



HAL
open science

Hémochromatose HFE : influence de facteurs génétiques et non génétiques sur l'expression phénotypique

Philippe Saliou

► **To cite this version:**

Philippe Saliou. Hémochromatose HFE : influence de facteurs génétiques et non génétiques sur l'expression phénotypique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0101 . tel-02112072

HAL Id: tel-02112072

<https://theses.hal.science/tel-02112072>

Submitted on 26 Apr 2019

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.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Santé

Spécialité: Recherche clinique, évaluation des risques, épidémiologie

École Doctorale ED SICMA

présentée par

Philippe SALIOU

Préparée à Brest, unité Inserm U1078

« Génétique, Génomique fonctionnelle et
Biotechnologies »

HEMOCHROMATOSE *HFE*:
INFLUENCE DE FACTEURS
GENETIQUES ET NON GENETIQUES
SUR L'EXPRESSION PHENOTYPIQUE

Thèse soutenue le 18 novembre 2014
devant le jury composé de :

M. le Professeur Jean-Baptiste NOUSBAUM
PU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Président

M. le Professeur Jacques ROCHETTE
PU-PH, Université de Picardie / Rapporteur

M. le Professeur Emmanuel OGER
PU-PH, Université de Rennes 1 / Rapporteur

M. le Docteur Ronan GARLANTEZEC
Enseignant-chercheur, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique
de Rennes / Examineur

M. le Professeur Claude FEREC
PU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Directeur

Mme le Docteur Virginie SCOTET
CR1 Inserm, Université de Bretagne Occidentale / Encadrante

M. le Docteur Gérald LE GAC
MCU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Claude Férec pour toute la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce travail de thèse. J'ai été très honoré d'être accueilli au sein de votre laboratoire d'excellence et de profiter des sommes de connaissances de l'ensemble des chercheurs qui y travaillent. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie très sincèrement le Professeur Jean-Baptiste Nousbaum qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

Je remercie également le professeur Jacques Rochette d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Je remercie Le Professeur Emmanuel Oger pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'en être également rapporteur.

Gérald, je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris sur l'hémochromatose au cours de ces dernières années. Tes conseils pertinents et toujours éclairés m'ont permis de progresser dans la compréhension de la maladie et dans l'orientation donnée à ces travaux. Je me souviens avec délice de notre tournoi de volley à Ouessant, de la soirée passée aux douces vapeurs rhumées et de notre retour agité dans la tempête. On remet ça quand tu veux.

Ronan, j'essaie de me glisser dans tes pas depuis le jour où j'ai rejoint la famille de la Santé Publique. Tu as toujours été là pour me former, me guider, me conseiller, me motiver, me soutenir, m'encourager... Nous avons traversé pas mal de tempêtes au cours de ces dernières années, sans jamais faillir. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi et je tiens à te renouveler toute mon amitié.

Virginie, il ya des rencontres qui marquent une vie professionnelle et tu en fais partie. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu m'as appris en épidémiologie. J'ai tenté de puiser dans tes qualités toute les exigences de rigueur, d'expertise, de professionnalisme que demande la recherche. Je te remercie sincèrement pour tout ce que tu as fait pour moi et pour cette amitié que, j'espère, nous partagerons encore longtemps.

Je remercie toute l'équipe « épidémiologie » pour les échanges statistiques et épidémiologiques que nous avons eu mais surtout pour les bons moments partagés durant ces années. Merci Karen pour ta bonne humeur et les moments de fous rires partagés. Merci à Lénaïck de m'avoir initié à la conception des yourtes et de m'avoir fait goûter tes produits maison. Merci Ingrid pour le temps que tu as consacré à la relecture de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Marie-Christine pour sa gentillesse, son aide et son temps consacré à fouiller les dossiers.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'unité inserm U1078 avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Yann, nous aurons encore l'occasion de débriefer les matchs du stade brestois, s'ils remontent un jour en ligue 1...

Je remercie tous les membres de l'EFS et notamment les médecins qui ont contribué au recueil des données utilisées pour cette étude.

Merci au personnel du laboratoire de génétique moléculaire qui a fait une partie des analyses génétiques utilisées dans ce travail.

Merci Paul pour tes conseils et les bons moments partagés.

Merci Pascal pour les parties de bayfoot du midi à l'internat. Meilleur moyen de déconnecter et de décompresser.

Je tiens à remercier toute l'équipe de Santé Publique et plus particulièrement l'Equipe Opérationnelle d'Hygiène, Anne, Solène, Morgane, Lénaïg, Maryline, Carine, avec qui je travaille depuis plusieurs années. Je crois qu'on forme une vraie bonne équipe ! Je remercie particulièrement le Dr Raoul Baron pour sa bienveillance et ses encouragements au cours de cette thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces dernières années et pour ton soutien sans faille. Merci également à Marc Carpentier, qui, malgré son exode en Suisse (pas fiscal) est resté très proche du service.

A Delphine, merci pour ton soutien et ta présence au quotidien. Cela fait maintenant de nombreuses années que nous n'en finissons pas de passer des diplômes, mais ce sont surtout des années de bonheur passées à tes côtés.

A Alexandre qui illumine notre vie depuis deux ans.

Au bébé qui arrive et qui aura eu la gentillesse d'attendre que je finisse ce manuscrit pour venir au monde.

A mon père, qui aurait été fier de ce travail.

A ma mère, merci pour ton soutien, ton aide tout au long de mes études et pour la relecture attentive de ce document.

A Jannick, merci pour ton aide et ton soutien durant toutes ces années d'étude.

A Yoann, Armelle, Thomas et Jeanne. Merci pour votre soutien et votre présence.

A tous mes amis, qui m'ont probablement pris pour un fou.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DU TRAVAIL DE THESE

- ARTICLES PUBLIES

Saliou P., Le Gac G., Mercier A.-Y., Chanu B., Guéguen P., Mérour M.-C., Gourlaouen I., Autret S., Le Maréchal C., Rouault K., et al. Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in *HFE* C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study. PLoS ONE 2013, 8, e81128.

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Berquier C, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D? Environnement, Risques et Santé 2011, vol 10, num 3 mai-juin 2011.

- ARTICLES SOUMIS

Scotet V, **Saliou P**, Uguen M, Mérour M-C, Triponey C, Chanu B, Nousbaum J-B, Le Gac G, Férec C
Do pregnancies really reduce iron overload in *HFE* hemochromatosis women?

Saliou P, Le Gac G, Mérour M-C, Tripogney C, Chanu B, Nousbaum J-B, Férec C and Scotet V
HFE hemochromatosis: influence of dietary iron intake on the iron overload of C282Y homozygous patients.

- COMMUNICATIONS ORALES

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.
Hémochromatose *HFE* : Influence d'une alimentation riche en fer sur le temps de traitement par saignées des patients C282Y/C282Y.
XXVI^e Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, 10-13 juin 2013, Paris (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.
Hémochromatose *HFE* : Influence de l'alimentation sur le phénotype des patients C282Y homozygotes.
3^{ème} réunion du Réseau « Epidémiologie Génétique », 17 janvier 2013, Rennes (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.
Hémochromatose *HFE* : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement des patients C282Y/C282Y.
Journée Jeunes Chercheurs de la Faculté de Médecine et du CHRU de Brest, 19 octobre 2012, Brest (France)

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Berquier C, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C
Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D.
Congrès National Santé Environnement 2010, 14-15 décembre 2010, Rennes (France)

- **COMMUNICATIONS AFFICHEES**

Uguen M, **Saliou P**, Le Gac G, Mérour MC, Tripogney C, Chanu B, Gourlaouen I, Nousbaum JB, Férec C, Scotet V.

Hémochromatose *HFE* : les grossesses diminuent-elles réellement l'expression phénotypique de la maladie chez les femmes ?

7^{èmes} Assises de Génétique Humaine et Médicale, 29-31 janvier 2014, Bordeaux (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose de type I : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement des patients C282Y/C282Y.

Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 21-24 mars 2013, Paris (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose de type I : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement des patients C282Y/C282Y.

Journée des Doctorants de l'Ecole Doctorale Santé, Information, Communication, Matière et Mathématiques (SICMA), 13 septembre 2012, Lorient (France)

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Berquier C, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose : profil des patients C282Y/H63D inclus en protocole de saignées.

6^{èmes} Assises de Génétique Humaine et Médicale, 2-4 février 2012, Marseille (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D ?

Journée des Doctorants et post-Doctorants en Biologie-Santé en Bretagne, 20 juin 2011, Brest (France)

TITRES ET TRAVAUX

DIPLÔMES

2014	4^{ème} année de thèse de Doctorat en Sciences. Ecole Doctorale SICMA. Inserm U1078 « Génétique, génomique fonctionnelle et biotechnologies» - Brest Lauréat du concours de Praticien Hospitalier en Hygiène Hospitalière
2011	D.E.S de Santé Publique et Médecine Sociale - Brest
2010	Thèse de Doctorat en Médecine : « <i>Peur bleue et cabotage, histoire des épidémies de choléra dans le Finistère au 19^{ème} siècle</i> » – Brest Master 2 Recherche, « Modélisation en Pharmacologie Clinique et Epidémiologie » - parcours Epidémiologie – Rennes
2009	D.U d'Hygiène Hospitalière – Brest
2008	Master 1 Méthodes en Santé Publique – Université du Kremlin-Bicêtre – Paris XI
2007	Concours de l'Internat en Médecine : D.E.S de Santé Publique et Médecine Sociale – Brest
2000-2007	Etudes de médecine à la Faculté de Médecine de Brest. UBO 2007 Certificat de Synthèse Clinique et Thérapeutique (CSCT) 2005 Certificat : Immunologie et mécanismes physiopathologiques 2004 Certificat : Traceurs, explorations fonctionnelles et métaboliques

TITRES HOSPITALIERS

Titres	Date de début de fonction	Date de fin de fonction
Praticien Hospitalier	01/11/2013	En cours
Assistant Hospitalo-Universitaire (AHU) Epidémiologie, économie de la Santé, prévention	01/11/2011	31/10/2013
Interne DES de Santé Publique et Médecine Sociale	01/11/2007	31/10/2011

TRAVAUX

- **Publications originales dans des revues à comité de lecture**

Birgand G, **Saliou P**, Lucet JC. Influence of Staff Behavior on Infectious Risk in Operating Room : What Is the Evidence? *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2014 (sous presse)

Saliou P, Le Gac G, Mercier A-Y, Chanu B, Guéguen P, Mérour M-C, et al. Evidence for the high importance of co-morbid factors in HFE C282Y/H63D patients cared by phlebotomies: results from an observational prospective study. *PloS One*. 2013;8(12):e81128.

Bruyère F, Lefebvre A, **Saliou P**, Mimos O, Lucet J-C, Le Guyader A, et al. [Update of the 2013 consensus conference « Management of the preoperative risk of infection »]. *Prog En Urol J Assoc Fr Urol Société Fr Urol*. juill 2014;24(9):545-50.

Lepelletier D, **Saliou P**, Lefebvre A, Lucet J-C, Grandbastien B, Bruyère F, et al. « Preoperative risk management: Strategy for *Staphylococcus aureus* preoperative decolonization » (2013 update). *Médecine Mal Infect [Internet]*. [cité 27 mai 2014]; Disponiblesur:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X14000961>.

Litard C, Conan V, Le Fur JM, Minot JP, Le Callonec M, Brisseau C, **Saliou P**, Lejeune B, Lagarde N, Garlantézec R. Breast cancer in Finistère, France: epidemiological description and tendencies over a 10-year period (2000-2009) according to pathology data. *Ann Pathol*. 2013 Feb;33(1):38-48.

Cornec-Le Gall E, Audrézet MP, Chen JM, Hourmant M, Morin MP, Perrichot R, Charasse C, Whebe B, Renaudineau E, Jousset P, Guillodo MP, Grall-Jezequel A, **Saliou P**, Férec C, Le Meur Y. PKD1 Mutation Type Influences Renal Outcome in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. 21 févr 2013;

Carpentier M, Appere V, **Saliou P**, de Tinteniach A, Floch H, Le Gall F, Cosse M, El Bouyoufii M, Baron R, Boles JM, Jourdain S, Lejeune B, Nancy B, Prat G, Tande D, Virmaux M, Wargnier JP, Garlantézec R. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit (Brest). *Med Mal Infect*. 2012 Oct;42(10):501-9.

Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Quinio D, Moalic E, **Saliou P**, Berthou C, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Oct;74(2):119-24

Scotet V, Duguépéroux I, **Saliou P**, Rault G, Roussey M, Audrézet MP, Férec C. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Mar 1;7:14

Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, Moalic E, Quinio D, Moal MC, Berthou C, **Saliou P**, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious renal sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(7):e62-71. Epub 2012 Feb 14.

Saliou P, Garlantézec R, Baron R, Quiot JJ, Cholet F, Le Floch MF, Lejeune B. Microbiological investigation of endoscopes at Brest Hospital over a period from 2007 to 2009. *Pathol Biol* 2011 Apr;59(2):88-93.

Lecornu L, Thillay G, Le Guillou C, Garreau PJ, **Saliou P**, Jantzem H, Puentes J, Cauvin JM. REFEROCOD: a probabilistic method to medical coding support. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009; 2009:3421-4.

Saliou P, Largeau F. The organization and management of health services during mine clearance operations in Finistère. Sante Publique. 2009 Mar-Apr;21(2):191-4.

- **Publications originales dans le cadre de congrès**

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Berquier C, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D. Environnement, Risques et Santé 2011, vol 10, num 3 mai-juin 2011

Carpentier M, **Saliou P**, Le Du I, Le Guillou C, Lecornu L, Cauvin JM. Détection et évaluation des associations entre les nomenclatures CCAM et LPP, Brest. Revue d'épidémiologie et de santé publique, avril 2010, vol. 58, n°supplément 1, pp. S5

- **Livres/ Chapitres de livres**

Saliou P

Le choléra. Dans : Voyage en Préfecture du Finistère. Collectif. Editions Coop Breizh : 2010

- **Communications orales**

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose *HFE* : Influence d'une alimentation riche en fer sur le temps de traitement par saignées des patients C282Y/C282Y. XXVIe Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, 10-13 juin 2013, Paris (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose *HFE* : Influence de l'alimentation sur le phénotype des patients C282Y homozygotes. 3^{ème} Réunion du Réseau « Epidémiologie Génétique », 17 janvier 2013, Rennes (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose *HFE* : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement des patients C282Y/C282Y. Journée Jeunes Chercheurs de la Faculté de Médecine et du CHRU de Brest, 19 octobre 2012, Brest (France)

Iddouar L, Férec M, **Saliou P**, Scotet V, Tanne F, Mercier A.-Y, Robaszekiewicz M, Férec C, Noursbaum J.-B. Impact des facteurs environnementaux sur la morbi-mortalité chez les patients atteints d'hémochromatose C282Y homozygote. Résultats d'une étude chez 559 patients. Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 15-18 mars 2012, Paris (France)

Scotet V, Duguépéroux I, **Saliou P**, Rault G, Roussey M, Audrézet MP, Férec C
Déclin dans l'incidence de la mucoviscidose : résultat d'une étude observationnelle de 35 années en Bretagne.
6^{èmes} Assises de Génétique Humaine et Médicale, 2-4 février 2012, Marseille (France)

Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, Rault G, Roussey M, **Saliou P**, Férec C.
Evidence of decline in CF incidence: study over a 40-year period.
34th European Cystic Fibrosis Conference, 8-11 juin 2011, Hamburg (Allemagne)

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Berquier C, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C
Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D.
Congrès National Santé Environnement 2010, 14-15 décembre 2010, Rennes (France)

Saliou P.

Peur Bleue et cabotage, histoire des épidémies de choléra dans le Finistère au 19^{ème} siècle.
Journée Scientifique de la Société Française de Médecine Maritime, 20-21 juillet 2010,
Landerneau (France)

Carpentier M, **Saliou P**, Le Du I, Le Guillou C, Lecornu L, Cauvin JM.
Détection et évaluation des associations entre les nomenclatures CCAM et LPP, Brest.
Congrès ADELFF (Association Des Epidémiologistes de langues Françaises)-EMOIS
(Évaluation, Management, Organisation, Information, Santé) 2010, 22-23 avril 2010,
Bordeaux (France)

Lecornu L, Thillay G, Le Guillou C, Garreau PJ, **Saliou P**, Jantzem H, Puentes J, Cauvin JM.
REFEROCOD: A probabilistic method for medical coding support.
31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology
Society, 2009

- **Communications affichées**

Lejeune D, Daniel L, Cosse M, Cabon S, Patris N, Baron R, **Saliou P**.
Patient infecté à BHR en réanimation chirurgicale : première expérience.
Congrès SF2H, 29-31 mai 2013, Paris (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.
Hémochromatose de type I : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement
des patients C282Y/C282Y.
Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 21-24 mars
2013, Paris (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.
Hémochromatose de type I : une alimentation riche en fer augmente le temps de traitement
des patients C282Y/C282Y.
Journée des Doctorants de l'École Doctorale Santé, Information, Communication, Matière et
Mathématiques (SICMA), 13 septembre 2012, Lorient (France)

Linard C, Abaléa L, **Saliou P**, Serey-Eiffel S, Le Rouzic C, Germouty I, De Vries P.
Traumatisme abdominal mineur : étude prospective sur 111 enfants (Brest).
Congrès des Sociétés Médico-Chirurgicales de Pédiatrie, 6-9 juin 2012, Bordeaux (France)

Le Mée D, Le Meur J, Jezequel J, Cholet F, Huguen A, **Saliou P**, Pennec O, Robaszkiewicz M.

Evaluation de la performance et de la reproductibilité de l'endomicroscopie confocale pour la caractérisation des polypes coliques.

Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 15-18 mars 2012, Paris (France)

Cornec Legall E, Audrezet MP, **Saliou P**, Le Meur Y, Férec C.

Mise en évidence de facteurs génétiques d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale dans la polykystose rénale autosomique dominante.

6^{èmes} Assises de Génétique Humaine et Médicale, 2-4 février 2012, Marseille (France)

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Berquier C, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose : profil des patients C282Y/H63D inclus en protocole de saignées.

6^{èmes} Assises de Génétique Humaine et Médicale, 2-4 février 2012, Marseille (France)

Saliou P, Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D ?

Journée des Doctorants et post-Doctorants en Biologie-Santé en Bretagne, 20 juin 2011, Brest (France).

Scotet V, Duguépéroux I, Audrezet MP, Rault G, Roussey M, **Saliou P**, Férec C.

Time trends in the incidence of cystic fibrosis over a 40-year period.

European Society of Human Genetics, 28-31 mai 2011, Amsterdam (Pays-Bas)

Scotet V, **Saliou P**, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Gac G, Férec C.

Profil des patients C282Y/H63D traités dans un centre de santé de l'EFS.

25^{ème} Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, 4-6 mai 2011, Lyon (France).

Saliou P, Baron R, Garlantézec R, Le Floch MF, Lejeune B.

Contrôles microbiologiques des endoscopes, janvier 2007 - mai 2009, C.H.U. de Brest.

Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), 3-4 décembre 2009, Paris (France).

Thillay G, Lecornu L, Le Guillou C, Garreau PJ, **Saliou P**, Cauvin JM.

Module d'aide au codage construit à partir de référentiels probabilistes.

V^{èmes} Journées du Grand Sud de l'Information Médicale, 18-19 juin 2009, Bordeaux (France).

Saliou P, Le Goff D.

Les chiffres du cancer en Bretagne.

Journée de Sensibilisation aux CMR, novembre 2008, Brest (France)

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

- **Figure 1** Homéostasie du fer
- **Figure 2** Hepsidine et hémochromatose
- **Figure 3** Régulation de l'hepcidine dans le foie
- **Figure 4** Structure de la protéine HFE
- **Figure 5** Détection du fer lié à la transferrine et régulation de l'expression de l'hepcidine dans les hépatocytes
- **Figure 6** Les trois principaux variants identifiés sur la protéine HFE
- **Figure 7** Représentation schématique des mutations dans le gène *HFE*
- **Figure 8** Evolution de l'hémochromatose en 5 stades de sévérité croissante
- **Figure 9** Arthropathie des articulations métacarpophalangiennes d'allure mixte, destructrice (pincement de l'interligne articulaire et géodes sous-chondrales) et constructive (condensation osseuse et ostéophytose périphérique)
- **Figure 10** Mélanodermie
- **Figure 11** Algorithme de prise en charge des patients C282Y/C282Y
- **Figure 12** Fréquence de l'allèle C282Y en Europe
- **Figure 13** Fréquence de l'allèle H63D en Europe
- **Figure 14** Ferritinémie et coefficient de saturation de la transferrine en fonction du génotype *HFE*
- **Figure 15** Equivalence des verres d'alcool en fonction du volume et du type d'alcool

Tableaux

- **Tableau 1** Prévalence de C282Y et H63D en population générale
- **Tableau 2** Prévalence des génotypes C282Y/C282Y et C282Y/H63D chez les patients symptomatiques
- **Tableau 3** Résumé des études publiées sur la relation entre les apports alimentaires, les marqueurs du fer et le gène *HFE*
- **Tableau 4** Points attribués aux aliments selon la fréquence de consommation

SOMMAIRE

ABREVIATIONS ET SIGLES	17
I. INTRODUCTION	18
II. ETAT DE L'ART	21
A. HOMEOSTASIE DU FER	22
1. Protéines impliquées dans le transport membranaire du fer.....	24
2. Protéines impliquées dans le transport et le stockage du fer.....	24
a) Transferrine.....	24
b) Ferritine.....	25
3. Protéines impliquées dans la régulation.....	25
a) Hepsidine.....	25
b) Protéine HFE.....	28
B. DIFFERENTS TYPES D'HEMOCHROMATOSE	30
1. Hémochromatose <i>HFE</i>	30
2. Hémochromatoses non <i>HFE</i>	31
C. HEMOCHROMATOSE <i>HFE</i>	32
1. Aspect clinique.....	32
a) 5 stades de sévérité croissante.....	32
b) Histoire naturelle.....	34
c) Signes cliniques.....	35
(1) Atteintes endocriniennes.....	35
(2) Atteintes articulaires et osseuses.....	36
(3) Atteintes cutanées.....	38
(4) Atteintes digestives.....	38
(5) Atteintes cardiaques.....	39
2. Prise en charge des patients.....	40
a) Bilan initial des complications.....	40
b) Traitement de la surcharge en fer.....	42
(1) Phlébotomies.....	42
(2) Chélateurs du fer.....	44
c) Traitement des complications.....	45
3. Epidémiologie de l'hémochromatose <i>HFE</i>	47
a) Prévalence de C282Y et H63D en population générale.....	47
(1) Prévalence de C282Y.....	48
(2) Prévalence de H63D.....	50
b) Prévalence des génotypes C282Y/C282Y et C282Y/H63D chez les patients symptomatiques.....	51
c) Pénétrance des différents génotypes.....	52
(1) Pénétrance incomplète du génotype C282Y/C282Y.....	52
(2) Pénétrance du génotype C282Y/H63D.....	53
(3) Dépistage et pénétrance.....	55
4. Influence des facteurs génétiques et non génétiques.....	58
a) Influence de l'âge.....	58
b) Influence du sexe.....	59
c) Influence des facteurs génétiques.....	60
d) Influence des facteurs non génétiques.....	62
(1) Consommation excessive d'alcool.....	62
(2) Alimentation.....	63
(3) Autres facteurs non génétiques.....	69

III. OBJECTIFS DE LA THESE	71
IV. MATERIEL ET METHODE	73
A. Population et méthode	74
1. Schéma d'étude	74
2. Population d'étude	74
3. Recueil des données	75
a) Outil de recueil	75
b) Codage, saisie et contrôle qualité des données	76
B. Variables.....	76
1. Variables à expliquer	76
2. Variables explicatives principales.....	77
3. Autres variables explicatives	78
C. Analyses statistiques	80
1. Etude descriptive	80
2. Etude analytique	81
a) Analyse univariée.....	81
b) Analyse multivariée	82
c) Vérification des hypothèses et adéquation des modèles	82
V. RESULTATS	83
A. Etude de l'importance des facteurs non génétiques chez les patients C282Y/H63D traités par phlébotomies	84
B. Rôle des grossesses dans le degré de surcharge en fer des patientes C282Y homozygotes	99
C. Influence des apports alimentaires en fer sur le phénotype des patients C282Y/C282Y	127
VI. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	147
A. Principaux résultats	148
B. Validité interne de l'étude.....	149
C. Validité externe de l'étude.....	151
D. Perspectives	153
VII. BIBLIOGRAPHIE	155
VIII. ANNEXES	182
Annexe 1 : Teneur en fer des principaux aliments riches en fer.....	183
Annexe 2 : Questionnaire médical	185
Annexe 3 : Fiche d'information aux patients	191
Annexe 4 : Formulaire de consentement	193

ABREVIATIONS ET SIGLES

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AIR	Amount of Iron Removed
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALAT	ALanine AminoTransférerase
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ANOVA	ANalysis Of Variance
ANSES	Agence Nationale de SEcurité Sanitaire
ASAT	ASpartate AminoTransférerase
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenic Proteins
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CIQUAL	Centre d'Information sur la QUalité des ALiments
EASL	European Association for the Study of the Liver
EFS	Etablissement Français du Sang
EGF	Epidermal Growth Factor
EMSAI	Enquête Multicentrique sur les SAignées Itératives
EPO	ErythroPOïétine
FPN	FerroPortiNe
GWAS	Genome-Wide Association Study
HAS	Haute Autorité de Santé
HLA	Human Leukocyte Antigen
HO-1	Hème Oxygénase 1
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
METAVIR	META-analysis of histological data in VIRal hepatitis
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
SF	Serum Ferritin
TGF	Transforming Growth Factor
TS	Transferrin Saturation
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
Wt	Wild type
95% CI	95% Confidence Interval

I. INTRODUCTION

L'histoire de la médecine est marquée par une succession de découvertes fondamentales qui permettent de résoudre des énigmes parfois ancestrales. S'ouvrent alors parfois des perspectives diagnostiques et thérapeutiques jusque là insoupçonnées.

Ainsi lorsqu'au milieu du 19^{ème} siècle, un médecin français, - le docteur Armand Trousseau - décrit au cours d'une autopsie chez un patient diabétique un visage d'aspect « bronze » et un gros foie cirrhotique de couleur gris jaunâtre (Trousseau, 1865), il était probablement loin d'imaginer que la pathologie à laquelle il faisait face allait connaître une succession de découvertes menant elles-mêmes à de nombreuses interrogations.

C'est un autre médecin français, - le docteur Troisier - qui fit en 1871 la seconde description d'un patient qui présentait un tableau clinique plus caractéristique de ce que l'on nommera plus tard l'hémochromatose héréditaire : mélanodermie (teint brun) généralisée, diabète sucré grave car amaigri, gros foie brun rougeâtre dû à des granulations pigmentaires en amont dans le foie,...(Troisier, 1871).

En 1889, le médecin allemand, Daniel Von Recklinghausen, introduit pour la première fois le terme « hémochromatose » pour désigner ce tableau clinique (von Recklinghausen, 1889). Il faudra attendre 1935 pour que Joseph Sheldon fasse l'hypothèse d'un lien entre ce syndrome multiviscéral et le fer. On parle également pour la première fois de probable maladie héréditaire (Sheldon, 1935). Une première protéine liée au métabolisme du fer, - la ferritine- est identifiée et caractérisée en 1937 (Laufberger, 1937), ce qui va permettre de quantifier les réserves en fer de l'organisme. En 1950, on assiste à l'introduction des saignées dans le traitement de l'hémochromatose (Davis and Arrowsmith, 1950) et dans les années qui suivent des chercheurs comme MacDonald s'interrogent sur le caractère héréditaire et sur le rôle de l'alcool et du fer alimentaire dans cette pathologie (MacDonald, 1961).

Une étape majeure est franchie en 1975 lorsque l'on découvre une association entre hémochromatose et marqueurs antigéniques du système HLA dont les gènes sont localisés sur le chromosome 6 (Simon et al., 1975).

Mais c'est en 1996 qu'une découverte fondamentale va permettre d'avancer dans la compréhension de la maladie : Feder et ses collaborateurs montrent qu'une mutation sur le gène *HFE* situé sur le chromosome 6 est à l'origine de l'hémochromatose héréditaire (Feder et al., 1996). La mutation principale C282Y (ou p.[Cys282Tyr] selon la nomenclature officielle de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org>)) est retrouvée à l'état homozygote chez la majorité des malades. D'autres variants seront identifiés dans ce gène, parmi lesquels H63D (p.[His63Asp]), dont l'association avec la pathologie restera longtemps discutée (Carella et al., 1997; Jazwinska et al., 1996; Jouanolle et al., 1996; The UK Haemochromatosis Consortium, 1997).

L'étude du gène *HFE* montre que la maladie est plus complexe qu'il n'y paraît. Des cas familiaux de surcharge en fer ont été identifiés mais sans être liés à *HFE*. On va ainsi progressivement découvrir qu'il existe en réalité plusieurs formes d'hémochromatose (type 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B) qui sont associées à des gènes et des modes de transmission différents et qui surviennent à des âges variables. On va retrouver des mutations dans des gènes qui codent pour d'autres protéines impliquées dans le métabolisme du fer comme la ferroportine codée par le gène *SLC40A1* (Abboud and Haile, 2000; Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000; Montosi et al., 2001), la transferrine, codée par *TFR2* (Camaschella et al., 2000; Kawabata et al., 1999), l'hémojuvéline codée par le gène *HJV* (Papanikolaou et al., 2004) et l'hépcidine codée par le gène *HAMP* (Roetto et al., 2003).

La forme principale d'hémochromatose sera alors rebaptisée « hémochromatose de type 1 » ou « hémochromatose *HFE* » (sur laquelle repose ce travail de thèse).

De plus, la découverte de l'hépcidine (Krause et al., 2000; Nicolas et al., 2003; Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001), protéine clé de l'homéostasie du fer, et l'identification du gène *HAMP* qui la code, ont été des étapes fondamentales dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'hémochromatose. L'homéostasie du fer est, en effet, régulée en grande partie par l'hépcidine, peptide produit par les hépatocytes en réponse à une augmentation de la quantité de fer dans l'organisme, en cas d'inflammation (Nicolas et al., 2002, 2003) ou en fonction de l'érythropoïèse (Kautz et al., 2014).

Le modèle de l'hémochromatose *HFE* a donc fortement évolué. Cette pathologie était considérée comme une maladie *a priori* monogénique, liée au gène *HFE* identifié en 1996 par Feder. L'accumulation rapide des connaissances a permis de comprendre qu'il s'agissait en réalité d'une maladie complexe avec une variabilité phénotypique importante et une pénétrance incomplète des différents génotypes, notamment du génotype majoritaire C282Y/C282Y. La prévalence de ce génotype est estimée à 1/200 (Beutler et al., 2002; Jackson et al., 2001; McCune and Worwood, 2003; Merryweather-Clarke et al., 1998) par de nombreuses études, mais un grand nombre de questions restent posées. En effet la pénétrance des différents génotypes est incomplète et le fait d'être homozygote C282Y n'est pas suffisant pour développer des symptômes (Wood et al., 2008).

Cette notion de pénétrance incomplète a ouvert la voie à la recherche de facteurs génétiques (gènes modificateurs) et non génétiques (environnementaux) capables de moduler l'expressivité phénotypique des différents génotypes du gène *HFE*.

Les études développées dans ce travail vont dans ce sens et ont pour objet l'identification de différents facteurs susceptibles d'expliquer les différences phénotypiques observées dans l'hémochromatose *HFE*.

II. ETAT DE L'ART

A. HOMEOSTASIE DU FER

Le fer est un élément indispensable à la vie du fait des nombreuses fonctions auxquelles il participe au sein de l'organisme. Il est capable de réagir avec l'oxygène et de changer d'état d'oxydoréduction. Il participe ainsi au transport de l'oxygène, catalyse des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou de synthèse d'ADN. Paradoxalement, cet élément indispensable à la vie peut se révéler toxique lorsqu'il réagit avec l'oxygène et crée l'apparition de radicaux libres (Erickson, 1978).

La quantité de fer normalement présente dans notre organisme est comprise entre 3 et 4 g. On estime que 2,5 g sont fixés au niveau de l'hémoglobine, que 400 mg sont situés dans les protéines riches en fer comme la myoglobine ou les cytochromes et qu'entre 3 et 7 mg sont liés à la transferrine (fer circulant). Le reste du fer est contenu dans le foie, la rate et la moelle osseuse. La quantité de fer en réserve varie selon le sexe: les hommes auraient environ 1 g de réserve et les femmes nettement moins en fonction de l'intensité de leurs règles, du nombre de grossesses, d'accouchements, d'allaitements et de leur apport en fer (Demarmels Biasiutti, 2009).

L'homéostasie du fer repose sur un équilibre finement régulé entre les apports en fer de l'organisme et les différentes pertes. Cet équilibre conjugue l'absorption intestinale du fer au niveau du duodénum, son utilisation par différentes enzymes de l'organisme, puis son recyclage après dégradation des globules rouges sénescents par les macrophages (Beaumont, 2004). Schématiquement, le fer est absorbé par l'intestin grêle, circule grâce à la transferrine vers la moelle osseuse qui consomme l'essentiel du fer pour la synthèse des érythrocytes. Les macrophages tissulaires phagocytent les érythrocytes sénescents et recycle le fer au niveau de la rate. Une partie du fer est stocké dans les hépatocytes et ce fer peut être mobilisé dans ces réserves et il circule à nouveau par l'intermédiaire de la transferrine.

Le fer absorbé en excès ne peut pas être éliminé par l'organisme, c'est pourquoi le contrôle fin de l'absorption intestinale et le recyclage du fer au niveau des macrophages constituent les seuls moyens pour l'organisme de prévenir toute surcharge en fer (figure 1).

Les syndromes de surcharge en fer comprennent une multitude de troubles du métabolisme dont certaines causes peuvent être acquises ou héréditaires (Camaschella and Poggiali, 2011).

Les formes d'hémochromatose peuvent conduire dans un premier temps à une simple accumulation de fer dans l'organisme, puis se compliquer jusqu'à l'atteinte fonctionnelle de différents organes.

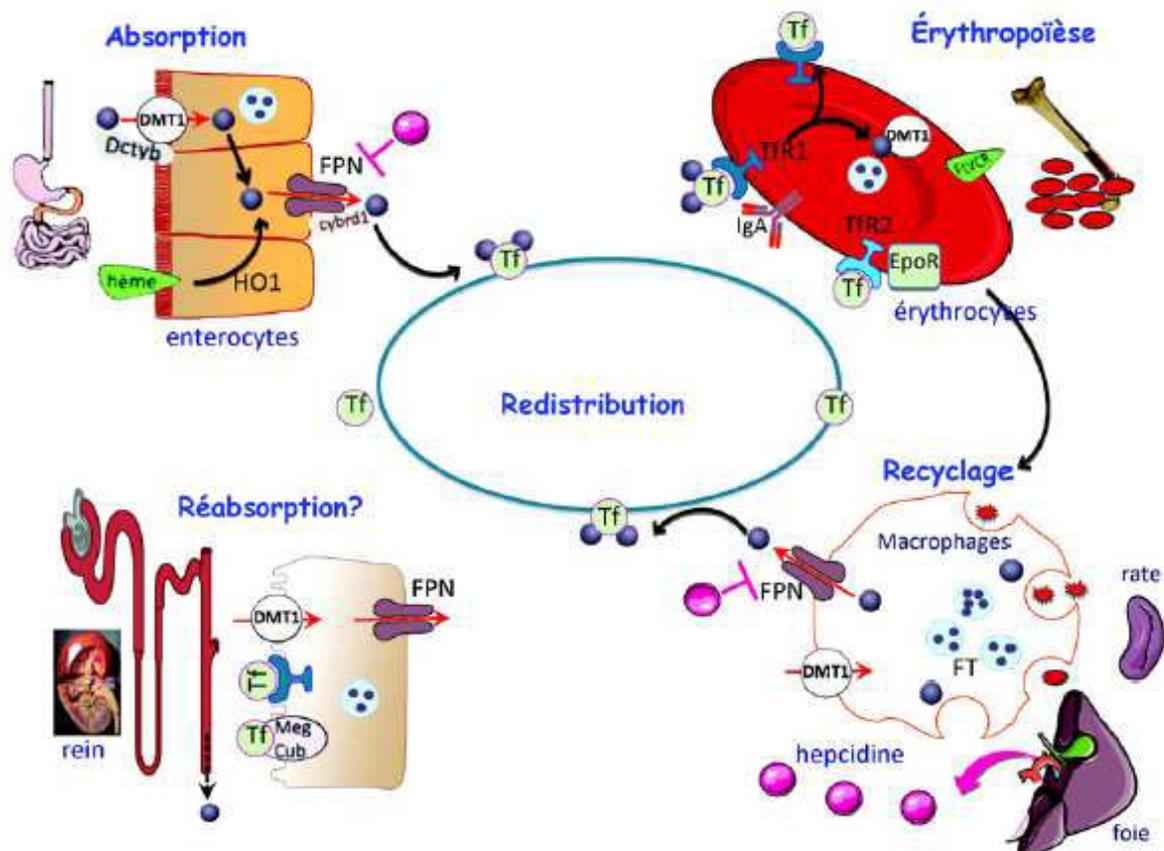


Figure 1 : Homéostasie du fer, d'après (Beaumont and Karim, 2013).

Cybrd1 : Hephaestine ; DMT1 : co-transporteur Fe(II)-proton ; Dcyt B : duodéal cytochrome B ; EpoR : récepteur de l'érythropoïétine ; FPN : ferroportine ; FT : ferritine ; HO-1 : hème oxygénase 1 ; Meg/Cub : le complexe mégaline/cubuline ; Tf : transferrine ; TFR1/2 : récepteur de la transferrine 1/2,

Le métabolisme du fer fait intervenir de nombreuses protéines chargées de l'absorption du fer, de son transport dans l'organisme et de son stockage. Elles interviennent également dans la régulation de l'homéostasie.

1. Protéines impliquées dans le transport membranaire du fer

Le fer d'origine alimentaire Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} par une enzyme appelée duodenal cytochrome B (Dcyt B) avant son absorption au niveau de la membrane apicale des entérocytes (Anderson and Frazer, 2005). Le passage à travers la membrane est ensuite assuré par le co-transporteur apical *divalent metal transporter 1* (DMT1) (Gunshin et al., 1997). Le fer est ensuite stocké dans la cellule grâce à la ferritine ou livré à la circulation sanguine. Le transport du fer à travers la membrane basolatérale des entérocytes est assuré par une protéine de 67 kDa et 12 domaines transmembranaires appelée ferroportine (Donovan et al., 2000). Si le fer absorbé par les entérocytes n'est pas libéré dans la circulation sanguine, il va être éliminé dans les selles lors du vieillissement et de l'élimination de la cellule. La ferroportine est indispensable pour assurer le passage du fer dans le sang à partir des entérocytes, des macrophages et des hépatocytes. Le fonctionnement de cette protéine est intimement lié à deux autres protéines : la céruloplasmine et l'héphaestine. Ces protéines permettent d'oxyder le fer ferreux au moment de son export afin qu'il soit pris en charge par la transferrine. Elles contribuent également au maintien de la ferroportine au niveau de la membrane basocellulaire (McKie et al., 2000).

La ferroportine est régulée par le taux de fer disponible mais également par un peptide produit par les hépatocytes, l'hepcidine. Lorsque le taux d'hepcidine augmente, celle-ci se lie à la ferroportine, ce qui provoque son internalisation et sa dégradation (Nemeth et al., 2004). Le taux de fer sérique diminue alors puisque les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes ne peuvent plus libérer de fer dans le sang.

Le fer absorbé sous forme hémique (fer incorporé dans la structure de l'hème) est métabolisé par l'hème oxygénase 1 (HO-1) qui libère l'atome de fer. Son absorption serait plus efficace que celle du fer inorganique (non lié à l'hème) (Beaumont and Karim, 2013).

2. Protéines impliquées dans le transport et le stockage du fer

a) Transferrine

La protéine chargée de transporter le fer dans le plasma est la transferrine. Cette molécule possède deux sites de liaisons qui peuvent chacun capter un atome de fer trivalent (Crichton, 1990). La transferrine assure le transport du fer libéré par les entérocytes, les hépatocytes ou les macrophages. On estime que 3 à 4 mg de fer circulent sous cette forme dans le plasma (Anderson and McLaren, 2012). Cette protéine est produite par les hépatocytes, sa liaison au fer est réversible et dépend du pH. Plus le pH est acide, plus la dissociation est facile. Chez les sujets sains, le coefficient de saturation de la transferrine est compris entre 30 et 35 %. Le fer est libéré au niveau des récepteurs à la transferrine (TfR1) qui

l'internalisent par endocytose. L'influx de protons dans l'endosome ainsi obtenu provoque une diminution du pH et la libération du fer qui sera utilisé dans la cellule pour la synthèse de l'hème (Zhang et al., 2005).

b) Ferritine

La ferritine est une protéine constituée de 24 sous unités capable de stocker 4500 atomes de fer (Harrison and Arosio, 1996). C'est la molécule majeure de stockage du fer dans l'organisme et elle occupe un rôle central dans l'homéostasie du fer. La ferritine permet en effet de faire face à une augmentation ou une diminution de la quantité de fer disponible. Le dosage de la ferritine plasmatique est le reflet des réserves tissulaires mobilisables. Chez les sujets sains il existe une corrélation entre la ferritinémie et les réserves disponibles. On estime qu'1 $\mu\text{g/L}$ de ferritine plasmatique équivaut entre 8 et 10mg de fer tissulaire (Cook, 1999; Walters et al., 1973). Le taux de ferritinémie normal varie entre 30 et 300 $\mu\text{g/L}$ chez les hommes et entre 15 et 200 $\mu\text{g/L}$ chez les femmes.

3. Protéines impliquées dans la régulation

a) Hépécidine

L'homéostasie du fer est régulée en grande partie par l'hépécidine, peptide produit par les hépatocytes en réponse à une augmentation de la quantité de fer dans l'organisme ou en cas d'inflammation (Nicolas et al., 2002, 2003). Cette hormone est synthétisée par le foie sous forme d'un précurseur de 80 acides aminés, puis le peptide mature de 25 acides aminés est sécrété dans le plasma (Hunter et al., 2002). L'hépécidine agit sur l'expression de la ferroportine à la surface des entérocytes et des macrophages, en fonction des réserves en fer et des besoins nécessaires à la synthèse des hématies, l'érythropoïèse. Elle contrôle les changements dans les différents niveaux de fer disponibles et s'assure de leur maintien à des taux très précis. Ce contrôle se fait par l'intermédiaire de la ferroportine, protéine de transport du fer, à laquelle l'hépécidine se lie (Nemeth and Ganz, 2006; Nemeth et al., 2004). Lorsque le taux d'hépécidine diminue, la ferroportine augmente son activité de transport notamment au niveau des entérocytes, ce qui permet d'augmenter l'absorption de fer d'origine alimentaire. Les macrophages libèrent également plus de fer dans la circulation sanguine, ce qui tend à augmenter la quantité de fer circulant.

Le risque de surcharge en fer de l'organisme est alors réel et le fer en excès peut alors se déposer au niveau des parenchymes des tissus de l'organisme.

Différentes études réalisées chez l'homme et la souris ont montré qu'un déficit en hepcidine était à l'origine de l'hémochromatose héréditaire (Ahmad et al., 2002; Bridle et al., 2003; Lesbordes-Brion et al., 2006; Muckenthaler et al., 2003; Nicolas et al., 2003; Niederkofler, 2005; Wallace et al., 2005, 2009).

La régulation de l'activité de la ferroportine via l'hepcidine est au cœur de l'homéostasie du fer. Toute anomalie dans la régulation de la production d'hepcidine peut conduire à différentes pathologies liées à un défaut d'homéostasie du fer (figure 2).

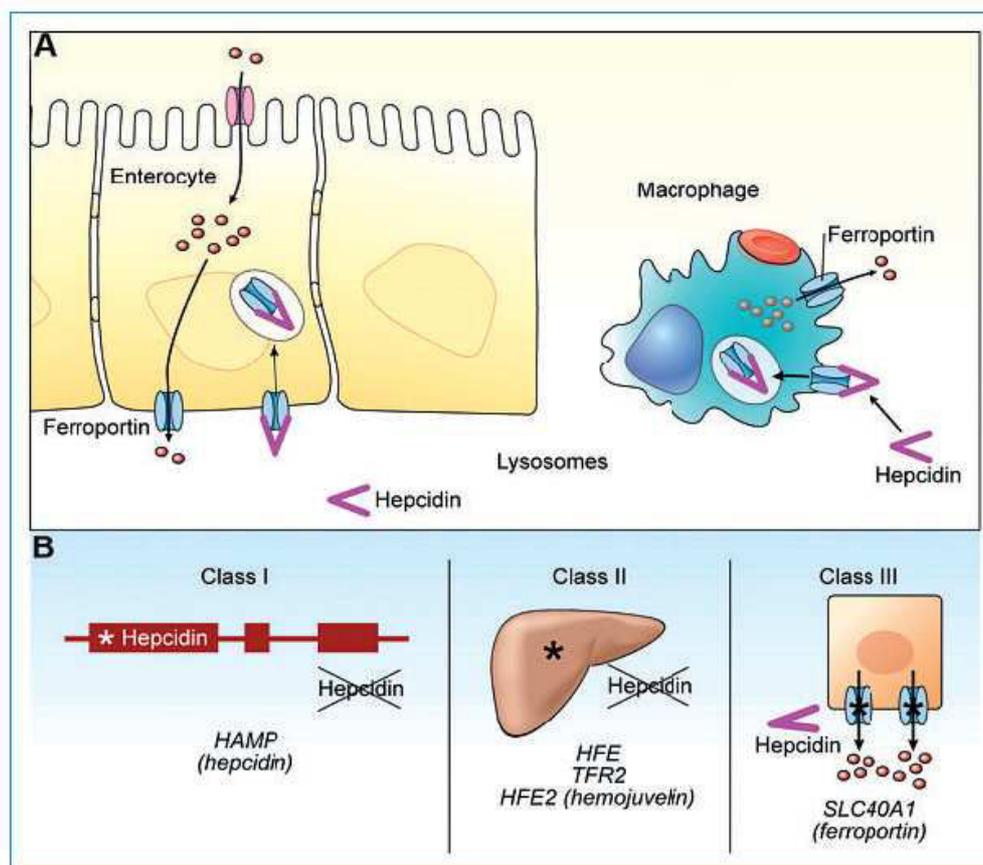


Figure 2 : Hpcidine et hémochromatose, d'après (Andrews, 2008)

A Action de l'hepcidine sur la ferroportine au niveau des entérocytes et des macrophages

B Les perturbations de l'axe de régulation hepcidine/ferroportine

Les anomalies du gène de l'hepcidine (*HAMP*) empêchent la production fonctionnelle de la protéine

Les anomalies des gènes *HFE*, *TFR2* ou de l'hémojuveline perturbent la régulation hépatique de la synthèse d'hepcidine

Une anomalie au niveau de la synthèse de ferroportine perturbe la régulation de l'hepcidine

Les patients peuvent présenter un tableau clinique d'anémie en cas de sur-expression de l'hepcidine ou au contraire une surcharge en fer en cas de sous-expression de la protéine. L'hepcidine peut être sous-exprimée quand les mutations touchent le gène *HFE*, le gène codant le récepteur à la transferrine TfR2 (Kawabata et al., 2005; Nemeth et al., 2005; Roetto et al., 2002), l'hémojuvéline (Babitt et al., 2006; Huang, 2005; Lanzara et al., 2004; Niederkofler, 2005; Papanikolaou et al., 2004), l'hepcidine elle-même (Lesbordes-Brion et al., 2006; Roetto et al., 2003) et/ou la ferroportine (Le Lan et al., 2011; Pietrangelo, 2004a; Sham et al., 2009). De même, un excès de production d'hepcidine peut conduire à des anémies dont il existe des formes génétiques.

La transcription de l'hepcidine s'effectue au niveau des hépatocytes sous la dépendance de différents facteurs qui activent ou inhibent la transcription du gène *HAMP* (figure 3). Une surcharge en fer ou l'inflammation stimule la synthèse d'hepcidine. Au contraire, la transcription du gène est inhibée dans le cas d'une carence en fer, d'anémie, d'érythropoïèse inefficace ou en présence d'érythropoïétine (EPO).

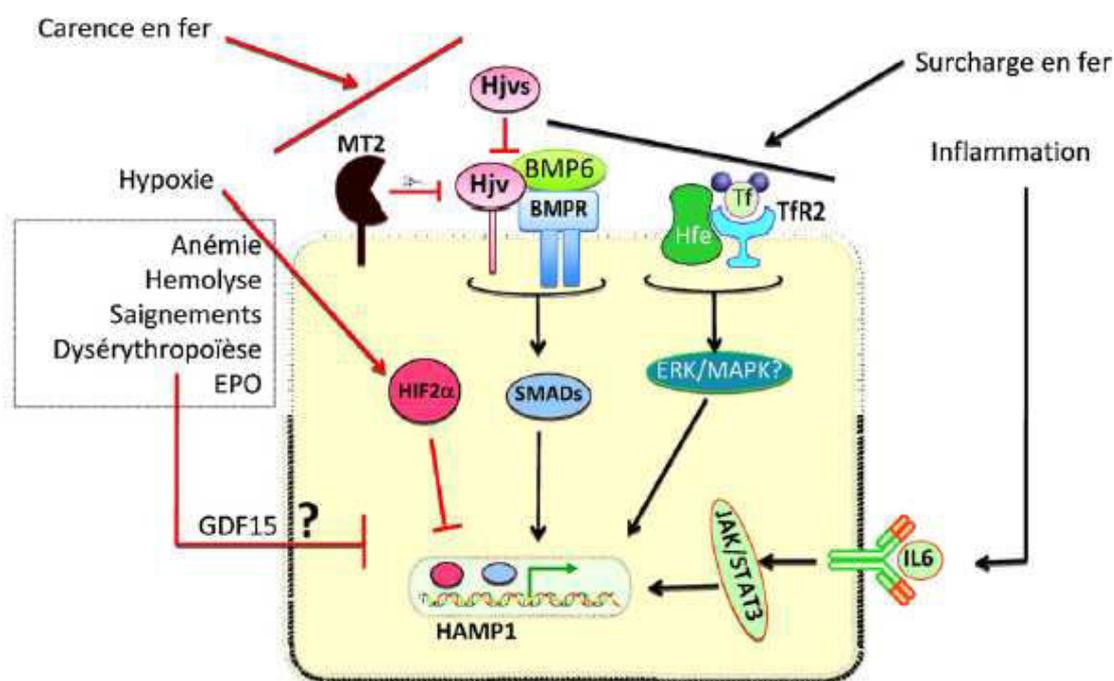


Figure 3 : Régulation de l'hepcidine dans le foie, d'après (Beaumont and Karim, 2013)

b) Protéine HFE

Le gène *HFE* situé sur le locus p21.3 du chromosome 6 code une protéine composée d'une partie extracellulaire (3 domaines alpha), d'une région transmembranaire et d'une petite partie intracellulaire (figure 4).

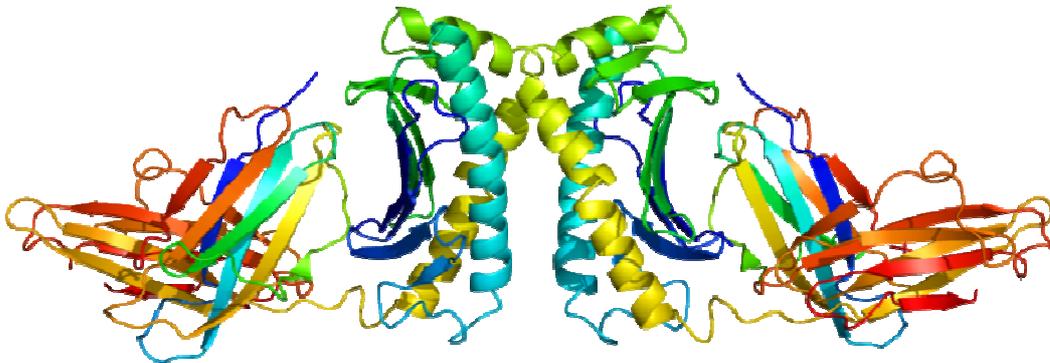


Figure 4: Structure de la protéine HFE, d'après (Lebrón et al., 1998)

HFE interagit avec la bêta-2-microglobuline et cette association permet le transport de HFE à la surface de la cellule où elle interagit avec TfR1 (figure 5).

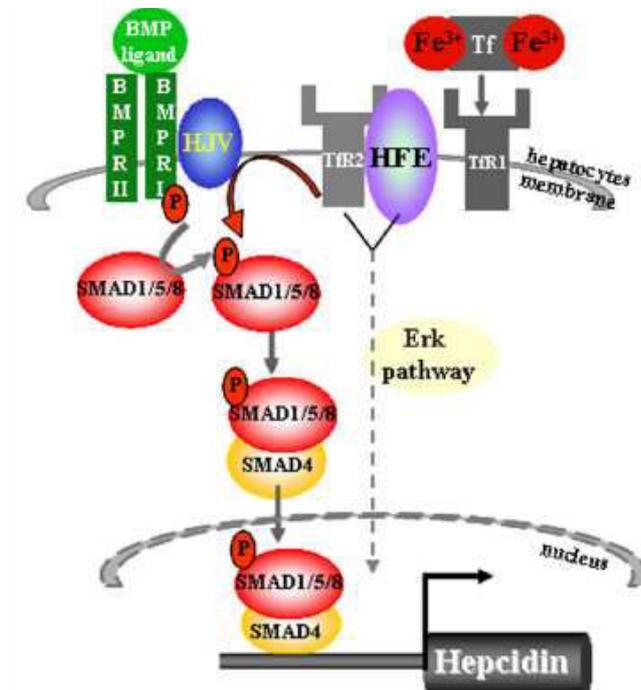


Figure 5 : Détection du fer lié à la transferrine et régulation de l'expression de l'hépcidine dans les hépatocytes, d'après (Vujic Spasic, 2014)

La mutation C282Y rompt les ponts disulfures du domaine extramembranaire de la protéine HFE, ce qui empêche son association avec la Béta-2-microglobuline et TfR1.

Le variant H63D forme lui un complexe stable avec TfR1, ce qui est en accord avec le fait que ce variant affecte de façon marginale l'absorption de fer et conduit plus rarement à une surcharge en fer.

La protéine HFE serait séquestrée par la protéine TfR1, formant un complexe sensible au fer et situé au niveau de la membrane cellulaire des hépatocytes (Goswami and Andrews, 2006). Lorsque la transferrine chargée de fer rencontre ce complexe, celle-ci se substitue à HFE du fait d'une plus grande affinité avec TfR1 (Goswami and Andrews, 2006). Suite à cette dissociation, HFE interagirait avec une autre protéine, TfR2. Cette nouvelle association serait favorisée par un autre complexe membranaire. Ce complexe membranaire constitué des récepteurs BMPI (Bone Morphogenic Proteins) et BMPII associés au récepteur à l'hémojuvéline (HJV) est activé par la présence de BMP (D'Alessio et al., 2012; Goswami and Andrews, 2006). Il a été démontré que la perte de la protéine endogène HJV annihile la production d'hepcidine induite par *HFE*, ce qui démontre une codépendance de HFE et HJV (Schmidt et al., 2010).

Le co-récepteur formé par HJV et BMPR I et BMPR II est impliqué dans la transmission du signal initié par la fixation de ligands Bmp sur les récepteurs à BMP situé à la surface de la membrane (Babitt et al., 2006, 2007; Miyazono et al., 2005)

Après phosphorylation des protéines SMAD 1, 5 et 8 forment un complexe protéique en association avec SMAD4. Ce complexe est transloqué au niveau du noyau et provoque l'activation de la synthèse de l'hepcidine au niveau de HAMP (Babitt et al., 2006, 2007; Miyazono et al., 2005; Truksa et al., 2009).

Un défaut de HJV, HFE, TfR2 ou un déficit combiné de HFE et TfR2 impacte l'activité de la voie de signalisation BMP/SMAD ce qui se manifeste par un défaut d'expression d'hepcidine et une surcharge en fer de l'organisme (Babitt et al., 2006; Corradini et al., 2009, 2011; Kautz et al., 2009; Ryan et al., 2010; Vujić Spasić et al., 2013).

Il a également été montré chez des souris que le déficit en récepteur hépatique à BMP de type I, Alk2 ou Alk3 (Steinbicker et al., 2011), le déficit en SMAD4 (Wang et al., 2005), le déficit d'expression de BMP6 (Andriopoulos et al., 2009; Meynard et al., 2009) sont à l'origine de taux relativement bas d'hepcidine au regard d'une surcharge en fer de l'organisme.

Il est donc établi que la synthèse d'hepcidine dépend de l'hémojuvéline, et des protéines BMP parmi lesquelles BMP6 tient un rôle important. Quant aux protéines SMADs, elles forment la voie principale d'activation de la synthèse d'hepcidine au niveau de *HAMP*.

B. DIFFERENTS TYPES D'HEMOCHROMATOSE

1. Hémochromatose *HFE*

Encore appelée hémochromatose de type 1, l'hémochromatose *HFE* est la plus fréquente des formes d'hémochromatose. C'est une maladie génétique à transmission autosomique récessive, liée à une ou plusieurs mutations dans le gène *HFE* situé sur le locus p21.3 du chromosome 6. Environ 80 à 90 % des patients qui présentent une forme héréditaire de surcharge en fer sont homozygotes pour la mutation C282Y du gène *HFE*. Une petite partie d'entre eux sont des hétérozygotes composites et présentent la mutation C282Y associée au variant H63D ou S65C (figures 6 et 7) (Pietrangelo, 2010).

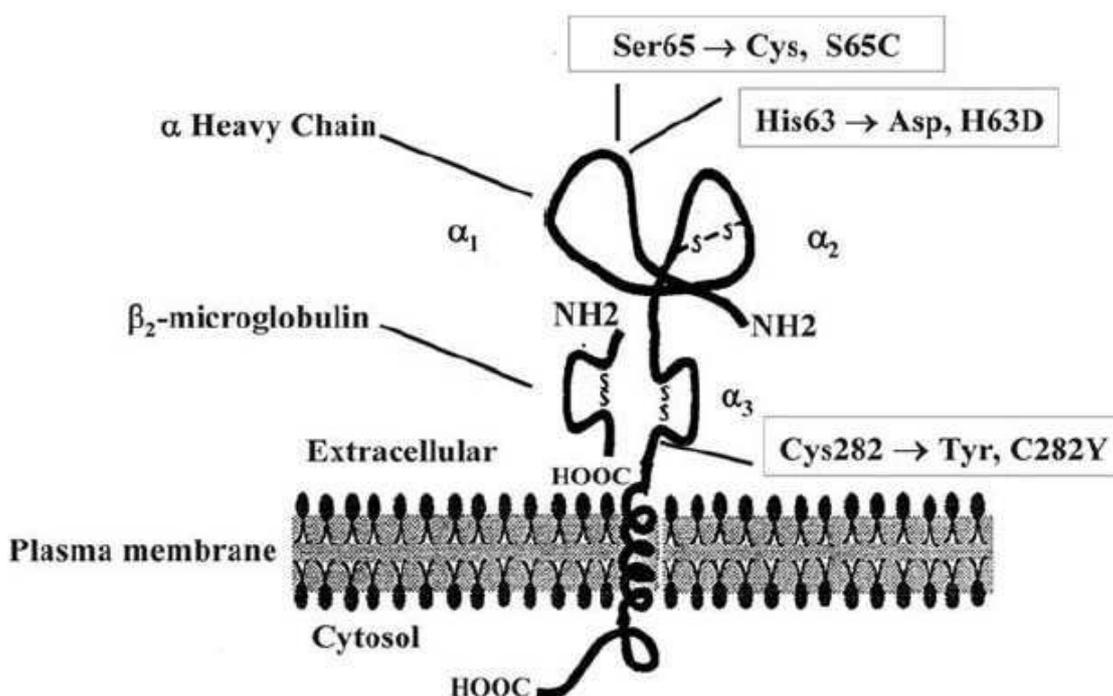


Figure 6 : Les trois principaux variants identifiés sur la protéine HFE, d'après (Bacon et al., 2011)

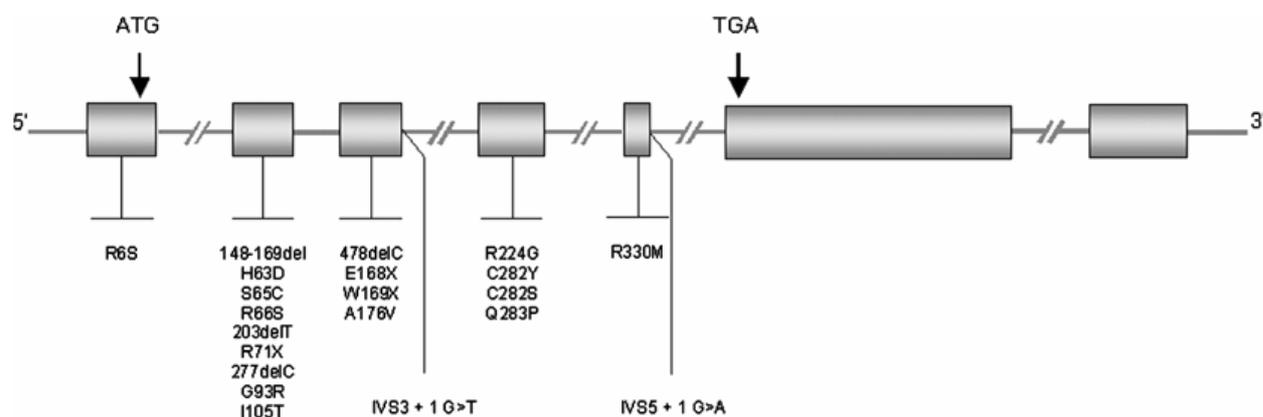


Figure 7: Représentation schématique de mutations dans le gène *HFE*, d'après (Le Gac and Férec, 2005)

2. Hémochromatoses non *HFE*

Les autres formes héréditaires de surcharge en fer appartiennent au groupe des hémochromatoses dites non liées au gène *HFE*.

Il s'agit de:

- L'hémochromatose de type 2 (ou hémochromatose juvénile), maladie autosomale récessive divisée en 2 groupes :

Le type 2A dû à une mutation dans le gène *HJV* situé sur le locus q21 du chromosome 1 qui code l'hémojuvéline. Ce syndrome touche plus particulièrement les individus âgés de moins de 30 ans. Les symptômes cliniques sont le plus souvent endocriniens et cardiaques (Papanikolaou et al., 2001).

Le type 2B lié à une mutation du gène *HAMP* situé sur le locus q13 du chromosome 19 qui code pour l'hepcidine. Cette forme d'hémochromatose est décrite comme étant particulièrement sévère (Roetto et al., 2003).

- L'hémochromatose de type 3 est une maladie autosomale récessive liée à une mutation du gène *TFR2* situé sur le locus q22 du chromosome 7. Le tableau clinique est très similaire à celui d'une hémochromatose *HFE* (Roetto et al., 2001).
- L'hémochromatose de type 4A est due à une mutation dans le gène *HFE2A* situé sur le locus q32 du chromosome 2 qui code pour la ferroportine. C'est une maladie à transmission autosomale dominante (Njajou et al., 2001).

- L'hémochromatose de type 4B, également lié à une mutation du gène *SLC40A1* qui rend la ferroportine résistante à sa dégradation par l'hepcidine (Montosi et al., 2001; Pietrangelo et al., 1999).

C. HEMOCHROMATOSE *HFE*

Les patients atteints d'hémochromatose *HFE* peuvent présenter un grand nombre de signes biologiques et cliniques selon l'état d'évolution de leur pathologie.

1. Aspect clinique

Une classification de la maladie a donc été proposée, du fait de la grande diversité de tableaux biologiques et cliniques rencontrés.

a) 5 stades de sévérité croissante

Cette classification repose donc sur les caractéristiques biologiques et cliniques des individus. Les personnes qui présentent le génotype C282Y/C282Y peuvent être classées en 5 stades regroupés en 3 phases (figure 8) en fonction de leur phénotype (Brissot et al., 2004; HAS, 2005):

- Phase de latence

Le stade 0 : il correspond à l'absence de toute anomalie biologique et d'expressivité clinique. Le coefficient de saturation de la transferrine est inférieur à 45 % et le taux de ferritine est normal (inférieur à 300 µg/L pour les hommes et inférieur à 200 µg/L pour les femmes). Les patients ne présentent aucun symptôme clinique lié à l'hémochromatose.

- Phase d'expression biologique

Le stade 1 : il constitue un des stades précliniques. Il se caractérise par une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (> 45 %) sans élévation du taux de ferritine. Il n'existe à ce stade aucun signe clinique de la pathologie.

Le stade 2 : c'est le dernier stade de la phase préclinique. On assiste à une augmentation du coefficient de la transferrine et à une augmentation de la ferritinémie (supérieure à 300 µg/L pour les hommes et supérieure à 200 µg/L pour les femmes).

- Phase d'expression clinique

Le stade 3 : il s'agit du premier stade de la phase clinique. On assiste sur le plan biologique à une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine et à une augmentation du taux de ferritine tandis que sur le plan clinique on assiste à l'apparition des premiers symptômes qui affectent la qualité de vie (asthénie, hypogonadisme, signes ostéo-articulaires, diabète, hépatopathie non-cirrhotique, troubles du rythme cardiaque, mélanodermie).

Le stade 4 : il se caractérise par les mêmes anomalies biologiques qu'au stade 3 mais sur le plan clinique, les atteintes viscérales peuvent compromettre le pronostic vital : cirrhose, carcinome hépato-cellulaire, diabète insulino-requérant, insuffisance cardiaque.

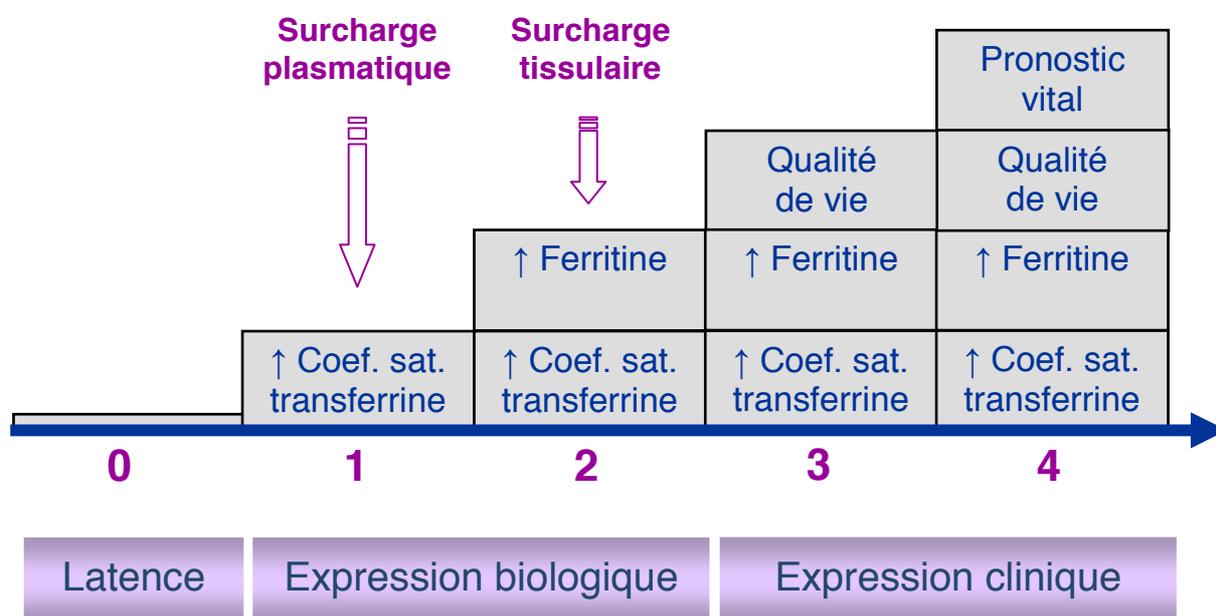


Figure 8 : Evolution de l'hémochromatose en 5 stades de sévérité croissante, d'après (Brissot et al., 2004)

En pratique, il est difficile de différencier les patients entre les stades 2 et 3 de la maladie car les principaux signes cliniques de l'hémochromatose (asthénie, arthralgies...) sont peu

spécifiques de la pathologie et sont couramment retrouvés dans la population générale (McDonnell et al., 1999; Waalen et al., 2002).

Les patients qui sont au stade 2 de la maladie ou ceux qui sont en phase d'expression clinique (stade 3 et 4) nécessitent une prise en charge thérapeutique qui consiste d'une part au traitement de la surcharge en fer et d'autre part au traitement symptomatique éventuel des atteintes viscérales ou métaboliques telles que le diabète.

b) Histoire naturelle

Sur le plan clinique, l'hémochromatose *HFE* est une maladie qui évolue lentement dans le temps. Après une phase totalement latente (stade 0), les premiers stigmates de l'excès de fer dans l'organisme apparaissent vers l'âge de 20 ans. Ceci se caractérise par une augmentation progressive des valeurs des paramètres sériques, à savoir, le coefficient de saturation de la transferrine (stade 1), puis le taux de ferritine (stade 2). Le stade 0 de la maladie peut perdurer chez les individus C282Y homozygotes toute leur vie. Ceci est lié à la pénétrance incomplète du génotype C282Y/C282Y. Différentes études transversales systématiques de populations adultes ont montré que le taux de saturation de la transferrine peut être normal chez un grand nombre d'individus portant le génotype C282Y/C282Y. Ainsi sur plus de 50000 sujets, 20 à 25 % des hommes et 40 % des femmes homozygotes présentaient un taux normal de saturation de la transferrine (Beutler et al., 2002; Deugnier et al., 2002).

Comme mentionné précédemment, les stades 1 et 2 correspondent à la phase « d'expression biologique » dans laquelle on observe uniquement des anomalies biologiques. Cette phase peut passer inaperçue durant plusieurs années chez les individus. La phase « d'expression clinique » se manifeste plus tardivement, généralement vers l'âge de 40-50 ans chez les hommes et de 50-60 ans chez les femmes. Le tableau clinique peut associer, à un stade précoce (stade 3), des signes cliniques non spécifiques qui affectent la qualité de vie, et à un stade plus avancé (stade 4), des signes qui engagent le pronostic vital.

c) Signes cliniques

Les premiers signes cliniques apparaissent entre 20 et 35 ans chez les sujets pathologiques. Le tableau clinique de l'hémochromatose *HFE* est très peu spécifique et il n'existe aucun signe pathognomonique de la maladie. Les signes cliniques sont très nombreux et leur incidence varie.

(1) Atteintes endocriniennes

- Le diabète

L'hémochromatose *HFE* peut être responsable d'un diabète de type 1. Une étude danoise réalisée auprès de 716 patients atteints de diabète de type 1 et 9174 témoins a montré que la prévalence du génotype C282Y/C282Y était plus importante dans le groupe des diabétiques (Ellervik et al., 2001). La plupart des études qui se sont intéressées au lien entre diabète de type 2 et hémochromatose *HFE*, n'a retrouvé aucune association significative (Davis et al., 2008; Frayling et al., 1998; Halsall et al., 2003; Njajou et al., 2002). Cependant, la présence d'un diabète témoigne d'une surcharge ferrique importante, et ces patients sont plus exposés au risque de cirrhose que les patients non diabétiques. Le mécanisme principal repose sur une accumulation pancréatique du fer, conduisant à des phénomènes oxydatifs et favorisant la survenue d'une apoptose des cellules β des îlots de Langerhans, les cellules α responsables de la sécrétion de glucagon restant normales, tout comme la sécrétion exocrine. Il s'agit donc essentiellement d'un diabète lié à une insulinopénie, mais la surcharge en fer pourrait également être responsable d'une insulino-résistance. Il s'agit parfois d'un diabète instable difficile à traiter, devenant rapidement insulino-requérant et susceptible de complications micro et macroangiopathiques. Une fois déclaré, le diabète évolue en effet pour son propre compte ; il n'y a pas de régression avec la déplétion martiale.

- L'hypogonadisme

C'est la cause la plus fréquente d'endocrinopathie au cours de l'hémochromatose, en dehors du diabète. L'hypogonadisme peut se révéler par une impuissance chez l'homme, une aménorrhée chez la femme, une perte de la libido ou une ostéoporose (Niederau et al., 1996). Il s'agit d'une insuffisance gonadotrope, liée à une accumulation de fer dans l'hypophyse. Une atteinte gonadique primitive est exceptionnelle. Les saignées ne permettent pas d'obtenir une récupération.

- Autres atteintes endocriniennes

La survenue d'une insuffisance thyroïdienne périphérique serait plus fréquente au cours de l'hémochromatose, que dans la population générale du fait de la coexistence d'une accumulation thyroïdienne du fer, responsable d'une fibrose, et d'une atteinte auto-immunitaire. La fréquence de l'hypothyroïdie a été estimée à 10 % dans une cohorte d'hommes atteints d'hémochromatose (Edwards et al., 1983).

(2) Atteintes articulaires et osseuses

Elle concerne deux tiers des patients et constitue la principale cause de diminution de leur qualité de vie. Dans un tiers des cas, elle est révélatrice de la maladie (Allen et al., 2008; Guggenbuhl et al., 2011; Pawlotsky et al., 1999). Le tableau clinique peut facilement être confondu avec celui de pathologies fréquentes, à partir d'un certain âge, comme le rhumatisme à cristaux de pyrophosphate de calcium avec ou sans chondrocalcinose articulaire ou l'arthrose. Les symptômes peuvent débuter avant la trentaine chez l'homme, et généralement après la ménopause chez la femme. Dans une série récente de 199 patients, l'âge moyen des premiers symptômes articulaires était de 45,8 ans (Sahinbegovic et al., 2010a).

Les atteintes les plus fréquentes sont des arthropathies chroniques, de type mécanique, mais parfois de type inflammatoire. L'atteinte peut être mono-, oligo- ou polyarticulaires, de gravité variable, depuis de simples arthralgies jusqu'à des troubles articulaires sévères et invalidants (Cofer, 2014). Elle concerne plus particulièrement les articulations métacarpophalangiennes, notamment les deuxièmes et troisièmes, mais elle peut s'étendre aux interphalangiennes proximales et aux poignets, voire aux grosses articulations des membres supérieurs et inférieurs. Plus rarement, il existe des localisations aux épaules, aux coudes et au rachis (Schumacher, 2000; Vaiopoulos et al., 2003).

Le risque de remplacement prothétique articulaire est plus élevé que dans la population générale. Une étude a montré que ce risque est multiplié par 9 chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*, après ajustement sur l'âge, le sexe, la ménopause, le diabète et l'indice de masse corporelle. La localisation la plus fréquente étant de loin la hanche (84,6 %), suivie par le genou (11,5 %) et la cheville (3,8 %). Ce type d'opération est également plus précoce en cas d'hémochromatose *HFE* (Sahinbegovic et al., 2010b). Une étude cas-témoin effectuée auprès de patients hémochromatosiques *HFE* a confirmé cette constatation puisque ces patients présentaient un plus grand nombre de porteurs de

prothèse de hanche et de genou que dans la population générale, après stratification sur l'âge, le sexe et l'indice de masse corporelle (Richette et al., 2010).

Sur les radios, peuvent être observés (figure 9) :

- des stigmates de chondrocalcinose dans les interlignes articulaires et à la périphérie des articulations ;
- des signes d'arthropathie chondrale et sous-chondrale sur des articulations peu touchées par l'arthrose, notamment les deuxièmes et troisièmes métacarpophalangiennes, avec des géodes cernées par une condensation et disposées dans la zone osseuse sous-chondrale, des ostéophytes à extrémité arrondie ou acuminée en hameçon

L'hémochromatose *HFE* apparaît être associée à une perte osseuse significative, d'origine multifactorielle (toxicité du fer, cirrhose, hypogonadisme).



Figure 9 : Arthropathie des articulations métacarpophalangiennes d'allure mixte, destructrice (pincement de l'interligne articulaire et géodes sous-chondrales) et constructive (condensation osseuse et ostéophytose périphérique), d'après (Cofer, 2014)

A. Radiographie de la main de face.

B. Cliché centré sur les articulations métacarpophalangiennes.

(3) Atteintes cutanées

Sur la plan dermatologique, certains patients présentent une coloration de la peau en brun, appelée mélanodermie (figure 10). L'étude de Niederau et de ses collaborateurs a retrouvé 72 % d'individus avec une pigmentation de la peau parmi les 251 personnes de la cohorte (Niederau et al., 1996). Celle-ci survient tardivement au cours de l'évolution, conduisant à une coloration grisâtre ou brune des téguments, parfois limitée aux zones découvertes (visage, cou, dos des mains, avant-bras, partie inférieure des jambes) et aux parties génitales. Elle est souvent visible sur la muqueuse buccale.

Il peut s'y associer une atrophie cutanée, une perte des cheveux et des ongles cassants (Niederau et al., 1996).



Figure 10 : Mélanodermie, d'après (Cofer, 2014)

(4) Atteintes digestives

Sur le plan digestif, les individus peuvent présenter des douleurs abdominales récidivantes préférentiellement localisées au niveau de l'épigastre et de l'hypochondre droit. L'examen clinique peut alors mettre en évidence une hépatomégalie reflet d'une possible cirrhose hépatique. Ce risque est d'autant plus élevé que le taux de ferritine est supérieur ou égal à 1000 $\mu\text{g/L}$. La réalisation d'un FibroScan® permet de quantifier de façon instantanée et totalement non invasive la fibrose du foie (Adhoute et al., 2008). Certains diagnostics d'hémochromatose *HFE* peuvent se faire suite à la découverte d'un carcinome hépatocellulaire, complication la plus sévère de la maladie. Le risque de développer un

hépatocarcinome est 100 fois plus élevé chez les patients cirrhotiques atteints d'hémochromatose que dans le reste de la population (Niederau et al., 1996).

Une étude irlandaise composée d'une cohorte de 209 personnes C282Y homozygotes a retrouvé que parmi les 106 hommes, 30 % d'entre eux présentaient une augmentation des enzymes hépatiques (Gleeson et al., 2004). Dans cette étude, 18 % des hommes et 5 % des femmes avaient une fibrose du foie. Le stade de cirrhose concernait 1 % des individus.

Les bilans biologiques réalisés dans le contexte d'hémochromatose doivent s'orienter vers la recherche de facteurs aggravants de la maladie tels que l'hépatite B ou C.

(5) Atteintes cardiaques

La cardiomyopathie par surcharge en fer, quelle que soit son origine, est caractérisée par une cardiomyopathie restrictive avec une dysfonction diastolique précoce manifeste qui évolue invariablement vers la cardiomyopathie dilatée terminale (Barton and Edwards, 2000; Chen et al., 2000; Kremastinos et al., 1993; Liu and Olivieri, 1994; Oudit et al., 2006).

La surcharge en fer chronique peut entraîner une variété d'arythmies, incluant le bloc auriculo-ventriculaire, des anomalies de la conduction, des bradyarythmies, des tachyarythmies et la mort cardiaque subite (Brittenham et al., 1994; Buja and Roberts, 1971; Laurita et al., 2003; Olivieri et al., 1994). La surcharge en fer peut également aggraver les lésions de reperfusion dans l'ischémie myocardique en raison de la formation accrue d'espèces oxygénées réactives et de la réserve réduite d'antioxydants (Oudit et al., 2006). Lorsque le taux de fer est élevé, la production excessive de radicaux libres entraîne une peroxydation accrue et la lésion des lipides, des protéines et des acides nucléiques, produisant des lésions cellulaires et la déplétion des antioxydants (Oudit et al., 2004).

Les effets de la production de radicaux libres et du stress oxydatif en présence de toxicose aiguë due au fer et de cardiomyopathie par surcharge en fer ont été bien documentés chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*, de bêta-thalassémie majeure et d'insuffisance rénale terminale (Lim et al., 2000; Young et al., 1994).

Ces symptômes sont associés à d'autres signes généraux comme l'asthénie (Camaschella, 2005; Davies and Enns, 2004; Guggenbuhl et al., 2005; Pietrangelo, 2010).

L'ensemble des signes d'altération de l'état général, endocriniens, rhumatologiques, cardiaques, hépatiques et dermatologiques peuvent être observés de façon majorée aux stades avancés de la maladie.

2. Prise en charge des patients

a) Bilan initial des complications

Chez les patients homozygotes pour la mutation C282Y et qui présentent des anomalies au bilan sanguin (coefficient de saturation de la transferrine supérieur à 45 %, ferritinémie supérieure à 300 µg/L pour les hommes et supérieure à 200 µg/L pour les femmes), l'EASL (European Association for the Study of the Liver) propose de faire un bilan à la recherche d'éventuelles complications (figure 11) (EASL, 2010) :

Il s'agit de prescrire un bilan biologique hépatique (ALAT, ASAT) afin d'évaluer l'atteinte du foie. Certains patients peuvent bénéficier d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) hépatique qui possède une excellente corrélation signal-surcharge ferrique hépatique. Elle permet de voir la répartition du fer, de détecter d'éventuels nodules ou un carcinome hépatocellulaire. Cet examen permet aussi une exploration pancréatique. La ponction-biopsie hépatique est utile si le malade présente une hyperferritinémie multifactorielle, en cas de cirrhose. Elle est conseillée si le taux de ferritine est supérieur à 1000 µg/L. D'autres examens peuvent être prescrits dans le but de détecter l'atteinte d'autres organes. C'est le cas de l'endoscopie digestive haute qui permet de détecter des varices oesophagiennes. Ce bilan peut être complété par une échographie abdominale, le dosage de l'alpha-foetoprotéine, de l'hémoglobine glyquée, de la TSH, et de la testostérone. Une échocardiographie ainsi qu'une densitométrie osseuse peuvent aussi être proposées.

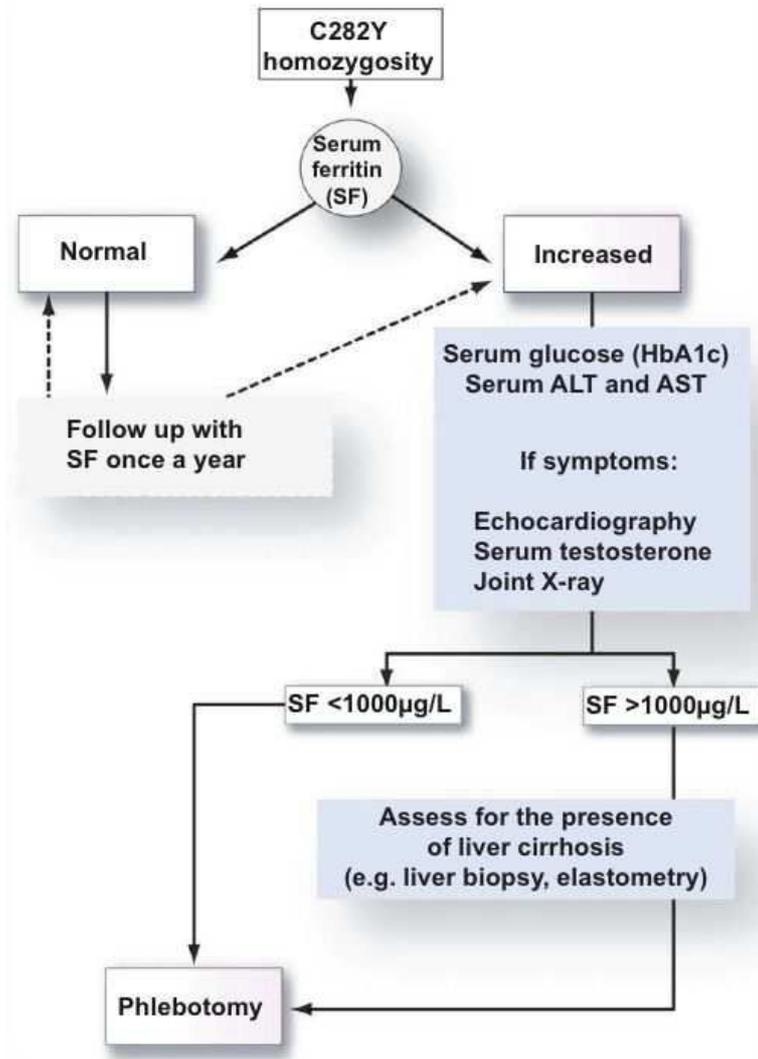


Figure 11 : Algorithme de prise en charge des patients C282Y/C282Y, d'après (EASL, 2010)

b) Traitement de la surcharge en fer

Le traitement initial consiste à normaliser les réserves en fer de l'organisme par la réalisation de phlébotomies ou l'utilisation de chélateurs du fer. Il s'agit également de prendre en charge les complications associées.

(1) Phlébotomies

C'est le traitement le plus couramment utilisé dans la prise en charge des patients symptomatiques atteints d'hémochromatose *HFE*. L'objectif de ces saignées itératives est de rétablir des réserves en fer à un niveau normal.

Il n'existe aucun essai clinique randomisé comparant les bénéfices des saignées à l'absence de saignées chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Cependant certaines études ont montré l'intérêt de commencer les phlébotomies avant le développement d'une cirrhose ou d'un diabète, afin de diminuer la morbidité et la mortalité chez les patients (Adams et al., 1991; Niederau et al., 1996).

Les bénéfices liés à cette pratique ont été démontrés par comparaison de la survie de patients atteints d'hémochromatose traités par saignées à celle des cohortes historiques de patients non saignés (Bomford and Williams, 1976) ou saignés de façon incorrecte (Milman et al., 2001). Cette dernière étude a retrouvé un taux de survie des patients saignés de 93 % à 5 ans contre 48 % chez les patients mal pris en charge (78 % versus 32 % de survie à 10 ans).

Certains symptômes cliniques sont améliorés par la pratique des saignées. C'est le cas de l'asthénie et de la mélanodermie (Niederau et al., 1996). On peut également observer une amélioration de l'intégrité des organes tels que le foie, ce qui se traduit par une diminution du taux de transaminases. Des biopsies hépatiques répétées chez des malades ont montré une régression de la fibrose chez 15 à 50 % des patients (Milman et al., 2001). D'autres études ont également mis en évidence une amélioration du score METAVIR de fibrose hépatique chez 35 à 69 % des patients selon le score initial (Falize et al., 2006). Enfin, certains patients cirrhotiques ont vu régresser ou disparaître leurs varices œsophagiennes (Fracanzani et al., 1995).

A contrario, les saignées n'ont pas d'effet démontré sur certains symptômes tels que les arthralgies (Milman et al., 2001; Niederau et al., 1996), l'hypogonadisme ou les cirrhoses hépatiques. L'amélioration des troubles d'origine endocrinienne comme le diabète ou d'origine cardiaque comme les arythmies est intimement liée à la surcharge en fer initiale de ces organes.

L'Association Américaine pour l'Etude des Maladies du Foie (AASLD : American Association for the Study of Liver Diseases) a proposé une synthèse des différentes réponses obtenues chez les patients traités par phlébotomie (Bacon et al., 2011) :

- normalisation des réserves en fer au niveau des organes
- amélioration de la survie des patients diagnostiqués et traités avant le développement d'une cirrhose ou d'un diabète
- amélioration de la sensation de bien-être
- amélioration des fonctions cardiaques
- stabilisation du diabète
- diminution des douleurs abdominales
- diminution de la mélanodermie
- normalisation du taux d'enzymes hépatiques
- diminution de la fibrose hépatique chez environ 30 % des patients
- diminution de l'hypertension portale chez les patients cirrhotiques
- risque d'hépatocarcinome lié à l'hémochromatose écarté chez les patients désaturés avant l'apparition d'une cirrhose
- pas d'amélioration de la cirrhose chez les patients cirrhotiques
- peu ou pas d'amélioration des arthralgies
- pas d'amélioration en cas d'atrophie testiculaire.

En conclusion, les bénéfices liés à la pratique des saignées ont largement été admis malgré l'absence d'essai clinique randomisé. Cette pratique est considérée comme le traitement de référence chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Ce traitement est généralement bien supporté par les patients (Adams, 1998) et la majorité des malades est bien compliant (Hicken et al., 2003).

Il n'existe aucune étude permettant de déterminer avec précision à quel moment les phlébotomies doivent débuter. Il est admis de façon conventionnelle que le traitement doit être initié lorsque le taux de ferritinémie dépasse les normes (des taux $>$ à 200 $\mu\text{g/L}$ pour les femmes et $>$ à 300 $\mu\text{g/L}$ pour les hommes).

Le traitement des patients par phlébotomies se fait selon deux phases : une phase dite d'attaque dont l'objectif est de retrouver une ferritinémie normale, suivie d'une phase d'entretien.

- La phase d'attaque

La phase d'attaque consiste en la réalisation de phlébotomies hebdomadaires dont le volume, adapté à chaque patient, est généralement compris entre 400 et 500 mL. Cette quantité de sang comprend en moyenne entre 200 et 250 mg de fer. Le temps nécessaire pour obtenir la désaturation, c'est-à-dire un taux de ferritine compris entre 50 et 100 $\mu\text{g/L}$, varie d'un patient à l'autre et s'étale généralement entre 3 mois et dans de rares cas sur plus d'une année. Le taux de ferritine théorique recommandé à atteindre est fixé à 50 $\mu\text{g/L}$ (Bacon et al., 2011; EASL, 2010) mais en pratique il est parfois difficile à obtenir chez des patients qui présentent des cofacteurs de risques d'hyperferritinémie tels que la prise d'alcool.

- La phase d'entretien

Lorsque l'on considère que le patient est arrivé à désaturation, commence alors la phase d'entretien. Il s'agit de maintenir un taux de ferritine acceptable chez les malades. Elle consiste en la réalisation régulière de saignées dont l'objectif est de maintenir les réserves en fer de l'organisme à des niveaux normaux. En pratique, les patients subissent une phlébotomie entre 2 et 4 fois par an en fonction de leur réponse au traitement.

Selon les centres de traitement, le sang récupéré rejoint parfois le circuit des dons destinés à la pratique de transfusions (Arrêté du 12 janvier 2009). Dans la réalité, de nombreux patients sont exclus de ce circuit en raison de taux anormalement élevés des transaminases, d'un diabète ou d'une prise de médicaments. Il est pourtant recommandé de réintégrer ce sang aux dons à chaque fois que cela est possible (Pietrangelo, 2010).

(2) Chélateurs du fer

Lorsque la réalisation de saignées est contre-indiquée pour raisons médicales telles qu'une anémie sévère, une pathologie cardiaque ou toute autre défaillance d'organe, les chélateurs du fer constituent une alternative possible. Une étude publiée en 2010 a montré l'intérêt de cette méthode dans le traitement des patients C282Y homozygotes (Phatak et al., 2010). L'utilisation de déférasirox chez ces patients a permis d'obtenir une diminution significative des taux de ferritine.

c) Traitement des complications

- Complications hépatiques

Il convient de s'assurer que les patients atteints d'hémochromatose *HFE* n'ont pas atteint le stade de cirrhose. Il est recommandé de surveiller l'apparition d'une tumeur par échographie et de mesurer l'alpha-foetoprotéine tous les 6 mois. Le recours à la greffe hépatique peut être discuté chez les patients qui présentent une insuffisance hépatique terminale, mais des études ont montré que la survie des patients transplantés atteints d'hémochromatose *HFE* était moins bonne que la survie des malades transplantés pour une autre raison (Kowdley et al., 2005; Yu and Ioannou, 2007). L'explication serait liée à la défaillance des autres organes surchargés en fer tels que le cœur.

- Complications endocriniennes

Le fait de pratiquer des saignées ne permet pas de guérir un diabète insulino-requérant mais son équilibre semble plus facile à obtenir. La prise en charge des diabètes liés à l'hémochromatose *HFE* se fait de façon identique aux autres.

Il convient de surveiller une éventuelle hypothyroïdie et de la traiter. La surveillance des taux de testostérone chez les hommes est également recommandée face à une baisse de la libido. Un traitement hormonal peut alors être proposé.

- Complications cardiaques

Il convient d'effectuer une surveillance cardiologique chez les patients. En effet, un tiers des patients présenteraient des anomalies à l'électrocardiogramme et pour beaucoup d'entre eux les saignées amélioreraient les symptômes (Niederau et al., 1996). L'apparition de troubles du rythme ou d'une insuffisance cardiaque peut nécessiter la mise en place d'un traitement spécifique.

- Complications articulaires et osseuses

Les pathologies articulaires liées à l'hémochromatose *HFE* sont difficiles à traiter et on assiste souvent à une progression des symptômes chez les patients. Les antalgiques de niveau I ou II sont généralement efficaces. Les injections intra-articulaires de corticoïdes retard (hexacétonide de triamcinolone) guidées par arthrographie ou échographie sont généralement très efficaces et doivent être proposées rapidement en cas d'échec des mesures précédentes. Dans l'état actuel des connaissances, le traitement de l'ostéoporose liée à l'hémochromatose ne diffère pas de la prise en charge de l'ostéoporose de la population générale. Aucune donnée actuelle ne permet de savoir si les saignées préviennent de la perte osseuse. Les patients à risque élevé de survenue de fracture doivent

recevoir le traitement habituel de l'ostéoporose: il repose sur de l'exercice physique, des apports calciques optimisés (de l'ordre de 1 g/j), une supplémentation en vitamine D pour obtenir un taux cible de 30 ng/mL, la suppression des toxiques (alcool, tabac) et l'emploi des médicaments anti-ostéoporotiques (bisphosphonates, raloxifène, ranélate de strontium ou tériparatide) (Guggenbuhl et al., 2011).

Les lésions articulaires peuvent parfois progresser de façon importante au point de devoir prescrire un remplacement articulaire par des prothèses, notamment au niveau de la hanche et du genou (Richette et al., 2010).

Les manifestations biologiques et cliniques de la maladie peuvent être très différentes selon les patients. Il existe donc plusieurs façons de définir le phénotype de la maladie selon que l'on parle en termes d'expression biologique ou clinique. La notion de prévalence ne devrait, par conséquent, pas être dissociée du type d'expression de la maladie.

3. Epidémiologie de l'hémochromatose *HFE*

L'hémochromatose *HFE* est la forme d'hémochromatose la plus répandue (Bridle et al., 2003; Levy et al., 1999; Muckenthaler et al., 2003). Cette maladie serait d'ailleurs le désordre métabolique héréditaire le plus fréquent dans les populations d'origines caucasiennes si la pénétrance des différents génotypes n'était pas aussi faible. La prévalence de la maladie reste difficile à estimer car la pénétrance des génotypes est incomplète et varie selon les génotypes (C282Y/C282Y ou C282Y/H63D). De plus, elle dépend des critères biologiques et cliniques retenus pour définir la maladie.

a) Prévalence de C282Y et H63D en population générale

Le tableau 1 rapporte les fréquences estimées des allèles C282Y et H63D dans différentes populations.

Tableau 1 : Prévalence des allèles C282Y et H63D en population générale

Auteurs	Pays/ Population	Effectif (n)	Fréquence allélique (%)	
			C282Y	H63D
(Beckman et al., 1997)	Mordovie	85	1,76	
	Finlande	173	5,20	
	Suède- Saami	151	1,99	
	Suède- Saami	206	7,52	
(Merryweather-Clarke et al., 1997)	Royaume-Uni	368	6,00	12,00
	Irlande	45	10,00	18,90
	Islande	90	6,70	10,60
	Norvège	94	7,40	11,20
	Ex-URSS	154	1,00	10,40
	Finlande	38	0	11,80
	Danemark	37	9,5	22,00
	Pays-Bas	39	2,60	29,50
	Allemagne	115	3,90	14,80
	Ashkénaze	35	0	8,60
	Italie	91	0,50	12,60
	Grèce	196	1,30	13,50
	Turquie	70	0	13,60
	Espagne	78	3,20	26,30
(Datz et al., 1997)	Autriche	271	4,10	25,80
(Burt et al., 1998)	Nouvelle-Zélande	1064	7,00	14,40
(Jouanolle et al., 1998)	France- Bretagne	1000	6,50	
(Merryweather-Clarke et al., 1999)	Scandinavie	837	5,10	17,30
(Distante et al., 1999)	Norvège	505	7,80	22,90
(Olynyk et al., 1999)	Australie	3011	7,57	
(Marshall et al., 1999)	Etats-Unis	100	5,00	24,00
(Beutler et al., 2000)	Etats-Unis	7620	6,40	15,40
(Steinberg KK et al., 2001)	Etats-Unis	2016	6,37	15,37
(Andrikovics et al., 2001)	Hongrie	996	3,40	1,40

Tableau 1 (suite) : Prévalence des allèles C282Y et H63D en population générale

Auteurs	Pays/ Population	Effectif (n)	Fréquence allélique (%)	
			C282Y	H63D
(Pozzato et al., 2001)	Italie	149	3,69	14,42
(Byrnes et al., 2001)	Irlande	800	12,75	17,18
(Beutler et al., 2002)	Etats-Unis	30672	6,22	
(Guix et al., 2002)	Espagne	665	2,03	20,15
(Deugnier et al., 2002)	France	9396	7,63	
(Cimburova et al., 2002)	République-Tchèque	254	3,93	14,20
(Van Aken et al., 2002)	Pays-Bas	1213	6,14	
(Phatak et al., 2002)	Etats-Unis	3227	5,07	15,12
(Jones et al., 2002)	Royaume-Uni	159	8,50	17,30
(Candore et al., 2002)	Italie	578	2,50	14,70
(Salvioni et al., 2003)	Italie	606	4,70	14,35
(Papazoglou et al., 2003)	Grèce	264	0	8,90
(Sánchez et al., 2003)	Espagne	5370	3,15	20,80
(Mariani et al., 2003)	Italie	1132	3,20	13,40
(Altes et al., 2004)	Espagne	1043	2,82	19,89
(Adams et al., 2005)	Etats-Unis	44082	6,82	15,31
(Barry et al., 2005)	Etats-Unis	3532	5,07	14,00
(Meier et al., 2005)	Allemagne	709	4,40	
(Matas et al., 2006)	Majorque	255	0,78	12,35
(Hoppe et al., 2006)	Etats-Unis	991	5,49	13,42
(Aranda et al., 2007)	Espagne	812	3,14	21,92
(Terzić et al., 2006)	Bosnie-Herzégovine	200	2,25	11,50
(Floreani et al., 2007)	Italie	502	1,89	14,84
(Raszeja-Wyszomirska et al., 2008)	Pologne	1517	4,41	15,42

(1) Prévalence de C282Y

La fréquence allélique moyenne de la mutation C282Y, selon une méta-analyse portant sur 36 études constituant une cohorte de 127613 individus, est de 6,2 % (EASL, 2010). La prévalence du génotype C282Y/C282Y parmi la population Caucasienne est estimée entre 1/200 et 1/300 (Edwards et al., 1988; Merryweather-Clarke et al., 1997; Pietrangelo, 2004b). Ce génotype est moins fréquent chez les hispaniques, les américains d'origine asiatique, dans les îles du Pacifique et chez les personnes d'origine africaine (Adams et al., 2005). Environ 85 % des patients du Nord de l'Europe atteints d'hémochromatose *HFE* portent le génotype C282Y/C282Y. Cette mutation est présentée comme une mutation présente dans les populations celtes d'Europe centrale et qui se serait ensuite étendue à l'ouest et au nord de l'Europe (Distante et al., 2004).

La distribution géographique actuelle des allèles (figure 12) est compatible avec cette théorie, puisqu'on observe une fréquence élevée de l'allèle C282Y dans les pays du nord de l'Europe comme l'Irlande (12,5 %) et des taux beaucoup plus faibles, de l'ordre de 1 %, dans les pays du sud de l'Europe (Distante et al., 2004).



Figure 12 : Fréquence de l'allèle C282Y en Europe, d'après (EASL, 2010)

(2) Prévalence de H63D

Le variant H63D est commun à travers toute l'Europe (figure 13). Sa prévalence est plus importante puisqu'on estime qu'environ 25 % de la population européenne est porteuse de cet allèle (Merryweather-Clarke et al., 2000). La fréquence allélique moyenne est estimée par l'EASL à environ 14 %, soit 23733 allèles sur les 170066 étudiés (EASL, 2010).



Figure 13 : Fréquence de l'allèle H63D en Europe, d'après (Distante et al., 2004)

b) Prévalence des génotypes C282Y/C282Y et C282Y/H63D chez les patients symptomatiques

Une méta-analyse regroupant 32 études a permis d'évaluer la fréquence du génotype C282Y/C282Y parmi 2802 patients atteints d'hémochromatose *HFE* en Europe (tableau 2). Cette analyse a fait ressortir que 80,6 % des patients (2260 sur 2802) étaient homozygotes pour la mutation C282Y du gène *HFE*. Les hétérozygotes composites C282Y/H63D représentaient en moyenne 5,3 % des malades testés (EASL, 2010).

Tableau 2 : Prévalence des génotypes C282Y/C282Y et C282Y/H63D chez les patients symptomatiques, d'après (EASL, 2010)

Auteurs	Pays	Effectif (n)	Prévalence des génotypes (%)		
			C282Y/C282Y	C282Y/H63D	Non muté
(Feder et al., 1996)	Etats-Unis	187	79,14		11,23
(Jazwinska et al., 1996)	Australie	112	100,00	0,00	
(Jouanolle et al., 1996)	France	65	100,00		0,00
(Beutler et al., 1996)	Etats-Unis	147	82,31		
(Borot et al., 1997)	France	94	72,34	4,26	19,15
(Carella et al., 1997)	Italie	75	64,00	6,67	
(Datz et al., 1997)	Autriche	40	77,50		
(Willis et al., 1997)	Royaume-Unis	18	100,00		
(The UK Haemochromatosis Consortium, 1997)	Royaume-Unis	115	91,30		4,35
(Press et al., 1998)	Etats-Unis	37	32,43		
(Cardoso et al., 1998)	Suède	87	91,95	3,45	1,15
(Sánchez et al., 1998)	Espagne	31	87,10	6,45	3,23
(Ryan et al., 1998)	Irlande	60	93,33	1,67	3,33
(Nielsen et al., 1998)	Allemagne	92	94,57	4,35	
(Murphy et al., 1998)	Irlande	30	90,00		
(Mura et al., 1999)	France	711	80,17	5,63	4,92
(Brissot et al., 1999)	France	217	96,31	1,84	0,92
(Bacon et al., 1999)	Etats-Unis	66	90,91	3,03	
(Brandhagen et al., 2000a)	Etats-Unis	5	80,00		
(Rivard et al., 2000)	Canada	32	43,75	9,38	25,00
(Papanikolaou et al., 2000)	Grèce	10	30,00		50,00
(Guix et al., 2000)	Espagne	14	92,86		
(Brandhagen et al., 2000b)	Etats-Unis	82	85,37		2,44
(Sham et al., 2000)	Etats-Unis	123	60,16	12,20	4,88
(Van Vlierberghe et al., 2000)	Belgique	49	93,88	4,08	2,04
(Bell et al., 2000)	Norvège	120	76,67	2,50	
(Hellerbrand et al., 2001)	Allemagne	36	72,22	8,33	5,56
(de Juan et al., 2001)	Espagne	35	57,14	11,43	5,71
(Guix et al., 2002)	Espagne	30	90,00	6,67	0,00
(De Marco et al., 2004)	Italie	46	19,57	21,74	23,91
(Bauduer et al., 2005)	France	15	53,33	13,33	
(Cukjati et al., 2007)	Slovénie	21	47,62	9,52	9,52

c) Pénétrance des différents génotypes

La pénétrance d'un génotype représente la proportion d'individus porteurs du génotype qui développe la maladie. Le nombre de malades identifiés atteints d'hémochromatose *HFE* n'est pas en accord avec les taux de prévalence des différents génotypes estimés en population générale. Ce constat est lié au fait que la pénétrance des différents génotypes est incomplète.

(1) Pénétrance incomplète du génotype C282Y/C282Y

Plusieurs études ont déterminé des pénétrances du génotype C282Y/C282Y variant de 1 à 60 % (Rochette et al., 2010). Les différences observées entre les études pour estimer la pénétrance de ce génotype sont essentiellement liées aux difficultés rencontrées pour définir un phénotype précis de la maladie. Une étude basée sur le dépistage de 41038 individus issus de la population générale a montré que l'évaluation de la pénétrance du génotype basé sur les symptômes était difficile du fait de leur caractère non spécifique et de leur grande fréquence (Beutler et al., 2002). De plus, il existe clairement une différence entre les hommes et les femmes puisqu'on estime que 38 % des hommes ayant le génotype C282Y/C282Y pourraient avoir une surcharge en fer contre seulement 1 % des femmes (Allen et al., 2008).

La pénétrance du génotype C282Y/C282Y a donc fait l'objet de nombreuses études, parmi lesquelles une méta-analyse qui en regroupait 19. La détermination de la pénétrance de ce génotype s'est basée sur des critères très hétérogènes, à la fois biologiques et/ou cliniques. Malgré les différences dans les critères d'inclusion et dans les critères retenus pour définir la maladie, la pénétrance du génotype C282Y homozygote a été estimée à 13,5 % (IC 95 % : [13,4 % ; 13,6 %]) (EASL, 2010).

D'un point de vue biologique, la méta-analyse conduite par l'EASL sur 1382 patients C282Y homozygotes a révélé que 26 % des femmes et 32 % des hommes avaient des taux de ferritine anormalement élevés, soit des taux supérieurs à 200 $\mu\text{g/L}$ pour les femmes et à 300 $\mu\text{g/L}$ pour les hommes. Une étude récente basée sur une cohorte de 6020 Danois âgés de 30 à 53 ans a permis d'estimer la pénétrance biologique des différents génotypes (Pedersen and Milman, 2009a). Lorsque l'on se base sur un coefficient de saturation de la transferrine supérieur à 50 % et un taux de ferritinémie supérieur à 300 $\mu\text{g/L}$, la pénétrance estimée du génotype C282Y/C282Y est de 76,5 %.

Une étude réalisée en Irlande sur une population de patients homozygotes s'est intéressée au dosage des enzymes hépatiques pour identifier une atteinte du foie. Elle a montré que

32,3 % des hommes avaient une augmentation des enzymes hépatiques (Gleeson et al., 2004)

D'un point de vue histologique, une méta-analyse basée sur 13 études a montré que lors de biopsies hépatiques effectuées chez 626 patients C282Y homozygotes, un excès de fer était retrouvé dans les tissus ($>25 \mu\text{moles/g}$ de foie) chez 52 % des femmes et 75 % des hommes (EASL, 2010).

Les études de pénétrance basées sur l'analyse de tissus hépatiques est possible, mais les résultats sont à interpréter avec attention du fait du biais de sélection. En effet, les patients biopsiés sont généralement ciblés suite à une forte suspicion d'atteinte hépatique. En Norvège une étude conduite chez 120 patients a permis de montrer que 18 % des hommes et 5 % des femmes homozygotes pour C282Y avaient une fibrose hépatique (Bell et al., 2000) ; environ 6 % des hommes et 2 % des femmes présentaient une cirrhose hépatique (Bell et al., 2000; Powell LW et al., 2006).

Les résultats d'une méta-analyse réalisée dans le cadre d'une revue systématique conduite en 2006 tend à montrer que 38 à 50 % des patients homozygotes pour la mutation C282Y pourraient présenter une surcharge en fer et qu'entre 10 et 33 % d'entre eux auraient des symptômes associés à l'hémochromatose (Whitlock et al., 2006).

Les études faites sur le suivi des patients et la progression de leur maladie ont montré que seule une minorité des patients C282Y/C282Y voyaient leur pathologie s'aggraver (Allen et al., 2008; Andersen et al., 2004; Olynyk et al., 2004).

Au final, on estime qu'entre 75 et 100 % des hommes qui sont C282Y homozygotes ont des marqueurs biologiques qui témoignent d'une surcharge en fer et que 10 à 25 % d'entre eux ont des signes de fibrose hépatique lors de biopsie. Seuls 4 à 6 % d'entre eux présentent des signes de cirrhose hépatique. Chez les femmes, la proportion de patientes concernées est beaucoup plus faible (Wood et al., 2008).

(2) Pénétrance du génotype C282Y/H63D

H63D est le variant le plus fréquemment retrouvé après la mutation majoritaire C282Y chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Cependant, l'association du génotype C282Y/H63D avec la maladie est encore très discutée. En effet ce génotype est associé à une surcharge en fer plus modérée, le plus souvent marquée par une hyperferritinémie d'origine multifactorielle (compliquée par des facteurs secondaires : syndrome métabolique, consommation excessive d'alcool, syndrome inflammatoire, cytolyse) (Deugnier et al., 2009). Une étude de cohorte prospective australienne faite en population générale, a permis d'identifier 180 individus hétérozygotes composites et de les comparer à 300 témoins sans

mutations sur le gène *HFE* (Gurrin et al., 2009). La ferritinémie et le coefficient de saturation de la transferrine étaient significativement plus élevés chez les hétérozygotes composites que chez les individus ne présentant pas ces mutations ($p < 0,02$). Cette différence ne s'observait pas chez les femmes hétérozygotes composites ménopausées qui présentaient des taux semblables au reste de la population. D'un point de vue clinique, la prévalence des morbidités associées à l'hémochromatose n'était pas différente pour les hétérozygotes composites de celle retrouvée dans le reste de la population. La pénétrance biologique est donc un peu supérieure à la pénétrance clinique chez ces individus. Une étude américaine s'est intéressée à l'expression phénotypique de la maladie au niveau du foie chez des patients présentant différents génotypes, parmi lesquels des hétérozygotes composites (Cheng et al., 2009). Il en est ressorti que les réserves en fer de l'organisme étaient moins importantes chez les patients C282Y/H63D que chez les homozygotes C282Y alors que paradoxalement les anomalies hépatiques (inflammation, stéatose à la biopsie) étaient plus nombreuses chez ces derniers. Les données suggéraient que ce sont des pathologies hépatiques sous-jacentes qui étaient à l'origine de l'expression phénotypique de l'hémochromatose chez les patients hétérozygotes composites et non pas le génotype.

Une étude basée sur une cohorte de 6020 Danois âgés de 30 à 53 ans a permis de montrer qu'il existe une différence importante entre les pénétrances biologiques des différents génotypes (Pedersen and Milman, 2009a). Lorsque l'on se base sur un coefficient de saturation de la transferrine supérieur à 50 % et un taux de ferritinémie supérieur à 300 $\mu\text{g/L}$, la pénétrance estimée du génotype C282Y/C282Y est de 76,5 % contre seulement 9,1 % pour le génotype C282Y/H63D (figure 14).

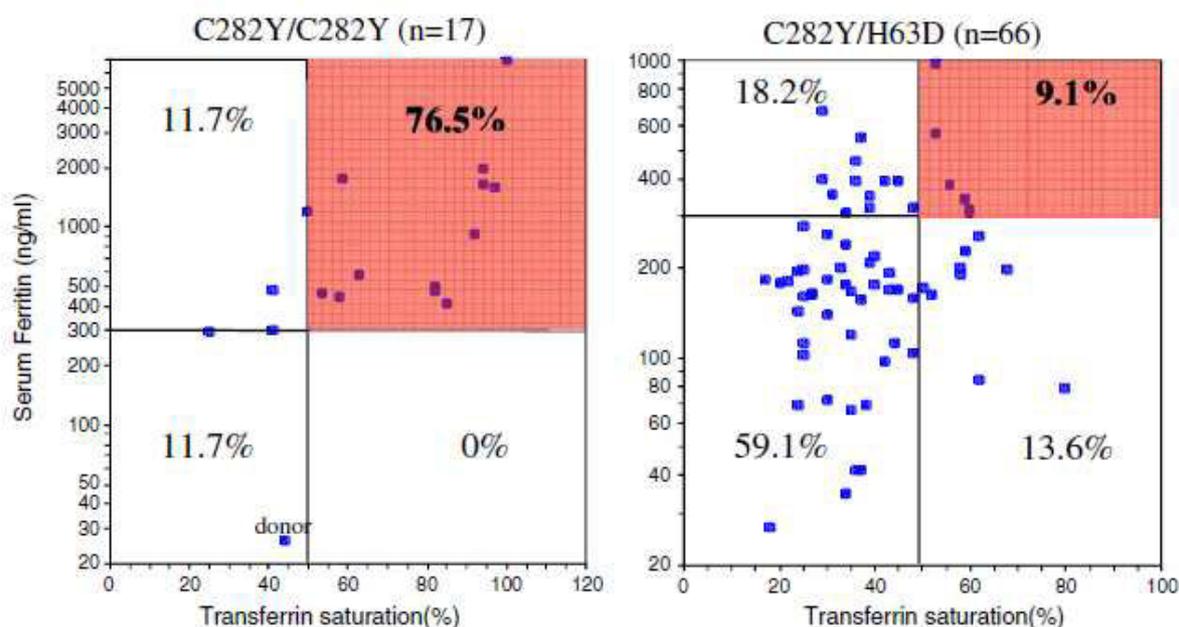


Figure 14 : Ferritinémie et coefficient de saturation de la transferrine en fonction du génotype *HFE*, d'après (Pedersen and Milman, 2009a)

Par ailleurs, une étude réalisée en Espagne auprès de 815 personnes bien portantes âgées de 18 à 75 ans a montré que le génotype hétérozygote composite C282Y/H63D était associé à une augmentation de 16,4 % du coefficient de saturation de la transferrine et que ce génotype expliquait 37,7 % de la variabilité observée dans les taux de ferritine (Aranda et al., 2010).

Une autre équipe a montré que les patients hétérozygotes composites adressés en consultation médicale présentaient des marqueurs de surcharge en fer plus importants que ceux identifiés par dépistage. De plus, les patients portant le génotype C282Y/H63D qui présentaient des taux significativement plus élevés de ferritinémie avaient tous des facteurs de comorbidités connus tels que l'obésité ou une consommation excessive d'alcool (Walsh et al., 2006). Il a également été démontré que les patients C282Y hétérozygotes qui ont une surcharge hépatique en fer d'aspect hémochromatosique sont plus susceptibles d'avoir une mutation sur le second allèle du gène *HFE* (Aguilar-Martinez et al., 2011; Mariani et al., 2010), alors que chez les patients C282Y hétérozygotes sans pathologie de surcharge en fer documentée, les causes secondaires d'hyperferritinémies sont fréquentes (Mariani et al., 2010).

La perception de l'effet du variant H63D a évolué au cours des dernières années devant les données disponibles dans la littérature. On parle maintenant plus volontiers de facteur de susceptibilité, c'est-à-dire de variant dont l'impact sur la maladie est faible lorsqu'on le considère indépendamment d'autres facteurs. Ce constat est en accord avec le fait que le variant H63D n'altère pas la structure de la protéine HFE, contrairement à la mutation C282Y (Feder et al., 1997; Waheed et al., 1997).

(3) Dépistage et pénétrance

Le dépistage de l'hémochromatose *HFE* s'inscrit dans le cadre de la prévention secondaire des maladies, qui se définit comme la prévention des conséquences physiques liées au développement de la maladie. L'objectif est de pouvoir dépister précocément la survenue d'une surcharge en fer chez les individus porteurs du génotype C282Y homozygote afin de proposer une prise en charge thérapeutique et de limiter les complications éventuelles.

La notion de pénétrance incomplète du génotype C282Y rend complexe la possibilité d'un programme de dépistage. L'identification du génotype C282Y homozygote ne permet pas à lui seul de prédire l'apparition d'une surcharge en fer et de ses complications. Le dépistage basé sur le bilan biologique (dépistage phénotypique) connaît également des limites. En effet, l'évocation du diagnostic d'hémochromatose *HFE* se fait généralement suite à la découverte

de perturbation au niveau du bilan ferrique sanguin. Ces paramètres sont utilisés comme test de dépistage phénotypique mais leur caractère prédictif est discuté. Ainsi, différentes études se sont intéressées au caractère prédictif des paramètres biologiques du fer quant au diagnostic d'hémochromatose (Asberg et al., 2001; Åsberg et al., 2007). En Norvège, une étude conduite par Asberg et coll. sur plus de 60000 personnes a montré que les coefficients de saturation de la transferrine restaient anormalement élevés au cours du temps chez environ 1 % des individus. La moitié de ces individus (54,9 %) présentaient également une hyperferritinémie. L'étude du gène *HFE* dans cette sous-population a permis de montrer que 90 % des hommes et 75 % des femmes étaient C282Y homozygotes. La prévalence de l'hémochromatose définie dans cette étude par le diagnostic de cirrhose hépatique était estimée à environ 5 % chez les hommes et moins de 0,5 % chez les femmes (Åsberg et al., 2007).

Il existe deux types de dépistages : le dépistage en population générale, qui peut être systématique ou organisé, et le dépistage familial (ciblé).

Plusieurs études se sont intéressées à la stratégie de dépistage en population générale. Certaines se sont appuyées sur la recherche de l'homozygotie C282Y chez les sujets ayant une augmentation du coefficient de la transferrine, sans rechercher d'hyperferritinémie (Dautreux-Lagarde, 1999; Rosenfeld, 2000) tandis que d'autres ont pris également en compte l'existence d'une hyperferritinémie (Hagen et al., 2002). Ces stratégies ont permis d'identifier entre 1,3 et 2 individus C282Y homozygotes pour 1000 sujets testés. Une étude australienne a conclu que, l'association d'un dépistage phénotypique basé sur le coefficient de saturation de la transferrine et d'un dépistage génétique, était la stratégie la moins coûteuse et la plus efficace (Bassett et al., 1997). Une étude canadienne qui évaluait la même stratégie concluait également que l'association du test phénotypique (test de première intention) et génétique (test de confirmation) constituait la meilleure stratégie (Adams and Valberg, 1999). Une étude australienne a effectué un dépistage systématique de 18779 patients hospitalisés. Il s'agissait de mesurer le coefficient de saturation de la transferrine et de proposer, lorsque celui-ci était supérieur à 40 %, un génotypage (McCullen et al., 2008). Cette stratégie a permis de dépister 887 (5,4 %) individus ayant un coefficient de saturation de la transferrine élevé et d'identifier 35 C282Y homozygotes dont 14 étaient déjà connus.

L'autre stratégie proposée est le dépistage familial. Ce dépistage est par nature plus efficace car il s'adresse à une population à plus haut risque d'être porteur de la mutation C282Y.

La stratégie proposée par Moirand et Brissot est la suivante (Anaes, 2004; Brissot et al., 2005; HAS, 2005; Moirand et al., 1999) :

- Dépistage phénotypique chez les parents du probant (avec test génétique pour les sujets qui présentent une anomalie)
- Dépistage phénotypique et génétique dans la fratrie du probant
- Dépistage génétique chez l'autre parent naturel de l'enfant du probant afin d'estimer les risques d'homozygotie C282Y chez les enfants mineurs.

Une autre stratégie a été proposée par Rochette et ses collaborateurs (Rochette et al., 2000). Il s'agit de réaliser un dépistage qui consiste à remonter l'arbre familial d'un sujet testé au hasard et identifié porteur du génotype C282Y homozygote. Dans ce cas, le risque calculé pour un des parents d'être porteur du génotype C282Y/C282Y est 17 fois plus élevé qu'en population générale, compte tenu de la fréquence de l'homozygotie C282Y et de la fréquence de l'allèle C282Y.

Le dépistage de l'hémochromatose *HFE* dans la population générale n'est pas, à ce jour, recommandé par l'HAS (HAS, 2005). Le dépistage de groupes ciblés sur les pathologies telles que les cardiopathies ou les hépatopathies n'ont pas montré leur efficacité.

Le dépistage familial des apparentés du premier degré est lui fortement conseillé. Sa mise en œuvre était toute fois difficile du fait de la dispersion des apparentés et des contraintes légales et réglementaires (Deugnier and Jouanolle, 2007). Le décret du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale devrait permettre de faciliter l'information des apparentés et faciliter le dépistage familial (Décret n°2013-527, 2013).

Les pénétrances biologiques et cliniques du génotype C282Y/C282Y est très incomplète, ce qui montre que le fait d'être porteur de ce génotype est une condition nécessaire mais pas suffisante pour développer une hémochromatose *HFE*.

Il existe donc des facteurs génétiques et environnementaux susceptibles de modifier l'expression de ce génotype. L'identification de ces facteurs constitue un enjeu majeur dans la compréhension des maladies dites multifactorielles.

4. Influence des facteurs génétiques et non génétiques

La détermination de facteurs de risque d'apparition des signes et des complications associés à l'hémochromatose *HFE*, est un élément clé pour la compréhension de l'histoire naturelle de la maladie et pour la prise en charge des patients. Il s'agit de tenter d'expliquer la pénétrance incomplète des différents génotypes.

a) Influence de l'âge

L'âge est un facteur de risque important d'apparition ou d'aggravation des complications de l'hémochromatose *HFE*. Ceci est directement lié à l'histoire naturelle de la maladie qui est marquée par l'accumulation progressive de fer au niveau des tissus de l'organisme. L'évolution des complications est donc directement liée à la durée d'exposition des tissus à la surcharge en fer. C'est d'ailleurs ce critère qui devrait être considéré comme le facteur de risque le plus pertinent. Ainsi le risque d'apparition des symptômes liés à l'hémochromatose *HFE* et notamment le développement d'une cirrhose hépatique augmente lorsque le taux de ferritinémie approche les 1000 $\mu\text{g/L}$ (Beaton and Adams, 2006; Guyader et al., 1998; Morrison et al., 2003).

L'âge d'apparition des premiers symptômes est généralement compris entre 45 et 60 ans selon le sexe, mais il est impossible de déterminer avec précision un âge seuil de survenue des complications. De même il n'est pas possible de définir un âge au-delà duquel toute survenue de complications supplémentaires serait écartée (Anaes, 2004).

Aucune fibrose hépatique n'a été retrouvée chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE* avant l'âge de 40 ans (Bacon et al., 1999; Guyader et al., 1998). Cependant, cette fibrose peut être observées plus jeune chez les individus qui consomment de l'alcool en quantité excessive (Adams et al., 1997). Les hommes âgés de 50 ans et plus sont ceux qui présentent le risque le plus important de développer une cirrhose hépatique (Allen et al., 2008; Asberg et al., 2001; Olynyk et al., 1999).

L'accumulation de fer dans l'organisme des patients âgés de plus de 50 ans pourrait être liée à des besoins en fer moins importants que chez les adolescents ou les jeunes adultes. Une autre explication pourrait être une diminution naturelle de la sécrétion d'hepcidine avec l'âge. Enfin, l'accumulation progressive de dérivés réactifs de l'oxygène tels que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, liée à la surcharge hépatique en fer pourrait également contribuer au développement d'une cirrhose (Bonekamp et al., 2009; Pietrangelo, 1996).

L'âge est un facteur à prendre en compte au cours des analyses, car il traduit indirectement le temps d'exposition des tissus à la surcharge martiale. Ce facteur est directement lié à l'histoire naturelle de la maladie et est par conséquent incontournable.

b) Influence du sexe

L'hémochromatose *HFE* se manifeste habituellement plus tardivement chez les femmes que chez les hommes (respectivement environ 60 ans versus 50 ans). L'expression biologique est moins marquée chez les femmes avec des coefficients de saturation de la transferrine et des taux de ferritinémie généralement plus faibles que chez les hommes. De plus, d'un point de vue clinique, les femmes présentent des complications moins sévères (Deugnier et al., 2002; Moirand et al., 1997).

Deux études se sont intéressées plus précisément aux différences cliniques et thérapeutiques entre hommes et femmes. L'une d'elles était rétrospective et comparait 176 femmes appariées à 176 hommes de même année de naissance (Moirand et al., 1997), l'autre était prospective et comparait 32 hommes et 22 femmes (Olynyk et al., 1998). Elles concluaient de manière similaire à une surcharge martiale significativement moins importante chez la femme du fait d'une moindre ferritinémie et d'une moindre quantité totale de fer à soustraire par saignée (différence $\Delta = - 3,1$ g ou $- 2$ g selon l'étude soit 12 à 8 saignées de moins).

Une des hypothèses formulées est que les femmes sont relativement protégées des conséquences de la surcharge en fer en raison des pertes sanguines physiologiques (menstruations) et des grossesses (Bothwell and MacPhail, 1998; Waalen et al., 2005). Au cours de la grossesse, les besoins en fer augmentent de façon importante afin d'assurer une production massive de globules rouges chez la mère. Le développement du placenta et la croissance du fœtus entraînent également une consommation importante de fer. Enfin l'augmentation physiologique du taux d'hémoglobine permet de compenser les pertes sanguines liées à l'accouchement (Milman, 2006). Il est communément admis dans la littérature que les pertes en fer liées à la grossesse ont un effet protecteur vis-à-vis de la maladie. Ceci se traduirait par une accumulation moins rapide de fer chez les femmes, mais cette affirmation n'a jamais été supportée par aucune étude épidémiologique. L'étude conduite en 1997 par l'équipe de Deugnier concluait que ni la concentration hépatique en fer, ni la quantité de fer soustraite n'étaient significativement corrélées au nombre de grossesses (Moirand et al., 1997). Toutefois, aucun résultat n'était présenté dans cet article. Cette même équipe a également observé lors d'une étude conduite en population que le nombre de

grossesses ne différait pas entre le groupe de 23 femmes qui présentaient des symptômes liés à l'hémochromatose *HFE* et les 19 autres femmes non expressives (Deugnier et al., 2002). Le nombre de grossesses a également servi de facteur d'ajustement dans une étude sur le lien entre l'indice de masse corporelle et le degré de surcharge en fer des patientes atteintes d'hémochromatose *HFE* (Desgrippes et al., 2013). Aucune association significative n'a été retrouvée entre le nombre de grossesses et la quantité de fer soustraite par phlébotomies ($\geq 6g$ ou $< 6g$).

D'un point de vue biologique, les besoins en fer augmentent fortement au cours de la grossesse. Les besoins sont d'environ 0,8 mg par jour au premier semestre tandis qu'au cours des 3 dernières semaines les besoins sont de 10 mg de fer par jour (FAO/WHO, 2004; Milman, 2006; Schümann et al., 2007; Viteri, 1994). L'augmentation du taux d'hémoglobine consommerait environ 500 mg de fer. La croissance du fœtus et du placenta nécessitent près de 315 mg de fer supplémentaire (respectivement 290 mg et 25 mg) tandis que les pertes normales en fer sont d'environ 250 mg pendant toute une grossesse, soit 0,9 mg par jour (FAO/WHO, 2004). Une étude réalisée chez des souris a montré que les grossesses multiples ne réduisent pas les réserves en fer de l'organisme (Neves et al., 2010). Une autre étude conduite récemment sur des souris suggère que les différences observées entre hommes et femmes pourraient être liées à des facteurs hormonaux. Il a été montré que la testostérone inhiberait la transcription d'hepcidine chez les souris mâles, ce qui conduirait à une accumulation plus rapide et plus importante de fer dans les tissus (Latour et al., 2014).

c) Influence des facteurs génétiques

De nombreuses études ont cherché à étudier l'implication de gènes impliqués dans le métabolisme du fer dans la régulation de la surcharge en fer des patients C282Y homozygotes.

Des études réalisées auprès de patients C282Y homozygotes ont permis d'identifier des mutations rares ou privées des gènes *HAMP* et *HJV* associées à une augmentation du degré de surcharge en fer (Le Gac et al., 2004a, 2004b; Island et al., 2009; Jacolot et al., 2004; Merryweather-Clarke et al., 2003). Ainsi, dans une cohorte de 392 patients C282Y homozygotes, cinq patients présentant un degré de surcharge en fer particulièrement élevé ont été identifiés porteurs d'une mutation du gène *HAMP* alors qu'aucune mutation de ce gène n'a pas été retrouvée dans un groupe contrôle de 300 individus (Jacolot et al., 2004). En 2009, une nouvelle mutation dans la séquence du promoteur proximal du gène *HAMP* a été découverte chez un individu C282Y homozygote qui présentait une surcharge en fer importante (Island et al., 2009).

Des mutations ont également été identifiées dans le gène *HJV* qui code l'hémojuvéline. Ainsi, une mutation du gène *HJV* a pu être identifiée chez neuf individus d'une cohorte composée de 310 patients C282Y homozygotes. Ces neuf patients présentaient un degré de surcharge en fer plus importante que le reste de la cohorte, après appariement sur l'âge et le sexe (Le Gac et al., 2004b).

La voie BMP-SMAD chargée de réguler la synthèse de l'hepcidine et dans laquelle de nombreux gènes sont impliqués a été explorée. Ainsi des variants des gènes *BMP2* et *BMP4* ont été retrouvés associés à des variations du degré de surcharge en fer dans une cohorte de 592 patients C282Y homozygotes (Milet et al., 2007, 2010).

D'autres résultats supportent l'hypothèse de l'existence de variants au niveau de gènes impliqués dans le métabolisme du fer qui pourraient moduler l'expressivité du génotype C282Y/C282Y. Un variant du gène *CYBRD1*, qui code le cytochrome b réductase 1, a été retrouvé associé à un degré de surcharge en fer plus modéré (ferritinémie moins élevée) chez des patients C282Y homozygotes (Constantine et al., 2009; Pelucchi et al., 2012).

Un variant du gène *TMPRSS6* (transmembrane protease, serine 6) a également été identifié comme modificateur de l'expression de l'hémochromatose *HFE* dans une cohorte de 163 patients C282Y homozygotes (Valenti et al., 2012).

Tout récemment, une étude d'association pangénomique, GWAS (genome-wide association study), réalisée auprès de 474 patients C282Y homozygotes a montré qu'un polymorphisme du gène *TF*, qui code la transferrine, était associé à la concentration de la transferrine (de Tairac et al., 2014).

Enfin, une étude s'est intéressée au variant mitochondrial rs16189, connu pour être associé à certaines comorbidités telles que le diabète ou les cardiomyopathies dilatées. Ce variant était plus fréquemment retrouvé chez les patients C282Y homozygotes qui présentaient une surcharge en fer, que dans une population contrôle (14,4 % vs 8,6 %, $p=0,003$) et que chez les individus C282Y homozygotes non expressifs (14,4 % vs 3,1 %, $p=0,023$) (Livesey et al., 2004). Cependant, ce lien n'a pas été confirmé par d'autres études qui ont comparé les taux de ferritine chez les patients C282Y homozygotes selon la présence ou non de ce variant (Beutler et al., 2004).

La recherche de gènes modificateurs a conduit à un certain nombre de résultats. Cette recherche demeure difficile du fait de la grande hétérogénéité des protocoles d'études. Les critères d'inclusion des patients, les phénotypes utilisés, le choix des variants étudiés diffèrent beaucoup entre les études, ce qui conduit parfois à des résultats contradictoires. De plus, peu d'études d'association ont pu être répliquées sur des échantillons indépendants. Cependant des résultats ont été obtenus suite à l'étude de gènes impliqués dans la synthèse de l'hepcidine (Milet et al., 2007, 2010), dans le métabolisme des ROS et du TGF- β (Osterreicher et al., 2005a, 2005b) et l'absorption du fer par les entérocytes (Constantine et

al., 2009). Des études axées sur l'haptoglobine (Le Gac et al., 2009; Van Vlierberghe et al., 2001) et les gènes mitochondriaux ont également permis d'obtenir un certain nombre de résultats (Livesey et al., 2004).

d) Influence des facteurs non génétiques

Au-delà des facteurs génétiques, les études ont également cherché à identifier les facteurs non génétiques modulant l'expression phénotypique du génotype C282Y homozygotes.

(1) Consommation excessive d'alcool

La consommation excessive d'alcool est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par une consommation supérieure à 21 verres par semaine pour un homme (soit 3 verres par jour) et 14 verres pour une femme (soit 2 verres par jour) (Organisation Mondiale de la Santé, 2007). Tous les verres standard contiennent la même quantité d'alcool (figure 15).

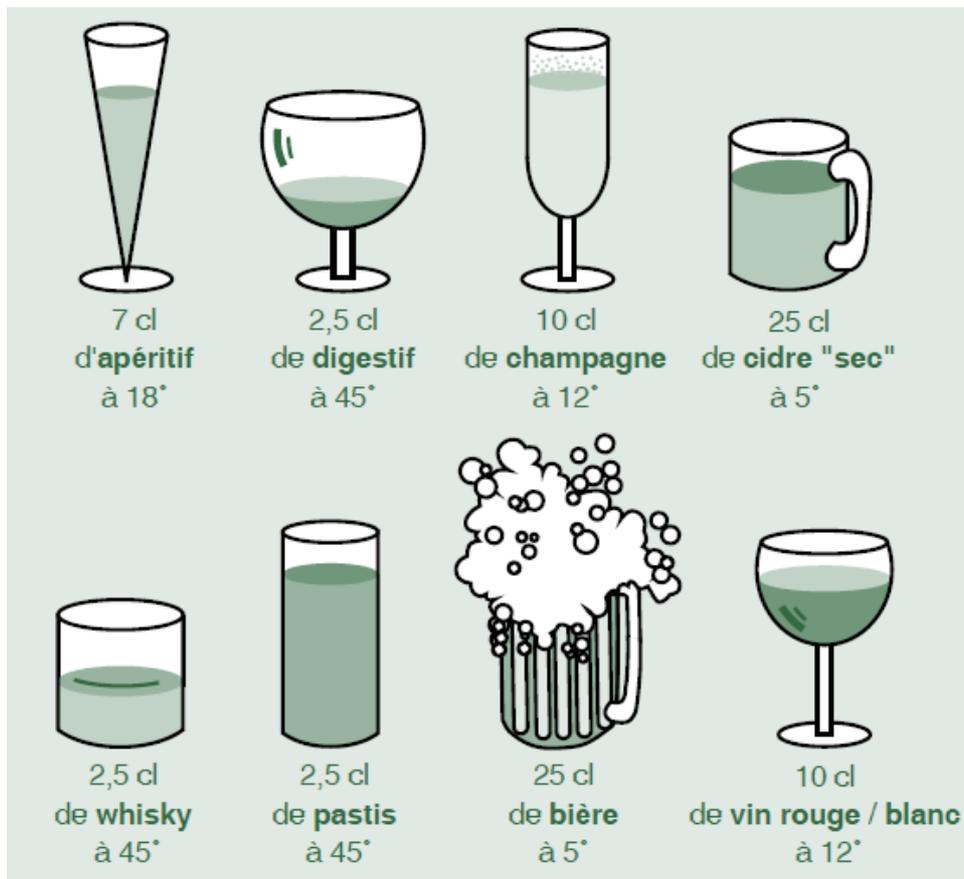


Figure 15 : Equivalence des verres d'alcool en fonction du volume et du type d'alcool, d'après (Bush et al., 1998)

Comme dans beaucoup de pathologies hépatiques, une consommation excessive d'alcool contribue à aggraver les dommages causés au foie par l'accumulation de fer chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE* (Fletcher et al., 2002).

Les études réalisées sur des modèles expérimentaux ont montré que l'alcool diminuerait la production hépatique d'hépcidine (Harrison-Findik et al., 2007). Ce mécanisme va dans le sens des observations faites dans de nombreuses études concernant le lien entre la consommation d'alcool et les paramètres biologiques du fer. Il existe une corrélation entre la quantité d'alcool consommée et l'augmentation du taux de ferritine, ainsi que de la quantité de fer absorbée (Chapman et al., 1983; Ioannou et al., 2004, 2007; Scotet et al., 2003).

(2) Alimentation

Le rôle de l'alimentation sur le degré de surcharge en fer des patients atteints d'hémochromatose *HFE* n'a jusqu'à présent, jamais été clairement démontré. Il n'existe notamment aucun essai randomisé dans la littérature actuelle. Le fer, d'origine héminique (lié à l'hème) et non héminique, est absorbé par des voies distinctes. Le fer d'origine héminique est issu de l'hémoglobine et de la myoglobine contenues dans des aliments tels que la viande rouge, les fruits de mer ou les volailles. Le fer d'origine non héminique se retrouve dans les aliments d'origine végétale comme les lentilles, le riz ou les haricots blancs.

L'absorption du fer héminique et non héminique se fait de façon très inégale. Environ 15 à 35 % du fer héminique contenu dans les aliments est absorbé efficacement. Ce type de fer est absorbé intact (Le Blanc et al., 2012), les aliments n'ont pas d'influence sur son absorption, bien que le calcium ait été décrit comme inhibiteur (Hallberg et al., 1991).

Quant à l'absorption intestinale du fer non héminique, son efficacité varie de 2 à 20 % et elle est influencée par d'autres aliments qui peuvent l'inhiber. Ainsi les phytates et polyphénols comme le tanin diminuent l'absorption intestinale du fer non héminique (Brune et al., 1989; Cook et al., 1997; Minihane and Fairweather-Tait, 1998; Samman et al., 2001). Les composés comme les phytates contenus dans les légumes ou le riz, ainsi que l'acide tannique que l'on retrouve dans le thé vert et le café se lient au fer et forment un complexe insoluble dans la lumière de l'intestin. Chez les patients en surcharge en fer la consommation de café et de thé pourrait avoir un effet protecteur.

Certains nutriments peuvent, *a contrario*, améliorer l'absorption intestinale du fer non héminique, c'est le cas de la vitamine C. L'acide ascorbique va réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) et former des complexes solubles dans la lumière de l'intestin. De plus, la vitamine C favorise la séparation du fer capté par les inhibiteurs (Hunt et al., 1994; Siegenberg et al., 1991). C'est également le cas des protéines d'origine animale (Hurrell et al., 2006)

D'un point de vue alimentaire, la consommation de viande rouge, d'abats, de poissons et de volailles constitue une source importante de fer facilement assimilable. Les fruits et légumes secs ainsi que les végétaux constituent également une source importante de fer mais leur absorption reste plus limitée.

Plusieurs études réalisées en population générale ou sur des individus porteurs du génotype C282Y homozygotes ont tenté de déterminer si l'apport alimentaire de fer avait une influence sur le degré de surcharge en fer (tableau 3). Les résultats des différentes études disponibles restent hétérogènes. Une étude de cohorte réalisée en Grande-Bretagne en 2005 auprès de 2531 femmes a permis d'établir un lien entre la consommation de fer héminique et le degré de surcharge en fer chez les individus qui présentaient le génotype C282Y/C282Y (Cade et al., 2005; Greenwood et al., 2005). L'effet de la consommation de viandes, poissons ou volailles sur le degré de surcharge en fer, estimé par le taux de ferritine, était deux fois plus important chez les homozygotes C282Y que dans les autres groupes génotypiques. Aucune différence n'a été observée pour le fer non héminique. Une autre étude faite aux Pays-Bas sur une cohorte de femmes âgées de plus de 50 ans a abouti à des résultats similaires (van der A et al., 2006). Les femmes C282Y homozygotes et les hétérozygotes composites avaient des taux plus élevés de ferritine et il existait un lien significatif entre la quantité de fer héminique consommée et les taux observés. Ces deux études ont utilisé des questionnaires alimentaires afin de déterminer les quantités de fer héminique et non héminique habituellement consommées. D'autres études n'ont pas retrouvé les associations décrites précédemment (Gordeuk et al., 2012; McCune et al., 2006; Milward et al., 2008).

Une étude conduite en Grande-Bretagne a permis d'établir un lien entre la consommation de fruits frais, la consommation d'alcool et le degré de surcharge en fer chez des patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Une faible consommation de fruits frais (moins de sept portions par semaine) était significativement associée à un degré de surcharge en fer plus important tandis qu'une consommation excessive d'alcool était liée à des taux élevés de ferritine (McCune et al., 2006).

Une étude australienne a, quant à elle, observé que les personnes qui avaient une consommation importante de fruits (autres que des agrumes), ainsi qu'une consommation restreinte de viandes et d'alcool, présentaient des taux significativement plus faibles de ferritine (Milward et al., 2008). Cependant cette étude n'était pas restreinte aux personnes portant le génotype C282Y/C282Y.

Une autre étude qui s'intéressait aux parents au premier degré d'individus C282Y homozygotes a retrouvé que les grands consommateurs de viande (>200 g par jour) avaient également des taux de ferritine plus élevés (Jacobs et al., 2009).

En 2012, une étude nord-américaine a identifié 213 individus qui présentaient le génotype C282Y/C282Y lors d'un dépistage en population générale. Leur consommation de fer

héminique et non héminique a été évaluée par un auto-questionnaire alimentaire. Aucun lien significatif n'a été retrouvé entre leur consommation déclarée de fer et leur taux de ferritine (Gordeuk et al., 2012).

Il existe donc peu d'études à s'être intéressées à l'existence d'un lien entre la consommation de fer héminique ou non héminique et le degré de surcharge en fer des patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Le nombre d'individus qui présentent le génotype C282Y/C282Y est relativement faible parmi ces études généralement réalisées à partir d'un dépistage en population et ces personnes ne présentent pas forcément d'expression phénotypique. Aucune de ces études ne concerne des patients homozygotes inclus en protocole de saignées. De plus, le degré de surcharge en fer des individus est apprécié par la mesure du taux de ferritine mais aucune n'utilise la quantité de fer soustraite par saignées. Cet indicateur semble pourtant être un meilleur reflet de la surcharge en fer des patients (Haskins et al., 1952).

Tableau 3 : Résumé des études publiées sur la relation entre les apports alimentaires, les marqueurs du fer et le gène *HFE*

Auteurs, année de publication	Pays	Population d'étude	Méthode	Principaux résultats	Conclusions
(Kaltwasser et al., 1998)	Allemagne	Patients atteints d'hémochromatose (n=18) dont 10 C282Y homozygotes	Essai non randomisé pour évaluer l'effet de la consommation de thé noir sur le taux de ferritine et la quantité de fer soustraite A) : Consommation de Thé (n=9) B) Pas de consommation de thé (n=9)	Δ SF : 2,78 μ g/L (r=0,95, p<0,05) vs 4,26 μ g/L (r=0,98, p<0,05)	Augmentation significative de la ferritinémie dans les 2 groupes mais plus faible chez les consommateurs de thé
(Scotet et al., 2003)	France	Etude de patients C282Y homozygotes (n=378) Consommation nulle ou raisonnable d'alcool : n=345 Consommation excessive d'alcool : n=33	Etude de cohorte Comparaison des marqueurs du fer (TF, CST, Fe) entre les 2 groupes	Comparaison des 2 groupes TS : 969 μ g/L vs 1745 μ g/L (p<0,05) Fe : 36 μ mol/L vs 40 μ mol/L (p<0,05) CST: 80 % vs 87 % (p<0,05)	Consommation excessive d'alcool associée à des marqueurs du fer plus élevés chez les patients C282Y/C282Y
(Cade et al., 2005)	Grande-Bretagne	Cohorte de femmes britanniques âgées de 35 à 69 ans C282Y homozygotes (n=31) C282Y hétérozygotes (n=888) C282Y wild type (n=5805) H63D homozygotes (n=167) H63D hétérozygotes (n=1742) H63D wild type (n=4846) C282Y/H63D (n=171)	Etude de l'association entre l'apport en fer héminique et la surcharge en fer par régression linéaire multivariée grâce à un questionnaire alimentaire	Consommation de fer héminique associée à une augmentation de 41 % de la ferritinémie (p<0,001). Aucune association significative n'est retrouvée avec le fer non héminique	Les femmes C282Y homozygotes ménopausées qui consomment le plus de fer héminique ont les marqueurs ferriques les plus élevés

Tableau 3 (suite) : Résumé des études publiées sur la relation entre les apports alimentaires, les marqueurs du fer et le gène *HFE*

Auteurs, année de publication	Pays	Population d'étude	Méthode	Principaux résultats	Conclusions
(Greenwood et al., 2005)	Grande-Bretagne	Cohorte de femmes britanniques âgées de 35 à 69 ans	Etude de l'association entre l'apport en fer héminique et le degré de surcharge en fer par régression linéaire multivariée grâce à un questionnaire alimentaire	Après ajustement, les femmes C282Y/C282Y ont des TF 2,4 fois plus élevés (IC à 95 %=(1,9 ; 3,1)) et l'effet du fer héminique est 2 fois plus élevé (p=0,006)	Les femmes C282Y homozygotes ont des taux de ferritine plus élevés
(van der A et al., 2006)	Pays-Bas	Cohorte de femmes âgées de plus de 50 ans (n=1611) C282Y homozygotes (n=5) C282Y hétérozygotes (n=146) C282Y wild type (n=1035) H63D homozygotes (n=23) H63D hétérozygotes (n=381) C282Y/H63D (n=21)	Etude du lien entre l'apport de fer héminique et la surcharge en fer (SF)	Les femmes qui présentaient l'allèle C282Y avaient une ferritinémie significativement plus élevée 115,2 mg/L (IC 95 %=[81,4 ; 162,9 mg/L])	Les femmes C282Y homozygotes ou hétérozygotes composites ménopausées qui consomment le plus de fer héminique ont les ferritinémies les plus élevées
(McCune et al., 2006)	Grande-Bretagne	Individus apparentés au premier degré à des personnes C282Y homozygotes avec différents génotypes ou phénotypes, identifiés cliniquement ou par dépistage	Régression logistique multivariée. Etude du lien entre le génotype, la surcharge en fer (CST>50 % et TF>300 µg/L chez les hommes et 200 µg/L chez les femmes) et les facteurs environnementaux (moins de 7 portions de fruits par semaine, plus de 5 unités d'alcool par semaine)	Faible consommation de fruits frais : OR (IC à 95 %) =3,28 (1,05 ; 11,42, p<0,05) Consommation excessive d'alcool : OR=2,30 (1,01 ; 5,31, p<0,05)	Une alimentation riche en alcool et pauvre en fruits frais est un facteur de risque de surcharge en fer chez ces individus

Tableau 3 (suite) : Résumé des études publiées sur la relation entre les apports alimentaires, les marqueurs du fer et le gène *HFE*

Auteurs, année de publication	Pays	Population d'étude	Méthode	Principaux résultats	Conclusions
(Allen et al., 2008)	Australie	Cohorte de patients C282Y homozygotes (n=46)	Etude du lien entre consommation d'alcool (> ou < à 20 g/j), de viande et le degré de surcharge en fer	Ferritine tendant à être plus élevée chez les consommateurs d'alcool et de viande.	Aucune association significative retrouvée
(Milward et al., 2008)	Australie	Cohorte de 2232 personnes wt/wt : n=1303 C282Y/C282Y ou C282Y/H63D n=57 C282Y/wt ou H63D/wt : n=873	Questionnaire alimentaire. Modèle de régression linéaire multivarié. Etude du lien entre l'alimentation et le degré de surcharge en fer en fonction du génotype <i>HFE</i>	Viande rouge et alcool associés à des taux plus élevés de ferritine. La consommation de fruits frais associée à une ferritine plus faible chez les hommes ($p=0,002$).	La consommation de fruits frais, hors agrumes, aurait un effet protecteur vis-à-vis d'une surcharge en fer, quel que soit le génotype <i>HFE</i> .
(Jacobs et al., 2009)	Pays-Bas	Cohorte de patients C282Y homozygotes (n=224) et leurs 735 apparentés au premier degré	Régression logistique multivariée. Etude du lien entre ferritine ou CST élevé et différents facteurs environnementaux (dont l'alimentation) et génétiques (<i>HFE</i>)	Surcharge familiale en fer sévère : OR=1,04 (1,01 ; 1,08) Age au diagnostic : OR=1,02 (1,00 ; 1,05) Consommation importante de viande (>200 g/jour) : OR=1,61 (1,01 ; 2,56)	Une consommation riche en viande affecte la ferritinémie des apparentés au 1 ^{er} degré de patients C282Y homozygotes
(Gordeuk et al., 2012)	Amérique du Nord	Cohorte d'individus C282Y homozygotes identifiés par dépistage (n=213)	Questionnaire alimentaire. Régression linéaire multivariée. Etude du lien entre la ferritinémie et des facteurs environnementaux dont l'alimentation	Age, sexe et consommation d'alcool sont directement corrélés à la ferritinémie.	Pas d'effet retrouvé de la consommation de fer hémique ou non hémique sur la ferritinémie

(3) Autres facteurs non génétiques

Syndrome métabolique et surpoids/obésité

Le syndrome métabolique se caractérise par un ensemble de divers troubles d'origine glucidique, lipidique ou vasculaire associés à une obésité abdominale. Il est défini par la présence obligatoire d'une obésité abdominale associée à au moins deux troubles suivants : hypertriglycémie ($\geq 1,50$ g/L), diminution du HDL cholestérol ($< 0,40$ g/L chez l'homme et $< 0,50$ g/L chez la femme), une hypertension artérielle systolique (> 130 mmHg), une hyperglycémie à jeun (> 1 g/L) ou la présence d'un diabète de type 2 (Alberti et al., 2005). Les personnes qui présentent un syndrome métabolique ont souvent une hyperferritinémie associée dont le taux est proportionnel au degré d'insulinorésistance (Deugnier et al., 2009; Fernández-Real et al., 1998). Ce syndrome est un diagnostic différentiel d'hyperferritinémie qui doit être évoqué en consultation.

Ce syndrome est difficilement pris en compte dans les études du fait du manque d'informations disponibles pour le caractériser précisément chez les patients. L'utilisation de l'indice de masse corporelle (IMC) est plus simple et c'est généralement le surpoids et /ou l'obésité qui sont pris en compte dans les études comme facteur de confusion.

Une étude publiée par Lainé et ses collaborateurs a montré que l'expression biologique du génotype C282Y/C282Y (définie par un coefficient de saturation de la transferrine > 45 %) était plus faible chez les femmes en surpoids (Lainé and Deugnier, 2006; Lainé et al., 2005). Cette étude a été réalisée sur 78 homozygotes C282Y (57 femmes et 21 hommes) repérés grâce à un programme de dépistage à grande échelle mené sur 19 644 sujets français. Il a été montré que l'IMC (analysé de manière continue) est significativement associé à une non expressivité phénotypique ($OR_{\text{non expressif vs expressif}} = 1,21 [1,02 ; 1,44]$; $p=0,03$). Autrement dit, les sujets ayant un coefficient de saturation de la transferrine inférieur à 45 % ont un IMC plus important. La même équipe vient récemment de montrer que, chez les patientes C282Y homozygotes, un IMC supérieur ou égal à 28 kg/m² était indépendamment associé à une plus faible quantité de fer soustraite par saignées (analyses faites avec un seuil de 6 g de fer soustraits) (Desgrippes et al., 2013). Ceci a mené les auteurs à conclure que l'IMC est probablement un facteur de modulation de l'expression phénotypique de l'homozygotie C282Y, vraisemblablement par une augmentation du taux circulant d'hépcidine.

Autres facteurs modulateurs

- Les pertes en fer

Les dons de sang réguliers sont susceptibles d'avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'apparition d'une surcharge en fer. Ces dons constituent des saignées itératives et leur effet sur la surcharge en fer des patients dépend de la fréquence des dons. On peut supposer que plus les personnes donnent leur sang régulièrement et plus l'effet protecteur est important.

Les individus peuvent également présenter des pertes chroniques :

- pertes chroniques liées à des saignements gastro-intestinaux, une hématurie chronique, des infections parasitaires ou autres
- pour les femmes, des pertes liées aux grossesses éventuelles, mais également liées à leur cycle menstruel. Certaines femmes peuvent présenter des épisodes de ménorragies, métrorragies et/ou ménométrorragies au cours de leur vie, ce qui provoque des pertes de sang qui sont parfois non négligeables.

- Les apports en fer

Le degré de surcharge en fer des patients atteints d'hémochromatose *HFE* dépend également des apports excessifs en fer que les personnes peuvent recevoir. Ces apports peuvent être dus à des antécédents de transfusions sanguines ou à une supplémentation en fer dont la durée et la nature du traitement peuvent varier.

Ces données montrent que tous les facteurs génétiques et non génétiques qui influencent le degré de surcharge en fer des patients atteints d'hémochromatose *HFE* ne sont pas encore identifiés. De plus, les conclusions relatives à l'influence de certains facteurs tels que l'alimentation ne sont pas claires.

III. OBJECTIFS DE LA THESE

Les pénétrances incomplètes des différents génotypes du gène *HFE* ont été en partie expliquées par l'identification de quelques facteurs génétiques et non génétiques. Cependant, tous les facteurs qui influent sur le degré de surcharge en fer des patients atteints d'hémochromatose *HFE* n'ont pas été identifiés à ce jour. Les recherches menées dans l'unité Inserm UMR 1078 ont pour objectifs de mieux comprendre la variabilité phénotypique observée dans cette maladie. Les forces de l'unité sont de pouvoir conduire des études épidémiologiques menées à partir des patients traités au centre de santé brestois de l'E.F.S.-Bretagne et de faire l'analyse de gènes impliqués dans le métabolisme du fer.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre. L'objectif principal est de mieux comprendre l'hétérogénéité phénotypique observée dans cette maladie. Ce travail est mené à partir de la cohorte de patients atteints d'hémochromatose *HFE* qui ont été pris en charge dans un protocole de saignées au centre de santé brestois de l'E.F.S.-Bretagne entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2011.

La première partie de la thèse concernera l'étude de l'influence du génotype C282Y/H63D dans la survenue d'une surcharge en fer et appréciera plus particulièrement le poids de facteurs non génétiques (tels que le sexe, la consommation d'alcool, le surpoids ou l'âge) chez ces patients, par rapport aux patients C282Y/C282Y.

Les deux autres parties consisteront à étudier l'influence de facteurs non génétiques sur l'expression phénotypique des patients porteurs du génotype majoritaire du gène *HFE*.

Nous étudierons tout d'abord le lien entre le nombre de grossesses et le niveau de surcharge en fer des patientes C282Y homozygotes. Enfin la dernière partie concernera l'étude de l'influence de l'alimentation sur le degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes.

IV. MATERIEL ET METHODE

A. Population et méthode

1. Schéma d'étude

Nos travaux s'appuient sur une étude de cohorte prospective coordonnée par l'unité Inserm U1078 de Brest, qui a recensé de manière prospective les patients intégrés en protocole de saignées entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2011 au sein du centre de santé brestois de l'EFS – Bretagne (site de Brest et antenne de Morlaix). Cette cohorte représente plus de 1000 patients.

Les patients ont été inclus dans l'étude dès leur entrée en protocole de saignées et ont été suivis pendant les traitements d'attaque et d'entretien.

Le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique du CHRU de Brest en date du 15 décembre 2003.

2. Population d'étude

Nos travaux reposent plus spécifiquement sur les patients homozygotes C282Y ou hétérozygotes composites C282Y/H63D issus de cette cohorte.

Les patients ont été adressés par des médecins généralistes ou des gastroentérologues hospitaliers et libéraux suite à la découverte de marqueurs sériques du fer (coefficient de saturation de la transferrine, ferritinémie) anormalement élevés.

Pour être inclus, les patients devaient donc présenter les critères suivants :

- être inclus en protocole de saignées entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2011 dans le centre de santé brestois de l'EFS-Bretagne
- présenter le génotype C282Y/C282Y ou C282Y/H63D
- avoir un coefficient de saturation de transferrine supérieur à 45 %
- avoir un taux de ferritine supérieur à 300 µg/L pour les hommes et supérieur à 200 µg/L pour les femmes
- avoir donné leur consentement éclairé de participation à l'étude.

3. Recueil des données

a) Outil de recueil

Un questionnaire était renseigné par un médecin référent de l'EFS pour chaque nouveau patient lors de son inclusion en protocole de saignées. Ce questionnaire servait également de dossier médical et l'exemplaire original était par conséquent conservé dans le dossier du patient.

Le questionnaire utilisé a permis de recueillir les données suivantes :

- les caractéristiques socio-démographiques des patients (année de naissance, sexe, âge au diagnostic, ...),
- leurs habitudes de vie et différents facteurs environnementaux (poids, taille, consommation d'alcool, dons réguliers de sang, ...),
- des paramètres biologiques. Un bilan sanguin était systématiquement réalisé à l'entrée en protocole de saignées. Ce bilan comprenait un bilan martial (le taux de ferritine (ng/mL), le coefficient de saturation de la transferrine (%), le fer sérique ($\mu\text{mol/L}$), un bilan hépatique (enzymes hépatiques, marqueurs des hépatites B et C) et un bilan inflammatoire (protéine C-réactive (mg/L), volume globulaire moyen (μ^3)). L'existence d'un trouble métabolique tel qu'une hypercholestérolémie ou une hypertriglycémie ont également été recherchés de façon systématique.
- les signes cliniques associés au moment du diagnostic : asthénie, mélanodermie, cardiopathie, hypertension artérielle, hépatomégalie, arthropaties, diabète de type 1 ou 2, hypogonadisme, cirrhose,...
- les variations du gène HFE (variants C282Y et H63D) était également renseignées.
- des données alimentaires. Le questionnaire comportait également un questionnaire alimentaire succinct qui a été mis au point avec l'aide d'un diététicien. Il a permis d'estimer les habitudes alimentaires des patients concernant la consommation d'aliments riches en fer. Le questionnaire a également recueilli la consommation de substances susceptibles de modifier l'absorption du fer (thé, vitamine C).

La quantité de fer soustraite par saignées, un des paramètres permettant d'apprécier le degré de surcharge en fer, a été calculée *a posteriori* grâce au nombre et au volume moyen de saignées itératives effectuées pour atteindre une quantité de ferritine sérique inférieure à 100 $\mu\text{g/L}$. Ces données étaient retranscrites dans le questionnaire dès lors que la phase de désaturation était atteinte.

b) Codage, saisie et contrôle qualité des données

Dès que le patient était parvenu au stade de désaturation, une copie du questionnaire était adressée à l'assistante de recherche clinique en charge du programme de recherche pour saisie.

Les données ont été saisies dans une base de données développée sur le logiciel EpiInfo™ V.6.04. Un masque de saisie et un thesaurus ont été créés afin de limiter les erreurs de saisie.

B. Variables

1. Variables à expliquer

L'objectif est d'évaluer l'impact de différents facteurs génétiques et environnementaux sur le degré de surcharge en fer des patients, qui est apprécié par la concentration de la ferritine et la quantité de fer soustraite.

Deux variables dépendantes ont donc été étudiées : la concentration de la ferritine (exprimée en $\mu\text{g/L}$) et la quantité de fer soustraite (exprimée en g). Ces deux variables sont quantitatives.

- Concentration de ferritine ($\mu\text{g/L}$)

La concentration de ferritine ne nécessite pas de calcul particulier puisque ce paramètre est renseigné directement dans le questionnaire. Elle est mesurée lors du bilan sanguin réalisé à l'entrée dans le protocole de saignées.

- Quantité de fer soustraite (g)

La quantité de fer soustraite dans le sang n'est pas une valeur directement renseignée dans le questionnaire, il a donc fallu la calculer. Pour cela, nous avons créé une variable permettant de calculer, pour chaque sujet arrivé à désaturation (ferritinémie inférieure à $100 \mu\text{g/L}$), la quantité de fer qui leur a été soustraite jusqu'au moment de la désaturation. Cette variable dépend du nombre et du volume moyen des phlébotomies réalisées. Sachant qu'un litre de sang contient l'équivalent de 0,5g de fer (Haskins et al., 1952), elle est calculée de la manière suivante :

$$\text{Quantité de fer soustraite (g)} = \frac{(\text{Nombre de saignées} \times \text{volume moyen des saignées (ml)})}{2000}$$

2. Variables explicatives principales

Au vue des objectifs de la thèse, les variables explicatives principales sont au nombre de trois.

- Le génotype *HFE*

Le génotype *HFE* (génotype C282Y/C282Y vs C282Y/H63D) est la première variable indépendante principale dont l'effet sur le degré de surcharge en fer des patients a été étudié. Cette donnée était parfois disponible lors de la prise en charge des patients par le site brestois de l'EFS (génotypage réalisé par un laboratoire extérieur). Le génotypage a été pratiqué dans le laboratoire de Brest (laboratoire de l'EFS puis laboratoire du CHRU de Brest) lorsque celui-ci n'avait pas encore été réalisé.

Les variants C282Y et H63D ont été génotypés par discrimination allélique avec sonde TaqMan® d'hydrolyse exonucléasique.

- Les grossesses

Le nombre de grossesses constituent la seconde variable explicative principale d'intérêt. Le nombre de grossesses déclarées avant l'entrée en protocole de saignées était renseigné dans le questionnaire. Nous avons réalisé trois classes en fonction du nombre de grossesses : 0, [1 ; 2] et ≥ 3 , l'objectif étant de détecter un éventuel effet-dose.

- L'alimentation

La troisième variable explicative principale est l'alimentation riche en fer. L'influence de l'alimentation a été étudiée grâce aux données du questionnaire alimentaire. Les personnes ont déclaré le nombre de repas par semaine au cours desquels elles consommaient :

- des coquillages,
- des abats, de la viande rouge et des œufs,
- des fruits secs et oléagineux ainsi que des légumes secs.

Nous avons dû créer un score pour résumer la consommation d'aliments riches en fer. Nous avons attribué des points en fonction du nombre de repas déclarés consommés par semaine (tableau 4).

Tableau 4: Points attribués aux aliments selon la fréquence de consommation

Aliments	Nombre de repas/semaine	Nombre de points attribués
Coquillages	0	0
	1-3	1
	>3	2
Abats, viandes rouges et oeufs	0	0
	1-5	1
	>5	2
Fruits secs et oléagineux, légumes secs	0	0
	1-3	1
	>3	2

Les scores obtenus pour chaque patient ont permis de classer les patients en deux groupes dont la consommation hebdomadaire d'aliments riches en fer différait. Les patients dont le score était supérieur ou égal à 2 étaient considérés comme ayant une alimentation plus riche en fer que l'autre groupe. Cette variable explicative qualitative a été utilisée pour étudier l'influence de l'alimentation sur la surcharge en fer des patients.

3. Autres variables explicatives

Les autres variables qui ont été prises en compte dans les différentes études étaient les suivantes :

- Le sexe des patients

C'est un facteur essentiel à prendre en compte puisqu'il est démontré que les marqueurs sériques du fer sont différents chez les hommes et les femmes et que la maladie survient plus tardivement chez les femmes.

- L'âge au diagnostic

Le degré de surcharge en fer des patients augmente avec le temps, ce paramètre doit impérativement être pris en compte au moment de l'analyse. L'âge au moment du diagnostic a été transformé en variable qualitative. Nous avons réalisé des classes d'âge de 10 ans ou utilisé un âge seuil en fonction des études.

- La consommation excessive d'alcool

Le nombre déclaré de verres d'alcool pris par jour a permis de classer cette consommation en excessive ou pas, en se basant sur les critères de l'OMS : une consommation d'alcool est considérée comme excessive lorsqu'elle dépasse 21 verres par semaine pour un homme (soit 3 verres par jour) et 14 verres par semaine pour une femme (soit 2 verres par jour).

- La consommation régulière de thé

Les patients étaient également interrogés sur leur consommation régulière de thé (oui/non). Les acides tanniques qu'il contient inhibent l'absorption intestinale de fer et peut avoir un effet protecteur vis-à-vis de la surcharge en fer.

- La consommation régulière de vitamine C

Les patients devaient déclarer s'ils avaient un apport régulier de vitamine C par la consommation de fruits frais ou la prise de médicaments (oui/non). La vitamine C favoriserait l'absorption intestinale de fer.

- Le surpoids

La variable surpoids n'était pas directement renseignée dans le questionnaire, mais le poids et la taille de chaque patient étaient mesurés lors de la consultation. Il a donc été possible de calculer l'indice de masse corporelle (IMC, exprimé en kg/m²) avec la formule suivante :

$$IMC = \frac{Poids (Kg)}{Taille^2 (Cm)}$$

Les patients ont ensuite été catégorisés selon les classes d'IMC (< 25, [25 ; 30] ou ≥ 30 kg/m²). Cette classification permet d'identifier les patients en surpoids ayant un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m² et les patients obèses dont l'IMC est supérieur ou égal à 30 kg/m².

- Les dons réguliers de sang

Les patients étaient interrogés pour savoir s'ils étaient donneurs réguliers de sang ou pas (oui/non) avant l'entrée en protocole de saignées. Les dons de sang réguliers ont potentiellement tendance à protéger de la maladie.

- Les pertes chroniques de sang

Les patients étaient interrogés sur la présence (oui/non) des pertes physiologiques suivantes avant l'entrée en protocole de saignées : pertes chroniques liées à des saignements gastro-intestinaux, à une hématurie chronique ou à une infection parasitaire. Ces pertes de sang sont susceptibles d'avoir un effet protecteur vis-à-vis d'une surcharge en fer.

- Contraception et ménopause

Les femmes ont été interrogées sur la prise éventuelle d'une contraception (oui/non) et son type (œstrogène, stérilet) au moment du diagnostic. Elles devaient également préciser si elles étaient ou non ménauposée (oui/non) au moment de l'entrée en protocole de saignées et préciser, le cas échéant, l'âge de la ménopause. La prise d'un traitement hormonal substitutif a été renseignée chez les femmes concernées (oui/non).

- Les apports excessifs en fer

Les patients ont été interrogés sur leurs antécédents de transfusions sanguines (oui/non) et leur nombre le cas échéant. En cas de supplémentation en fer (oui/non), la durée et la nature du traitement ont été notés.

C. Analyses statistiques

L'extraction et la vérification de la qualité des données ont été effectuées à l'aide du logiciel EpilInfo™ (version 6.04). Les analyses statistiques ont été menées grâce aux logiciels SAS, (version 9.02 ; SAS Institute Inc, Cary, NC) et R (version 2.12.1).

Tous les tests étaient bilatéraux avec un risque de première espèce alpha fixé à 5 %.

1. Etude descriptive

Toutes les études ont débuté par une description de la population d'étude. Les variables qualitatives ont été décrites en pourcentage de l'effectif global et les comparaisons menées entre les différents groupes ont été réalisées à l'aide d'un test du Chi2 lorsque les effectifs étaient suffisants ou par un test exact de Fisher si tel n'était pas le cas (effectifs théoriques inférieurs à 5).

La normalité des différentes variables quantitatives a été testée. Nous avons utilisé la moyenne et l'écart type pour les décrire lorsque leurs distributions étaient normales, puis les

comparaisons ont été faites par le test de Student ou des ANOVA. Lorsque la normalité n'était pas respectée, nous avons utilisé les médianes et les quartiles (ou l'espace interquartile [Q1 ; Q3]) pour en faire la description. Dans ce cas, les comparaisons ont été réalisées par un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon.

2. Etude analytique

a) Analyse univariée

Dans un premier temps, nous avons, pour chaque variable explicative d'intérêt, réalisé des modèles de régression linéaire simple afin de tester leur association avec les variables à expliquer (ferritinémie et quantité de fer soustraite). Ce type de modèle est adapté aux variables quantitatives continues telles que la ferritinémie et la quantité de fer soustraite.

Les distributions des variables quantitatives modélisées ont été représentées et leur normalité vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Les distributions n'étant pas normale, la méthode Box & Cox a été employée afin de choisir la transformation « normalisante » à effectuer (Box and Cox, 1964). Nous avons dû effectuer une transformation logarithmique des variables concernées afin de normaliser leur distribution.

Avec une transformation logarithmique (\ln) de la variable à expliquer, les coefficients de régression (β) estimés par le modèle linéaire indiquent la variation moyenne observée dans le logarithme des variables d'intérêt pour chaque incrémentation d'une unité des variables explicatives. Cette interprétation étant moins évidente, il est classique de déterminer l'exponentiel des coefficients de régression estimés ($\exp(\beta)$), qui indiquent de combien de fois la variable varie (augmente ou diminue) pour chaque augmentation d'une unité de la variable explicative. A titre d'exemple, si l'exponentiel du coefficient estimé associé à une variable explicative (codée 0/1) vaut 1,5, cela signifie que la concentration moyenne de la ferritine (ou la quantité de fer soustraite) est 1,5 fois plus élevée chez les patients qui sont codés 1 par rapport à ceux qui sont codés 0.

Dans un second temps, afin d'identifier les facteurs de confusion potentiels et de sélectionner les variables à intégrer dans le modèle multivarié, nous avons, toujours à l'aide de modèles de régression linéaire simples, étudié les relations brutes entre les différentes covariables et chacune des variables à expliquer puis nous avons testé l'association entre chacune des covariables et les variables explicatives principales.

b) Analyse multivariée

Cette analyse a permis d'ajuster la relation entre les variables explicatives principales (génotype *HFE*, nombre de grossesses et alimentation riche en fer) et les variables à expliquer (ferritinémie et quantité de fer soustraite) sur les facteurs de confusion potentiels. Nous avons intégré dans le modèle multivarié toutes les variables significatives (au seuil de 5 %) et toutes les variables associées au seuil conservateur de 20 % lors de l'analyse univariée. De plus, certaines variables qui ne remplissaient pas ce critère mais qui étaient connues dans la littérature pour être associées aux variables à expliquer ont tout de même été intégrées au modèle multivarié (variables forcées).

c) Vérification des hypothèses et adéquation des modèles

Les hypothèses de validité des modèles de régression linéaire ont été vérifiées. Pour cela, une analyse détaillée des résidus des modèles a été réalisée. Les hypothèses de validité ont été vérifiées de la manière suivante :

- Normalité : représentation de l'histogramme des résidus du modèle et application du test de Shapiro-Wilk afin de vérifier la distribution normale des résidus.
- Homoscédasticité : réalisation et analyse du nuage de points entre les résidus et les valeurs prédites par le modèle, ce nuage de points ne devant pas représenter une forme particulière, une tendance. Le test de White a été appliqué afin de ne pas rejeter l'hypothèse d'homoscédasticité des résidus.
- Non corrélation des résidus : vérification de la non corrélation (ou indépendance) des erreurs en rejetant l'hypothèse d'autocorrélation des résidus grâce au test de Durbin-Watson
- Linéarité : réalisation du nuage de points entre la variable à expliquer (log transformée) et la variable explicative, qui doit suggérer une relation linéaire

V. RESULTATS

A. Etude de l'importance des facteurs non génétiques chez les patients C282Y/H63D traités par phlébotomies

Le variant H63D est majoritairement identifié chez les patients non C282Y homozygotes, cependant l'association de ce génotype composite (C282Y/H63D) avec la pathologie est encore très discutée. En effet, ce génotype s'accompagne d'une surcharge en fer plus modérée, le plus souvent marquée par une hyperferritinémie d'origine multifactorielle. La découverte d'un génotype composite C282Y/H63D reste difficile à interpréter pour les cliniciens.

Objectif

L'objectif de cette étude était de dresser le profil des individus C282Y/H63D traités par phlébotomies et d'évaluer l'influence des facteurs de comorbidité sur l'expression phénotypique de ces malades, en comparaison avec les patients C282Y homozygotes.

Matériel et méthode

- Population d'étude

La population d'étude est issue de la cohorte de patients inclus dans un programme de phlébotomies dans le centre de santé brestois de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Bretagne entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2007. La recherche systématique du variant H63D n'était plus faite après cette date.

Nous nous sommes focalisés sur les patients porteurs des génotypes C282Y/C282Y ou C282Y/H63D, soit respectivement 172 et 58 patients.

- Données recueillies

L'étude s'est appuyée sur les données colligées via le questionnaire clinique complété par les médecins référents à l'entrée dans le protocole de saignées.

- Analyses statistiques

Nous avons dans un premier temps décrit les caractéristiques sociodémographiques des patients inclus dans l'étude.

Puis, nous avons évalué l'impact du génotype C282Y/H63D en trois étapes :

- nous avons tout d'abord déterminé la prévalence des génotypes C282Y/H63D et C282Y/C282Y au sein de notre population d'étude, c'est-à-dire parmi les patients traités par phlébotomies. Nous avons comparé ces taux à ceux observés dans la population générale en nous appuyant sur un échantillon de 797 donneurs de sang du Finistère.

- nous avons ensuite comparé la nature et la sévérité de la surcharge en fer en fonction du génotype des patients (C282Y/C282Y vs C282Y/H63D). Les paramètres biologiques utilisés pour cette comparaison étaient le coefficient de saturation de la transferrine, la ferritinémie et la quantité de fer soustraite. Nous avons réalisé un modèle de régression linéaire afin d'évaluer l'influence du génotype sur le degré de surcharge en fer des patients. Nous avons logtransformé (\log_{10}) les variables dépendantes modélisées (la ferritinémie et la quantité de fer soustraite) afin de normaliser leur distribution.

Après avoir effectué des analyses univariées, nous avons réalisé un modèle de régression linéaire multivarié afin d'ajuster les relations sur les facteurs de confusion potentiels que sont l'âge au diagnostic, la consommation d'alcool ou le surpoids. Les interactions entre les variables du modèle ont été testées deux à deux.

- enfin, nous avons vérifié si les patients qui possèdent le génotype C282Y/H63D présentaient plus couramment des facteurs de comorbidité connus pour engendrer une hyperferritinémie tels que l'abus d'alcool ou le surpoids. Nous avons ensuite comparé la fréquence de ces facteurs dans les deux groupes de génotypiques (C282Y/C282Y et C282Y/H63D).

Résultats-Conclusion

Cette étude a permis de montrer que le génotype C282Y/H63D est beaucoup moins fréquent parmi les patients traités par phlébotomies. Ce génotype hétérozygote composite est trois fois moins fréquent que le génotype C282Y homozygote chez les patients inclus en protocole de saignées (18,9 % vs 56,0 %) alors que dans la population générale, il est 4,9 fois plus fréquent que le génotype C282Y/C282Y (4,3 % vs 0,9 %, $p < 0,0001$).

Bien que les niveaux d'hyperferritinémie soient comparables entre les deux groupes, les patients hétérozygotes composites C282Y/H63D qui sont pris en charge en protocole de saignées présentent une surcharge en fer moins importante que les patients C282Y homozygotes. Ceci se traduit par un coefficient de saturation de la transferrine médian moins élevé (52,0 % vs 84,0 % ; $p < 0,0001$). De plus la quantité de fer soustraite pour atteindre la

désaturation est moins importante chez les patients hétérozygotes composites (2,1 g vs 3,4 g ; $p < 0,0001$).

La fréquence des facteurs de comorbidité est également plus importante chez les patients C282Y/H63D. Ainsi, parmi ces patients, on note 26,0 % de consommateurs excessifs d'alcool (contre 13,9 % chez les C282Y homozygotes, $p = 0,0454$) et 66,7 % de patients en surpoids (contre 39,4 % dans l'autre groupe, $p = 0,0005$). Au total, 21,3 % des patients hétérozygotes composites présentent les deux facteurs associés contre seulement 2,6 % chez les homozygotes ($p < 0,0001$).

En conclusion, cette étude a confirmé que H63D doit être considéré comme un discret facteur génétique de susceptibilité dont l'expression phénotypique est liée à l'association d'autres facteurs non génétiques tels que le surpoids ou une consommation excessive d'alcool. Ces résultats confirment la nécessité de rechercher les facteurs non génétiques de comorbidité lors de ces situations diagnostiques et d'assurer un conseil hygiéno-diététique chez ces patients.



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/sante_pub/ers/sommaire.md?type=text.html

Environnement & Risques Santé ERS

Volume 10 – numéro 3 • mai-juin 2011



Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D ?

VIRGINIE SCOTET^{1,2,3}PHILIPPE SALIOU^{1,2,3,4}MARIE-CHRISTINE MÉROUR²ANNE-YVONNE MERCIER²BRIGITTE CHANU²CÉLINE BERQUIER²GÉRALD LE GAC^{1,2,3,4}CLAUDE FÉREC^{1,2,3,4}

¹ Inserm U613 « Génétique moléculaire et génétique épidémiologique »
46, rue Félix Le Dantec
CS 51819
29218 Brest cedex 2
France

<virginie.scotet@univ-brest.fr>
<philippe.saliou@chu-brest.fr>
<gerald.legac@univ-brest.fr>
<claud.ferec@univ-brest.fr>

² Établissement français du Sang-Bretagne
Site de Brest
29200 Brest
France
<marie-christine.merour@efs.sante.fr>
<anne-yvonne.mercier@efs.sante.fr>
<brigitte.chanu@efs.sante.fr>
<celine_berquier@yahoo.fr>

³ Université de Bretagne occidentale
29200 Brest
France

⁴ CHRU de Brest
Hôpital Morvan
Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité
29200 Brest
France

Tirés à part :
V. Scotet

Article reçu le 14 décembre 2010,
accepté le 28 janvier 2011

Résumé. Caractérisée par une surcharge en fer des cellules parenchymateuses, l'hémochromatose de type I est une maladie génétique complexe particulièrement fréquente dans les populations d'Europe du Nord. Elle est principalement associée au génotype C282Y/C282Y du gène *HFE*. Un second génotype – C282Y/H63D – a majoritairement été décrit chez les patients non C282Y homozygotes, mais l'association de ce génotype composite avec la pathologie demeure encore très discutée. L'objectif de cette étude était de déterminer le poids du génotype C282Y/H63D chez les patients traités par saignées dans un centre de santé de l'Établissement français du sang (site de Brest). Parmi les 326 patients pris en charge sur la période 2004-2007, 172 étaient C282Y/C282Y et 59 C282Y/H63D. Le groupe de patients C282Y/H63D comportait une proportion plus élevée d'hommes (71,2 *versus* 55,8 %, $p = 0,0377$) et présentait un âge moyen au diagnostic plus tardif (56,9 ans *vs* 49,2 ans, $p < 0,0001$) comparativement aux patients C282Y/C282Y. Le génotype C282Y/H63D était également associé à un degré de surcharge en fer plus modéré, ce qui se traduisait par un coefficient de saturation de la transferrine inférieur (52,0 *versus* 84,0 %, $p < 0,0001$) et une quantité de fer soustrait moindre (2,1 *versus* 3,6 g, $p < 0,0001$), ce pour des concentrations de ferritine similaires. Les facteurs d'environnement étaient aussi significativement plus fréquents chez les patients C282Y/H63D (consommation excessive d'alcool : 27,5 *versus* 13,9 %, $p = 0,0252$; surpoids : 67,3 *versus* 39,4 %, $p = 0,0003$). Par ailleurs, si l'impact du génotype C282Y/H63D était comparable à celui du génotype C282Y/C282Y, nous aurions dû l'observer 14 fois plus dans notre population d'étude (OR = 0,07 [0,03-0,18], $p < 0,0001$). Cette étude confirme le poids très relatif du génotype C282Y/H63D dans la survenue d'une surcharge en fer et le rôle prépondérant des facteurs de comorbidité.

Mots clés : facteurs déclenchants ; génotype ; hémochromatose ; surcharge en fer.

Abstract

Type I haemochromatosis: What about the C282Y/H63D genotype?

Characterised by an iron overload, type I haemochromatosis (classic haemochromatosis) is a complex genetic disease particularly frequent in northern European populations. It is principally associated with the C282Y/C282Y genotype of the HFE gene. A second genotype – C282Y/H63D – has mostly been described in patients not homozygous for C282Y, but the association of this composite genotype with the disease is highly debated. The objective of this study was to determine the weight of this genotype in patients treated by phlebotomy in a French Blood Agency health centre in Brest. Of 326 patients treated from 2004 through 2007, 172 were C282Y/C282Y and 59 C282Y/H63D. The C282Y/H63D group included a higher proportion of men (71.2 versus 55.8%, $p = 0.0377$) and was diagnosed later (56.9 versus 49.2 years, $p < 0.0001$) than the C282Y/C282Y patients. The C282Y/H63D genotype was also associated with a milder degree of iron overload, translated by a lower median transferrin saturation coefficient (52.0 versus 84.0%, $p < 0.0001$) and a smaller median amount of iron removed (2.1 versus 3.6 g, $p < 0.0001$), despite median serum ferritin were similar. Environmental factors were also significantly more frequent in C282Y/H63D patients (excessive alcohol consumption: 27.5 versus 13.9%, $p = 0.0252$; overweight: 67.3 versus 39.4%, $p = 0.0003$). Moreover, if the impact of the C282Y/H63D genotype was comparable to that of the C282Y/C282Y genotype, we should have observed it 14 times more frequently in our study population (OR = 0.07 [0.03-0.18], $p < 0.0001$). This study confirms the very relative

Pour citer cet article : Scotet V, Saliou P, Mérouc MC, Mercier AY, Chanu B, Berquier C, Le Gac G, Férec C. Hémochromatose de type I : quid du génotype C282Y/H63D ? *Env Risque Sante* 2011 ; 10 : 190-4. doi : 10.1684/ers.2011.0456

doi : 10.1684/ers.2011.0456

weight of the C282Y/H63D genotype in the occurrence of iron overload and the predominant role of comorbid factors.

Key words: *genotype; hemochromatosis; iron overload; precipitating factors.*

Caractérisée par une surcharge en fer dans l'organisme, l'hémochromatose de type I est la maladie autosomique récessive la plus répandue dans les populations caucasiennes, avec une prévalence de l'ordre de trois sur mille [1, 2]. Cette maladie se caractérise par une absorption excessive du fer au niveau de l'intestin et une libération accrue du fer recyclé par les macrophages, ayant pour conséquence l'accumulation progressive de ce fer dans différents tissus parenchymateux de l'organisme (notamment le foie, le pancréas et le cœur) et, à terme, l'altération de la structure et de la fonction de ces organes.

L'histoire naturelle de la maladie comporte trois phases qui se déclinent en cinq stades (figure 1) :

- une phase de latence (stade 0) ;
- une phase d'expression biologique, qui débute rarement avant l'âge de 20 ans. À ce stade, les premiers stigmates de l'excès de fer dans l'organisme apparaissent et se traduisent par une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (témoignant d'une surcharge plasmatique ; stade 1), puis de la concentration de la ferritine sérique (témoignant d'une surcharge tissulaire ; stade 2) ;
- une phase d'expression clinique, qui se manifeste par des symptômes non spécifiques survenant généralement vers l'âge de 40 ans chez les hommes et de 50 ans chez les femmes. La maladie va tout d'abord associer des

signes altérant la qualité de vie des patients (stade 3) : asthénie, douleurs ostéo-articulaires, hépatomégalie, mélanodermie, atteinte cardiaque, ... À un stade plus avancé (stade 4), elle va évoluer vers des atteintes pouvant compromettre le pronostic vital (diabète, cirrhose, hépatocarcinome...).

L'hémochromatose de type I est l'une des seules maladies génétiques à bénéficier d'un traitement simple, peu onéreux et efficace dès lors qu'il est mis en place précocement. Le traitement repose sur des saignées itératives et comporte deux phases : une phase d'attaque (visant à normaliser la quantité de fer dans l'organisme) et une phase d'entretien (visant à éviter la réaccumulation de fer). Une prise en charge précoce permet de prévenir le développement de complications irréversibles et assure aux patients une espérance de vie similaire à celle de la population générale [1, 2].

Du point de vue génétique, l'hémochromatose de type 1 se transmet sur le mode autosomal récessif. Le gène responsable, le gène *HFE*, a été identifié en 1996 sur le chromosome 6 [4]. Il comporte une mutation majoritaire - C282Y (p.[Cys282Tyr]) - qui est présente à l'état homozygote chez 80 à 90 % des patients originaires du Nord de l'Europe. Cette mutation, dont l'implication a été confirmée par des tests fonctionnels, constitue aujourd'hui le critère diagnostique principal de la maladie.

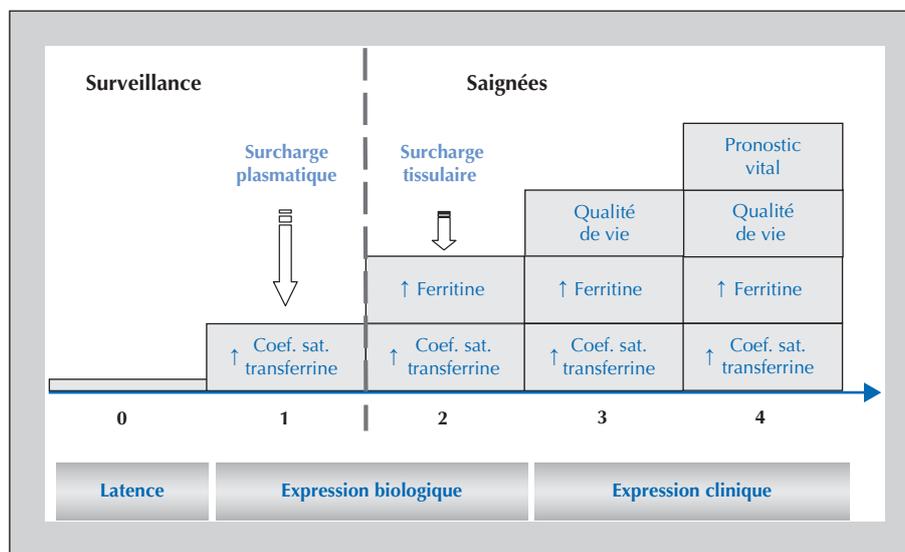


Figure 1. Schéma représentant les différents stades de l'hémochromatose (d'après [3]).

Figure 1. The different stages of hemochromatosis (modified from [3]).

Les connaissances acquises sur cette pathologie ont considérablement progressé depuis la découverte du gène *HFE* [2]. D'autres formes d'hémochromatoses, associées à des âges de survenue et à des modes de transmission différents, ont été identifiées (type 2A, 2B, 3 et 4 liées respectivement aux gènes *HJV*, *HAMP*, *TFR2* et *SLC40A1*). Le rôle de l'hepcidine, hormone clé de la régulation de l'homéostasie du fer, a également été mis en évidence. Il a, par ailleurs, été démontré que le génotype C282Y/C282Y présentait une pénétrance incomplète et une expressivité variable, modulée par des facteurs génétiques (gènes modificateurs) et environnementaux [5-7].

Parmi les facteurs d'environnement, certains contribuent à accroître le stock de fer dans l'organisme (alimentation riche en fer, supplémentation en fer, consommation excessive d'alcool...), tandis que d'autres visent à réduire la surcharge en fer (dons réguliers de sang, pertes de sang physiologiques [grossesses, menstruations] ou chroniques). Il semblerait par ailleurs que la vitamine C favorise l'absorption du fer provenant de l'alimentation tandis que les tanins auraient un effet inverse [5-7].

À côté de la mutation majoritaire C282Y, on retrouve également la variation H63D (p.[His63Asp]), mais l'association du génotype C282Y/H63D avec la pathologie reste encore très discutée aujourd'hui [8-10]. En effet, ce génotype est associé à une surcharge en fer plus modérée, le plus souvent marquée par une hyperferritinémie d'origine multifactorielle (compliquée par des facteurs secondaires : syndrome métabolique, consommation excessive d'alcool, syndrome inflammatoire, cytolyse) [11]. L'objectif de cette étude était donc de déterminer le poids du génotype C282Y/H63D dans la survenue d'une surcharge en fer chez les patients admis en protocole de saignées itératives et d'apprécier le rôle des différents facteurs d'environnement.

Population d'étude et méthode

Cette étude incluait les patients intégrés en protocole de saignées au sein de l'Établissement de transfusion sanguine de Brest entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2007. Notre attention s'est focalisée sur les patients porteurs des génotypes C282Y/C282Y et C282Y/H63D.

L'étude s'est appuyée sur les données colligées via un questionnaire clinique complété par les médecins référents à l'entrée dans le protocole de saignées. Ce questionnaire renseigne sur des caractéristiques socio-démographiques (sexe, âge au diagnostic...), des habitudes de vie, des facteurs d'environnement (poids, taille, consommation d'alcool...), des paramètres biologiques et des signes cliniques associés au moment du diagnostic, ainsi que sur la quantité de fer soustrait par saignées itératives (en grammes) pour atteindre une quantité de ferritine sérique inférieure à 100 µg/L.

L'analyse statistique a consisté à comparer le profil des patients C282Y/C282Y et C282Y/H63D en termes de degré de surcharge en fer et de fréquence de facteurs environnementaux. La consommation d'alcool a été jugée excessive dès lors que la consommation journalière dépassait trois verres chez les hommes et deux verres chez les femmes (valeurs seuils définies par l'Organisation mondiale de la santé [OMS]). Le surpoids correspondait à un indice de masse corporelle (IMC) ≥ 25 kg/m² et l'obésité à un IMC ≥ 30 kg/m². Nous avons appliqué des modèles de régression linéaire pour étudier l'influence du génotype sur le degré de surcharge en fer (avec transformation logarithmique des variables d'intérêt).

Enfin, nous avons comparé la prévalence des génotypes C282Y/H63D chez les patients inclus en protocole de saignées à celle observée dans la population générale (à partir d'un échantillon de 797 donneurs de sang de notre région).

Résultats

L'étude incluait 172 patients C282Y/C282Y et 59 patients C282Y/H63D.

Le groupe de patients C282Y/H63D présentait une proportion d'hommes plus élevée (71,2 *versus* 56,4 %, $p = 0,0452$) et un âge moyen au diagnostic plus tardif (56,9 *versus* 49,2 ans, $p < 0,0001$).

Le génotype C282Y/H63D était également clairement associé à un degré de surcharge en fer plus modéré (tableau 1), ce qui se traduisait par un coefficient de saturation de la transferrine médian inférieur (52,0 *versus* 84,0 %, $p < 0,0001$) et, une quantité de fer soustrait moindre (2,1 *versus* 3,6 g, $p < 0,0001$). En accord avec ces données, il importe de noter qu'un coefficient de saturation de la transferrine égal ou supérieur à 80 % était observé chez une très faible proportion de patients C282Y/H63D (3,8 *versus* 58,0 %, $p < 0,0001$). Le rôle plus modeste de ce génotype sur le degré de surcharge en fer était confirmé par l'analyse de régression linéaire multivariée. Ainsi, après ajustement sur le sexe, l'âge au diagnostic et la consommation d'alcool, le coefficient de saturation de la transferrine apparaissait 1,6 fois moins élevé chez les patients C282Y/H63D (10b = 0,64, IC95 % : [0,58-0,71], $p < 0,0001$), et la quantité de fer soustraite 1,3 fois moins élevée (10b = 0,78, IC95 % : [0,71-0,85], $p < 0,0001$). La différence observée au niveau du degré de surcharge en fer contrastait avec la différence moins marquée au niveau de la ferritinémie (médiane : 525,0 *versus* 692,0 µg/L, $p = 0,0838$).

Enfin, les facteurs d'environnement étaient également significativement plus fréquents chez les patients C282Y/H63D. Ainsi, une consommation excessive d'alcool était déclarée par 27,5 % de ces patients *vs* 13,9 % des patients C282Y/C282Y ($p = 0,0252$). Une surcharge pondérale était observée respectivement chez 67,3 *versus* 39,4 % des patients ($p = 0,0003$) et des résultats similaires étaient

Tableau 1. Valeurs médianes du coefficient de saturation de la transferrine, de la quantité de fer soustraite et de la concentration de la ferritine selon le génotype.

Table 1. Median values of the transferrin saturation coefficient, of the amount of iron removed, and of the serum ferritin concentration according to genotype.

		C282Y/C282Y médiane [Q1 ; Q3]	C282Y/H63D médiane [Q1 ; Q3]	p-value
Coefficient de saturation de la transferrine (%)	(28 vm)	84,0 [67,0 ; 92,0]	52,0 [40,0 ; 60,0]	<0,000 1
Hommes		87,5 [75,7 ; 94,3]	57,0 [45,5 ; 68,3]	<0,000 1
Femmes		73,5 [64,3 ; 88,7]	42,0 [37,0 ; 51,0]	<0,000 1
Quantité de fer soustraite (g)	(6 vm)	3,6 [1,8 ; 5,7]	2,1 [1,2 ; 2,7]	<0,000 1
Hommes		5,2 [3,2 ; 7,0]	2,4 [1,7 ; 2,9]	<0,000 1
Femmes		2,1 [1,5 ; 3,4]	1,4 [1,0 ; 2,6]	0,059 5
Ferritine (ng/mL)	(0 vm)	692,0 [392,8 ; 1 264,0]	525,0 [409,5 ; 927,0]	0,081 8
Hommes		927,0 [649,0 ; 1 700,0]	639,5 [440,5 ; 1 044,0]	0,001 0
Femmes		414,0 [273,5 ; 700,0]	422,0 [300,0 ; 665,0]	0,764 5

observés pour l'obésité (21,8 versus 10,6 %, $p = 0,0361$). Au total, près de trois quarts des patients C282Y/H63D présentaient au moins un de ces facteurs d'environnement (72,9 versus 49,4 %, $p < 0,0001$). En termes de fréquences, nous avons constaté que le génotype C282Y/H63D était 4,9 fois plus fréquent que le génotype C282Y/C282Y dans la population finistérienne (4,3 versus 0,9 %). En revanche, il était 2,9 fois moins fréquent chez les patients admis en protocole de saignées (19,2 versus 56,0 %). Par conséquent, si l'impact du génotype C282Y/H63D était comparable à celui du génotype C282Y/C282Y, nous aurions dû l'observer 14 fois plus dans notre population d'étude (OR = 0,07 [0,03-0,18], $p < 0,0001$).

Conclusion

Cette étude confirme le poids très relatif du génotype C282Y/H63D dans la survenue d'une surcharge en fer. Les patients porteurs de ce génotype sont moins fréquents qu'attendu. Ils sont diagnostiqués à un âge plus avancé et plus fréquemment porteurs de facteurs secondaires

pouvant à eux seuls expliquer une hyperferritinémie. Au regard de ces résultats, il est intéressant de rappeler que le génotype C282Y/H63D n'a que très rarement été rapporté dans un contexte familial. Nous n'avons, dans notre propre expérience, jamais observé de famille comportant deux ou plusieurs sujets porteurs du génotype C282Y/H63D et présentant une surcharge en fer.

Le variant H63D apparaît donc comme un discret facteur génétique de susceptibilité dont l'expression est surtout visible en association avec d'autres cofacteurs comme le surpoids et/ou l'alcool.

Cette situation particulière devrait conduire à une réflexion sur la prise en charge thérapeutique des patients C282Y/H63D, étant entendu que les recommandations actuelles sont basées sur des situations avérées d'hémochromatose et qu'une partie importante des patients considérés pourraient tirer bénéfice de recommandations hygiéno-diététiques. ■

Remerciements et autres mentions

Financement : aucun ; **conflits d'intérêts** : aucun.

Références

1. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, et al. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988 ; 318 : 1355-62.
2. Pietrangelo A. Hereditary haemochromatosis: a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2383-97.
3. Brissot P, Troadec MB, Loréal O. The clinical relevance of new insights in iron transport and metabolism. *Curr Hematol Rep* 2004, 3 : 107-15.
4. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996 ; 13 : 399-408.
5. Rochette H, Le Gac G, Lassoued K, et al. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet* 2010 ; 128 : 233-48.
6. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, et al. Penetrance of 845G>A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002 ; 359 : 211-8.

7. Pedersen P, Milman N, et al. Extrinsic factors modifying expressivity of the HFE variant C282Y, H63D, S65C phenotypes in 1,294 Danish men. *Ann Hematol* 2009 ; 88 : 957-65.
8. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology* 2009 ; 50 : 94-101.
9. Cheng R, Barton JC, Morrison ED, et al. Differences in hepatic phenotype between hemochromatosis patients with HFE C282Y homozygosity and other HFE genotypes. *J Clin Gastroenterol* 2009 ; 43 : 569-5673.
10. Walsh A, Dixon JL, Ramm GA, et al. The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006 ; 4 : 1403-10.
11. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, et al. Hyperferritinemia not related to hemochromatosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2009 ; 33 : 323-6.

Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in *HFE* C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study

Philippe Saliou^{1,2,3,4}, Gérald Le Gac^{1,2,3,5}, Anne-Yvonne Mercier³, Brigitte Chanu³, Paul Guéguen^{1,2,3,5}, Marie-Christine Mérour³, Isabelle Gourlaouen³, Sandrine Autret⁵, Cédric Le Maréchal^{1,2,3,5}, Karen Rouault^{1,2,3,5}, Jean-Baptiste Nousbaum^{1,2,3,6}, Claude Férec^{1,2,3,5}, Virginie Scotet^{1,2,3*}

1 Inserm, UMR 1078, Brest, France, **2** Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, **3** Etablissement Français du Sang – Bretagne, Brest, France, **4** CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire d'hygiène et de santé publique, Brest, France, **5** CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité, Brest, France, **6** CHRU Brest, Hôpital La Cavale Blanche, Service d'Hépatogastroentérologie, Brest, France

Abstract

Despite type I haemochromatosis (HC) is mainly associated with the *HFE* C282Y/C282Y genotype, a second genotype - C282Y/H63D- has mostly been described in other patients. Its association with HC, apart from any associated co-morbid factors, remains unclear and complex to interpret for physicians. This study assesses the weight of this genotype and the role of co-morbid factors in the occurrence of iron overload. This prospective study included the C282Y/C282Y (n = 172) and C282Y/H63D (n = 58) patients enrolled in a phlebotomy program between 2004 and 2007 in a blood centre of western Brittany (Brest, France), where HC is frequent. We compared prevalence of these two genotypes, as well as patients' profile regarding degree of iron overload and prevalence of co-morbid factors. First, we confirmed the obvious deficit of C282Y/H63D compound heterozygotes among patients cared by phlebotomies. This genotype was 3.0 times less frequent than the C282Y/C282Y genotype among those patients (18.9% vs. 56.0%) whereas it was 4.9 times more frequent in the general population (4.3% vs. 0.9%; p < 0.0001). Despite a similar level of hyperferritinaemia, the C282Y/H63D patients who came to medical attention had a milder plasma iron overload, reflected by a lower transferrin saturation median (52.0% vs. 84.0%; p < 0.0001). They also exhibited more frequently co-morbid factors, as heavy drinking (26.0% vs. 13.9%; p = 0.0454), overweight (66.7% vs. 39.4%; p = 0.0005) or both (21.3% vs. 2.6%; p < 0.0001). Ultimately, they required a lower amount of iron removed to reach depletion (2.1 vs. 3.4 g; p < 0.0001), clearly reflecting their lower tissue iron. This study confirms that H63D is a discrete genetic susceptibility factor whose expression is most visible in association with other co-factors. It highlights the importance of searching for co-morbidities in these diagnostic situations and of providing lifestyle and dietary advice.

Citation: Saliou P, Le Gac G, Mercier A-Y, Chanu B, Guéguen P, et al. (2013) Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in *HFE* C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study. PLoS ONE 8(12): e81128. doi:10.1371/journal.pone.0081128

Editor: James R. Connor, Penn State Hershey Medical Center, United States of America

Received: May 7, 2013; **Accepted:** October 9, 2013; **Published:** December 5, 2013

Copyright: © 2013 Saliou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a grant from the Etablissement Français du Sang. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: virginie.scotet@inserm.fr

Introduction

Haemochromatosis (HC; EASL consensus conference 2000 [1]) refers to a group of inborn errors of iron metabolism characterized by increased absorption of dietary iron and rapid iron release from macrophages. If not diagnosed and treated early, iron loading can lead to tissue damages and severe clinical complications, including cirrhosis, hepatocellular carcinoma and cardiomyopathy [2]. The treatment relies on regular phlebotomies that are, in our country, mostly managed in blood centres.

The best-known and predominant form of HC is an adult-onset autosomal recessive condition mostly associated with the *HFE* C282Y homozygous genotype (p.[Cys282Tyr]+[Cys282Tyr] according to the recommendations of the Human Genome Variation Society - <http://www.hgvs.org>). This genotype is carried by approximately 1 person in 200 in Northern European populations [3]. However, not all of them develop clinical features

of HC. Full expression of iron overload in people with this genotype depends on age and gender, plus the complex interplay of environmental factors and modifier genes [4–5].

A second *HFE* variant – H63D (p.[His63Asp]) – has been identified in HC patients but its relation with disease remains unclear. An important enrichment of this variant has initially been reported on the non-C282Y alleles of HC patients [6], and it has subsequently been argued that the C282Y/H63D compound heterozygous genotype (p.[Cys282Tyr]+[His63Asp]), but not the H63D homozygous genotype (p.[His63Asp]+[His63Asp]), increases the disease risk [7–8]. Although relating to a very low penetrance [4,9–11], detection of C282Y/H63D compound heterozygotes was therefore recommended in the outline of most (if not all) diagnostic strategies in patients with suspected HC. In recent years, the perception of the H63D variant, which is highly prevalent in Caucasians (average allelic frequency of 14% [12]), has moved toward the notion of a susceptibility factor *i.e.* a variant

that has no impact on disease if considered in isolation. It has thus been reported that most of compound heterozygotes with iron overload usually have associated co-morbid factors (such as heavy drinking and obesity) [13].

It is therefore probable that co-morbid factors are more frequent in C282Y/H63D heterozygotes diagnosed than in C282Y/C282Y homozygotes because of an hyperferritinemia, and that hyperferritinemia observed in most of C282Y/H63D compound heterozygotes does not totally match with the classical iron overload hallmarks of HC. If checked, this assumption will emphasize the importance of acting on co-morbid factors during care.

The aim of our study was to assess the profile of the C282Y/H63D patients treated by phlebotomies and to investigate the role of the co-morbid factors in the phenotypic expression. For that, we analysed a cohort of patients cared in a blood centre of western Brittany (France), where HC is particularly common [14]. We clearly show here that co-morbid factors (such as alcohol abuse and overweight) are significantly more prevalent in C282Y/H63D patients who come to medical attention than in C282Y/C282Y patients.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study protocol was approved by our local ethical committee (University Hospital of Brest). Written informed consent was obtained from each patient included in the study.

Study Population

The present study was conducted from the cohort of patients enrolled in a phlebotomy program in a blood centre of western Brittany (Brest, France) between January 1st 2004 and December 31st 2007 (year from which the H63D was not systematically searched for in our laboratory) ($n = 325$). These patients were referred to the blood centre by general practitioners or gastroenterologists, for the achievement of phlebotomies because they had elevated serum ferritin ($\geq 300 \mu\text{g/L}$ for males or $\geq 200 \mu\text{g/L}$ for females).

Our attention was mainly focused on patients carrying the *HFE* C282Y/C282Y or C282Y/H63D genotypes ($n = 172$ and $n = 58$, respectively).

Case Report Form

The study relies on the data collected in a clinical questionnaire, which is completed by a referral physician at entrance in the phlebotomy program. As previously described [15], this questionnaire yields information on socio-demographic characteristics (gender, age, age at diagnosis, etc), lifestyle factors (weight, height, alcohol intake, etc), biological parameters (including transferrin saturation (TS) and serum ferritin (SF)), and clinical features associated at the time of diagnosis (asthenia, melanoderma, hepatomegaly, diabetes, cirrhosis, etc).

Data related to the treatment (number and volume of phlebotomies) are recorded thereafter, when depletion is reached. These data enable to assess the amount of iron removed (AIR; in grams) needed for normalising iron stores (*i.e.* decreasing SF below the threshold of $50 \mu\text{g/L}$).

Regarding lifestyle factors, daily consumption of alcohol was estimated by asking patients to state the number of glasses of different kinds of alcohol (beer, wine, fortified wine, hard liquor) they drank each day. In our area, people mainly drink red wine (especially during meals) and, in second line, beer. Daily consumption corresponded to the sum of the numbers of glasses

declared. Whatever the liquor, a standard drink (representing one unit of alcohol) contains the same amount of pure alcohol (ethanol), namely 10 grams in our country. Thereby, in France, a glass of 25 cl of beer (at 5°), of 10 cl of wine (12°), of 7 cl of fortified wine (18°) or of 3 cl of spirits (40°) contains about 10 grams of pure alcohol. In accordance with the WHO definition, alcohol intake was considered abusive when consumption exceeded 3 glasses per day for men (*i.e.* 21 glasses per week) and 2 glasses per day for women (*i.e.* 14 glasses per week). The second studied co-morbid factor – overweight – was defined by a body mass index (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ and obesity by a BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.

Measurement of Iron Markers and Genetic Analysis

Iron markers were measured by standard biochemical methods. The C282Y and H63D variants were studied using the 5'-nuclease allelic discrimination method or TaqMan method (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the SAS software (version 9.02; SAS Institute Inc, Cary, NC). All tests were performed two-sided, and a p-value less than 5% was considered significant.

First, we first described the socio-demographic characteristics of the population under study. Then, we assessed the impact of the C282Y/H63D genotype and proceeded, for that, in three steps:

- 1) We quantified the deficit of C282Y/H63D compound heterozygotes observed among patients who come to medical attention. For that, we determined the prevalence of the C282Y/H63D and C282Y/C282Y genotypes in the study population (*i.e.* among patients enrolled in a phlebotomy programme) and compared it to that observed in the general population (*i.e.* in a sample of 797 blood donors from our area).
- 2) We compared the nature and severity of iron overload (assessed by TS, SF and AIR) in C282Y/H63D and C282Y/C282Y patients who came to medical attention. We performed linear regression analysis to investigate the influence of the genotype on the level of iron overload. We performed logarithmic transformation (\log_{10}) of the dependant variables (*i.e.* TS, SF and AIR) in order to normalise their distribution that were highly skewed. With \log_{10} transformation, the estimated regression coefficients (β) corresponded to a 10^β time change in the dependant variable per unit increase in the explanatory variables. After univariate analyses, multivariate models were fitted to enable adjustment on potential confounding factors, such as gender, age at diagnosis, alcohol intake and overweight. Two-by-two interactions were also tested.
- 3) We examined whether the C282Y/H63D patients had more commonly co-morbid factors known to cause hyperferritinemia (alcohol abuse and overweight). We therefore compared the frequency of these factors in the two genotypic groups.

Results

Description of the Study Population

Over the study period, 325 patients were enrolled in a phlebotomy program at the blood centre of Brest. *HFE* genotypic data were complete for 306 of them (94.2%). Among these patients, 172 were C282Y/C282Y homozygotes and 58 C282Y/H63D compound heterozygotes. The group of C282Y/H63D

patients cared by phlebotomies tended to have a higher proportion of men (70.7% *vs.* 56.4%; $p=0.0547$) and was on average diagnosed later (56.9 *vs.* 49.3 y.; $p<0.0001$) than the group of C282Y/C282Y patients.

Frequency of the Different HFE Genotypes

One way to confirm the milder effect of the C282Y/H63D genotype was to compare the prevalence of the various HFE genotypes observed respectively in the group of patients treated by phlebotomies and in the general population (Table 1).

The C282Y/H63D genotype appears relatively common in our population. It is carried by 1 individual in 23 (*i.e.* 4.3%) whereas the C282Y/C282Y genotype is found in 1 individual in 110 (*i.e.* 0.9%). The H63D and C282Y allele frequencies are 14.3% (95% confidence interval (CI), 12.6–16.0) and 9.6% (95% CI, 8.2–11.0), respectively.

By focusing on the C282Y/C282Y and C282Y/H63D genotypes, we observed that, in the general population, the C282Y/H63D genotype was 4.9 times more frequent than the C282Y/C282Y genotype (4.3% *vs.* 0.9%). However, this genotype appeared 3.0 times less frequent than the main genotype among patients enrolled in a phlebotomy program (18.9% *vs.* 56.0%). This confirmed the obvious deficit of C282Y/H63D compound heterozygotes among patients cared by phlebotomies. We estimated that they were 14.4 times less frequently observed (OR, 0.07; 95% CI, 0.03–0.17; $p<0.0001$). As expected, most of the patients carrying this genotype did not come to medical attention because of their mild, if any, iron overload.

Degree of Iron Overload

We then compared the severity of iron overload in C282Y/H63D and C282Y/C282Y patients treated by phlebotomies. As illustrated in Table 2, the C282Y/H63D genotype was clearly associated with a milder iron overload. The amount of plasma iron was milder in these patients, as reflected by a lower median TS (52.0% *vs.* 84.0% for the C282Y/C282Y patients; $p<0.0001$). One third of them (32.7%) had a TS value $<45\%$ and did not meet the diagnostic criteria of HC. Only a very small proportion of these patients had a TS value $\geq 80\%$ (3.9% *vs.* 58.0%; $p<0.0001$). It should be noted that TS was not determined in 28 patients (22 homozygotes and 6 compound heterozygotes) that were taken in care at the end of 2007 when the non-payment of this examination by our health insurance was introduced.

Similar findings were obtained with the AIR by phlebotomies, which is a good marker of the iron burden. This marker was indeed significantly lower in the C282Y/H63D patients cared by phlebotomies than in the C282Y/C282Y ones (median: 2.1 *vs.* 3.4 g; $p<0.0001$).

The milder role of the C282Y/H63D genotype on the level of iron overload was confirmed by linear regression analysis (Table 3). The multivariate analysis showed that, after adjustment for gender, age at diagnosis, alcohol intake and overweight, TS was 1.56 fold lower in the C282Y/H63D patients (10^{β} , 0.64; 95% CI, 0.58–0.71; $p<0.0001$), and AIR 1.29 fold lower (10^{β} , 0.78; 95% CI, 0.71–0.85; $p<0.0001$).

In contrast, the level of hyperferritinaemia appeared similar between the two genotypic groups (median, 529.0 *vs.* 692.0 mg/L; $p=0.1003$). Nevertheless, after adjustment on potential confounders, the role of the genotype on SF became significant. This marker was 1.47 fold lower in the C282Y/H63D patients (10^{β} , 0.68; 95% CI, 0.55–0.85; $p=0.0009$).

Frequency of Co-morbid Factors

Finally, we checked whether the C282Y/H63D patients who came to medical attention had more commonly co-morbid factors that could explain their hyperferritinemia. Data on alcohol intake and on body mass index were not documented for 15 (6.5%) and 16 (7.0%) patients respectively, but the frequency of these missing values did not differ according to genotype ($p=0.0917$).

We observed that the co-morbid factors were significantly more frequent in the group of C282Y/H63D patients (Fig. 1). Heavy drinking was thus reported by 26.0% of those patients (*vs.* 13.9% of the C282Y/C282Y homozygotes; $p=0.0454$), and overweight was observed in 66.7% of them (*vs.* 39.4%; $p=0.0005$). Similar results tended to be observed for obesity (20.4% *vs.* 10.6%; $p=0.0663$).

In summary, three quarters of the C282Y/H63D patients had at least one of these co-morbid factors (75.0% *vs.* 51.3% of the C282Y/C282Y homozygotes; $p=0.0026$), and more than one fifth of them had the two factors (21.3% *vs.* 2.6%; $p<0.0001$). One can also note that all the C282Y/H63D patients having a SF $\geq 1000 \mu\text{g/L}$ had at least one of these lifestyle factors (*vs.* 63.0% for the C282Y/C282Y patients; $p=0.0116$).

Discussion/Conclusions

The present study confirms that the C282Y/H63D genotype is clearly associated with a milder iron overload. Patients carrying this genotype that are cared by phlebotomies have both a milder amount of plasma iron (reflected by lower TS) and of tissue iron (reflected by lower AIR required to reach depletion). These patients also exhibit more frequently co-morbid factors (as heavy drinking and/or overweight) that may alone explain their hyperferritinemia (whose level did not seem different from that of the C282Y/C282Y patients). This study confirms therefore the modest weight of the C282Y/H63D genotype and the major role of co-morbid factors in the occurrence of biological expression of HC.

The lack of C282Y/H63D genotypes among patients enrolled in a phlebotomy program is an additional argument reflecting the modest role of this genotype in the occurrence of iron overload. Indeed, we have shown here that the C282Y/H63D genotype was 3.0 times less frequent than the C282Y/C282Y genotype among patients enrolled in a phlebotomy program whereas it was 4.9 times more frequent in the general population. As expected, most of the patients carrying this genotype do not come to medical attention because of their mild, if any, iron overload.

Table 1. Frequency of HFE genotypes observed in the study population (*i.e.* among patients enrolled in a phlebotomy programme) and in the general population.

HFE genotype	Study population		General population	
	n	%	n	%
C282Y/C282Y	172	56.2%	7	0.9%
C282Y/H63D	58	18.9%	34	4.3%
H63D/H63D	18	5.9%	15	1.9%
C282Y/wt*	11	3.6%	105	13.1%
H63D/wt*	25	8.2%	164	20.6%
wt*/wt*	22	7.2%	472	59.2%
Total	306	100.0%	797	100.0%

*wt: wild type.

doi:10.1371/journal.pone.0081128.t001

Table 2. Comparison of serum markers in C282Y/H63D and C282Y/C282Y patients who were enrolled in a phlebotomy program at the blood centre of Brest (western Brittany, France) between 2004 and 2007.

	C282Y/H63D	C282Y/C282Y	p
	Median (Q1–Q3)*	Median (Q1–Q3)*	
Transferrin saturation (%)	52.0 (40.0–60.5)	84.0 (67.0–92.0)	<0.0001
Males	57.0 (47.0–69.0)	87.5 (75.5–94.5)	<0.0001
Females	42.0 (37.0–51.0)	73.5 (64.0–89.0)	<0.0001
Amount of iron removed (g)	2.1 (1.3–2.8)	3.4 (1.9–6.0)	<0.0001
Males	2.3 (1.7–2.9)	5.2 (3.2–7.0)	<0.0001
Females	1.3 (1.0–2.2)	2.1 (1.5–3.5)	0.0132
Serum ferritin (ng/ml)	529.0 (414.0–937.0)	692.0 (392.5–1293.5)	0.1003
Males	659.0 (448.0–1072.0)	927.0 (649.0–1700.0)	0.0032
Females	422.0 (300.0–665.0)	414.0 (272.0–733.0)	0.7913

*Q1: first quartile; Q3: third quartile.
doi:10.1371/journal.pone.0081128.t002

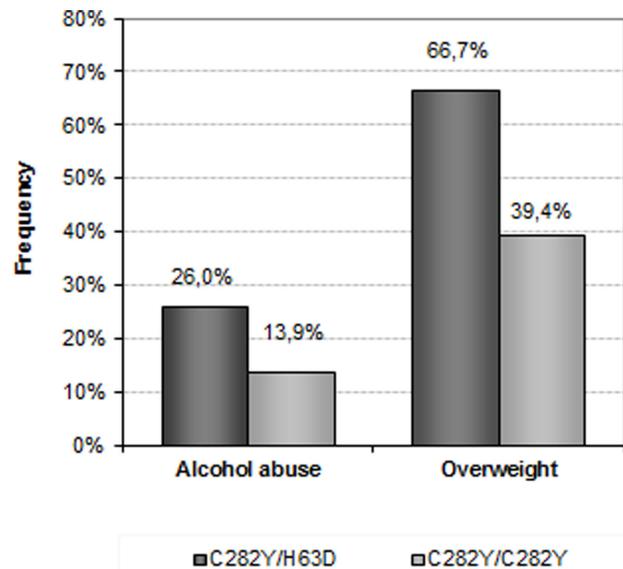
Table 3. Parameter estimates of the linear regression model testing the effect of genotype on the level of serum markers, after adjustment on covariables.

Variables	10 ^b	(95% CI)	p
Transferrin saturation			
Genotype (ref: C282Y/C282Y)	0.64	(0.58–0.71)	<0.0001
Gender (ref: women)	1.15	(1.07–1.25)	0.0005
Age at diagnosis (ref: <40 y.)			
[40 y. –50 y.]	1.07	(0.95–1.20)	0.2731
[50 y. –60 y.]	1.08	(0.96–1.21)	0.1790
≥60 y.	1.09	(0.95–1.24)	0.2235
Heavy drinking	1.05	(0.95–1.16)	0.3273
Overweight	0.92	(0.85–0.99)	0.0353
Amount of iron removed			
Genotype (ref: C282Y/C282Y)	0.78	(0.71–0.85)	<0.0001
Gender (ref: women)	1.11	(1.03–1.20)	0.0082
Age at diagnosis (ref: <40 y.)			
[40 y. –50 y.]	0.96	(0.85–1.07)	0.4472
[50 y. –60 y.]	1.00	(0.89–1.12)	0.9730
≥60 y.	0.96	(0.84–1.09)	0.5005
Heavy drinking	1.11	(1.00–1.22)	0.0441
Overweight	0.96	(0.89–1.04)	0.3459
Serum ferritin			
Genotype (ref: C282Y/C282Y)	0.68	(0.55–0.85)	0.0009
Gender (ref: women)	1.89	(1.58–2.27)	<0.0001
Age at diagnosis (ref: <40 y.)			
[40 y. –50 y.]	1.16	(0.89–1.53)	0.2768
[50 y. –60 y.]	1.36	(1.04–1.77)	0.0250
≥60 y.	1.30	(0.97–1.75)	0.0799
Heavy drinking	1.76	(1.39–2.22)	<0.0001
Overweight	1.12	(0.94–1.34)	0.2130

doi:10.1371/journal.pone.0081128.t003

Beyond these results, it is also important to keep in mind that this C282Y/H63D genotype has only rarely been reported in a family context. In our experience, we have never seen a family with two or more sibling carrier of the genotype C282Y/H63D that present an iron overload.

It should be noted that, in our cohort, less than one third of patients had a SF ≥1000 µg/L (30.9% *i.e.* 33.7% of the C282Y/C282Y patients and 22.4% of the C282Y/H63D patients). The discovery of the HFE gene in 1996 and the availability of the DNA test have greatly changed the clinical presentation of the disease [16], and it is now rare to diagnose severe forms, associating darkened skin, diabetes and cirrhosis. Diagnosis is made at an earlier stage, particularly in areas like ours, where the prevalence of the disease is high and where physicians are very aware of the disease.

**Figure 1.** Frequency of co-morbid factors in C282Y/H63D and C282Y/C282Y patients who were enrolled in a phlebotomy program at the blood centre of Brest (western Brittany, France) between 2004 and 2007.

doi:10.1371/journal.pone.0081128.g001

The originality of our study was to investigate the role of both *HFE* genotype and co-morbid factors (alcohol, overweight) on the disease expression, this from a cohort of patients cared by phlebotomies. Our study focused on a cohort of treated patients while, so far, most studies have been conducted in the general population and attempted to estimate the penetrance of the C282Y/H63D genotype. Another strength of our study, which was performed in an area where HC is particularly common, was its ability to assess the influence of co-morbid factors. We clearly showed here that alcohol abuse and overweight were significantly more prevalent in C282Y/H63D patients in comparison to C282Y/C282Y patients.

One limitation of our study was our inability to determine the true prevalence of the metabolic syndrome, which combines the presence of several metabolic abnormalities (abdominal obesity, low HDL cholesterol, high triglycerides, glucose intolerance, hypertension) [17]. It is obvious that a part of the C282Y/H63D patients may have such a syndrome, which is known to be one of the main causes of hyperferritinemia [18]. Unfortunately, until now, our questionnaire did not collect all the information needed to clearly define it (waist circumference is not measured, making it impossible to assess the presence of abdominal obesity). Nevertheless, in absence of this indicator, we focused our attention on overweight and obesity. Furthermore, we compared the frequency of overweight observed in each genotypic group with that observed in the French population by referring to a nationwide survey on overweight (Obepi) [19]. We noticed that, if the frequency of overweight was similar to that of the general population in our cohort of C282Y homozygotes (39.4% *vs.* 46.4%; $p=0.2140$), it was significantly higher in compound heterozygotes (67.3% *vs.* 46.4%; $p=0.0340$). This confirms the role of co-morbid factors in the occurrence of iron overload in the C282Y/H63D patients.

Another limitation was that the possible existence of modifier genes. We re-sequenced the five genes associated with haemochromatosis (*HFE*, *HAMP*, *HJV*, *TFR2*, *SLC40A1*) in 23 C282Y/H63D patients for whom DNA was available (knowing that the initial analysis of *HFE* gene was not carried out by our laboratory for all patients). These genes are involved in the same physiological pathway that controls production of hepcidin to fit body iron needs and avoid iron accumulation in tissues. No variation that could influence phenotypes observed in the 23 C282Y/H63D patients has been detected; only synonymous variants or common variations with no physiological consequence were observed. We are aware that rare variants in non-*HFE* genes can influence iron burden in C282Y/H63D patients. However we believe that they can be neglected in this study and that environmental factors are prominent in our patient sample.

Our findings are consistent with data reported in the literature illustrating that the perception of the H63D variant has moved, in recent years, toward the notion of susceptibility factor (*i.e.* a variant with no impact on disease if considered in isolation). In support of this, Gurrin *et al.* have evidenced, in a prospective and longitudinal study, that compound heterozygotes had an increased prevalence of elevated SF compared to subjects with neither the C282Y mutation nor the H63D variant, but that mean SF levels at baseline and follow-up remained within the normal range [11].

References

- Adams P, Brissot P, Powell LW (2000) EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 33: 485–504.
- Pietrangelo A (2007) Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46: 1291–1301.
- Le Gac G, Ferec C (2005) The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet* 13: 1172–1185.

The authors were not able to determine whether C282Y/H63D heterozygotes with significant hyperferritinemia had co-morbid factors. In another study, Walsh *et al.* found that compound heterozygotes referred for clinical evaluation had higher iron indices than those identified through family screening. The authors extended their observations showing that of the C282Y/H63D subjects with a significant hyperferritinemia, all had known co-morbid factors such as heavy drinking or obesity [13]. It has also been showed that C282Y heterozygotes with a haemochromatosis pattern of hepatic iron overload are more likely to have a private mutation on the second *HFE* allele [20–21], while secondary causes of hyperferritinemia are frequent in C282Y heterozygotes without documented iron overload-related disease [21].

Regarding penetrance, a recent study, based on a cohort of 6020 Danish men aged 30 to 53 years has estimated the biological penetrance at 87.5% for the C282Y homozygotes and at only 9.1% for the C282Y/H63D compound heterozygotes (based on $TS \geq 50\%$ and $SF \geq 300 \mu\text{g/L}$) [10]. An other study recently performed in a Spanish Mediterranean population composed of 815 healthy subjects aged between 18 and 75 y. has reported that the C282Y/H63D genotype was associated with a 16.4% increase in TS and that it explained 37.7% of the variability observed in SF values [22].

Beyond this, we should also keep in mind that, at protein level, the H63D does not alter the *HFE* protein structure, in contrast to the C282Y that prevents interaction with beta₂-microglobulin and presentation on cell surface [23–24].

In conclusion, our study provides evidence for the milder effect of the C282Y/H63D genotype in comparison to the C282Y/C282Y genotype by three ways: 1) through the lower frequency of this genotype among patients cared by phlebotomies than expected, 2) through the higher prevalence of associated co-morbid factors in these patients 3) and finally through the milder degree of iron overload in these patients.

Our results combined with data from the literature underline that the H63D variant, which is common in the general population, is a discrete genetic susceptibility factor whose expression is most visible in association with other co-factors such as alcohol abuse and/or overweight. Our study clearly highlights the importance of searching for co-morbidities in these diagnostic situations and of acting on these factors during care. In most cases, lifestyle and dietary advices should be sufficient to reduce the number of phlebotomies requested in those patients. This work should therefore contribute to improve the management of haemochromatosis patients.

Acknowledgments

The authors are grateful to Emmanuelle GENIN from Inserm (France) for her assistance on population genetic issues.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VS GLG CF. Performed the experiments: MCM IG SA. Analyzed the data: VS PS GLG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PG CLM KR. Wrote the paper: VS GLG CF. Patient inclusion and data collection: AYM BC JBN.

6. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, et al. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13: 399–408.
7. Beutler E (1997) Genetic irony beyond haemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *Lancet* 349: 296–297.
8. Risch N (1997) Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. *Nat Genet* 17: 375–376.
9. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, et al. (2008) Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 358: 221–230.
10. Pedersen P, Milman N (2009) Genetic screening for HFE hemochromatosis in 6,020 Danish men: penetrance of C282Y, H63D, and S65C variants. *Ann Hematol* 88: 775–784.
11. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, et al. (2009) HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology* 50: 94–101.
12. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis (2010). *J Hepatol* 53: 3–22.
13. Walsh A, Dixon JL, Ramm GA, Hewett DG, Lincoln DJ, et al. (2006) The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1403–1410.
14. Jouanolle AM, Fergelot P, Raoul ML, Gandon G, Roussey M, et al. (1998) Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: penetrance of genetic hemochromatosis? *Ann Genet* 41: 195–198.
15. Scotet V, Merour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Faou T, et al. (2003) Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol* 158: 129–134.
16. Scotet V, Le Gac G, Merour MC, Mercier AY, Chanu B, et al. (2005) Impact of *HFE* genetic testing on clinical presentation of hereditary hemochromatosis: new epidemiological data. *BMC Med Genet* 6: 24.
17. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2005) The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059–1062.
18. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Brissot P (2009) Hyperferritinemia not related to hemochromatosis. *Gastroenterol Clin Biol* 33: 323–326.
19. Charles MA, Eschwege E, Basdevant A (2008) Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997–2006. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2182–2186.
20. Aguilar-Martinez P, Grandchamp B, Cunat S, Cadet E, Blanc F, et al. (2011) Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. *Haematologica* 96: 507–514.
21. Mariani R, Pelucchi S, Arosio C, Coletti S, Pozzi M, et al. (2010) 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.
22. Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arijia V (2010) Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol* 89: 767–773.
23. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, et al. (1997) The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 272: 14025–14028.
24. Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, et al. (1997) Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2- microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12384–12389.

B. Rôle des grossesses dans le degré de surcharge en fer des patientes C282Y homozygotes

L'expressivité de l'hémochromatose *HFE* se manifeste généralement plus tard chez les femmes (autour de 60 ans chez les femmes et 50 ans chez les hommes). Les femmes présentent également des tableaux cliniques et biologiques moins sévères, ce qui se traduit par des atteintes hépatiques généralement moins fréquentes (Deugnier et al., 2002; Moirand et al., 1997).

Cette différence entre hommes et femmes est classiquement attribuée à l'effet protecteur des pertes physiologiques en fer liées aux règles et aux grossesses (Bacon et al., 2011; Hanson et al., 2001; Wood et al., 2008). Cependant, aucune étude épidémiologique n'a été conduite chez l'homme pour étudier spécifiquement ce lien.

Objectif

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence des grossesses sur l'expression phénotypique des femmes qui présentent le génotype C282Y/C282Y.

Matériel et méthode

- Population d'étude

Cette étude repose sur une cohorte composée de 140 femmes présentant le génotype C282Y/C282Y et incluses dans un programme de saignées entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2011 dans le centre de santé brestois de l'Etablissement Français du Sang de Bretagne.

- Données recueillies

L'étude s'est appuyée sur les données recueillies à l'aide du questionnaire médical décrit précédemment.

- Analyses statistiques

Avant d'évaluer l'effet des grossesses sur le degré de surcharge en fer des femmes C282Y homozygotes, nous avons vérifié s'il existait dans notre cohorte une différence liée au sexe dans l'expression de la maladie. Nous avons pour cela comparé l'âge au diagnostic des femmes de notre cohorte à celui des 161 hommes traités dans le même centre de santé au cours de la même période.

Dans un second temps, nous avons décrit le nombre de grossesses déclarées par les femmes avant leur entrée en protocole de saignées. Nous avons ensuite étudié l'influence du nombre de grossesses sur le degré de surcharge en fer appréciée par la ferritinémie et la quantité de fer soustraite. Les analyses ont été menées à l'aide d'un modèle de régression linéaire après logtransformation des variables d'intérêt.

Suite à l'analyse univariée, nous avons réalisé un modèle de régression linéaire multivarié ajusté sur les facteurs de confusion tels que l'âge au diagnostic, la consommation d'alcool et le statut vis-à-vis de la ménopause.

Résultats-Conclusion

Nos résultats confirment que, chez les patients qui présentent le génotype C282Y/C282Y, le diagnostic de l'hémochromatose *HFE* est réalisé plus tardivement chez les femmes que chez les hommes (52,6 vs. 47,4 ans, $p=0,0006$). Notre étude montre également que les femmes qui déclarent avoir eu au moins une grossesse n'ont pas de surcharge en fer moins importante que les autres femmes. A l'inverse, la quantité de fer soustraite par phlébotomies apparaît significativement plus élevée chez les femmes qui ont eu au moins une grossesse mais cette association disparaît après ajustement sur les facteurs de confusion tels que l'âge au diagnostic, la consommation d'alcool ou le statut ménopausal ($e^{\beta}=1,35$, $p=0,0883$). De même, la ferritinémie n'apparaît pas plus faible chez les femmes qui ont eu au moins une grossesse ($e^{\beta}=1,32$, $p=0,1770$).

Il existe donc bien une différence d'expressivité liée au sexe. Cependant, nos données ne confirment pas l'effet protecteur typiquement attribué aux grossesses pour expliquer la plus lente accumulation de fer chez les femmes.

Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales récemment publiées dans la littérature. Ainsi une étude réalisée chez des souris servant de modèle pour l'hémochromatose a montré que les grossesses multiples ne réduisent pas les réserves en fer de l'organisme (Neves et al., 2010). Une autre étude conduite récemment également sur des souris suggère que les différences observées pourraient être liées à des facteurs hormonaux. Les auteurs ont montré que la testostérone inhibe fortement la transcription de l'hepcidine chez les souris mâles, ce qui conduit à une accumulation plus rapide et plus importante de fer dans les tissus (Latour et al., 2014).

Do pregnancies really reduce iron overload in *HFE* hemochromatosis women?

Virginie Scotet ^{1,2,3}, Philippe Saliou ^{1,2,3,4}, Marianne Uguen ^{1,2,3}, Marie-Christine Mérour ³,
Céline Triponey ³, Brigitte Chanu ³, Jean-Baptiste Nousbaum ^{1,2,3,6}, Gérald Le Gac ^{1,2,3,5},
Claude Férec ^{1,2,3,5}

Institutional affiliations

¹ Inserm, UMR 1078, Brest, France

² Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

³ Etablissement Français du Sang – Bretagne, Brest, France

⁴ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, Brest, France

⁵ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité,
Brest, France

⁶ CHRU Brest, Hôpital La Cavale Blanche, Service d'Hépatogastroentérologie, Brest, France

Emails

virginie.scotet@inserm.fr, philippe.saliou@chu-brest.fr, marianne-uguen@hotmail.fr, marie-christine.merour@efs.sante.fr,
celine.triponey@efs.sante.fr, brigitte.chanu@efs.sante.fr,
jean-baptiste.nousbaum@chu-brest.fr, gerald.legac@chu-brest.fr, claud.ferec@chu-brest.fr

Keywords

HFE hemochromatosis, iron burden, phenotypic expressivity, pregnancy, C282Y.

Contact Information

Virginie Scotet, PhD, Inserm UMR 1078, 46 rue Félix Le Dantec, CS 51819, 29218 Brest cedex 2, France. Phone: + 33 (0)2 98 44 50 64 – Fax: + 33 (0)2 98 43 05 55 – Email: virginie.scotet@inserm.fr

List of Abbreviations

TS, transferrin saturation; SF, serum ferritin; AIR, amount of iron removed; BMI, body mass index, 95% CI, 95% confidence interval; EGF, epidermal growth factor.

Financial Support

This work was supported by supported by a grant from the Etablissement Français du Sang.

ABSTRACT (274 words)

HFE hemochromatosis is an inborn error of iron metabolism linked to a regulation defect in hepcidin synthesis. This autosomal recessive disease typically manifests later in women than men. While it is commonly stated that pregnancy is, with menses, one of the factors that offsets iron accumulation in women, no epidemiological study has supported this assertion. The aim of our study was to investigate the influence of pregnancies on phenotypic expressivity of the predominant *HFE* C282Y/C282Y genotype. One hundred and forty C282Y homozygous women, enrolled in a phlebotomy programme between 2004 and 2011 at a blood centre in western Brittany (France) where *HFE* hemochromatosis is common, were included in the study. After checking whether a gender difference existed in our cohort of patients, we assessed the influence of pregnancies on iron markers using multiple linear regression analysis. Our study confirmed that women were diagnosed later than men cared over the same period (52.6 vs. 47.4 y., $p=0.0006$). Compared to no pregnancy, having had at least one pregnancy was not associated with lower iron markers. On the contrary, the amount of iron removed by phlebotomies appeared even significantly higher in women who had at least one pregnancy ($e^{\beta}=1.50$, $p=0.0472$), but this relationship disappeared after adjustment on potential confounding factors as age at diagnosis, alcohol consumption or menopausal status ($e^{\beta}=1.35$, $p=0.0883$). **Conclusion:** Our findings do not confirm that pregnancies protect against progressive iron accumulation. They support experimental data showing that multiple pregnancies did not reduce iron stores in *Hfe*^{-/-} mice, and that the gender difference may be explained by other factors (and particularly hormonal factors as the recent evidence of testosterone-induced repression of hepcidin in male mice).

HFE-related hemochromatosis (also called type 1 hemochromatosis; OMIM #235200) is an innate iron metabolic disorder that is particularly common in Caucasian populations (1, 2). This genetic disease is characterised by an inappropriately high iron absorption from enterocytes and excessive iron release from macrophages, and is due to a regulation defect in the synthesis of hepcidin, the key regulator of iron homeostasis (3-5). Excess iron in the body gradually affects various organs and lead, if not treated early, to serious clinical complications including cirrhosis, hepatocellular carcinoma and cardiomyopathy (6).

HFE hemochromatosis is inherited as an autosomal recessive trait and is mainly associated with the *HFE* C282Y (p.Cys282Tyr¹) homozygous genotype (7). The penetrance of this genotype is clearly incomplete (8-10), and its expressivity is influenced by genetic and environmental factors that may increase or reduce the iron burden (8, 11, 12).

The disease usually manifests later in women than men (about five to ten years later), and women also present a less severe clinical profile, with notably a lower prevalence of liver injury (13, 14). This gender difference has classically been attributed to the protective effects mediated by iron losses related to menses and pregnancy (15-17).

During pregnancy, maternal iron requirements increase substantially to allow for the physiological expansion of the haemoglobin mass, to promote formation of the foetus and placenta, and to cope with blood losses at delivery (18). While it is commonly stated in the literature that pregnancy-associated iron losses are one of the factors that offset the lifelong iron accumulation in women, this assertion has never been supported by any epidemiological studies in humans.

As experimental data are now accumulating to show that other factors (and particularly hormonal factors) may contribute to explain the observed gender difference (19, 20), we sought to investigate the influence of pregnancies on phenotypic expressivity of the predominant *HFE* C282Y/C282Y genotype.

¹ According to the recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org>)

PATIENTS AND METHODS

Population under study

This study evaluated a cohort of 140 C282Y homozygous hemochromatosis women who were prospectively enrolled in a phlebotomy programme over a 8-year period (between January 1st, 2004 and December 31st, 2011) at a blood centre of western Brittany (Brest, France) where this disease is particularly common (21, 22). Included patients demonstrated elevated iron markers (with transferrin saturation (TS) > 45% and serum ferritin (SF) > 200 µg/L) (1) and were referred to the blood centre for the achievement of phlebotomies by general practitioners or gastroenterologists.

The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the medical ethical committee of Brest on December 15th, 2003.

Questionnaire

This study relied on data obtained using a clinical questionnaire that is filled out for each newly diagnosed patient at the time of entry into the phlebotomy programme. As previously described (22, 23), this questionnaire, which is completed by a referral physician, yields information on socio-demographic characteristics (gender, age at diagnosis, etc.), lifestyle factors (height, weight, alcohol intake, etc.), biological parameters (including TS and SF), and clinical features present at the time of diagnosis.

The questionnaire also records data on reproductive functions. For women it informs on the presence (or not) of pregnancies prior to the start of the treatment and on the number of pregnancies if any, as well as on the menopausal status at entry into the phlebotomy programme and on the age at menopause if appropriate. It also informs on the type of contraception used if any (oral contraceptive or intrauterine device).

Patients were also asked if they were regular blood donors, if they had chronic bleedings (including gastrointestinal or parasitic infection-induced bleedings and hematuria) and if they received blood transfusions (and how many if any), all this prior to entry into the phlebotomy programme.

In addition, at the end of the depletion stage, data related to treatment (i.e., the number and average volume of the phlebotomies) are recorded by a clinical research technician. This enables assessment of the amount of iron removed (AIR; in grams) for normalising the patient's iron stores, i.e., for decreasing SF below the threshold of 100 $\mu\text{g/L}$. This calculation is performed assuming that 1 L of blood contains 0.5 g of iron (24). In our study, SF and AIR were the two dependant variables that represented the phenotypic expressivity.

Measurement of iron markers and genetic analysis

Iron markers were measured using standard biochemical methods. *HFE* genotyping was performed by real time PCR (5'- nuclease allelic discrimination method; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SAS software (version 9.02; SAS Institute Inc., Cary, NC). All tests were performed two-sided, and the significance level was set at 5% for all analyses.

First, we described the baseline characteristics of the population under study. Continuous variables were described by means and standard deviations, or quartiles and interquartile ranges, and compared using Student's *t* test, Anova or Mann-Whitney

nonparametric test. Categorical variables were summarised using percentages, and compared using χ^2 test or Fisher's exact test when appropriate.

Before assessing the effect of pregnancies, we searched to evaluate whether a gender difference in disease expression existed in our cohort of patients. For this, we compared the age at diagnosis of women to that observed in the men cared over the same period in our blood centre (n=161) (using Student's *t* test). We also evaluated whether the proportion of diagnosed female patients increased with the age at diagnosis or, in other words, if the sex ratio $_{(M/F)}$ decreased with the age at diagnosis (using a linear trend χ^2 test).

In a second time, we described the number of pregnancies declared by women prior to entry into the phlebotomy programme. We then investigated the influence of pregnancies on the degree of iron burden (assessed by SF and AIR) using linear regression analysis. We checked the normality of these quantitative outcome variables using the Kolmogorov-Smirnov test, and as their distributions were highly skewed, we performed logarithmic (ln) transformations to normalise the data. With such a transformation, the exponential of the estimated regression coefficients (e^β) indicated from how many times the outcome variable was changed (increased or decreased) for each unit increment in explanatory variables. The "pregnancy" variable was coded in three groups (0, 1 or 2, 3 or more) in order to detect a possible dose-response relationship. After univariate analyses, multivariate models were fitted to enable adjustment for potential confounding factors, such as age at diagnosis, alcohol intake, overweight and menopausal status. All explanatory variables associated with the outcome variables at a conservative threshold of $p < 0.20$ in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.

In the present study, abusive alcohol intake was defined, in accordance with the World Health Organization definition, as daily consumption exceeding two glasses per day (i.e., 14 glasses per week) for women. Overweight status was defined as a body mass index (BMI) ≥ 25 kg/m².

RESULTS

Baseline characteristics of the population under study

During the study period (2004-2011), 140 C282Y homozygous hemochromatosis women were enrolled in a phlebotomy programme at the blood centre of Brest. At the time of the study, 129 of them (92.1%) completed the depletion phase.

The baseline characteristics of women included in the study are presented in table 1. These women were diagnosed in mean at the age of 52.6 years (SD=14.0). Among them, 29.1% were overweight (BMI \geq 25) and 5.1% declared having excessive alcohol consumption (\geq 20 g daily). Close to 60% of the women were menopausal at entry into the phlebotomy programme, with a mean age at menopause of 49.2 y. (median: 50 y., interquartile range: [46; 52]).

Analysis of the gender difference in expressivity of the C282Y homozygous genotype

Our study confirmed that the age at diagnosis was delayed in women in comparison to the men cared over the same period (52.6 vs. 47.4 y., $p=0.0006$). As illustrated in table 2, the sex ratio decreased significantly with the age at diagnosis, especially after the age of 50 years ($\chi^2_{\text{linear trend}}$: 10.5, $p=0.0012$). Thus, women represented about 38% of the C282Y homozygous patients diagnosed before the age of 50 (sex ratio: 1.64), 47.3% of patients diagnosed between 50 and 59 years (sex ratio: 1.12), and 64.6% of patients diagnosed after the age of 60 (sex ratio: 0.55).

Baseline characteristics of women according to the number of pregnancies

The item "pregnancy" was documented for 137 (97.9%) of the 140 C282Y homozygous women included in the study. The number of pregnancies prior to entry into the

phlebotomy programme ranged from zero to six, with an average of 2.4 pregnancies per woman (sd=1.3). Nearly 90% of the women in our sample (n=123) had at least one pregnancy before entering the protocol, with the majority of women having had two (42.3%, n=58) or three (27.0%, n=37) pregnancies. Approximately 15% of the women had four pregnancies or more (15.3%, n=21).

The baseline characteristics and the biological markers of the female patients according to the number of pregnancies (categorised in three groups: 0, 1 or 2, 3 or more) are summarised in table 3 and 4. As illustrated in table 3, the age at diagnosis, the proportion of overweight patients and the frequency of alcohol abusers did not differ significantly between the three groups. Similar results were observed for the proportion of patients with previous regular blood donations, chronic bleedings or blood transfusions. On the opposite, one can note that the proportion of postmenopausal women increased significantly with the number of pregnancies ($p=0.0022$). Table 4 shows that there was no significant difference in iron markers according to the three groups.

Influence of pregnancies on iron markers

The results of linear regression modelling of the influence of pregnancies on iron markers (SF and AIR, respectively) are summarised in tables 5 and 6. Unlike what one might expect, women having had at least one pregnancy did not present lower iron markers than women with no pregnancy.

In contrast, the univariate analysis showed that, in comparison to women with no pregnancy, the SF concentration would tend to be higher in women who had one or two pregnancies (1.25 fold higher) and in women who had three or more pregnancies (1.39 fold higher), but these results were not significant ($p=0.2882$ and $p=0.1258$, respectively). Combination of these two modalities provided similar findings ($e^{\beta}_{\geq 1 \text{ vs. } 0 \text{ pregnancy}}=1.32$, 95% confidence interval (CI): [0.88; 1.97], $p=0.1770$). Adjustment on potential confounders as age

at diagnosis, alcohol intake and menopausal status tended to neutralise the observed trends, whatever the coding used.

Similar findings were obtained for the second iron marker (Table 6). The univariate analysis showed that, in comparison to women without any pregnancy, the AIR tended to be higher both in women who had one or two pregnancies (1.49 fold higher – $p=0.0610$) and in women who had three pregnancies or more (1.51 fold higher – $p=0.0583$). These results were at the limit of the significance, and the relationship became even significant when we considered women who at least one pregnancy in comparison to women with no pregnancy ($e^{\beta}_{\geq 1 \text{ vs. } 0 \text{ pregnancy}}=1.50$, 95% CI: [1.01; 2.23], $p=0.0472$). However, this relationship disappeared after adjustment for potential confounders ($e^{\beta}_{\geq 1 \text{ vs. } 0 \text{ pregnancy}}=1.35$, 95% CI: [0.96; 1.90], $p=0.0083$). One can nevertheless see that after adjustment on age at diagnosis, alcohol consumption, menopausal status and baseline SF level, the results remains also at the limit of significance for women having one or two pregnancies. Their AIR appeared 1.41 fold higher than that of women without any pregnancy ($p=0.0581$).

DISCUSSION

Although it is commonly reported in the literature that pregnancy may be one of the factors responsible for the later manifestation of *HFE* hemochromatosis in women (15-17), our epidemiological study is the first entirely devoted to the influence of pregnancy on the phenotypic expressivity of the main *HFE* genotype in humans. Our study confirms that C282Y homozygous women are diagnosed at a later age than men, and thus corroborates the existence of a gender difference in the expressivity of this genotype. Nevertheless, our data do not confirm the protective effect typically attributed to pregnancies to explain the slower iron accumulation in women.

Regarding internal validity, our study was subject to very little selection bias for several reasons. First, it was a cohort study that included prospectively almost all of the C282Y homozygous hemochromatosis women enrolled in a phlebotomy programme at our centre over the study period (the rate of refusal to participate in the study was very small). Second, the rate of missing values for the main explanatory variable (i.e., pregnancy) was very low (~ 2.0%). Our sample was therefore fully representative of the C282Y homozygous women who come to medical attention in our area. We also ensured that the baseline characteristics of women excluded from the multivariate analysis (due to missing values) did not differ from those of included women.

Moreover, in our study, iron burden was measured using SF but also AIR, which is, when correctly determined, the reference method to assess body iron stores (25). AIR is a more reliable marker than SF, which may also be increased beyond the real degree of iron burden by excessive alcohol intake or by various disorders as metabolic or inflammatory syndromes.

We are aware that our study provides only a rough estimate of the impact of pregnancies, as our survey solely asked the number of pregnancies that women had experienced prior to their entry into the phlebotomy programme. It would have been ideal to know the dates of these pregnancies in order to measure the delay between various pregnancies, as well as the delay between the last pregnancy and beginning of the treatment. These durations may have an impact on the studied relationship.

Beyond the small sample size (our study relied on 140 women), another limitation of our study was that we did not have information on the presence of some factors susceptible to modify the iron burden. Thereby, we did not have data on: *i*) iron supplementation during pregnancy (especially as general physicians and gynecologists easily prescribe iron for anemia in pregnant women), *ii*) existence and duration of maternal breastfeeding (as amenorrhea consecutive to lactation reduces iron loss in women) and *iii*) importance of menstrual blood losses (which depends, in addition to heredity, on various factors such as weight, height, age and parity and is known to influence iron status (26)). It would have been relevant to adjust the relationships on all these potential confounding factors; however, these data are not easy to quantify precisely. Moreover, some of them may have only a small impact, as lactation whose average duration is around ten weeks in our country.

Our study was nevertheless able to take into account the menopausal status at entry into the phlebotomy programme. Our questionnaire also provides information on the use of contraceptives, but this item was completed only for premenopausal women and therefore did not able to correctly study the influence of contraceptive use on the phenotypic expressivity. The type of contraception used is known to influence the duration and intensity of bleeding. It is stated that anovulatory hormones present in contraceptive pills reduce menstrual losses by half (27), whereas intrauterine devices may double them (28). However, our study did not highlight, in premenopausal women, difference in SF and AIR according to the type of contraception used (data not shown).

To the best of our knowledge, no epidemiological study has thus far specifically investigated the relationship between pregnancies and iron burden in *HFE* hemochromatosis in humans. Some studies have nevertheless shown interest to pregnancies. In a study comparing clinical features of 176 women and 176 matched men (14), Deugnier *et al.* mentioned that they found no significant correlation between the number of pregnancies and the hepatic iron concentration or the AIR, but no data were presented. This team also observed, through a population-based screening study (13), that the number of pregnancies did not differ between 23 expressive and 19 non expressive women. More recently, the same team considered pregnancy as an adjustment variable in a model assessing the relationship between body mass index and iron burden in *HFE* hemochromatosis (29). The univariate analysis they performed found no significant difference between the number of pregnancies and the AIR by phlebotomies (≥ 6 g or < 6 g). All these data are consistent with our results.

Regarding biological plausibility, our findings seem quite credible in the current context of fertility (the fertility rate was estimated at 2.01 children per woman in our country in 2010). It is not surprising that iron losses resulting from an average of two pregnancies per woman are not sufficient to protect against this disease. However, this situation was most likely different in the past when women had more offspring.

During pregnancy, the daily requirements for iron markedly increase, from approximately 0.8 mg/day in the first trimester to ~10 mg/day during the last six weeks of gestation (18, 30-32). The physiological expansion of haemoglobin mass is assumed to bind a total of 500 mg of iron. In addition, the constitution of foetal tissue and formation of the placenta requires ~315 additional mg of iron (290 mg and 25 mg, respectively), while basal losses correspond to ~250 mg of iron (i.e., 0.9 mg/day) (30). Blood losses at delivery also accounts to 150 to 250 mg of iron. Globally, for a singleton pregnancy, a woman needs up to one gram of iron to ensure the balance of iron (depending on iron stores at the beginning of gestation) (30). These additional needs are drawn from the reserves of the mother and are transported to the foetus via the placenta. To cope with extra needs and to replenish the

maternal stores, intestinal iron absorption also increases during pregnancy (about approximately 25%) (33). A part of iron is also made available from the stopping of menses – although this is not sufficient – and prophylactic iron supplementation is usually recommended in healthy women to avoid iron deficiency anaemia.

It would have been interesting to compare the amount of iron lost during pregnancy to that lost during menses. For example, it has been shown that healthy women with normal menses lose an average of 26 to 65 mL of blood per cycle (34-36), which corresponds at most to a loss of 1 mg iron per cycle (35). Therefore, if we consider that the entire childbearing period lasts average of 40 years (from the mean age at menarche (~12 y.) until the mean age at menopause (51 y.)), the total quantity of iron lost due to menses over a lifetime is approximately 520 mg (assuming 13 cycles of 28 days per year). This quantity appears lower than that lost during one pregnancy.

Our findings are also consistent with the results of an experimental study in a mouse model (20) showing that multiple pregnancies do not reduce body iron stores in *Hfe*^{-/-} mice. The authors of this study found that all relevant clinical parameters of hemochromatosis (except TS) were not significantly decreased (or even increased) in pluriparous females compared with nulliparous females. These authors also observed that the hepatic expression of hepcidin (the master regulator of iron homeostasis) (37) and BMP6 (a key endogenous regulator of hepcidin through the BMP/SMAD signalling pathway) (38) was lower in pluriparous females, suggesting that the inhibition of intestinal iron absorption was abrogated in response to pregnancy. This study, which did not take into account menstrual blood loss (as mice do not have menses) suggests that the slower iron accumulation in C282Y homozygous women should be explained by other factors than pregnancy.

Experimental data are now accumulating to show that other factors – and particularly hormonal factors – may contribute to explain the gender difference observed. It has thus been speculated that the lower progression of liver injury in women with disease involving

reduced hepcidin expression (such as chronic hepatitis C) may be attributed to estrogens and their antifibrotic effect (39)(40).

Very recent findings revealed that the gender difference observed in diseases with reduced hepcidin expression could be explained by the negative regulation of hepcidin transcription by testosterone (19). Latour *et al.* showed that testosterone robustly represses hepcidin transcription in mice, by improving the epidermal growth factor (EGF) receptors signalling in the liver (knowing that EGF was recently shown to suppress the hepatic hepcidin synthesis (41)). The authors exhibited that selective inhibition of EGF receptor in male mice stops testosterone-induced repression and clearly increases hepcidin expression. Castration of male mice also leads to hepcidin expression increase and therefore to iron overload decrease. Therefore this work highlights that testosterone should be one major hormone responsible for the observed gender difference in regulation of iron metabolism.

In conclusion, our work challenges an old and well-established hypothesis, despite the lack of dedicated study. It does not confirm the protective effect commonly attributed to pregnancy to explain the slower iron accumulation in women. Combined with recent experimental data from the literature, our findings clearly show that the effect of pregnancy is not as important as initially announced and that the search for the factors responsible for the gender difference should continue.

REFERENCES

1. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 2010;53:3-22.
2. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 2000;33:485-504.
3. Anderson GJMGD. Iron physiology and Pathophysiology in Humans. New York: Humana Press, 2012: 697.
4. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003;361:669-673.
5. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-2093.
6. Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 2007;46:1291-1301.
7. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.
8. Bacon BR, Britton RS. Clinical penetrance of hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 2008;358:291-292.
9. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G>A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-218.
10. McCune A, Worwood M. Penetrance in hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003;102:2696; author reply 2696-2697.

11. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Ferec C, Robson KJ. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet* 2010;128:233-248.
12. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, McLaren CE, et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 2008;358:221-230.
13. Deugnier Y, Jouanolle AM, Chaperon J, Moirand R, Pithois C, Meyer JF, Pouchard M, et al. Gender-specific phenotypic expression and screening strategies in C282Y-linked haemochromatosis: a study of 9396 French people. *Br J Haematol* 2002;118:1170-1178.
14. Moirand R, Adams PC, Bicheler V, Brissot P, Deugnier Y. Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann Intern Med* 1997;127:105-110.
15. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011;54:328-343.
16. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol* 2001;154:193-206.
17. Wood MJ, Powell LW, Ramm GA. Environmental and genetic modifiers of the progression to fibrosis and cirrhosis in hemochromatosis. *Blood* 2008;111:4456-4462.
18. Milman N. Iron and pregnancy--a delicate balance. *Ann Hematol* 2006;85:559-565.
19. Latour C, Kautz L, Besson-Fournier C, Island ML, Canonne-Hergaux F, Loreal O, Ganz T, et al. Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of epidermal growth factor receptor signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatology* 2014;59:683-694.

20. Neves JV, Olsson IA, Porto G, Rodrigues PN. Hemochromatosis and pregnancy: iron stores in the Hfe-/- mouse are not reduced by multiple pregnancies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G525-529.
21. Jouanolle AM, Fergelot P, Raoul ML, Gandon G, Roussey M, Deugnier Y, Feingold J, et al. Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: penetrance of genetic hemochromatosis? *Ann Genet* 1998;41:195-198.
22. Saliou P, Le Gac G, Mercier AY, Chanu B, Gueguen P, Merour MC, Gourlaouen I, et al. Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in HFE C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study. *PLoS One* 2013;8:e81128.
23. Scotet V, Merour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Faou T, Raguenes O, Le Gac G, et al. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol* 2003;158:129-134.
24. Haskins D, Stevens AR, Jr., Finch S, Finch CA. Iron metabolism; iron stores in man as measured by phlebotomy. *J Clin Invest* 1952;31:543-547.
25. Brissot P, Bourel M, Herry D, Verger JP, Messner M, Beaumont C, Regnouard F, et al. Assessment of liver iron content in 271 patients: a reevaluation of direct and indirect methods. *Gastroenterology* 1981;80:557-565.
26. Blanco-Rojo R, Toxqui L, Lopez-Parra AM, Baeza-Richer C, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP. Influence of diet, menstruation and genetic factors on iron status: a cross-sectional study in Spanish women of childbearing age. *Int J Mol Sci* 2014;15:4077-4087.
27. Nilsson L, Solvell L. Clinical studies on oral contraceptives--a randomized, doubleblind, crossover study of 4 different preparations (Anovlar mite, Lyndiol mite, Ovulen, and Volidan). *Acta Obstet Gynecol Scand* 1967;46:Suppl 8:1-31.

28. Guillebaud J, Bonnar J, Morehead J, Matthews A. Menstrual blood-loss with intrauterine devices. *Lancet* 1976;1:387-390.
29. Desgrippes R, Laine F, Morcet J, Perrin M, Manet G, Jezequel C, Bardou-Jacquet E, et al. Decreased iron burden in overweight C282Y homozygous women: Putative role of increased hepcidin production. *Hepatology* 2013;57:1784-1792.
30. FAO/WHO: Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. In: FAO Food and Nutrition Series. Volume N°23. Rome: FAO, 2004; 246-278.
31. Schumann K, Szegner B, Kohler B, Pfaffl MW, Etle T. A method to assess ⁵⁹Fe in residual tissue blood content in mice and its use to correct ⁵⁹Fe-distribution kinetics accordingly. *Toxicology* 2007;241:19-32.
32. Viteri FE. The consequences of iron deficiency and anaemia in pregnancy on maternal health, the foetus and the infant. *SCN News* 1994:14-18.
33. Millard KN, Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut* 2004;53:655-660.
34. Harvey LJ, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, Fairweather-Tait SJ. Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br J Nutr* 2005;94:557-564.
35. Napolitano M, Dolce A, Celenza G, Grandone E, Perilli MG, Siragusa S, Carta G, et al. Iron-dependent erythropoiesis in women with excessive menstrual blood losses and women with normal menses. *Ann Hematol* 2014;93:557-563.
36. Dasharathy SS, Mumford SL, Pollack AZ, Perkins NJ, Mattison DR, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. Menstrual bleeding patterns among regularly menstruating women. *Am J Epidemiol* 2012;175:536-545.

-
37. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;34:97-101.
 38. Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009;41:482-487.
 39. Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, Moussalli J, et al. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 2004;40:1426-1433.
 40. Harrison-Findik DD. Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases. *World J Hepatol* 2010;2:302-310.
 41. Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology* 2012;56:291-299.

Table 1. Baseline characteristics of the C282Y homozygous hemochromatosis women included in the study. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Variables	No.	Frequency
Age at diagnosis (<i>n</i> =140)		
≥ 60 y.	42	30.0%
< 60 y.	98	70.0%
<i>Means (± SD)</i>	<i>52.6</i>	<i>(14.0)</i>
Body mass index (<i>n</i> =134)		
≥ 25 kg/m ²	39	29.1%
< 25 kg/m ²	95	70.9%
<i>Means (± SD)</i>	<i>23.9</i>	<i>(4.8)</i>
Alcohol intake (<i>n</i> =137)		
Excessive	7	5.1%
Non excessive	130	94.9%
Menopause (<i>n</i> =127)		
Yes	81	63.8%
No	46	36.2%
Regular blood donations (<i>n</i> =138)		
Yes	37	26.8%
No	101	73.2%
Chronic bleedings (<i>n</i> =137)		
Yes	4	2.9%
No	133	97.1%
Blood transfusions (<i>n</i> =135)		
Yes	15	11.1%
No	120	88.9%

Table 2. Proportion of C282Y homozygous patients diagnosed by gender according to the age at diagnosis, and evolution of the sex ratio. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Age at diagnosis	Total	Men		Women		Sex ratio
		No.	%	No.	%	
< 40 y.	68	42	61.8%	26	38.2%	1.61
[40-50[y.	77	48	62.3%	29	37.7%	1.66
[50-60[y.	91	48	52.7%	43	47.3%	1.12
≥ 60 y.	65	23	35.4%	42	64.6%	0.55
Total	301	161	53.5%	140	46.5%	1.15

$\chi^2_{\text{linear trend}}$: 10.5, $p=0.0012$

Table 3. Baseline characteristics of the C282Y homozygous hemochromatosis women according to the number of pregnancies had prior to entry into the phlebotomy programme. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Variables	Number of pregnancies						p
	0		1 or 2		≥ 3		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Number of women	14		65		58		
Age at diagnosis (n=137)							
≥ 60 y.	2	14.3%	16	24.6%	23	39.7%	0.0771
< 60 y.	12	85.7%	49	75.4%	35	60.3%	
Body mass index (n=131)							
≥ 25 kg/m ²	2	14.3%	19	30.6%	18	32.7%	0.3949
< 25 kg/m ²	12	85.7%	43	69.4%	37	67.3%	
Alcohol intake (n=134)							
Excessive	0	0.0%	2	3.1%	4	7.0%	0.4183
Non excessive	13	100.0%	62	96.9%	53	93.0%	
Menopause (n=126)							
Yes	3	21.4%	36	66.7%	41	70.7%	0.0022
No	11	78.6%	18	33.3%	17	29.3%	
Regular blood donations (n=136)							
Yes	5	35.7%	15	23.1%	17	29.8%	0.5303
No	9	64.3%	50	76.9%	40	70.2%	
Chronic bleedings (n=135)							
Yes	2	14.3%	0	0.0%	2	3.4%	0.3131
No	12	85.7%	63	100.0%	56	96.6%	
Blood transfusions (n=134)							
Yes	1	7.1%	6	9.7%	8	13.8%	0.6809
No	13	92.9%	56	90.3%	50	86.2%	

Table 4. Biological parameters (medians and interquartile ranges) of the C282Y homozygous hemochromatosis women according to the number of pregnancies had prior to entry into the phlebotomy programme. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Biological parameters	Number of pregnancies						<i>p</i>
	0		1 or 2		≥ 3		
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
Transferrin saturation (%) (<i>n</i> =137)	81	[72 ; 89]	78	[65 ; 88]	83	[67 ; 97]	0.9983
Serum ferritin (μg/L) (<i>n</i> =137)	298	[236 ; 529]	414	[279 ; 693]	412	[297 ; 770]	0.2931
Amount of iron removed (g) (<i>n</i> =127)	1.3	[1.1 ; 2.0]	2.5	[1.4 ; 4.0]	2.3	[1.6 ; 3.6]	0.1402
Hemoglobin (g/dL) (<i>n</i> =108)	13.6	[13.3 ; 14.6]	14.0	[13.6 ; 14.5]	13.9	[13.4 ; 14.4]	0.8148

Table 5. Results of the linear regression analysis modelling the effect of pregnancies on serum ferritin. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	e ^β	95% CI	p	e ^β	95% CI	p
No. of pregnancies *						
0	1.00			1.00		
1 or 2	1.25	[0.82 ; 1.91]	0.2882	1.03	[0.67 ; 1.57]	0.9018
≥ 3	1.39	[0.91 ; 2.13]	0.1258	1.02	[0.66 ; 1.57]	0.9440
Age at diagnosis						
< 60 y.	1.00			1.00		
≥ 60 y.	1.35	[1.04 ; 1.73]	0.0260	1.20	[0.89 ; 1.62]	0.2299
Body mass index						
< 25 kg/m ²	1.00					
≥ 25 kg/m ²	1.13	[0.86 ; 1.48]	0.3868	-		
Alcohol intake						
Non excessive	1.00			1.00		
Excessive	2.38	[1.34 ; 4.20]	0.0032	2.06	[1.11 ; 3.85]	0.0232
Menopause						
No	1.00			1.00		
Yes	1.55	[1.20 ; 2.00]	0.0009	1.39	[1.03 ; 1.87]	0.0322
Regular blood donations						
No	1.00					
Yes	0.84	[0.64 ; 1.11]	0.2191	-		
Chronic bleedings						
No	1.00					
Yes	0.96	[0.46 ; 1.99]	0.9042	-		
Blood transfusions						
No	1.00					
Yes	1.02	[0.69 ; 1.50]	0.9376	-		

* Univariate analysis: global *p*-value = 0.2931

Table 6. Results of the linear regression analysis modelling the effect of pregnancies on the amount of iron removed by phlebotomies. Blood centre of Brest, western Brittany, France (2004-2011).

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	e ^β	95% CI	p	e ^β	95% CI	p
No. of pregnancies *						
0	1.00			1.00		
1 or 2	1.49	[0.98 ; 2.26]	0.0610	1.41	[0.99 ; 2.02]	0.0581
≥ 3	1.51	[0.99 ; 2.31]	0.0583	1.27	[0.89 ; 1.83]	0.1910
Age at diagnosis						
< 60 y.	1.00			1.00		
≥ 60 y.	1.19	[0.90 ; 1.56]	0.2135	1.11	[0.86 ; 1.43]	0.4151
Body mass index						
< 25 kg/m ²	1.00					
≥ 25 kg/m ²	0.96	[0.72 ; 1.27]	0.7661	-		
Alcohol intake						
Non excessive	1.00			1.00		
Excessive	2.29	[1.32 ; 3.97]	0.0036	1.32	[0.80 ; 2.19]	0.2791
Menopause						
No	1.00			1.00		
Yes	1.28	[0.97 ; 1.71]	0.0841	0.92	[0.72 ; 1.19]	0.5302
Regular blood donations						
No	1.00					
Yes	1.01	[0.76 ; 1.34]	0.9296	-		
Chronic bleedings						
No	1.00					
Yes	1.01	[0.50 ; 2.05]	0.9793	-		
Blood tansfusions						
No	1.00					
Yes	0.98	[0.67 ; 1.43]	0.9236	-		
Baseline ferritin	1.00	[1.00 ; 1.00]	<0.0001	1.00	[1.00 ; 1.00]	<0.0001

* Univariate analysis: global p-value = 0.1402

C. Influence des apports alimentaires en fer sur le phénotype des patients C282Y/C282Y

De nombreux facteurs génétiques et non génétiques sont connus pour moduler la surcharge en fer chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*. On peut citer parmi eux l'âge ou le sexe des malades. Cependant le rôle de certains de ces facteurs n'a jamais été clairement établi. C'est le cas de l'alimentation pour laquelle il existe très peu de données disponibles notamment sur l'effet des apports alimentaires en fer chez les patients atteints d'hémochromatose *HFE*. De plus, les résultats des différentes études publiées sont hétérogènes (Moretti et al., 2013).

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence d'une alimentation riche en fer sur l'expression phénotypique de l'hémochromatose *HFE*.

Matériel et méthode

- Population d'étude

Cette étude repose sur une cohorte composée de 286 individus présentant le génotype C282Y/C282Y et inclus dans un programme de saignées entre le 1^{er} janvier 2004 et le 31 décembre 2010 au centre de santé brestois de l'EFS-Bretagne.

- Données recueillies

Nous avons utilisé les données recueillies à l'aide du questionnaire médical décrit précédemment et plus spécifiquement celles issues du questionnaire alimentaire qui nous ont permis de classer les patients.

- Analyse statistiques

Les scores obtenus pour chaque patient suite aux réponses au questionnaire alimentaire nous ont permis de classer les patients en deux groupes dont les consommations hebdomadaires d'aliments riches en fer différaient. Les patients dont le score était supérieur ou égal à 2 étaient considérés comme ayant une alimentation plus riche en fer que l'autre groupe. Cette variable explicative qualitative a été utilisée pour étudier l'influence de l'alimentation riche en fer sur le degré de surcharge en fer des patients.

Avant d'évaluer l'effet de l'alimentation sur la surcharge en fer des individus, nous avons comparé les caractéristiques sociodémographiques et les habitudes de vie des deux groupes.

Nous avons ensuite étudié l'influence du régime alimentaire sur le degré de surcharge en fer apprécié par la quantité de fer soustraite. Afin de rechercher les facteurs de confusion potentiels, nous avons également étudié l'influence des covariables sur la quantité de fer soustraite, et comparé les caractéristiques des patients selon leur régime alimentaire. Nous avons ensuite réalisé un modèle de régression linéaire multivarié ajusté sur les facteurs de confusion tels que le sexe, l'âge au diagnostic, la consommation d'alcool, le surpoids, ...

Résultats-Conclusion

Le questionnaire alimentaire était correctement renseigné pour 222 patients. Les patients du groupe présentant une alimentation plus riche en fer (n=74) et ceux de l'autre groupe (n=148) avaient des âges moyens au diagnostic comparables (50,3 vs. 48,3 ans, p=0,28). Les proportions d'hommes (58,1 % vs. 53,4 %, p=0,50), de patients en surpoids (41,4 % vs. 43,6 %, p=0,77) et de buveurs excessifs d'alcool (10,8 % vs. 11,0 %, p=0,96) étaient également comparables dans les deux groupes. Le groupe de patients classés comme étant des consommateurs plus importants d'aliments riches en fer présentaient un degré de surcharge en fer plus élevé. Cela se traduisait par une quantité de fer soustraite plus élevée pour atteindre la désaturation (3,78 vs. 3,10 g, p=0,02). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de régression linéaire multivariée : la quantité de fer soustraite était 1,18 fois plus importante dans le groupe qui consommait plus d'aliments riches en fer, après ajustement sur les facteurs de confusion, à savoir le sexe, l'âge au diagnostic, la consommation d'alcool, le surpoids, la consommation de thé, la supplémentation en fer et la ferritinémie initiale (IC à 95% : [1,01 ; 1,38], p=0,04).

Cette étude a mis en évidence un lien modéré entre la consommation d'aliments riches en fer et le degré de surcharge en fer de patients C282Y homozygotes pris en charge par phlébotomies. Les patients ayant un régime alimentaire plus riche en fer auraient une surcharge en fer plus importante.

L'AASLD et certains auteurs recommandent, malgré l'absence de preuves, des règles hygiéno-diététiques aux patients C282Y homozygotes (Adams and Barton, 2010; Bacon et al., 2011). Nous pouvons penser qu'un régime alimentaire approprié pourrait retarder l'apparition des symptômes, notamment chez les individus C282Y homozygotes qui ne sont pas encore expressifs.

***HFE* hemochromatosis: influence of dietary iron intake on the iron overload of C282Y homozygous patients**

Philippe Saliou ^{1,2,3,4}, Gérald Le Gac ^{1,2,3,5}, Marie-Christine Mérour ³, Céline Tripogney ³, Brigitte Chanu ³, Jean-Baptiste Nousbaum ^{1,2,3,6}, Claude Férec ^{1,2,3,5} and Virginie Scotet ^{1,2,3}

¹ Inserm, UMR 1078, Brest, France

² Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

³ Etablissement Français du Sang – Bretagne, Brest, France

⁴ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, Brest, France

⁵ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité, Brest, France

⁶ CHRU Brest, Hôpital La Cavale Blanche, Service d'Hépatogastroentérologie, Brest, France

Corresponding author: Philippe Saliou, MD, Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, C.H.R.U. Morvan, 2 avenue Foch, 29200 Brest, France. Phone: + 33 (0)2 98 22 21 81 – Fax: + 33 (0)2 98 22 36 75 – Email: philippe.saliou@chu-brest.fr

Short title: Role of dietary iron intake on iron overload in hemochromatosis.

List of abbreviations

TS	Transferrin saturation
SF	Serum ferritin
AIR	Amount of iron removed
BMI	Body Mass Index
95% CI	95% confidence interval

Abstract (294 words)

Introduction: *HFE* hemochromatosis is an innate disorder of iron metabolism mainly associated with the *HFE* C282Y/C282Y genotype. Many genetic and environmental factors are viewed to modulate iron burden of these patients but only few of them have been firmly confirmed. This study aimed to determine the role of an iron-rich diet on the iron overload of C282Y homozygous patients treated by phlebotomies.

Methods: The study focused on C282Y homozygous patients enrolled in a phlebotomy programme between 2004 and 2010 in an area where *HFE* hemochromatosis is common (western Brittany, France) (n=286). Dietary iron intake was assessed using an iron-rich food frequency questionnaire. Multivariate linear regression was used to investigate the role of an iron-rich diet on the degree of iron overload.

Results: The food questionnaire was available for 222 patients. Patients with richer iron diet (n=74) and the other group (n=148) had similar mean age at diagnosis (50.3 vs. 48.3 y., p=0.28) as well as comparable proportions of men (58.1% vs. 53.4%, p=0.50), overweight patients (41.4% vs. 43.6%, p=0.77) and alcohol abusers (10.8% vs. 11.0%, p=0.96). Patients consuming more iron had a higher degree of iron overload. This resulted in a greater amount of iron removed (3.78 vs. 3.10 g, p=0.02) to normalize iron stores. These results were confirmed by multivariate analysis: the amount of iron removed was 1.18 fold higher in the richer iron diet group after adjustment on confounding factors (95% CI: [1.01 ; 1.38], p=0.04).

Conclusion: This study establishes a moderate link between dietary iron intake and the degree of iron overload in *HFE* hemochromatosis patients who come to medical attention. Eating habits may have an impact on iron burden. This could support the promotion of appropriate dietary advice in non expressive C282Y homozygous persons.

Introduction

HFE hemochromatosis, the predominant form of hemochromatosis (OMIM #235200), is an innate disorder of iron metabolism characterized by increased dietary iron absorption (1). Iron burden can lead to tissue damages and severe clinical complications such as cirrhosis, hepatocellular carcinoma and cardiomyopathy (2) (3). This can be prevented by early diagnosis and treatment by regular phlebotomies.

This disease is inherited as an autosomal recessive trait and is mostly associated with the *HFE* C282Y homozygous genotype (p.[Cys282Tyr]+[Cys282Tyr]²) (4). This genotype, which is carried by approximately 1 person in 200 in Northern European populations, has an incomplete penetrance as well as an heterogeneous expressivity (5)(6)(7).

Beyond age and gender, many genetic and environmental factors are viewed to modulate iron burden in *HFE* hemochromatosis but not all of them have been firmly confirmed. Some of them, such as high alcohol intake are clearly associated with higher serum ferritin (SF) levels in C282Y homozygous patients (8)(5). Little is known about diet-related effects on iron accumulation in *HFE* hemochromatosis.

Regarding dietary iron intake, several population-based studies have tried to determine whether dietary iron content influences iron overload regarding *HFE* status (9). We should keep in mind that there are two kinds of iron absorbed from the diet: iron bound to heme which is found in protein such as hemoglobin and myoglobin and iron not bound to heme present in vegetables, cereals or fruits (10). Moreover, heme iron is more efficiently absorbed from the diet (25-30%) than non heme iron (5-15 %) and is less subject to the influence of iron absorption modifiers.

Still now population-based studies have included very few *HFE* C282Y homozygous people (11)(12). Moreover the findings are not consistent from one study to another. Some studies found that C282Y homozygous women with a diet rich in heme iron had higher SF concentrations than wild types (13)(14) whereas other studies did not find any relationship between dietary iron

² According to the recommendations of the Human Genome Variation Society - <http://www.hgvs.org>.

content and this iron marker (15)(16). Consumption of red meat has been found to have a positive effect on iron status, individuals with high consumption displaying higher SF concentrations (17)(18).

Other studies have analysed the influence of diet habits known to modify iron absorption. The regular consumption of fresh fruits seems to have a protective effect against high body iron overload that is not clearly demonstrated (19). A link between non-citrus fruit consumption and the decrease of iron absorption has also been reported (20). A clinical trial has also shown that regular tea drinking with meals reduces the frequency of phlebotomies required in C282Y homozygous patients (21) whereas another study found no protective effect of tea consumption (20).

To date, few studies have focused on C282Y homozygous patients requiring treatment. The aim of this study was to determine the role of an iron-rich diet on the phenotypic expression of the C282Y/C282Y genotype in a cohort of patients treated by phlebotomies in an area where *HFE* hemochromatosis is common (Brittany, France) (22).

Patients and methods

Study population

The study focused on the C282Y homozygous patients who were enrolled in a phlebotomy program in a blood centre of western Brittany (Brest, France) between January 1st 2004 and December 31st 2010. The elevated transferrin saturation (TS; > 45%) and the high serum ferritin concentration in these patients (SF; > 300 $\mu\text{g/L}$ for men or > 200 $\mu\text{g/L}$ for women) were diagnosed by general practitioners or gastroenterologists. Patients were then referred to the blood centre for the achievement of phlebotomies.

This study was approved by the ethical committee of the University Hospital of Brest.

Questionnaire

At entrance in the phlebotomy program, a clinical questionnaire is completed for each patient by a referral physician. As previously described (8), this questionnaire notably contains information on socio-demographic characteristics (gender, age at diagnosis, etc), lifestyle factors (weight, height, alcohol intake, etc), biological parameters (including TS and SF) and clinical signs.

This questionnaire also enables to estimate dietary iron intake. The food part of the questionnaire, which was established by a dietician, asks about eating habits of a typical week. Patients reported the number of meals per week in which iron-rich foods such as shells, red meat, eggs, giblets, dried fruits and vegetables are consumed (table 1). The daily consumption of tea and vitamin C, which are known to modify iron intestinal absorption, were also sought. Factors known to increase iron burden such as blood transfusions or iron tablets intake were collected. Patients were also asked if they did regular blood donations before entrance in the phlebotomy programme and if they had chronic losses of blood such as hematuria or gastrointestinal bleeding.

In a second time, when iron depletion is reached (ie. when serum ferritin decreases below the threshold of 50 $\mu\text{g/L}$), data related to the treatment (ie. the mean volume and the number of phlebotomies performed since the beginning of treatment) are recorded. This enables to estimate

the amount of iron removed (assuming that 1 L of blood contains 0.5 g of iron (23), which is used to assess the degree of iron overload.

Measurement of iron markers and HFE analysis

Iron markers were measured by standard biochemical methods. The C282Y variants were studied using the 5'-nuclease allelic discrimination method or TaqMan method (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SAS software (version 9.02; SAS Institute inc, Cary, NC).

First, we described the population under study. Categorical variables were expressed as percentages and compared using the Chi square test or the Fisher exact test in case of little size samples. Continuous variables were described using mean and standard deviation, or median and quartiles for variables with a non normal distribution. They were compared using the Student t test or the Mann-Whitney test. The normality of each quantitative variable was tested using the Shapiro-Wilk test. A logarithmic transformation (\log_{10}) was used to normalise the distribution of iron indices that were highly skewed. All tests were performed two-sided, and a p-value less than 5% was considered significant.

We then classified the patients into two groups with regard to their dietary iron habits. We assigned a score to the patients in relation with the quantity of food they declared eating each week in order to create two groups (reference group, iron-rich diet group). We compared the characteristics of these two groups of patients in terms of gender, age at diagnosis, overweight, alcohol intake, etc. Alcohol intake was considered excessive when weekly consumption exceeded 21 glasses for men and 14 glasses for women, in accordance with the WHO definition. Overweight was defined by a body mass index (BMI) $\geq 25\text{kg/m}^2$.

We finally performed linear regression analysis to investigate the relationship between dietary iron content and the degree of iron overload assessed by the amount of iron removed (log transformed). With \log_{10} transformation of the dependant variable, the estimated regression coefficients (β) corresponded to a 10^β time change in the dependant variable per unit increase in the explanatory variables. After univariate analysis, multivariate analysis was performed to consider potentially confounding factors such as gender, age at diagnosis, overweight, alcohol, tea and vitamin C consumption in the analyses. All the variables associated with the amount of iron removed at a conservative threshold of $p < 0.20$ in univariate analysis were included in the multivariate analysis.

Results

Description of the study population

Over the study period, 286 C282Y/C282Y homozygous patients were enrolled in a phlebotomy program at the blood centre of Brest. The food questionnaire was filled for 222 (77.6%) patients of the cohort, who were therefore included in the analysis and separated into two groups thanks to the dietary questionnaire.

Among the 222 patients, 74 (33.3%) were classified in the iron-rich diet group while the 148 other patients constituted the reference group. As shown in table 1, these two groups of patients had comparable proportions of men (58.1% vs. 53.4%, $p=0.50$) and their age at diagnosis was very close (50.3 vs. 48.3 years, $p=0.28$). The proportion of overweight patients (41.4% vs. 43.6%, $p=0.77$) and of alcohol abusers (10.8% vs. 11.0%, $p=0.96$) did not differ between the two groups.

Dietary iron consumption

As mentioned above, the reference group was composed of 148 patients. Most of them (74.3%) reported eating red meat one to five times a week and none of them was used to eat red meat more than five times a week (Table 1). In this group no patient reported shell's consumption in their dietary habits and few of them (1.4%) eat dried fruits or dried vegetables. The second group was composed of 74 patients who reported a greater consumption of food rich in iron. Nearly 25% of these patients were used to eat red meat more than five times a week and 12.2% of them reported to consume shell from one to three times a week. Most of these patients (78.4%) also reported consuming dried fruits or dried vegetables from one to three times a week.

Patients of the iron-rich diet group declared a greater consumption of vitamin C (39.4% vs. 18.8%, $p=0.01$). The proportion of patients who drunk tea at lunch was not different between the two groups (17.4% vs. 16.7%, $p=0.90$). No difference was found between the two groups concerning the proportion of patients who had blood transfusions ($p=0.45$), took supplemental iron ($p=0.34$), made regular blood donations ($p=0.43$) and had chronic losses of blood ($p=0.40$).

Influence of dietary iron intake on iron burden

As illustrated in table 2, patients who consumed a richer iron diet had a higher iron overload. The amount of iron removed to reach depletion was significantly greater in this group (3.78 vs. 3.10 g, $p=0.02$). The SF concentration also tended to be higher among these patients (median: 749.5 vs. 530.5 $\mu\text{g/L}$, $p=0.06$), especially in men (median: 927 vs. 530.5 $\mu\text{g/L}$, $p=0.01$). Median TS did not differ between the two groups (82.0% vs. 83.0%, $p=0.48$).

The role of dietary iron intake on the degree of iron overload was confirmed by liner regression analysis (table 3). The multivariate analysis showed that after considering potentially confounding factors such as gender, age at diagnosis, alcohol consumption, overweight, tea consumption and SF concentration at diagnosis, the amount of iron removed was 1.18 fold higher in the richer iron diet group (95% CI: [1.01 ; 1.38], $p=0.039$).

Discussion

This study found evidence that dietary habits seem to influence the phenotypic expression of the C282Y/C282Y genotype. Patients treated by phlebotomies who reported consuming the most iron rich foods are those who had the largest iron overload. This results in a greater amount of iron removed to normalise iron stores. Our study took into account the main potentially confounding factors (gender, age at diagnosis, alcohol consumption, overweight, tea consumption, supplemental iron and serum ferritin concentration at diagnosis) and the link established between dietary iron intake and the degree of iron overload in *HFE* hemochromatosis patients was confirmed by multivariate linear regression analysis. However the effect of the diet remains modest compared to those of other factors such as alcohol intake or gender.

The originality of our study was to focus on a cohort of hemochromatosis patients cared in an area where this disease is particularly common, while so far, most studies have been conducted in the general population. Therefore we have, for the first time, assessed the relationship between dietary iron intake and iron burden among patients enrolled in a phlebotomy program.

Regarding internal validity, our study design (ie. a prospective cohort study) is little subject to selection bias. Patients were enrolled prospectively and the refusal rate of participation in the study was low. Therefore our cohort included almost all new patients cared in the blood centre of Brest over the study period. Moreover, as the response rate to the food questionnaire was not maximal (it was filled for 77.6% of patients), we ensured that the characteristics of the non-respondents did not differ significantly from those of the respondents (in term of sexe, age at diagnosis, alcohol consumption and baseline serum parameters).

Another strength of our study is that we used the amount of iron removed to evaluate iron burden. The use of this marker is known as the reference method to assess total body iron (24) and enables to describe the characteristics of the treatment. It is also more reliable than SF which can be increased by other disorders such as metabolic or inflammatory syndromes (25).

We are aware that our food questionnaire does not enable to precisely estimate the amount of iron ingested. Another limitation of our study was our inability to quantify the part of heme and nonheme iron intake by patients. Nevertheless, it is extremely challenging to accurately quantify the amount of heme and nonheme iron ingested during a long time of life. Anyway, we just needed to classify the patients into two groups according to their feeding habits because our aim was to check whether patients with richer iron diet had a higher iron burden. Therefore, we chose to study the influence of diet by questioning patients about their eating habits.

Regarding external validity, it is difficult to compare our findings with those of previous studies because our study population is very different. We focused on C282Y homozygous patients treated by phlebotomies what has not yet been done. Moreover results of previous population-based studies are often contradictory. In 2005, Cade *et al.* reported, from a population-based study on > 35000 UK women aged 35-69 y., that the highest SF concentrations were observed in postmenopausal women eating a diet rich in heme iron and who were C282Y homozygotes. Similarly, Greenwood *et al.* showed the same year, from a cohort of > 2500 UK women, that the effect of heme iron intake on SF concentrations was 2.0 times greater in C282Y homozygotes than in the other groups. This led them conclude that women who are homozygous for the C282Y mutation should be advised to limit their meat consumption, providing they are not anemic. On the other hand, in 2012, Gordeuk *et al.* found no significant relationship between dietary iron content (heme and non heme) and SF concentrations in 213 C282Y homozygotes identified through the screening of > 100 000 individuals. A recent systematic review concluded that iron accumulation in HH patients may be affected by dietary interventions modifying iron intake (9).

Our study highlights, for the first time, a link between dietary iron intake and the degree of iron overload in C282Y homozygous patients treated by phlebotomies. The eating habits may have an impact on the degree of iron burden as our study confirms the need to remove a larger amount of iron in these patients to achieve a normal SF level.

People with *HFE* hemochromatosis may be disadvantaged by public health policies that prevent iron deficiency. Fortification of food with inorganic iron may also increase the expressivity of iron

overload in people with HH (Cook 2000). The European Association for the Study of the Liver has considered that the most important issue was to maintain a broadly healthy diet (26) as there was no evidence (especially no randomized prospective trial) that dietary interventions has a beneficial effect on the outcome in patients treated by phlebotomies. Despite the lack of evidence they have nevertheless recommended to avoid iron supplemented foods such as breakfast cereals. The American Association for the Study of Liver Diseases did the same recommendation and proposed additionally to avoid vitamin C supplements (27). In an opinion article, Bacon *et al.* mentioned that the main dietary management recommendations for patients diagnosed with *HFE* hemochromatosis are to avoid supplemental iron, to consume red meats and ethanol in moderation and not to consume raw shellfish (28).

It is obvious that the regulation of intestinal iron absorption by hepcidin is failing in C282Y homozygotes (29). We can assume that a long and regular exposure to dietary iron may lead to a greater intestinal absorption, and although limited, may progressively result in a higher iron overload of tissues. Therefore, the promotion of appropriate dietary and lifestyle advice may delay the onset of symptoms, and therefore delay the age of entry into a phlebotomy program. Such dietary and lifestyle advice could primarily be offered to C282Y homozygous people who are not yet expressive. An appropriate health diet (including a reduced consumption of red meat and a high consumption of fresh fruits) associated with a reduction of alcohol intake are the main factors on which it is possible to act directly.

References

1. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol.* sept 2000;33(3):485-504.
2. Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology.* oct 2007;46(4):1291-301.
3. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* août 2010;139(2):393-408, 408.e1-2.
4. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* août 1996;13(4):399-408.
5. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.* 17 janv 2008;358(3):221-30.
6. Bacon BR, Britton RS. Clinical penetrance of hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.* 17 janv 2008;358(3):291-2.
7. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Férec C, Robson KJH. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum Genet.* sept 2010;128(3):233-48.
8. Scotet V, Mérour M-C, Mercier A-Y, Chanu B, Le Faou T, Raguénes O, et al. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol.* 15 juill 2003;158(2):129-34.
9. Moretti D, van Doorn GM, Swinkels DW, Melse-Boonstra A. Relevance of dietary iron intake and bioavailability in the management of HFE hemochromatosis: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* août 2013;98(2):468-79.
10. Wheby MS, Suttle GE, Ford KT 3rd. Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology.* mai 1970;58(5):647-54.
11. Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arija V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol.* août 2010;89(8):767-73.
12. Hunt JR, Zeng H. Iron absorption by heterozygous carriers of the HFE C282Y mutation associated with hemochromatosis. *Am J Clin Nutr.* oct 2004;80(4):924-31.
13. Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, et al. Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* oct 2005;82(4):813-20.
14. Greenwood DC, Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Burley VJ, Randerson-Moor JA, et al. HFE genotype modifies the influence of heme iron intake on iron status. *Epidemiology.* nov 2005;16(6):802-5.
15. Gordeuk VR, Lovato L, Barton J, Vitolins M, McLaren G, Acton R, et al. Dietary iron intake and serum ferritin concentration in 213 patients homozygous for the HFE C282Y hemochromatosis mutation. *Can J Gastroenterol.* juin 2012;26(6):345-9.

16. Pedersen P, Milman N. Extrinsic factors modifying expressivity of the HFE variant C282Y, H63D, S65C phenotypes in 1,294 Danish men. *Ann Hematol.* oct 2009;88(10):957-65.
17. Leggett BA, Brown NN, Bryant SJ, Duplock L, Powell LW, Halliday JW. Factors affecting the concentrations of ferritin in serum in a healthy Australian population. *Clinical Chemistry.* 7 janv 1990;36(7):1350-5.
18. Bergström E, Hernell O, Lönnerdal B, Persson LA. Sex differences in iron stores of adolescents: what is normal? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* févr 1995;20(2):215-24.
19. McCune CA, Ravine D, Carter K, Jackson HA, Hutton D, Hedderich J, et al. Iron loading and morbidity among relatives of HFE C282Y homozygotes identified either by population genetic testing or presenting as patients. *Gut.* avr 2006;55(4):554-62.
20. Milward EA, Baines SK, Knuiman MW, Bartholomew HC, Divitini ML, Ravine DG, et al. Noncitrus fruits as novel dietary environmental modifiers of iron stores in people with or without HFE gene mutations. *Mayo Clin Proc.* mai 2008;83(5):543-9.
21. Kaltwasser JP, Werner E, Schalk K, Hansen C, Gottschalk R, Seidl C. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut.* 11 janv 1998;43(5):699-704.
22. Saliou P, Le Gac G, Mercier A-Y, Chanu B, Guéguen P, Mérour M-C, et al. Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in HFE C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study. *Connor JR, éditeur. PLoS ONE.* 5 déc 2013;8(12):e81128.
23. Haskins D, Stevens AR, Finch S, Finch CA. Iron metabolism, iron stores in man as measured by phlebotomy. *Journal of Clinical Investigation.* 1 juin 1952;31(6):543-7.
24. Brissot P, Bourel M, Herry D, Verger JP, Messner M, Beaumont C, et al. Assessment of liver iron content in 271 patients: a reevaluation of direct and indirect methods. *Gastroenterology.* mars 1981;80(3):557-65.
25. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Brissot P. [Hyperferritinemia not related to hemochromatosis]. *Gastroenterol Clin Biol.* avr 2009;33(4):323-6.
26. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* juill 2010;53(1):3-22.
27. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* juill 2011;54(1):328-43.
28. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. *Blood.* 22 juill 2010;116(3):317-25.
29. Nicolas G, Viatte L, Lou D-Q, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet.* mai 2003;34(1):97-101.

Table 1: Characteristics of the C282Y homozygous patients treated by phlebotomies according to dietary iron intake

		Reference group (n=148)		Iron rich diet group (n=74)		p-value
		N	%	N	%	
Gender (n=222)	Women	69	46.6	31	41.9	0.50
	Men	79	53.4	43	58.1	
Age (years) mean ± SD		48.3 ± 13.0		50.3 ± 11.9		0.28
Red meat (n=222) times/week	0	38	25.7	0	0.0	NA*
	1 to 5	110	74.3	56	75.7	
	>5	0	0.0	18	24.3	
Shell (n=222) times/week	0	148	100.0	65	87.8	NA*
	1 to 3	0	0.0	9	12.2	
	>3	0	0.0	0	0.0	
Dried fruit and dried vegetables (n=222) times/week	0	146	98.6	16	21.6	NA*
	1 to 3	2	1.4	48	64.9	
	>3	0	0.0	10	13.5	
Tea at lunch (n=210)	No	114	82.6	60	83.3	0.90
	Yes	24	17.4	12	16.7	
Vitamine C (n=209)	No	112	81.2	43	60.6	0.01
	Yes	26	18.8	28	39.4	
Heavy drinking (n=219)	No	129	89.0	66	89.2	0.96
	Yes	16	11.0	8	10.8	
Overweight (n=203)	No	75	56.4	41	58.6	0.77
	Yes	58	43.6	29	41.4	
Blood transfusion (n=220)	No	134	91.8	70	94.6	0.45
	Yes	12	8.2	4	5.4	
Supplemental iron (n=213)	No	136	95.8	65	91.5	0.34
	Yes	6	4.2	6	8.5	
Regular blood donation (n=221)	No	103	70.1	48	64.9	0.43
	Yes	44	29.9	26	35.1	
Chronic losses of blood (n=219)	No	144	98.0	69	95.8	0.40
	Yes	3	2.0	3	4.2	

* NA: not analysable.

Table 2: Serum marker levels of the C282Y homozygous patients treated by phlebotomies according to dietary iron intake

	Reference group (n=148)	Iron rich diet group (n=74)	p-value
	Median [Q1 ; Q3]	Median [Q1 ; Q3]	
Transferrin saturation (%)	83.0 [65.0 ; 92.0]	82.0 [72.0 ; 91.0]	0.48
<i>Men</i>	86.5 [68.5 ; 92.5]	86.0 [72.0 ; 95.0]	0.62
<i>Women</i>	74.0 [61.0 ; 89.0]	78.0 [67.0 ; 85.0]	0.75
Serum ferritin (ng/ml)	530.5 [361.5 ; 944.0]	749.5 [393.0 ; 1484.0]	0.06
<i>Men</i>	746.0 [497.0 ; 1353.0]	927.0 [682.0 ; 1665.0]	0.01
<i>Women</i>	382.0 [271.0 ; 532.0]	419.0 [252.0 ; 770.0]	0.32
Amount of iron removed (g)	3.1 [1.8 ; 4.6]	3.8 [2.5 ; 6.3]	0.02
<i>Men</i>	3.7 [2.9 ; 6.3]	5.7 [3.3 ; 6.9]	0.07
<i>Women</i>	1.8 [1.2 ; 3.2]	2.6 [1.8 ; 3.6]	0.05

Table 3: Results of linear regression models testing the association of dietary iron intake with the amount of iron removed to reach depletion (log transformed) in C282Y homozygous patients treated by phlebotomies.

Variables		Univariate analysis			Multivariate analysis		
		10 ^β	95 % IC	p	10 ^β	95 % IC	p
Dietary iron intake	Reference group	ref.			ref.		
	Iron rich diet group	1.27	[1.05 ; 1.55]	0.0155	1.18	[1.01 ; 1.38]	0.0392
Gender	Women	ref.			ref.		
	Men	1.93	[1.66 ; 2.25]	<0.0001	1.44	[1.20 ; 1.72]	<0.0001
Age at diagnosis (years)	≤40	ref.			ref.		
	[40-50[1.41	[1.11 ; 1.79]	0.0055	1.16	[0.94 ; 1.04]	0.1579
	[50-60[1.23	[0.97 ; 1.55]	0.0877	1.17	[0.94 ; 1.04]	0.1521
	≥60	1.24	[0.95 ; 1.62]	0.1138	1.28	[1.00 ; 1.64]	0.0485
Heavy drinking	No	ref.			ref.		
	Yes	1.81	[1.37 ; 2.39]	<0.0001	1.31	[1.02 ; 1.69]	0.0355
Overweight	No	ref.			ref.		
	Yes	1.19	[0.99 ; 1.43]	0.0567	0.98	[0.84 ; 1.15]	0.8246
Tea consumption	No	ref.			ref.		
	Yes	0.79	[0.62 ; 1.00]	0.0511	0.99	[0.83 ; 1.20]	0.9767
Vitamine C consumption	No	ref.			-		
	Yes	0.97	[0.79 ; 1.20]	0.7968	-		
Serum ferritin		1.00	[1.00 ; 1.00]	<0.0001	1.00	[1.00 ; 1.00]	<0.0001
Supplemental iron	No	ref.			ref.		
	Yes	0.59	[0.41 ; 0.87]	0.0079	0.90	[0.66 ; 1.24]	0.5325
Chronic losses of blood	No	ref.			-		
	Yes	1.28	[0.74 ; 2.24]	0.3753	-		
Blood transfusion	No	ref.			-		
	Yes	0.96	[0.70 ; 1.31]	0.8057	-		
Regular blood donation	No	ref.			-		
	Yes	1.00	[0.83 ; 1.21]	0.9775	-		

VI. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

A. Principaux résultats

Cette étude de cohorte prospective nous a permis d'étudier le lien entre différents facteurs génétiques et non génétiques et le phénotype des patients atteints d'hémochromatose *HFE*.

Dans une première partie, nous avons confirmé le poids très relatif du génotype C282Y/H63D dans la survenue d'une surcharge en fer. Nous avons observé que la fréquence de ce génotype était plus élevée qu'attendue parmi les patients traités par phlébotomies. Ces patients sont généralement diagnostiqués plus tardivement et sont plus fréquemment porteurs de facteurs secondaires d'hyperferritinémie. De plus, le degré de surcharge en fer de ces patients est moins important que celui des patients homozygotes C282Y. Le rôle des facteurs de comorbidité est prépondérant dans l'expressivité de la surcharge en fer chez ces patients. Le variant H63D, dont l'expression est plus visible en présence de facteurs de comorbidité, peut donc être considéré comme un simple facteur génétique de susceptibilité.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'influence des grossesses sur l'expression phénotypique du génotype C282Y homozygote. Aucune étude épidémiologique n'a été consacrée à l'étude du lien entre grossesses et expression phénotypique de la maladie chez les femmes C282Y homozygotes. Cette étude est donc la première ciblée spécifiquement sur cette question. Nous avons confirmé la différence d'expressivité de ce génotype liée au sexe puisque nous avons bien observé que les femmes étaient diagnostiquées plus tardivement que les hommes. Nous n'avons en revanche pas confirmé le caractère protecteur couramment attribué aux grossesses vis-à-vis de la surcharge en fer des patients C282Y homozygotes. Ces résultats vont dans le sens de données expérimentales récentes menées chez la souris qui suggèrent que la différence pourrait être liée à des facteurs hormonaux (Latour et al., 2014; Neves et al., 2010).

Dans une troisième partie, nous avons rapporté une association modérée mais significative entre les apports alimentaires en fer et le degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes traités par phlébotomies. Les individus qui déclaraient un régime alimentaire plus riche en fer sont ceux qui présentaient les taux de surcharge en fer les plus importants.

B. Validité interne de l'étude

Notre étude est peu sujette à des biais de sélection. Il s'agit en effet d'une étude de cohorte qui a inclus, de façon prospective, la quasi-totalité des cas d'hémochromatoses homozygotes C282Y admis en protocole de saignées dans notre centre pendant la période de l'étude. Le taux de refus de participation était extrêmement faible. De même, peu de participants ont arrêté le protocole en cours d'étude, avant d'atteindre la phase de désaturation. L'inclusion des patients est donc quasiment exhaustive.

De plus, le taux de données manquantes pour les variables principales d'intérêt est également faible puisqu'il est seulement, par exemple, de 3 % en ce qui concerne les grossesses. Cependant, les données sur les habitudes alimentaires des patients n'étaient disponibles que pour 80 % des individus de la cohorte, mais nous sommes assurés que les caractéristiques des patients inclus et non inclus étaient comparables.

Par ailleurs, ce type d'étude prospective permet de réduire également les biais de mémoire. Concernant les variables à expliquer, nous avons non seulement utilisé le taux de ferritine pour évaluer le degré de surcharge en fer des patients mais également la quantité de fer soustraite pour arriver à désaturation. Cette dernière méthode est la méthode de référence, lorsqu'elle est bien conduite, pour évaluer le degré réel de surcharge en fer des individus (Haskins et al., 1952). Ce marqueur est plus fiable que la ferritinémie qui peut augmenter sous l'influence de nombreux facteurs tels que la prise d'alcool, l'inflammation ou le syndrome métabolique.

Nous disposons également d'informations concernant de nombreux facteurs de confusion (consommation d'alcool, âge au diagnostic, surpoids...) qui ont pu être pris en compte au moment de l'analyse.

Néanmoins, nous sommes conscients qu'il existe certaines limites à ce travail.

Tout d'abord, concernant l'étude de l'impact du variant H63D sur le degré de surcharge en fer, nous ne disposons pas des données nécessaires pour prendre en compte l'existence potentielle d'un syndrome métabolique chez les patients. Ce syndrome, qui est l'une des principales causes d'hyperferritinémie, demande de connaître de nombreux paramètres biologiques et cliniques pour être identifié (Alberti et al., 2005). En l'absence de ceux-ci, nous avons dû nous contenter de l'indice de masse corporelle qui nous a permis d'identifier les patients obèses ou en surpoids. De même, nous n'avons pas pu prendre en compte dans l'étude tous les gènes modificateurs rapportés à ce jour. Nous sommes conscients que certains variants rares de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer peuvent influencer la surcharge en fer des patients C282Y/H63D notamment.

Concernant l'étude du rôle des grossesses sur le degré de surcharge en fer des patientes C282Y homozygotes, nous avons également identifié certaines limites. Outre la taille d'échantillon limitée de femmes incluses (140 femmes), nous ne disposons pas de certaines données qui nous auraient permis d'ajuster les résultats sur des facteurs de confusion potentiels. Il aurait été intéressant de connaître les dates des grossesses pour pouvoir mesurer le délai entre celles-ci et l'entrée en protocole de saignées. Il nous manquait également certaines informations sur des facteurs susceptibles de modifier le degré de surcharge en fer des femmes. Ainsi nous n'avons pas les informations liées à l'allaitement et à l'importance des pertes de sang menstruelles, facteurs susceptibles de modifier les paramètres du fer (Blanco-Rojo et al., 2014). Ces données sont difficilement quantifiables et varient fortement d'une femme à l'autre. Il aurait également été intéressant de tenir compte du type de contraception utilisée chez les femmes concernées, sachant que la prise de pilule contraceptive tend à diminuer le volume de sang menstruel par deux (Nilsson and Sölvell, 1967) tandis que l'emploi de dispositif intra utérin est associé à une augmentation des pertes sanguines (Guillebaud et al., 1976). Nous avons néanmoins pris en compte les pertes de sang liées aux dons et aux pertes chroniques physiologiques bien que celles-ci ne soient pas quantifiées de manière précise.

Enfin, l'étude du rôle de l'alimentation sur degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes connaît des limites. Les données issues du questionnaire alimentaire ne nous ont pas permis d'établir avec précision les apports en fer hémunique et non hémunique. Nous avons recueilli les habitudes alimentaires des patients qui se voulaient le reflet de leur consommation habituelle, mais ces habitudes ont pu évoluer. De plus, les données recueillies n'étaient pas complètes pour tous les patients de la cohorte (20 % de données manquantes), ce qui nous a forcé à exclure un certain nombre de patients au moment de l'analyse. Cependant, nous avons comparé les caractéristiques du groupe de patients inclus et du groupe de patients exclus de l'étude et nous n'avons pas retrouvé de différences significatives. Nous avons pu également tenir compte de nombreux facteurs de confusion tels que les pertes chroniques de sang et les dons réguliers de sang au moment de l'analyse. Certaines variables, comme la consommation excessive d'alcool, reposent sur des informations fournies par les patients, les données sont donc déclaratives. Les patients peuvent avoir oublié leur consommation réelle et donner une valeur approximative (biais de mémoire). Il se peut aussi que certains patients décident de ne pas révéler leur consommation réelle, ce qui peut induire une sous-estimation du nombre de consommateurs excessifs. Cependant, ces biais sont non-différentiels car ils affectent de façon identique les deux groupes de patients.

Les données permettant d'estimer la quantité de fer soustraite sont renseignées, pour chaque patient, au moment de la désaturation. Si le nombre de saignées est déterminé par simple comptage, le volume moyen des saignées est quant à lui estimé de manière plus approximative pour certains patients dans la mesure où le volume peut varier au cours du protocole chez certains patients. En effet, la quantité de sang soustraite est fixée par le médecin de l'EFS et est fonction de l'état clinique du patient au moment de la saignée.

C. Validité externe de l'étude

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du variant H63D sont en accord avec les données de la littérature (Cheng et al., 2009; Gurrin et al., 2009; Walsh et al., 2006). Le génotype C282Y/H63D est associé à une surcharge en fer plus modérée que celle des patients porteurs du génotype C282Y/C282Y. Les patients porteurs du génotype C282Y/H63D sont également moins fréquents qu'attendus. Ainsi, nous avons confirmé le fait que le variant H63D doit être considéré comme un facteur de susceptibilité dont l'impact sur la maladie est limité lorsqu'il est isolé. Son expression phénotypique est liée à l'association d'autres facteurs non génétiques tels que le surpoids ou une consommation excessive d'alcool.

En ce qui concerne l'étude du rôle des grossesses sur le degré de surcharge en fer, nos résultats semblent plausibles d'un point de vue biologique. Bien que les besoins en fer augmentent au cours de la grossesse, passant d'environ 0,8 mg par jour au premier semestre à 10 mg par jour au cours des six dernières semaines de gestation (FAO/WHO, 2004; Milman, 2006; Schümann et al., 2007; Viteri, 1994), le nombre de grossesses par femmes en France n'est probablement pas suffisant pour limiter le degré de surcharge en fer des patientes concernées. Ainsi, le taux de fertilité était de 2,01 enfants par femmes en France en 2010. Ces résultats vont également dans le sens d'une étude expérimentale faite sur des souris *Hfe^{-/-}* et qui a montré que les grossesses multiples ne réduisent pas la quantité de fer stocké dans l'organisme (Neves et al., 2010). Il a même été observé que les femelles multipares avaient une absorption intestinale de fer plus importante du fait d'une diminution de la synthèse d'hepcidine et de BMP6. Les différences observées entre hommes et femmes pourraient être liées à des facteurs hormonaux et en particulier à la testostérone. Il vient d'être démontré dans un modèle murin que cette hormone inhiberait fortement la transcription de l'hepcidine, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'absorption intestinale de fer chez les souris mâles (Latour et al., 2014).

A notre connaissance, aucune équipe ne s'est spécifiquement intéressée à l'étude des grossesses sur la survenue d'une surcharge en fer chez les patientes atteintes d'hémochromatose *HFE*. Une étude de 1997 mentionne ne pas avoir retrouvé de corrélation significative entre le nombre de grossesses et la concentration hépatique en fer ou la quantité de fer soustraite mais aucune donnée n'était présentée dans l'article (Moirand et al., 1997). Cette même équipe a observé dans une étude en population générale que le nombre de grossesses ne différait pas entre les femmes qui exprimaient la maladie et les autres (Deugnier et al., 2002). Cette donnée était utilisée comme un facteur d'ajustement.

Notre étude analysant l'influence de l'alimentation sur le degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes est difficilement comparable avec les autres études actuellement disponibles dans la littérature. En effet, les populations d'étude sont très différentes, certaines concernent des individus dépistés en population générale, d'autres des échantillons de patients, parfois représentés en faible effectif. Aucune étude ne s'était jusqu'à présent spécifiquement basée sur une population de patients C282Y/C282Y inclus en protocole de saignées. Les résultats obtenus dans les différentes études publiées sont de plus contradictoires. En 2005, l'étude conduite par Cade et ses collaborateurs sur une population composée de plus de 35000 femmes britanniques, âgées de 35 à 69 ans, a conclu que les taux de ferritinémie les plus élevés étaient observés chez les femmes C282Y homozygotes ménopausées qui déclaraient un régime alimentaire riche en fer héminique (Cade et al., 2005). De même, une autre étude a montré, la même année, que l'effet de l'absorption de fer héminique sur la concentration de ferritine était 2 fois plus important chez les patients C282Y homozygotes (Greenwood et al., 2005). Ces résultats les ont conduits à conclure que les femmes C282Y/C282Y devraient se voir conseiller une limitation de leur consommation de viande. D'un autre côté, une étude publiée en 2012, basée sur 213 individus C282Y homozygotes dépistés en population générale n'a pas établi de lien entre la consommation de fer alimentaire et la ferritinémie (Gordeuk et al., 2012). Enfin, une revue systématique de la littérature conduite par Moretti et ses collaborateurs a conclu que le degré de surcharge en fer des individus atteints d'hémochromatose *HFE* pourrait être influencé par le régime alimentaire (Moretti et al., 2013).

Notre étude, qui établit un lien modéré entre la consommation d'aliments riches en fer et le degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes, apporte un regard nouveau sur le poids de l'alimentation sur l'expressivité phénotypique de l'hémochromatose *HFE*. Elle contribue à soutenir l'importance de conseiller un régime alimentaire adapté, en particulier chez les individus C282Y homozygotes non expressifs.

D. Perspectives

Nos travaux confirment que l'expression phénotypique de l'hémochromatose *HFE* est modulée par un ensemble de facteurs génétiques et non génétiques dont les degrés d'implication dans la surcharge en fer des individus étaient, jusque-là, difficiles à quantifier. Les différentes études menées sur le sujet étaient hétérogènes sur le plan des populations incluses et sur les définitions phénotypiques utilisées. Les conclusions étaient donc parfois contradictoires, notamment en ce qui concerne le rôle de l'alimentation. Les rôles de certains facteurs sont encore à éclaircir.

L'hémochromatose *HFE* est une pathologie qui pourrait se prêter à la mise en place d'une prévention secondaire. Elle répond en effet aux critères de l'OMS établis en 1968 pour définir la possibilité de mise en place d'un dépistage (Wilson and Jungner, 1968). La maladie représente un enjeu de santé publique, elle est relativement fréquente et est potentiellement grave. Un traitement simple et efficace existe s'il est mis en place précocement et les sujets dépistés peuvent en bénéficier. Les moyens appropriés de diagnostic et de traitement sont disponibles, la maladie est décelable pendant une phase de latence ou au début de la phase clinique.

Pour mettre en place cette prévention secondaire, il faut disposer d'un test adapté. On considère qu'un bon test de dépistage doit présenter les qualités suivantes : simple, fiable, valide, acceptable et peu coûteux. Le dépistage de l'hémochromatose peut reposer sur le phénotype (critères biologiques et/ou cliniques) et/ou sur le génotype (recherche de la variation C282Y). En pratique, le dépistage des individus est difficile du fait de la pénétrance incomplète du génotype C282Y homozygote. Le fait d'être porteur de ce génotype n'implique pas forcément que la maladie va se développer et *a contrario*, le fait d'avoir une augmentation des paramètres biologiques du fer n'est pas synonyme de découverte du génotype C282Y homozygote. Il n'existe donc pas *a priori* de test capable de répondre aux attentes de la mise en place d'un dépistage de masse.

La prévention secondaire doit donc plutôt s'orienter vers un dépistage familial qui est fortement recommandé mais qui reste insuffisamment proposé (Deugnier and Jouanolle, 2007). Ainsi, l'étude conduite par l'association Hémochromatose France auprès de ses adhérents a montré que pour 30 % des familles, aucun dépistage génétique n'avait été réalisé chez les frères et sœurs du probant alors que 60 % des enfants du probant le réalisaient (Borot, 2001). La sous-population la plus susceptible de développer la maladie n'est pas celle qui est dépistée en priorité puisque dans cette enquête moins de 50 % des frères et sœurs de l'ensemble des probants avaient bénéficié d'un dépistage (Anaes, 2004).

Ce type de dépistage, qui pourrait être mené dans la fratrie et la descendance après l'âge de 18 ans, n'est pas proposé de façon systématique dans tous les centres où sont pris en

charge les patients. Ces difficultés peuvent être liées au fait que jusqu'à juin 2013, c'étaient les probants qui devaient informer les membres de leur famille et, qu'en pratique, ils le faisaient de façon très variable. Certains les incitent au dépistage tandis que d'autres choisissent de ne pas divulguer leur maladie. Le décret du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale est un nouvel outil qui devrait permettre de faciliter l'information des apparentés et faciliter ainsi le dépistage familial (Décret n° 2013-527, 2013).

Même si des avancées importantes ont été faites dans la compréhension de l'hémochromatose *HFE*, d'autres études sont toutefois nécessaires pour confirmer les observations réalisées.

Ainsi, l'unité Inserm UMR 1078 coordonne actuellement une vaste étude épidémiologique nationale (protocole EMSAI : Enquête Multicentrique sur les Saignées Itératives), qui va permettre d'étudier l'association entre différents facteurs génétiques et non génétiques, évoqués dans notre travail, et le degré de surcharge en fer dans une population plus importante. En effet, cette étude prévoit d'inclure les patients suivis dans 31 centres de santé de l'EFS, soit environ 1500 patients sur 2 ans. L'objectif principal de cette étude est de pouvoir mieux connaître la population de patients inclus en protocole de saignées. Il s'agit plus précisément de pouvoir différencier, parmi les patients traités par saignées, les cas d'hémochromatoses génétiques lié au gène *HFE*, les formes rares d'hémochromatoses et les principales causes reconnues de surcharge en fer (syndrome métabolique, consommation excessive d'alcool,...). Cette étude multicentrique permettra également de colliger des données plus précises sur le syndrome métabolique (incluant la mesure de la circonférence abdominale par exemple) afin de pouvoir étudier la relation entre ce syndrome et le degré de surcharge en fer.

Ce travail multidisciplinaire, qui se situe à la jonction de l'épidémiologie, de la santé publique, et de la génétique a contribué à expliquer une partie de l'hétérogénéité phénotypique de cette maladie complexe, qui constitue un beau modèle de maladie multifactorielle. L'objectif était notamment d'obtenir des retombées applicables dans l'intérêt des patients et bénéfiques en terme de santé publique.

VII. BIBLIOGRAPHIE

A

- Abboud, S., and Haile, D.J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* *275*, 19906–19912.
- Adams, P.C. (1998). Factors affecting the rate of iron mobilization during venesection therapy for genetic hemochromatosis. *Am. J. Hematol.* *58*, 16–19.
- Adams, P.C., and Barton, J.C. (2010). How I treat hemochromatosis. *Blood* *116*, 317–325.
- Adams, P.C., and Valberg, L.S. (1999). Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model comparing genotyping to phenotyping. *Am. J. Gastroenterol.* *94*, 1593–1600.
- Adams, P., Brissot, P., and Powell, L.W. (2000). EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J. Hepatol.* *33*, 485–504.
- Adams, P.C., Speechley, M., and Kertesz, A.E. (1991). Long-term survival analysis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* *101*, 368–372.
- Adams, P.C., Deugnier, Y., Moirand, R., and Brissot, P. (1997). The relationship between iron overload, clinical symptoms, and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatol. Baltim. Md* *25*, 162–166.
- Adams, P.C., Reboussin, D.M., Barton, J.C., McLaren, C.E., Eckfeldt, J.H., McLaren, G.D., Dawkins, F.W., Acton, R.T., Harris, E.L., Gordeuk, V.R., et al. (2005). Hemochromatosis and Iron-Overload Screening in a Racially Diverse Population. *N. Engl. J. Med.* *352*, 1769–1778.
- Adhoute, X., Foucher, J., Laharie, D., Terrebonne, E., Vergniol, J., Castéra, L., Lovato, B., Chanteloup, E., Merrouche, W., Couzigou, P., et al. (2008). Diagnosis of liver fibrosis using FibroScan and other noninvasive methods in patients with hemochromatosis: a prospective study. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *32*, 180–187.
- Aguilar-Martinez, P., Grandchamp, B., Cunat, S., Cadet, E., Blanc, F., Nourrit, M., Lassoued, K., Schved, J.-F., and Rochette, J. (2011). Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. *Haematologica* *96*, 507–514.
- Ahmad, K.A., Ahmann, J.R., Migas, M.C., Waheed, A., Britton, R.S., Bacon, B.R., Sly, W.S., and Fleming, R.E. (2002). Decreased Liver Hfe Expression in the Hfe Knockout Mouse. *Blood Cells. Mol. Dis.* *29*, 361–366.
- Van Aken, M.O., De Craen, A.J.M., Gussekloo, J., Moghaddam, P.H., Vandenbroucke, J.P., Heijmans, B.T., Slagboom, P.E., and Westendorp, R.G.J. (2002). No increase in mortality and morbidity among carriers of the C282Y mutation of the hereditary haemochromatosis gene in the oldest old: the Leiden 85-plus Study. *Eur. J. Clin. Invest.* *32*, 750–754.
- Alberti, K.G.M., Zimmet, P., and Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet* *366*, 1059–1062.

- Allen, K.J., Gurrin, L.C., Constantine, C.C., Osborne, N.J., Delatycki, M.B., Nicoll, A.J., McLaren, C.E., Bahlo, M., Nisselle, A.E., Vulpe, C.D., et al. (2008). Iron-Overload–Related Disease in HFE Hereditary Hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* *358*, 221–230.
- Altes, A., Ruiz, A., Barceló, M.J., Remacha, A.F., Puig, T., Maya, A.J., Castell, C., Amate, J.M., Saz, Z., and Baiget, M. (2004). Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet. Test.* *8*, 407–410.
- Anaes (2004). Evaluation clinique et économique du dépistage de l'Hémochromatose HFE1 en 2004 (Anaes).
- Andersen, R.V., Tybjærg-Hansen, A., Appleyard, M., Birgens, H., and Nordestgaard, B.G. (2004). Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood* *103*, 2914–2919.
- Anderson, G.J., and Frazer, D.M. (2005). Recent advances in intestinal iron transport. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *7*, 365–372.
- Anderson, G.J., and McLaren, G. (2012). *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans* (Humana Press).
- Andrews, N.C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* *112*, 219–230.
- Andrikovics, H., Kalmár, L., Bors, A., Fandl, B., Petri, I., Kalász, L., and Tordai, A. (2001). Genotype Screening for Hereditary Hemochromatosis among Voluntary Blood Donors in Hungary. *Blood Cells. Mol. Dis.* *27*, 334–341.
- Andriopoulos, B., Jr, Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S.A., Chen, S., Grgurevic, L., Knutson, M.D., Pietrangelo, A., Vukicevic, S., Lin, H.Y., et al. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* *41*, 482–487.
- ANSES (2013). Table de composition nutritionnelle CIQUAL.
- Aranda, N., Viteri, F.E., Fernández-Ballart, J., Murphy, M., and Arija, V. (2007). Frequency of the hemochromatosis gene (HFE) 282C-->Y, 63H-->D, and 65S-->C mutations in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann. Hematol.* *86*, 17–21.
- Aranda, N., Viteri, F.E., Montserrat, C., and Arija, V. (2010). Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann. Hematol.* *89*, 767–773.
- Arrêté du 12 janvier 2009 Arrêté du 12 janvier 2009 fixant les critères de sélection des donneurs de sang.
- Asberg, A., Hveem, K., Thorstensen, K., Ellekjer, E., Kannelønning, K., Fjøsne, U., Halvorsen, T.B., Smethurst, H.B., Sagen, E., and Bjerve, K.S. (2001). Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand. J. Gastroenterol.* *36*, 1108–1115.
- Åsberg, A., Hveem, K., Kannelønning, K., and Øiestad Irgens, W. (2007). Penetrance of the C28Y/C282Y genotype of the HFE gene. *Scand. J. Gastroenterol.* *42*, 1073–1077.

Van der A, D.L., Peeters, P.H.M., Grobbee, D.E., Roest, M., Voorbij, H.A.M., and van der Schouw, Y.T. (2006). HFE genotypes and dietary heme iron: no evidence of strong gene-nutrient interaction on serum ferritin concentrations in middle-aged women. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 16, 60–68.

B

Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., et al. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* 38, 531–539.

Babitt, J.L., Huang, F.W., Xia, Y., Sidis, Y., Andrews, N.C., and Lin, H.Y. (2007). Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J. Clin. Invest.* 117, 1933–1939.

Bacon, B.R., and Britton, R.S. (2008). Clinical Penetrance of Hereditary Hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 291–292.

Bacon, B.R., Olynyk, J.K., Brunt, E.M., Britton, R.S., and Wolff, R.K. (1999). HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann. Intern. Med.* 130, 953–962.

Bacon, B.R., Adams, P.C., Kowdley, K.V., Powell, L.W., and Tavill, A.S. (2011). Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54, 328–343.

Barry, E., Derhammer, T., and Elsea, S.H. (2005). Prevalence of three hereditary hemochromatosis mutant alleles in the Michigan Caucasian population. *Community Genet.* 8, 173–179.

Barton, J.C., and Edwards, C.Q. (2000). *Hemochromatosis: Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment* (Cambridge University Press).

Bassett, M.L., Leggett, B.A., Halliday, J.W., Webb, S., and Powell, L.W. (1997). Analysis of the cost of population screening for haemochromatosis using biochemical and genetic markers. *J. Hepatol.* 27, 517–524.

Bauduer, F., Scribans, C., Degioanni, A., Renoux, M., and Dutour, O. (2005). Distribution of the C282Y and H63D polymorphisms in hereditary hemochromatosis patients from the French Basque Country. *Ann. Hematol.* 84, 99–102.

Beaton, M.D., and Adams, P.C. (2006). Prognostic factors and survival in patients with hereditary hemochromatosis and cirrhosis. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 20, 257–260.

Beaumont, C. (2004). Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer. *MS Médecine Sci.* 20, 68–72.

Beaumont, C., and Karim, Z. (2013). [Iron metabolism: State of the art]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne* 34, 17–25.

- Beckman, L.E., Saha, N., Spitsyn, V., Van Landeghem, G., and Beckman, L. (1997). Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism. *Hum. Hered.* *47*, 263–267.
- Bell, H., Berg, J.P., Undlien, D.E., Distant, S., Raknerud, N., Heier, H.E., Try, K., Thomassen, Y., Haug, E., Raha-Chowdhury, R., et al. (2000). The clinical expression of hemochromatosis in Oslo, Norway. Excessive oral iron intake may lead to secondary hemochromatosis even in HFE C282Y mutation negative subjects. *Scand. J. Gastroenterol.* *35*, 1301–1307.
- Bergström, E., Hernell, O., Lönnerdal, B., and Persson, L.A. (1995). Sex differences in iron stores of adolescents: what is normal? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *20*, 215–224.
- Beutler, E. (1997). Genetic irony beyond haemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *The Lancet* *349*, 296–297.
- Beutler, E., Gelbart, T., West, C., Lee, P., Adams, M., Blackstone, R., Pockros, P., Kosty, M., Venditti, C.P., Phatak, P.D., et al. (1996). Mutation Analysis in Hereditary Hemochromatosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *22*, 187–194.
- Beutler, E., Felitti, V., Gelbart, T., and Ho, N. (2000). The Effect of HFE Genotypes on Measurements of Iron Overload in Patients Attending a Health Appraisal Clinic. *Ann. Intern. Med.* *133*, 329–337.
- Beutler, E., Felitti, V.J., Koziol, J.A., Ho, N.J., and Gelbart, T. (2002). Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *The Lancet* *359*, 211–218.
- Beutler, E., Beutler, L., Lee, P.L., and Barton, J.C. (2004). The mitochondrial nt 16189 polymorphism and hereditary hemochromatosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *33*, 344–345.
- Le Blanc, S., Garrick, M.D., and Arredondo, M. (2012). Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *302*, C1780–C1785.
- Blanco-Rojo, R., Toxqui, L., López-Parra, A., Baeza-Richer, C., Pérez-Granados, A., Arroyo-Pardo, E., and Vaquero, M. (2014). Influence of Diet, Menstruation and Genetic Factors on Iron Status: A Cross-Sectional Study in Spanish Women of Childbearing Age. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 4077–4087.
- Bomford, A., and Williams, R. (1976). Long term results of venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. *Q. J. Med.* *45*, 611–623.
- Bonekamp, N.A., Vökl, A., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 346–355.
- Borot, N. (2001). Pensez à avertir vos frères et soeurs. *Hémochromatose 2001* *60*.
- Borot, N., Roth, M., Malfroy, L., Demangel, C., Vinel, J.P., Pascal, J.P., and Coppin, H. (1997). Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* *45*, 320–324.
- Bothwell, T.H., and MacPhail, A.P. (1998). Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic, and clinical aspects. *Semin. Hematol.* *35*, 55–71.

- Box, G.E., and Cox, D. (1964). An Analysis of Transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* *26*, 211–252.
- Brandhagen, D.J., Alvarez, W., Therneau, T.M., Kruckeberg, K.E., Thibodeau, S.N., Ludwig, J., and Porayko, M.K. (2000a). Iron overload in cirrhosis-HFE genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology* *31*, 456–460.
- Brandhagen, D.J., Fairbanks, V.F., Baldus, W.P., Smith, C.I., Kruckeberg, K.E., Schaid, D.J., and Thibodeau, S.N. (2000b). Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. *Am. J. Gastroenterol.* *95*, 2910–2914.
- Bridle, K.R., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Dixon, J.L., Purdie, D.M., Crawford, D.H., Subramaniam, V.N., Powell, L.W., Anderson, G.J., and Ramm, G.A. (2003). Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *The Lancet* *361*, 669–673.
- Brissot, P., Bourel, M., Herry, D., Verger, J.P., Messner, M., Beaumont, C., Regnouard, F., Ferrand, B., and Simon, M. (1981). Assessment of liver iron content in 271 patients: a reevaluation of direct and indirect methods. *Gastroenterology* *80*, 557–565.
- Brissot, P., Moirand, R., Jouanolle, A.M., Guyader, D., Le Gall, J.Y., Deugnier, Y., and David, V. (1999). A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as “genetic hemochromatosis” on “classical” phenotypic criteria. *J. Hepatology* *30*, 588–593.
- Brissot, P., Troadec, M.-B., and Loréal, O. (2004). The clinical relevance of new insights in iron transport and metabolism. *Curr. Hematol. Rep.* *3*, 107–115.
- Brissot, P., Le Lan, C., Troadec, M.B., Lorho, R., Ropert, M., Lescoat, G., and Loréal, O. (2005). [HFE hemochromatosis: pathogenic and diagnostic approach]. *Transfus. Clin. Biol. J. Société Fr. Transfus. Sang.* *12*, 77–82.
- Brittenham, G.M., Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., Allen, C.J., Farrell, D.E., and Harris, J.W. (1994). Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N. Engl. J. Med.* *331*, 567–573.
- Brune, M., Rossander, L., and Hallberg, L. (1989). Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* *43*, 547–557.
- Buja, L.M., and Roberts, W.C. (1971). Iron in the heart. Etiology and clinical significance. *Am. J. Med.* *51*, 209–221.
- Burt, M.J., George, P.M., Upton, J.D., Collett, J.A., Frampton, C.M.A., Chapman, T.M., Walmsley, T.A., and Chapman, B.A. (1998). The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* *43*, 830–836.
- Bush, K., Kivlahan, D.R., McDonnell, M.B., Fihn, S.D., and Bradley, K.A. (1998). The AUDIT alcohol consumption questions (AUDIT-C): an effective brief screening test for problem drinking. Ambulatory Care Quality Improvement Project (ACQUIP). Alcohol Use Disorders Identification Test. *Arch. Intern. Med.* *158*, 1789–1795.
- Byrnes, V., Ryan, E., Barrett, S., Kenny, P., Mayne, P., and Crowe, J. (2001). Genetic hemochromatosis, a Celtic disease: is it now time for population screening? *Genet. Test.* *5*, 127–130.

C

- Cade, J.E., Moreton, J.A., O'Hara, B., Greenwood, D.C., Moor, J., Burley, V.J., Kukulizch, K., Bishop, D.T., and Worwood, M. (2005). Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am. J. Clin. Nutr.* *82*, 813–820.
- Camaschella, C. (2005). Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood* *106*, 3710–3717.
- Camaschella, C., and Poggiali, E. (2011). Inherited disorders of iron metabolism. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Pediatr.* Febr. 2011 *23*, 14–20.
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P. (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.* *25*, 14–15.
- Candore, G., Mantovani, V., Balistreri, C.R., Lio, D., Colonna-Romano, G., Cerreta, V., Carru, C., Deiana, L., Pes, G., Menardi, G., et al. (2002). Frequency of the HFE Gene Mutations in Five Italian Populations. *Blood Cells. Mol. Dis.* *29*, 267–273.
- Cardoso, E.M., Stål, P., Hagen, K., Cabeda, J.M., Esin, S., de Sousa, M., and Hultcrantz, R. (1998). HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J. Intern. Med.* *243*, 203–208.
- Carella, M., D'Ambrosio, L., Totaro, A., Grifa, A., Valentino, M.A., Piperno, A., Girelli, D., Roetto, A., Franco, B., Gasparini, P., et al. (1997). Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 828.
- Chapman, R.W., Morgan, M.Y., Boss, A.M., and Sherlock, S. (1983). Acute and chronic effects of alcohol on iron absorption. *Dig. Dis. Sci.* *28*, 321–327.
- Charles, M.-A., Eschwège, E., and Basdevant, A. (2008). Monitoring the Obesity Epidemic in France: The Obepi Surveys 1997–2006. *Obesity* *16*, 2182–2186.
- Chen, C., and Paw, B.H. (2012). Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 1459–1467.
- Chen, F.E., Ooi, C., Ha, S.Y., Cheung, B.M., Todd, D., Liang, R., Chan, T.K., and Chan, V. (2000). Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. *N. Engl. J. Med.* *343*, 544–550.
- Cheng, R., Barton, J.C., Morrison, E.D., Phatak, P.D., Krawitt, E.L., Gordon, S.C., and Kowdley, K.V. (2009). Differences in hepatic phenotype between hemochromatosis patients with HFE C282Y homozygosity and other HFE genotypes. *J. Clin. Gastroenterol.* *43*, 569–573.
- Cimburova, M., Putova, I., Provaznikova, H., and Horak, J. (2002). Hereditary hemochromatosis: detection of C282Y and H63D mutations in HFE gene by means of Guthrie cards in population of Czech Republic. *Genet. Epidemiol.* *23*, 260–263.
- Cofer (2014). Hémochromatose.

- Constantine, C.C., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., McLaren, C.E., Bahlo, M., Yeap, H.L., Gertig, D.M., Osborne, N.J., Bertalli, N.A., Beckman, K.B., et al. (2009). 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.
- Cook, J.D. (1999). Defining optimal body iron. *Proc. Nutr. Soc.* *58*, 489–495.
- Cook, J.D., Reddy, M.B., Burri, J., Juillerat, M.A., and Hurrell, R.F. (1997). The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am. J. Clin. Nutr.* *65*, 964–969.
- Corradini, E., Babitt, J.L., and Lin, H.Y. (2009). The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 389–398.
- Corradini, E., Rozier, M., Meynard, D., Odhiambo, A., Lin, H.Y., Feng, Q., Migas, M.C., Britton, R.S., Babitt, J.L., and Fleming, R.E. (2011). Iron Regulation of Hepcidin Despite Attenuated Smad1,5,8 Signaling in Mice Without Transferrin Receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology* *141*, 1907–1914.
- Crichton, R.R. (1990). Proteins of iron storage and transport. *Adv. Protein Chem.* *40*, 281–363.
- Cukjati, M., Vaupotic, T., Ruprecht, R., and Curin-Serbec, V. (2007). Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay. *BMC Med. Genet.* *8*, 69.
- D'Alessio, F., Hentze, M.W., and Muckenthaler, M.U. (2012). The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *J. Hepatol.* *57*, 1052–1060.

D

- Dasharathy, S.S., Mumford, S.L., Pollack, A.Z., Perkins, N.J., Mattison, D.R., Wactawski-Wende, J., and Schisterman, E.F. (2012). Menstrual bleeding patterns among regularly menstruating women. *Am. J. Epidemiol.* *175*, 536–545.
- Datz, C., Lalloz, M.R.A., Vogel, W., Graziadei, I., Hackl, F., Vautier, G., Layton, D.M., Maier-Dobersberger, T., Ferenci, P., Penner, E., et al. (1997). Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. *J. Hepatol.* *27*, 773–779.
- Dautreaux-Lagarde, M. (1999). Dépistage de l'hémochromatose génétique chez 991 assurés sociaux volontaires pour un bilan de santé. Université de Picardie Jules-Verne.
- Davies, P.S., and Enns, C.A. (2004). Expression of the Hereditary Hemochromatosis Protein HFE Increases Ferritin Levels by Inhibiting Iron Export in HT29 Cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 25085–25092.
- Davis, W.D., Jr, and Arrowsmith, W.R. (1950). The effect of repeated bleeding in Hemochromatosis. *J. Lab. Clin. Med.* *36*, 814–815.

- Davis, T.M.E., Beilby, J., Davis, W.A., Olynyk, J.K., Jeffrey, G.P., Rossi, E., Boyder, C., and Bruce, D.G. (2008). Prevalence, characteristics, and prognostic significance of HFE gene mutations in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* 31, 1795–1801.
- Décret n° 2013-527 (2013). Décret n° 2013-527 du 20 juin 2013 relatif aux conditions de mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale.
- Demarmels Biasiutti, F. (2009). Régulation du métabolisme du fer. *Forum Med Suisse* 36, 630–632.
- Desgrippes, R., Lainé, F., Morcet, J., Perrin, M., Manet, G., Jezequel, C., Bardou-Jacquet, E., Ropert, M., and Deugnier, Y. (2013). Decreased iron burden in overweight C282Y homozygous women: Putative role of increased hepcidin production. *Hepatology* 57, 1784–1792.
- Deugnier, Y., and Jouanolle, A.-M. (2007). [Screening for hereditary HFE hemochromatosis]. *Presse Médicale Paris Fr.* 136, 1292–1294.
- Deugnier, Y., Jouanolle, A.-M., Chaperon, J., Moirand, R., Pithois, C., Meyer, J.-F., Pouchard, M., Lafraise, B., Brigand, A., Caserio-Schoenemann, C., et al. (2002). Gender-specific phenotypic expression and screening strategies in C282Y-linked haemochromatosis: a study of 9396 French people. *Br. J. Haematol.* 118, 1170–1178.
- Deugnier, Y., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., and Brissot, P. (2009). Hyperferritinemia not related to hemochromatosis. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 33, 323–326.
- Distante, S., Berg, J.P., Lande, K., Haug, E., and Bell, H. (1999). High prevalence of the hemochromatosis-associated Cys282Tyr HFE gene mutation in a healthy Norwegian population in the city of Oslo, and its phenotypic expression. *Scand. J. Gastroenterol.* 34, 529–534.
- Distante, S., Robson, K.J.H., Graham-Campbell, J., Arnaiz-Villena, A., Brissot, P., and Worwood, M. (2004). The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation. *Hum. Genet.* 115, 269–279.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776–781.
- Durazzo, M., Belci, P., Collo, A., Prandi, V., Pistone, E., Martorana, M., Gambino, R., and Bo, S. (2014). Gender specific medicine in liver diseases: a point of view. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 2127–2135.

E

- EASL (2010). EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J. Hepatol.* 53, 3–22.

- Edwards, C.Q., Kelly, T.M., Ellwein, G., and Kushner, J.P. (1983). Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch. Intern. Med.* *143*, 1890–1893.
- Edwards, C.Q., Griffen, L.M., Goldgar, D., Drummond, C., Skolnick, M.H., and Kushner, J.P. (1988). Prevalence of Hemochromatosis among 11,065 Presumably Healthy Blood Donors. *N. Engl. J. Med.* *318*, 1355–1362.
- Ellervik, C., Mandrup-Poulsen, T., Nordestgaard, B.G., Larsen, L.E., Appleyard, M., Frandsen, M., Petersen, P., Schlichting, P., Saermark, T., Tybjaerg-Hansen, A., et al. (2001). Prevalence of hereditary haemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* *358*, 1405–1409.
- Erickson, R.P. (1978). Haemochromatosis and superoxide metabolism: Free-radical influenced iron storage? *Lancet* *2*, 743.

F

- Falize, L., Guillygomarc'h, A., Perrin, M., Lainé, F., Guyader, D., Brissot, P., Turlin, B., and Deugnier, Y. (2006). Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatol. Baltim. Md* *44*, 472–477.
- FAO/WHO (2004). Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. *FAO Food Nutr. Ser.* 246–278.
- Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr, Ellis, M.C., Fullan, A., et al. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* *13*, 399–408.
- Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., et al. (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* *272*, 14025–14028.
- Fernández-Real, J.M., Ricart-Engel, W., Arroyo, E., Balançá, R., Casamitjana-Abella, R., Cabrero, D., Fernández-Castañer, M., and Soler, J. (1998). Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* *21*, 62–68.
- Fletcher, L.M., Dixon, J.L., Purdie, D.M., Powell, L.W., and Crawford, D.H.G. (2002). Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* *122*, 281–289.
- Floreani, A., Rizzotto, E.R., Basso, D., Navaglia, F., Zaninotto, M., Petridis, I., Di Andrea, O., Testa, R., Marra, M., Baldo, V., et al. (2007). An open population screening study for HFE gene major mutations proves the low prevalence of C282Y mutation in Central Italy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *26*, 577–586.
- Fracanzani, A.L., Fargion, S., Romano, R., Conte, D., Piperno, A., D'Alba, R., Mandelli, C., Fraquelli, M., Pacchetti, S., and Braga, M. (1995). Portal hypertension and iron depletion in patients with genetic hemochromatosis. *Hepatol. Baltim. Md* *22*, 1127–1131.

Frayling, T., Ellard, S., Grove, J., Walker, M., and Hattersley, A.T. (1998). C282Y mutation in HFE (haemochromatosis) gene and type 2 diabetes. *The Lancet* *351*, 1933–1934.

G

Le Gac, G., and Férec, C. (2005). The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur. J. Hum. Genet.* *13*, 1172–1185.

Le Gac, G., Mons, F., Jacolot, S., Scotet, V., Férec, C., and Frébourg, T. (2004a). Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent. *Br. J. Haematol.* *125*, 674–678.

Le Gac, G., Scotet, V., Ka, C., Gourlaouen, I., Bryckaert, L., Jacolot, S., Mura, C., and Férec, C. (2004b). The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1913–1918.

Le Gac, G., Ka, C., Gourlaouen, I., Bryckaert, L., Mercier, A.-Y., Chanu, B., Scotet, V., and Férec, C. (2009). HFE-Related Hemochromatosis: The Haptoglobin 2-2 Type Has a Significant but Limited Influence on Phenotypic Expression of the Predominant p.C282Y Homozygous Genotype. *Adv. Hematol.* *2009*, 251701.

Gleeson, F., Ryan, E., Barrett, S., and Crowe, J. (2004). Clinical expression of haemochromatosis in Irish C282Y homozygotes identified through family screening. *J. Gastroenterol.* *16*, 859–863.

Goodnough, J.B., Ramos, E., Nemeth, E., and Ganz, T. (2012). Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *56*, 291–299.

Gordeuk, V.R., Lovato, L., Barton, J.C., Vitolins, M., McLaren, G., Acton, R.T., McLaren, C., Harris, E.L., Speechley, M., Eckfeldt, J.H., et al. (2012). Dietary iron intake and serum ferritin concentration in 213 patients homozygous for the HFE C282Y hemochromatosis mutation. *Can. J. Gastroenterol.* *26*, 345.

Goswami, T., and Andrews, N.C. (2006). Hereditary Hemochromatosis Protein, HFE, Interaction with Transferrin Receptor 2 Suggests a Molecular Mechanism for Mammalian Iron Sensing. *J. Biol. Chem.* *281*, 28494–28498.

Greenwood, D.C., Cade, J.E., Moreton, J.A., O'Hara, B., Burley, V.J., Randerson-Moor, J.A., Kukulizch, K., Thompson, D., Worwood, M., and Bishop, D.T. (2005). HFE genotype modifies the influence of heme iron intake on iron status. *Epidemiol. Camb. Mass* *16*, 802–805.

Guggenbuhl, P., Deugnier, Y., Boisdet, J.F., Rolland, Y., Perdriger, A., Pawlotsky, Y., and Chalès, G. (2005). Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos. Int.* *16*, 1809–1814.

Guggenbuhl, P., Coiffier, G., Chalès, G., Brissot, P., and Loréal, O. (2011). Hémochromatose génétique : le rhumatologue en première ligne. *Rev. Rhum. Monogr.* *78*, 216–223.

- Guillebaud, J., Bonnar, J., Morehead, J., and Matthews, A. (1976). Menstrual blood-loss with intrauterine devices. *Lancet* *1*, 387–390.
- Guix, P., Picornell, A., Parera, M., Tomás, C., Muncunill, J., Castro, J.A., Rossell, J., Vaquer, P., Ramon, M.M., and Obrador, A. (2000). Prevalence of the C282Y mutation for haemochromatosis on the Island of Majorca. *Clin. Genet.* *58*, 123–128.
- Guix, P., Picornell, A., Parera, M., Galmes, A., Obrador, A., Ramon, M., and Castro, J. (2002). Distribution of HFE C282Y and H63D mutations in the Balearic Islands (NE Spain). *Clin. Genet.* *61*, 43–48.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* *388*, 482–488.
- Gurrin, L.C., Bertalli, N.A., Dalton, G.W., Osborne, N.J., Constantine, C.C., McLaren, C.E., English, D.R., Gertig, D.M., Delatycki, M.B., Nicoll, A.J., et al. (2009). HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology* *50*, 94–101.
- Guyader, D., Jacquelinet, C., Moirand, R., Turlin, B., Mendler, M.H., Chaperon, J., David, V., Brissot, P., Adams, P., and Deugnier, Y. (1998). Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* *115*, 929–936.
- H**
- Hagen, K., Stovner, L.J., Asberg, A., Thorstensen, K., Bjerve, K.S., and Hveem, K. (2002). High headache prevalence among women with hemochromatosis: the Nord-Trøndelag health study. *Ann. Neurol.* *51*, 786–789.
- Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A.S., and Rossander-Hultén, L. (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *53*, 112–119.
- Halsall, D.J., McFarlane, I., Luan, J., Cox, T.M., and Wareham, N.J. (2003). Typical type 2 diabetes mellitus and HFE gene mutations: a population-based case - control study. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1361–1365.
- Hanson, E.H., Imperatore, G., and Burke, W. (2001). HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology*. *Am. J. Epidemiol.* *154*, 193–206.
- Harrison, P.M., and Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1275*, 161–203.
- Harrison-Findik, D.D., Klein, E., Crist, C., Evans, J., Timchenko, N., and Gollan, J. (2007). Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* *46*, 1979–1985.
- Harvey, L.J., Armah, C.N., Dainty, J.R., Foxall, R.J., John Lewis, D., Langford, N.J., and Fairweather-Tait, S.J. (2005). Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br. J. Nutr.* *94*, 557–564.

- HAS (2005). Recommandations pour la prise en charge de l'hémochromatose HFE.
- Haskins, D., Stevens, A.R., Finch, S., and Finch, C.A. (1952). Iron metabolism, iron stores in man as measured by phlebotomy. *J. Clin. Invest.* *31*, 543–547.
- Hellerbrand, C., Bosserhoff, A.K., Seegers, S., Lingner, G., Wrede, C., Lock, G., Schölmerich, J., and Büttner, R. (2001). Mutation analysis of the HFE gene in German hemochromatosis patients and controls using automated SSCP-based capillary electrophoresis and a new PCR-ELISA technique. *Scand. J. Gastroenterol.* *36*, 1211–1216.
- Hicken, B.L., Tucker, D.C., and Barton, J.C. (2003). Patient compliance with phlebotomy therapy for iron overload associated with hemochromatosis. *Am. J. Gastroenterol.* *98*, 2072–2077.
- Hoppe, C., Watson, R.M., Long, C.M., Lorey, F., Robles, L., Klitz, W., Styles, L., and Vichinsky, E. (2006). Prevalence of HFE mutations in California newborns. *Pediatr. Hematol. Oncol.* *23*, 507–516.
- Huang, F.W. (2005). A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J. Clin. Invest.* *115*, 2187–2191.
- Hunt, J.R., and Zeng, H. (2004). Iron absorption by heterozygous carriers of the HFE C282Y mutation associated with hemochromatosis. *Am. J. Clin. Nutr.* *80*, 924–931.
- Hunt, J.R., Gallagher, S.K., and Johnson, L.K. (1994). Effect of ascorbic acid on apparent iron absorption by women with low iron stores. *Am. J. Clin. Nutr.* *59*, 1381–1385.
- Hunter, H.N., Fulton, D.B., Ganz, T., and Vogel, H.J. (2002). The Solution Structure of Human Heparin, a Peptide Hormone with Antimicrobial Activity That Is Involved in Iron Uptake and Hereditary Hemochromatosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 37597–37603.
- Hurrell, R.F., Reddy, M.B., Juillerat, M., and Cook, J.D. (2006). Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *J. Nutr.* *136*, 2808–2812.

I

- Ioannou, G.N., Dornitz, J.A., Weiss, N.S., Heagerty, P.J., and Kowdley, K.V. (2004). The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology* *126*, 1293–1301.
- Ioannou, G.N., Weiss, N.S., and Kowdley, K.V. (2007). Relationship between transferrin-iron saturation, alcohol consumption, and the incidence of cirrhosis and liver cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *5*, 624–629.
- Island, M.-L., Jouanolle, A.-M., Mosser, A., Deugnier, Y., David, V., Brissot, P., and Loréal, O. (2009). A new mutation in the hepcidin promoter impairs its BMP response and contributes to a severe phenotype in HFE related hemochromatosis. *Haematologica* *94*, 720–724.

J

- Jackson, H.A., Carter, K., Darke, C., Guttridge, M.G., Ravine, D., Hutton, R.D., Napier, J.A., and Worwood, M. (2001). HFE mutations, iron deficiency and overload in 10 500 blood donors. *Br. J. Haematol.* *114*, 474–484.
- Jacobs, E.M.G., Hendriks, J.C.M., van Deursen, C.T.B.M., Kreeftenberg, H.G., de Vries, R.A., Marx, J.J.M., Stalenhoef, A.F.H., Verbeek, A.L.M., and Swinkels, D.W. (2009). Severity of iron overload of proband determines serum ferritin levels in families with HFE-related hemochromatosis: the HEmochromatosis FAmily Study. *J. Hepatol.* *50*, 174–183.
- Jacolot, S., Le Gac, G., Scotet, V., Quere, I., Mura, C., and Ferec, C. (2004). HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood* *103*, 2835–2840.
- Jazwinska, E.C., Cullen, L.M., Busfield, F., Pyper, W.R., Webb, S.I., Powell, L.W., Morris, C.P., and Walsh, T.P. (1996). Haemochromatosis and HLA-H. *Nat. Genet.* *14*, 249–251.
- Jones, D.C., Young, N.T., Pigott, C., Fuggle, S.V., Barnardo, M.C.N.M., Marshall, S.E., and Bunce, M. (2002). Comprehensive hereditary hemochromatosis genotyping. *Tissue Antigens* *60*, 481–488.
- Jouanolle, A.M., Gandon, G., Jézéquel, P., Blayau, M., Campion, M.L., Yaouanq, J., Mosser, J., Fergelot, P., Chauvel, B., Bouric, P., et al. (1996). Haemochromatosis and HLA-H. *Nat. Genet.* *14*, 251–252.
- Jouanolle, A.M., Fergelot, P., Raoul, M.L., Gandon, G., Roussey, M., Deugnier, Y., Feingold, J., Le Gall, J.Y., and David, V. (1998). Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: penetrance of genetic hemochromatosis? *Ann. Génétique* *41*, 195–198.
- De Juan, D., Reta, A., Castiella, A., Pozueta, J., Prada, A., and Cuadrado, E. (2001). HFE gene mutations analysis in Basque hereditary haemochromatosis patients and controls. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *9*, 961–964.

K

- Kaltwasser, J.P., Werner, E., Schalk, K., Hansen, C., Gottschalk, R., and Seidl, C. (1998). Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut* *43*, 699–704.
- Kautz, L., Meynard, D., Besson-Fournier, C., Darnaud, V., Saati, T.A., Coppin, H., and Roth, M.-P. (2009). BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood* *114*, 2515–2520.
- Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E., and Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* *46*, 678–684.
- Kawabata, H., Yang, R., HIRAMA, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., and Koeffler, H.P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* *274*, 20826–20832.

- Kawabata, H., Fleming, R.E., Gui, D., Moon, S.Y., Saitoh, T., O'Kelly, J., Umehara, Y., Wano, Y., Said, J.W., and Koeffler, H.P. (2005). Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood* *105*, 376–381.
- Kowdley, K.V., Brandhagen, D.J., Gish, R.G., Bass, N.M., Weinstein, J., Schilsky, M.L., Fontana, R.J., McCashland, T., Cotler, S.J., Bacon, B.R., et al. (2005). Survival after liver transplantation in patients with hepatic iron overload: the national hemochromatosis transplant registry. *Gastroenterology* *129*, 494–503.
- Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* *480*, 147–150.
- Kremastinos, D.T., Tsiapras, D.P., Tsetsos, G.A., Rentoukas, E.I., Vretou, H.P., and Toutouzas, P.K. (1993). Left ventricular diastolic Doppler characteristics in beta-thalassemia major. *Circulation* *88*, 1127–1135.

L

- Lainé, F., and Deugnier, Y. (2006). Increased expression of hepcidin in obese patients: impact on phenotypic expression of hemochromatosis and pathophysiology of dysmetabolic iron overload syndrome. *Gastroenterology* *131*, 2028.
- Lainé, F., Jouannolle, A.-M., Morcet, J., Brigand, A., Pouchard, M., Lafraisse, B., Mosser, J., David, V., and Deugnier, Y. (2005). Phenotypic expression in detected C282Y homozygous women depends on body mass index. *J. Hepatol.* *43*, 1055–1059.
- Le Lan, C., Mosser, A., Ropert, M., Detivaud, L., Loustaud-Ratti, V., Vital-Durand, D., Roget, L., Bardou-Jacquet, E., Turlin, B., David, V., et al. (2011). Sex and Acquired Cofactors Determine Phenotypes of Ferroportin Disease. *Gastroenterology* *140*, 1199–1207.e2.
- Lanzara, C., Roetto, A., Daraio, F., Rivard, S., Ficarella, R., Simard, H., Cox, T.M., Cazzola, M., Piperno, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., et al. (2004). Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood* *103*, 4317–4321.
- Latour, C., Kautz, L., Besson-Fournier, C., Island, M.-L., Canonne-Hergaux, F., Loréal, O., Ganz, T., Coppin, H., and Roth, M.-P. (2014). Testosterone perturbs systemic iron balance through activation of epidermal growth factor receptor signaling in the liver and repression of hepcidin. *Hepatol. Baltim. Md* *59*, 683–694.
- Laufberger, V. (1937). Sur la cristallisation de la ferritine. *Soc Chim Biol* *19*.
- Laurita, K.R., Chuck, E.T., Yang, T., Dong, W.-Q., Kuryshev, Y.A., Brittenham, G.M., Rosenbaum, D.S., and Brown, A.M. (2003). Optical mapping reveals conduction slowing and impulse block in iron-overload cardiomyopathy. *J. Lab. Clin. Med.* *142*, 83–89.
- Lebrón, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., and Bjorkman, P.J. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* *93*, 111–123.

- Leggett, B.A., Brown, N.N., Bryant, S.J., Duplock, L., Powell, L.W., and Halliday, J.W. (1990). Factors affecting the concentrations of ferritin in serum in a healthy Australian population. *Clin. Chem.* *36*, 1350–1355.
- Lesbordes-Brion, J.-C., Viatte, L., Bennoun, M., Lou, D.-Q., Ramey, G., Houbron, C., Hamard, G., Kahn, A., and Vaulont, S. (2006). Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood* *108*, 1402–1405.
- Levy, J.E., Montross, L.K., Cohen, D.E., Fleming, M.D., and Andrews, N.C. (1999). The C282Y Mutation Causing Hereditary Hemochromatosis Does Not Produce a Null Allele. *Blood* *94*, 9–11.
- Lim, P.S., Chan, E.C., Lu, T.C., Yu, Y.L., Kuo, S.Y., Wang, T.H., and Wei, Y.H. (2000). Lipophilic antioxidants and iron status in ESRD patients on hemodialysis. *Nephron* *86*, 428–435.
- Liu, P., and Olivieri, N. (1994). Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* *8*, 101–110.
- Livesey, K.J., Wilmhurst, V.L.C., Carter, K., Worwood, M., Cadet, E., Rochette, J., Roberts, A.G., Pointon, J.J., Merryweather-Clarke, A.T., Bassett, M.L., et al. (2004). 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.

M

- MacDonald, R.A. (1961). Idiopathic hemochromatosis. A variant of portal cirrhosis and idiopathic hemosiderosis. *Arch. Intern. Med.* *107*, 606–616.
- De Marco, F., Liguori, R., Giardina, M.G., D'Armiento, M., Angelucci, E., Lucariello, A., Morante, R., Cimino, L., Galeota-Lanza, A., Tarantino, G., et al. (2004). High prevalence of non-HFE gene-associated haemochromatosis in patients from southern Italy. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* *42*, 17–24.
- Mariani, R., Salvioni, A., Corengia, C., Erba, N., Lanzafame, C., De Micheli, V., Baldini, V., Arosio, C., Fossati, L., Trombini, P., et al. (2003). Prevalence of HFE mutations in upper Northern Italy: study of 1132 unrelated blood donors. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *35*, 479–481.
- Mariani, R., Pelucchi, S., Arosio, C., Coletti, S., Pozzi, M., Paolini, V., Trombini, P., and Piperno, A. (2010). 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.
- Marshall, D.S., Linfert, D.R., and Tsongalis, G.J. (1999). Prevalence of the C282Y and H63D polymorphisms in a multi-ethnic control population. *Int. J. Mol. Med.* *4*, 389–393.
- Di Martino, V., Lebray, P., Myers, R.P., Pannier, E., Paradis, V., Charlotte, F., Moussalli, J., Thabut, D., Buffet, C., and Poynard, T. (2004). Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology. Baltim. Md* *40*, 1426–1433.

- Matas, M., Guix, P., Castro, J.A., Parera, M., Ramon, M.M., Obrador, A., and Picornell, A. (2006). Prevalence of HFE C282Y and H63D in Jewish populations and clinical implications of H63D homozygosity. *Clin. Genet.* *69*, 155–162.
- McCullen, M.A., Fletcher, L.M., Dimeski, G., Pink, A., Powell, L.W., Crawford, D.H.G., and Hickman, P.E. (2008). Patient-focused outcomes following detection in a hospital-based screening programme for C282Y haemochromatosis. *Intern. Med. J.* *38*, 651–656.
- McCune, A., and Worwood, M. (2003). Penetrance in hereditary hemochromatosis. *Blood* *102*, 2696–2696.
- McCune, C.A., Ravine, D., Carter, K., Jackson, H.A., Hutton, D., Hedderich, J., Krawczak, M., and Worwood, M. (2006). Iron loading and morbidity among relatives of HFE C282Y homozygotes identified either by population genetic testing or presenting as patients. *Gut* *55*, 554–562.
- McDonnell, S.M., Preston, B.L., Jewell, S.A., Barton, J.C., Edwards, C.Q., Adams, P.C., and Yip, R. (1999). A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. *Am. J. Med.* *106*, 619–624.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., et al. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* *5*, 299–309.
- Meier, P., Schuff-Werner, P., and Steiner, M. (2005). Hemochromatosis gene HFE Cys282Tyr mutation analysis in a cohort of Northeast German hospitalized patients supports assumption of a North to South allele frequency gradient throughout Germany. *Clin. Lab.* *51*, 539–543.
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Shearman, J.D., and Robson, K.J. (1997). Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J. Med. Genet.* *34*, 275.
- Merryweather-Clarke, A.T., Worwood, M., Parkinson, L., Mattock, C., Pointon, J.J., Shearman, J.D., and Robson, K.J.H. (1998). The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br. J. Haematol.* *101*, 369–373.
- Merryweather-Clarke, A.T., Siimonsen, H., Shearman, J.D., Pointon, J.J., Nørgaard-Pedersen, B., and Robson, K.J.H. (1999). A retrospective anonymous pilot study in screening newborns for HFE mutations in Scandinavian populations. *Hum. Mutat.* *13*, 154–159.
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Jouanolle, A.M., Rochette, J., and Robson, K.J.H. (2000). Geography of HFE C282Y and H63D Mutations. *Genet. Test.* *4*, 183–198.
- Merryweather-Clarke, A.T., Cadet, E., Bomford, A., Capron, D., Viprakasit, V., Miller, A., McHugh, P.J., Chapman, R.W., Pointon, J.J., Wimhurst, V.L.C., et al. (2003). Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2241–2247.

- Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., and Roth, M.-P. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* *41*, 478–481.
- Milet, J., Dehais, V., Bourgain, C., Jouanolle, A.M., Mosser, A., Perrin, M., Morcet, J., Brissot, P., David, V., Deugnier, Y., et al. (2007). Common variants in the BMP2, BMP4, and HJV genes of the hepcidin regulation pathway modulate HFE hemochromatosis penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 799–807.
- Milet, J., Le Gac, G., Scotet, V., Gourlaouen, I., Thèze, C., Mosser, J., Bourgain, C., Deugnier, Y., and Férec, C. (2010). 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. Mol. Dis.* *44*, 34–37.
- Millard, K.N., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., and Anderson, G.J. (2004). Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut* *53*, 655–660.
- Milman, N. (2006). Iron and pregnancy--a delicate balance. *Ann. Hematol.* *85*, 559–565.
- Milman, N., Pedersen, P., á Steig, T., Byg, K.E., Graudal, N., and Fenger, K. (2001). Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948-1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients. *Ann. Hematol.* *80*, 737–744.
- Milward, E.A., Baines, S.K., Knuiman, M.W., Bartholomew, H.C., Divitini, M.L., Ravine, D.G., Bruce, D.G., and Olynyk, J.K. (2008). Noncitrus Fruits as Novel Dietary Environmental Modifiers of Iron Stores in People With or Without HFE Gene Mutations. *Mayo Clin. Proc.* *83*, 543–549.
- Minihane, A.M., and Fairweather-Tait, S.J. (1998). Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am. J. Clin. Nutr.* *68*, 96–102.
- Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 251–263.
- Moirand, R., Adams, P.C., Bicheler, V., Brissot, P., and Deugnier, Y. (1997). Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann. Intern. Med.* *127*, 105–110.
- Moirand, R., Jouanolle, A.-M., Brissot, P., and Deugnier, Y. (1999). Le dépistage de l'hémochromatose génétique. *Hépatogastro Oncol. Dig.* *6*, 351–356.
- Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C.C., Gasparini, P., Andrews, N.C., and Pietrangelo, A. (2001). Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest.* *108*, 619–623.
- Moretti, D., Doorn, G.M. van, Swinkels, D.W., and Melse-Boonstra, A. (2013). Relevance of dietary iron intake and bioavailability in the management of HFE hemochromatosis: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* *98*, 468–479.

- Morrison, E.D., Brandhagen, D.J., Phatak, P.D., Barton, J.C., Krawitt, E.L., El-Serag, H.B., Gordon, S.C., Galan, M.V., Tung, B.Y., Ioannou, G.N., et al. (2003). Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis. *Ann. Intern. Med.* *138*, 627–633.
- Muckenthaler, M., Roy, C.N., Custodio, Á.O., Miñana, B., deGraaf, J., Montross, L.K., Andrews, N.C., and Hentze, M.W. (2003). Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and *Cybrd1* expression in mouse hemochromatosis. *Nat. Genet.* *34*, 102–107.
- Mura, C., Raguenes, O., and Férec, C. (1999). HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* *93*, 2502–2505.
- Murphy, S., Curran, M.D., McDougall, N., Callender, M.E., O'Brien, C.J., and Middleton, D. (1998). High incidence of the Cys 282 Tyr mutation in the HFE gene in the Irish population--implications for haemochromatosis. *Tissue Antigens* *52*, 484–488.

N

- Napolitano, M., Dolce, A., Celenza, G., Grandone, E., Perilli, M.G., Siragusa, S., Carta, G., Orecchioni, A., and Mariani, G. (2014). Iron-dependent erythropoiesis in women with excessive menstrual blood losses and women with normal menses. *Ann. Hematol.* *93*, 557–563.
- Nemeth, E., and Ganz, T. (2006). Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* *26*, 323–342.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004). Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* *306*, 2090–2093.
- Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T., and Camaschella, C. (2005). Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* *105*, 1803–1806.
- Neves, J.V., Olsson, I.A.S., Porto, G., and Rodrigues, P.N. (2010). Hemochromatosis and pregnancy: iron stores in the *Hfe*^{-/-} mouse are not reduced by multiple pregnancies. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G525–G529.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* *110*, 1037–1044.
- Nicolas, G., Viatte, L., Lou, D.-Q., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Andrews, N.C., and Vaulont, S. (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat. Genet.* *34*, 97–101.
- Niederau, C., Fischer, R., Pürschel, A., Stremmel, W., Häussinger, D., and Strohmeyer, G. (1996). Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* *110*, 1107–1119.
- Niederkofler, V. (2005). Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J. Clin. Invest.* *115*, 2180–2186.

- Nielsen, P., Carpinteiro, S., Fischer, R., Cabeda, J.M., Porto, G., and Gabbe, E.E. (1998). Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br. J. Haematol.* *103*, 842–845.
- Nilsson, L., and Sölvell, L. (1967). Clinical studies on oral contraceptives--a randomized, doubleblind, crossover study of 4 different preparations (Anovlar mite, Lyndiol mite, Ovulen, and Volidan). *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *46*, Suppl 8:1–31.
- Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., Berghuis, B., van Dongen, J.W., Breuning, M.H., Snijders, P.J., Rutten, W.P., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., et al. (2001). A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat. Genet.* *28*, 213–214.
- Njajou, O.T., Alizadeh, B.Z., Vaessen, N., Vergeer, J., Houwing-Duistermaat, J., Hofman, A., Pols, H.A.P., and Duijn, C.M. van (2002). The Role of Hemochromatosis C282Y and H63D Gene Mutations in Type 2 Diabetes Findings from the Rotterdam Study and meta-analysis. *Diabetes Care* *25*, 2112–2113.

O

- Olivieri, N.F., Nathan, D.G., MacMillan, J.H., Wayne, A.S., Liu, P.P., McGee, A., Martin, M., Koren, G., and Cohen, A.R. (1994). Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N. Engl. J. Med.* *331*, 574–578.
- Olynyk, J.K., Luxon, B.A., Britton, R.S., and Bacon, B.R. (1998). Hepatic iron concentration in hereditary hemochromatosis does not saturate or accurately predict phlebotomy requirements. *Am. J. Gastroenterol.* *93*, 346–350.
- Olynyk, J.K., Cullen, D.J., Aquilia, S., Rossi, E., Summerville, L., and Powell, L.W. (1999). A Population-Based Study of the Clinical Expression of the Hemochromatosis Gene. *N. Engl. J. Med.* *341*, 718–724.
- Olynyk, J.K., Hagan, S.E., Cullen, D.J., Bellby, J., and Whittall, D.E. (2004). Evolution of Untreated Hereditary Hemochromatosis in the Busselton Population: A 17-Year Study. *Mayo Clin. Proc.* *79*, 309–313.
- Organisation Mondiale de la Santé (2007). WHO I WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption.
- Osterreicher, C.H., Datz, C., Stickel, F., Hellerbrand, C., Penz, M., Hofer, H., Wrba, F., Penner, E., Schuppan, D., and Ferenci, P. (2005a). TGF-beta1 codon 25 gene polymorphism is associated with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Cytokine* *31*, 142–148.
- Osterreicher, C.H., Datz, C., Stickel, F., Hellerbrand, C., Penz, M., Hofer, H., Wrba, F., Penner, E., Schuppan, D., and Ferenci, P. (2005b). Association of myeloperoxidase promotor polymorphism with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *J. Hepatol.* *42*, 914–919.
- Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G.J., Liu, P., Sole, M.J., and Backx, P.H. (2004). Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* *109*, 1877–1885.

Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Liu, P.P., and Backx, P.H. (2006). Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *84*, 349–364.

P

Papanikolaou, G., Politou, M., Terpos, E., Fourlemadis, S., Sakellaropoulos, N., and Loukopoulos, D. (2000). Hereditary hemochromatosis: HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells. Mol. Dis.* *26*, 163–168.

Papanikolaou, G., Politou, M., Roetto, A., Bosio, S., Sakellaropoulos, N., Camaschella, C., and Loukopoulos, D. (2001). Linkage to chromosome 1q in Greek families with juvenile hemochromatosis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *27*, 744–749.

Papanikolaou, G., Samuels, M.E., Ludwig, E.H., MacDonald, M.L.E., Franchini, P.L., Dubé, M.-P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., et al. (2004). Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* *36*, 77–82.

Papazoglou, D., Exiara, T., Speletas, M., Panagopoulos, I., and Maltezos, E. (2003). Prevalence of Hemochromatosis Gene &(HFE)& Mutations in Greece. *Acta Haematol.* *109*, 137–140.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* *276*, 7806–7810.

Pawlotsky, Y., Le Dantec, P., Moirand, R., Guggenbuhl, P., Jouanolle, A.M., Catheline, M., Meadeb, J., Brissot, P., Deugnier, Y., and Chalès, G. (1999). Elevated parathyroid hormone 44-68 and osteoarticular changes in patients with genetic hemochromatosis. *Arthritis Rheum.* *42*, 799–806.

Pedersen, P., and Milman, N. (2009a). Genetic screening for HFE hemochromatosis in 6,020 Danish men: penetrance of C282Y, H63D, and S65C variants. *Ann. Hematol.* *88*, 775–784.

Pedersen, P., and Milman, N. (2009b). Extrinsic factors modifying expressivity of the HFE variant C282Y, H63D, S65C phenotypes in 1,294 Danish men. *Ann. Hematol.* *88*, 957–965.

Pelucchi, S., Mariani, R., Calza, S., Fracanzani, A.L., Modignani, G.L., Bertola, F., Busti, F., Trombini, P., Fraquelli, M., Forni, G.L., et al. (2012). CYBRD1 as a modifier gene that modulates iron phenotype in HFE p.C282Y homozygous patients. *Haematologica* *97*, 1818–1825.

Phatak, P., Brissot, P., Wurster, M., Adams, P.C., Bonkovsky, H.L., Gross, J., Malfertheiner, P., McLaren, G.D., Niederau, C., Piperno, A., et al. (2010). A phase 1/2, dose-escalation trial of deferasirox for the treatment of iron overload in HFE-related hereditary hemochromatosis. *Hepatology* *52*, 1671–1779.

Phatak, P.D., Ryan, D.H., Cappuccio, J., Oakes, D., Braggins, C., Provenzano, K., Eberly, S., and Sham, R.L. (2002). Prevalence and Penetrance of HFE Mutations in 4865 Unselected Primary Care Patients. *Blood Cells. Mol. Dis.* *29*, 41–47.

- Pietrangelo, A. (1996). Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* *16*, 13–30.
- Pietrangelo, A. (2004a). The ferroportin disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* *32*, 131–138.
- Pietrangelo, A. (2004b). Hereditary Hemochromatosis — A New Look at an Old Disease. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2383–2397.
- Pietrangelo, A. (2010). Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* *139*, 393–408, 408.e1–e2.
- Pietrangelo, A., Montosi, G., Totaro, A., Garuti, C., Conte, D., Cassanelli, S., Fraquelli, M., Sardini, C., Vasta, F., and Gasparini, P. (1999). Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N. Engl. J. Med.* *341*, 725–732.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loréal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* *276*, 7811–7819.
- Powell LW, Dixon JL, Ramm GA, and et al (2006). SCreening for hemochromatosis in asymptomatic subjects with or without a family history. *Arch. Intern. Med.* *166*, 294–301.
- Pozzato, G., Zorat, F., Nascimben, F., Gregorutti, M., Comar, C., Baracetti, S., Vatta, S., Bevilacqua, E., Belgrano, A., Crovella, S., et al. (2001). Haemochromatosis gene mutations in a clustered Italian population: evidence of high prevalence in people of Celtic ancestry. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *9*, 445–451.
- Press, R.D., Flora, K., Gross, C., Rabkin, J.M., and Corless, C.L. (1998). Hepatic iron overload: direct HFE (HLA-H) mutation analysis vs quantitative iron assays for the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Am. J. Clin. Pathol.* *109*, 577–584.

R

- Raszeja-Wyszomirska, J., Kurzawski, G., Suchy, J., Zawada, I., Lubinski, J., and Milkiewicz, P. (2008). Frequency of mutations related to hereditary haemochromatosis in northwestern Poland. *J. Appl. Genet.* *49*, 105–107.
- Von Recklinghausen, F. (1889). Über Hämochromatose. *Tageblatt Versammlungen Dtsch. Naturforscher Aerzte* *62*, 324–325.
- Richette, P., Ottaviani, S., Vicaut, E., and Bardin, T. (2010). Musculoskeletal complications of hereditary hemochromatosis: a case-control study. *J. Rheumatol.* *37*, 2145–2150.
- Risch, N. (1997). Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. *Nat. Genet.* *17*, 375–376.
- Rivard, S.R., Mura, C., Simard, H., Simard, R., Grimard, D., Le Gac, G., Raguenes, O., Férec, C., and De Braekeleer, M. (2000). Mutation analysis in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis in Saguenay-Lac-Saint-Jean (Quebec, Canada). *Br. J. Haematol.* *108*, 854–858.

- Rochette, J., Capron, D., Capron, J.P., and Julier, C. (2000). Screening for hereditary hemochromatosis. *Am. J. Gastroenterol.* *95*, 1368–1369.
- Rochette, J., Le Gac, G., Lassoued, K., Férec, C., and Robson, K.J.H. (2010). Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. *Hum. Genet.* *128*, 233–248.
- Roetto, A., Totaro, A., Piperno, A., Piga, A., Longo, F., Garozzo, G., Calì, A., De Gobbi, M., Gasparini, P., and Camaschella, C. (2001). New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* *97*, 2555–2560.
- Roetto, A., Daraio, F., Alberti, F., Porporato, P., Calì, A., De Gobbi, M., and Camaschella, C. (2002). Hemochromatosis Due to Mutations in Transferrin Receptor 2. *Blood Cells. Mol. Dis.* *29*, 465–470.
- Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., and Camaschella, C. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* *33*, 21–22.
- Rosenfeld, L. (2000). Dépistage de l'hémochromatose génétique dans le département du Puy-de-Dôme. Université de Clermont-Ferrand.
- Ryan, E., O'keane, C., and Crowe, J. (1998). Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells. Mol. Dis.* *24*, 428–432.
- Ryan, J.D., Ryan, E., Fabre, A., Lawless, M.W., and Crowe, J. (2010). Defective bone morphogenic protein signaling underlies hepcidin deficiency in HFE hereditary hemochromatosis. *Hepatology* *52*, 1266–1273.

S

- Sahinbegovic, E., Dallos, T., Aigner, E., Axmann, R., Manger, B., Englbrecht, M., Schöniger-Hekele, M., Karonitsch, T., Stamm, T., Farkas, M., et al. (2010a). Musculoskeletal disease burden of hereditary hemochromatosis. *Arthritis Rheum.* *62*, 3792–3798.
- Sahinbegovic, E., Dallos, T., Aigner, E., Axmann, R., Englbrecht, M., Schöniger-Hekele, M., Karonitsch, T., Farkas, M., Karger, T., Willeit, J., et al. (2010b). Hereditary hemochromatosis as a risk factor for joint replacement surgery. *Am. J. Med.* *123*, 659–662.
- Saliou, P., Le Gac, G., Mercier, A.-Y., Chanu, B., Guéguen, P., Mérour, M.-C., Gourlaouen, I., Autret, S., Le Maréchal, C., Rouault, K., et al. (2013). Evidence for the High Importance of Co-Morbid Factors in HFE C282Y/H63D Patients Cared by Phlebotomies: Results from an Observational Prospective Study. *PLoS ONE* *8*, e81128.
- Salvioni, A., Mariani, R., Oberkanins, C., Moritz, A., Mauri, V., Pelucchi, S., Riva, A., Arosio, C., Cerutti, P., and Piperno, A. (2003). Prevalence of C282Y and E168X HFE mutations in an Italian population of Northern European ancestry. *Haematologica* *88*, 250–255.

- Samman, S., Sandström, B., Toft, M.B., Bukhave, K., Jensen, M., Sørensen, S.S., and Hansen, M. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* *73*, 607–612.
- Sánchez, M., Bruguera, M., Bosch, J., Rodés, J., Ballesta, F., and Oliva, R. (1998). Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J. Hepatol.* *29*, 725–728.
- Sánchez, M., Villa, M., Ingelmo, M., Sanz, C., Bruguera, M., Ascaso, C., and Oliva, R. (2003). Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J. Hepatol.* *38*, 745–750.
- Schmidt, P.J., Andrews, N.C., and Fleming, M.D. (2010). Hfe induction by transgenic overexpression of Hfe does not require the Hfe cytoplasmic tail, but does require hemojuvelin. *Blood* *116*, 5679–5687.
- Schumacher, H.R., Jr (2000). Haemochromatosis. *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *14*, 277–284.
- Schumann, K., Szegner, B., Kohler, B., Pfaffl, M.W., and Ertle, T. (2007). A method to assess ⁵⁹Fe in residual tissue blood content in mice and its use to correct ⁵⁹Fe-distribution kinetics accordingly. *Toxicology* *241*, 19–32.
- Scotet, V., Mérour, M.-C., Mercier, A.-Y., Chanu, B., Faou, T.L., Raguénes, O., Gac, G.L., Mura, C., Nousbaum, J.-B., and Férec, C. (2003). Hereditary Hemochromatosis: Effect of Excessive Alcohol Consumption on Disease Expression in Patients Homozygous for the C282Y Mutation. *Am. J. Epidemiol.* *158*, 129–134.
- Scotet, V., Le Gac, G., Mérour, M.-C., Mercier, A.-Y., Chanu, B., Ka, C., Mura, C., Nousbaum, J.-B., and Férec, C. (2005). Impact of HFE genetic testing on clinical presentation of hereditary hemochromatosis: new epidemiological data. *BMC Med. Genet.* *6*, 24.
- Sham, R.L., Raubertas, R.F., Braggins, C., Cappuccio, J., Gallagher, M., and Phatak, P.D. (2000). Asymptomatic hemochromatosis subjects: genotypic and phenotypic profiles. *Blood* *96*, 3707–3711.
- Sham, R.L., Phatak, P.D., Nemeth, E., and Ganz, T. (2009). Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood* *114*, 493–494.
- Sheldon, J. (1935). *Haemochromatosis*. Oxf. Univ. Press.
- Siegenberg, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Macfarlane, B.J., Lamparelli, R.D., Car, N.G., MacPhail, P., Schmidt, U., Tal, A., and Mayet, F. (1991). Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* *53*, 537–541.
- Simon, M., Pawlotsky, Y., Bourel, M., Fauchet, R., and Genetet, B. (1975). [Letter: Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen]. *Nouv. Presse Médicale* *4*, 1432.
- Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, and et al (2001). Prevalence of c282y and h63d mutations in the hemochromatosis (hfe) gene in the united states. *JAMA* *285*, 2216–2222.

Steinbicker, A.U., Bartnikas, T.B., Lohmeyer, L.K., Leyton, P., Mayeur, C., Kao, S.M., Pappas, A.E., Peterson, R.T., Bloch, D.B., Yu, P.B., et al. (2011). Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* 118, 4224–4230.

T

De Tayrac, M., Roth, M.-P., Jouannolle, A.-M., Coppin, H., Le Gac, G., Piperno, A., Férec, C., Pelucchi, S., Scotet, V., Bardou-Jacquet, E., et al. (2014). Genome-wide association study identifies TF as a significant modifier gene of iron metabolism in HFE hemochromatosis. *J. Hepatol.*

Terzić, R., Sehić, A., Teran, N., Terzić, I., and Peterlin, B. (2006). Frequency of HFE gene mutations C282Y and H63D in Bosnia and Herzegovina. *Coll. Antropol.* 30, 555–557.

The UK Haemochromatosis Consortium (1997). A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. *Gut* 41, 841–844.

Troisier, C.E. (1871). Diabète sucré. *Bull Soc Anat. Paris* 14, 231–235.

Trousseau, A. (1865). Glycosurie; diabete sucré. *Clin. Médicale Hôtel Paris* 663–698.

Truksa, J., Lee, P., and Beutler, E. (2009). Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 113, 688–695.

V

Vaiopoulos, G., Papanikolaou, G., Politou, M., Jibreel, I., Sakellaropoulos, N., and Loukopoulos, D. (2003). Arthropathy in juvenile hemochromatosis. *Arthritis Rheum.* 48, 227–230.

Valenti, L., Fracanzani, A.L., Rametta, R., Fraquelli, M., Soverini, G., Pelusi, S., Dongiovanni, P., Conte, D., and Fargion, S. (2012). Effect of the A736V TMPRSS6 polymorphism on the penetrance and clinical expression of hereditary hemochromatosis. *J. Hepatol.* 57, 1319–1325.

Viteri, F.E. (1994). The consequences of iron deficiency and anaemia in pregnancy on maternal health, the foetus and the infant. *SCN News U. N. Adm. Comm. Coord. Subcomm. Nutr.* 14–18.

Van Vlierberghe, H., Messiaen, L., Hautekeete, M., De Paepe, A., and Elewaut, A. (2000). Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp mutation in Flemish patients with hereditary hemochromatosis. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* 63, 250–253.

Van Vlierberghe, H., Langlois, M., Delanghe, J., Horsmans, Y., Michielsen, P., Henrion, J., Cartuyvels, R., Billiet, J., De Vos, M., and Leroux-Roels, G. (2001). Haptoglobin phenotype 2-2 overrepresentation in Cys282Tyr hemochromatotic patients. *J. Hepatol.* 35, 707–711.

Vujic Spasic, M. (2014). Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Drug Metab. Transp.* *5*, 42.

Vujić Spasić, M., Sparla, R., Mleczko-Sanecka, K., Migas, M.C., Breitkopf-Heinlein, K., Dooley, S., Vaulont, S., Fleming, R.E., and Muckenthaler, M.U. (2013). Smad6 and Smad7 are co-regulated with hepcidin in mouse models of iron overload. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1832*, 76–84.

W

Waalén, J., Felitti, V., Gelbart, T., Ho, N.J., and Beutler, E. (2002). Prevalence of hemochromatosis-related symptoms among individuals with mutations in the HFE gene. *Mayo Clin. Proc.* *77*, 522–530.

Waalén, J., Nordestgaard, B.G., and Beutler, E. (2005). The penetrance of hereditary hemochromatosis. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *18*, 203–220.

Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J.N., Schatzman, R.C., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S. (1997). Hereditary hemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 12384–12389.

Wallace, D.F., Dixon, J.L., Ramm, G.A., Anderson, G.J., Powell, L.W., and Subramaniam, N. (2005). Hemojuvelin (HJV)-associated hemochromatosis: analysis of HJV and HFE mutations and iron overload in three families. *Haematologica* *90*, 254–255.

Wallace, D.F., Summerville, L., Crampton, E.M., Frazer, D.M., Anderson, G.J., and Subramaniam, V.N. (2009). Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology* *50*, 1992–2000.

Walsh, A., Dixon, J.L., Ramm, G.A., Hewett, D.G., Lincoln, D.J., Anderson, G.J., Subramaniam, V.N., Dodemaide, J., Cavanaugh, J.A., Bassett, M.L., et al. (2006). The Clinical Relevance of Compound Heterozygosity for the C282Y and H63D Substitutions in Hemochromatosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 1403–1410.

Walters, G.O., Miller, F.M., and Worwood, M. (1973). Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J. Clin. Pathol.* *26*, 770–772.

Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zervas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., et al. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* *2*, 399–409.

Wheby, M.S., Suttle, G.E., and Ford, K.T., 3rd (1970). Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology* *58*, 647–654.

Whitlock, E.P., Garlitz, B.A., Harris, E.L., Beil, T.L., and Smith, P.R. (2006). Screening for Hereditary Hemochromatosis: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* *145*, 209–223.

- Willis, G., Jennings, B.A., Goodman, E., Fellows, I.W., and Wimperis, J.Z. (1997). A high prevalence of HLA-H 845A mutations in hemochromatosis patients and the normal population in eastern England. *Blood Cells. Mol. Dis.* *23*, 288–291.
- Wilson, J., and Jungner, G. (1968). Principles and practice of screening for disease. Public Health Pap. WHO.
- Wood, M.J., Powell, L.W., and Ramm, G.A. (2008). Environmental and genetic modifiers of the progression to fibrosis and cirrhosis in hemochromatosis. *Blood* *111*, 4456–4462.

Y

- Young, I.S., Trouton, T.G., Torney, J.J., McMaster, D., Callender, M.E., and Trimble, E.R. (1994). Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic. Biol. Med.* *16*, 393–397.
- Yu, L., and Ioannou, G.N. (2007). Survival of liver transplant recipients with hemochromatosis in the United States. *Gastroenterology* *133*, 489–495.

Z

- Zhang, A.-S., Sheftel, A.D., and Ponka, P. (2005). Intracellular kinetics of iron in reticulocytes: evidence for endosome involvement in iron targeting to mitochondria. *Blood* *105*, 368–375.

VIII. ANNEXES

Annexe 1 : Teneur en fer des principaux aliments riches en fer, d'après (ANSES, 2013)

Teneur en fer (mg/100g)	Lait et produits laitiers	Céréales et dérivés	Produits carnés	Fruits, légumes et autres végétaux	Oeufs et ovoproduits	Poissons, mollusques et crustacés	Autres
15 - 25			Boudin noir cuit				Levure alimentaire
10 - 15		Céréales de petit déjeuner au son Céréales de petit déjeuner enrichies	Foie d'agneau cuit Foie de volaille cuit Lièvre en ragoût	Cacao en poudre		Clam ou Palourde crus Bigorneau cuit	
9 - 10		Biscotte complète	Rognon de boeuf, d'agneau ou de veau cuit Pâté de foie de volaille à tartiner	Farine de soja Graine de sésame			
8 - 9			Pigeon rôti Faisan rôti	Lentille sèche			
7 - 8		Germe de blé	Foie de génisse cuit Coeur de boeuf cuit	Haricot blanc sec Pistache rôtie et salée		Moules cuites	
6 - 7			Foie de veau cuit Rognon de porc cuit Foie gras	Chanterelle crue Graine de tournesol		Huître crue	
5 - 6		Blé tendre entier	Pâté de campagne Chevreuil rôti Bavette de boeuf grillée	Persil frais Abricot sec dénoyauté Noix de cajou	Jaune d'oeuf		

Annexe 1 (suite) : Teneur en fer des principaux aliments riches en fer, d'après (ANSES, 2013)

Teneur en fer (mg/100g)	Lait et produits laitiers	Céréales et dérivés	Produits carnés	Fruits, légumes et autres végétaux	Oeufs et ovoproduits	Poissons, mollusques et crustacés	Autres
4 - 5		Muesli Flocon d'avoine Biscotte diététique au son Biscuits apéritif	Boeuf braisé Steak de cheval cru	Amande			
3,5 - 4		Farine de blé complet	Pâté de foie de porc Flanchet de boeuf cuit Rosbif cuit Oie rôtie Boeuf à bourguignon cuit	Noisette		Bulot cuit Escargot cru	Levure de boulanger
3 - 3,5		Farine de sarrasin	Boeuf à pot-au-feu cuit Pâté de lapin Bifteck grillé Faux-filet grillé	Lait de noix de coco Noix de coco sèche Lentille cuite Pissenlit Noix du Brésil Datte sèche Concentré de tomate Soupe aux légumes		Crevette cuite Anchois frais cru Coquille St-Jacques cuite	Biscuits apéritifs au fromage

Annexe 2 : Questionnaire médical



Sexe H F

Année de naissance (_____)

Département de naissance (_____)

CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE DE LA SURCHARGE EN FER

Enquête familiale Autre

Signes d'appel (préciser)

Age au diagnostic	ans
Poids	kg
Taille	cm

RENSEIGNEMENTS BIOLOGIQUES

Au moment du diagnostic

Année du diagnostic (_____)

Fer sérique	μmol/L	Fer sérique	μg/dL	Coeff. SAT	%	Ferritine	ng/mL
S.G.O.T.	UI/L	S.G.P.T.	UI/L	Gamma-GT	UI/L	V.G.M	μ ³
Glycémie	g/L	Cholestérol	g/L	Triglycérides	g/L	Acide urique	mmol/L
C.R.P.	mg/L	Ag HBs		Ac Anti-HBc		Ac Anti-HCV	

Commentaire

PONCTION BIOPSIE HEPATIQUE

I.H.F. S.H.F.

Oui Non Date (____/____/____)

Commentaire

ECHOGRAPHIE HEPATIQUE

Commentaire

Oui Non Date (____/____/____)

I.R.M.

C.H.F. dosage estimé μmol/g

Oui Non Date (____/____/____)

Commentaire

RECHERCHE DES MUTATIONS DU GENE HFE

C282Y	+/+ <input type="checkbox"/>	H63D	+/+ <input type="checkbox"/>	S65C	+/+ <input type="checkbox"/>	AUTRES
	+/- <input type="checkbox"/>		+/- <input type="checkbox"/>		+/- <input type="checkbox"/>		
	-/- <input type="checkbox"/>		-/- <input type="checkbox"/>		-/- <input type="checkbox"/>		

Mutation à l'état homozygote (+/+) - Mutation à l'état hétérozygote (+/-) - Absence de la mutation (-/-)

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

Au moment du diagnostic

	OUI	NON		OUI	NON
Asthénie _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Troubles métaboliques _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mélanodermie _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Hypercholestérolémie</i> <input type="checkbox"/>		
Cardiopathie _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Hypertriglycéridémie</i> <input type="checkbox"/>		
H.T.A _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Hyperuricémie</i> <input type="checkbox"/>		
Hépatomégalie _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porphyrie Cutanée Tardive _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arthropathie _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hépatites virales chroniques _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabète _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Hépatite B</i> <input type="checkbox"/> (date) _____		
Type 1 <input type="checkbox"/> Type 2 <input type="checkbox"/>			<i>Hépatite C</i> <input type="checkbox"/> (date) _____		
Hypogonadisme _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Autres <input type="checkbox"/> (préciser) _____		
			Maladies hématologiques (préciser) _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Antécédents médicaux _____
 et chirurgicaux _____

Traitement en cours _____

SOUSTRACTIONS SANGUINES

Protocole d'attaque

Date de désaturation	Nombre de saignées	Volume moyen prélevé par saignée	Valeurs biologiques à la désaturation		
			Fer sérique	Coeff. Saturation	Ferritine
		ml	$\mu\text{mol/l}$	%	ng/ml

OBSERVATIONS

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

DONS DE SANG ET/OU PERTES PHYSIOLOGIQUES

- **DONS REGULIERS DE SANG** Oui Non Si oui, nombre
- **PERTES CHRONIQUES**
- Saignements gastro-intestinaux Oui Non
- Hématurie chronique Oui Non
- Infections parasitaires Oui Non
- Autres
- **POUR LES FEMMES**
- Grossesses Oui Non Si oui, nombre
- Contraception et/ou traitement hormonal Oui Non Oestrogène Stérilet
- Ménopause Oui Non Si oui, âge

APPORT EXCESSIF EN FER

- **TRANSFUSION SANGUINE** Oui Non Si oui, nombre
- **SUPPLEMENTATION EN FER** Oui Non
- Durée et nature du traitement
- **ALIMENTATION RICHE EN FER**
- | | Nombre de repas/semaine | | |
|-----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Coquillages | 0 <input type="checkbox"/> | 1 – 3 <input type="checkbox"/> | > 3 <input type="checkbox"/> |
| Abats, viandes rouges et oeufs | 0 <input type="checkbox"/> | 1 – 5 <input type="checkbox"/> | > 5 <input type="checkbox"/> |
| Fruits secs et oléagineux, légumes secs | 0 <input type="checkbox"/> | 1 – 3 <input type="checkbox"/> | > 3 <input type="checkbox"/> |

AUTRES FACTEURS

- **CONSOMMATION IMPORTANTE DE SUBSTANCES SUSCEPTIBLES DE MODIFIER L'ABSORPTION DU FER**
- Thé (pendant et/ou en fin de repas) Oui Non
- Vitamine C (médicament et/ou fruits) Oui Non
- Nombre de fruits riches en vitamine C **par jour** (.....)
- **CONSOMMATION D'ALCOOL**
- Type de consommation Quotidienne Occasionnelle Nulle
- Nombre de verres d'alcool **par jour** (vin, alcool fort, bière,...) (.....)
- Antécédents d'alcoolisme Oui Non Si oui, nombre d'années (.....)
- Date de l'arrêt (...../...../.....)

.....

(/ /)

Sexe H F Année de naissance ()**ALIMENTATION RICHE EN FER****Nombre de repas/semaine**

Coquillages	0 <input type="checkbox"/>	1 - 3 <input type="checkbox"/>	> 3 <input type="checkbox"/>
Abats, viandes rouges et oeufs	0 <input type="checkbox"/>	1 - 5 <input type="checkbox"/>	> 5 <input type="checkbox"/>
Fruits secs et oléagineux, légumes secs	0 <input type="checkbox"/>	1 - 3 <input type="checkbox"/>	> 3 <input type="checkbox"/>

ALIMENTS RICHES EN FER

COQUILLAGES	Moules, coques, huîtres
ABATS	Boudin, foie, rognons, cœur
VIANDES ROUGES	
OEUFS	
FRUITS SECS	Abricots, raisins, pruneaux, noix de coco
FRUITS OLEAGINEUX	Noix, noisettes, cacahuètes, pistaches, amandes
LEGUMES SECS	Haricots blancs/rouges, lentilles, pois chiche

CONSOMMATION IMPORTANTE DE SUBSTANCES SUSCEPTIBLES DE MODIFIER L'ABSORPTION DU FER

Thé (pendant et/ou en fin de repas) Oui Non

Vitamine C (médicament et/ou fruits) Oui Non

Nombre de fruits riches en vitamine C **par jour** ()

FRUITS OU JUS DE FRUITS RICHES EN VITAMINE C

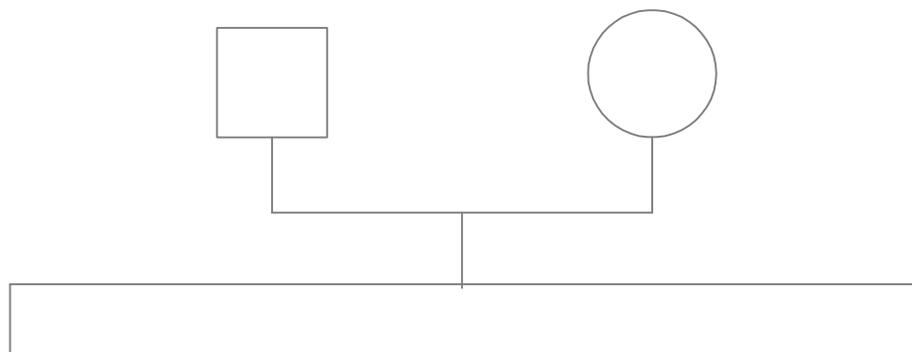
KIWIS	
AGRUMES	Oranges, pamplemousses, clémentines, citrons
FRUITS EXOTIQUES	Mangues, papayes

ARBRE GENEALOGIQUE

NE MENTIONNER NI NOM, NI PRENOM, UNIQUEMENT L'ANNEE DE NAISSANCE

Génération I

(Les parents du probant)



Génération II

(Le probant et sa fratrie)

Génération III

(Les enfants du probant)

1.- Utiliser des carrés (homme) et des cercles (femme) pour l'indication du sexe

2.- Indiquer par une étoile la position du probant sur l'arbre

3.- Indiquer par une flèche les sujets qui présentent ou qui ont présenté une surcharge en fer

Le patient est apparenté aux malades suivants :

Lien de Parenté	Sexe	Année de Naissance
-----	H <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	(_____)
-----	H <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	(_____)
-----	H <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	(_____)
-----	H <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	(_____)



Annexe 3 :

FICHE D'INFORMATION AUX PATIENTS

Madame, Monsieur,

Nous sollicitons votre participation à une étude épidémiologique dirigée par le Professeur Claude FEREC, Directeur Médical et Scientifique de l'Etablissement Français du Sang – Bretagne, en collaboration avec le Docteur de l'Etablissement Français du Sang – site de

Cette fiche d'information peut contenir des termes que vous ne comprenez pas. N'hésitez pas à demander au médecin ou au personnel de l'étude de vous expliquer tout mot ou toute information que vous ne comprenez pas clairement.

Contexte de l'étude :

A la suite de la découverte d'une surcharge en fer, un protocole thérapeutique vous a été proposé. Ce protocole comprend deux étapes. La première, qualifiée de «phase d'attaque», a pour objectif de dépléter l'organisme de la surcharge accumulée. Elle consiste classiquement en la soustraction hebdomadaire d'une poche de sang de 350 à 500 mL. La deuxième phase du traitement, qualifiée de «phase d'entretien», a pour but d'éviter une réaccumulation de fer. Il s'agit d'un traitement à vie qui, suivant le bilan biologique, va consister à réaliser des soustractions de sang tous les deux à six mois.

Les surcharges en fer sont particulièrement fréquentes dans l'Ouest de la France. Leurs origines sont diverses et sont encore difficiles à classer. On distingue cependant le groupe des surcharges en fer innées, qui repose aujourd'hui sur la présence de mutations au sein de six gènes du métabolisme du fer (gènes des hémochromatoses héréditaires), des surcharges en fer acquises qui, en France, sont essentiellement le fait d'un syndrome polymétabolique ou d'une cirrhose évoluée. On sait également que plusieurs cas de surcharges en fer peuvent relever d'une interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs non génétiques (ou facteurs environnementaux).

But de l'étude :

Il s'agit d'analyser les facteurs génétiques et environnementaux à l'origine des surcharges en fer observées chez les patients admis dans un protocole de soustractions sanguines au sein de l'un des sites de l'Etablissement Français du Sang.

Contrainte :

Dans le cadre du suivi médical lié à votre surcharge en fer, les valeurs de plusieurs paramètres biologiques vont être déterminées. Des analyses génétiques visant à établir un diagnostic d'hémochromatose héréditaire vous seront également proposées. Celles-ci consisteront systématiquement en une recherche des mutations C282Y, H63D et S65C du gène *HFE*. Dans un deuxième temps, en fonction des éléments portés à la connaissance du Docteur, une recherche de mutations rares sur l'ensemble des gènes associés à une forme d'hémochromatose héréditaire pourra être envisagée.

Pour les besoins de l'étude épidémiologique à laquelle nous vous demandons de participer, nous avons augmenté le nombre de rubriques du questionnaire médical utilisé par les médecins en charge des protocoles de soustractions sanguines au sein de l'Etablissement Français du Sang.

Déroulement de l'étude :

L'étude sera réalisée à partir des questionnaires médicaux collectés sur les sites participant. Les données de ces questionnaires seront transmises, sous couvert d'anonymat, sur le site de Brest afin d'y être saisies et analysées.

Le fichier informatique contenant l'ensemble des informations a fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés. Vous pouvez vous opposer à la saisie des informations vous concernant sans encourir de conséquences. Les soins prodigués par l'équipe médicale seront bien sûr toujours méticuleux. Si vous acceptez de participer à l'étude, vous garderez un droit d'accès et de rectification à tout moment sur les données enregistrées. Vous pourrez exercer ce droit auprès du Docteur

Cette étude a reçu un avis favorable du Comité d'Ethique de Brest le 15 décembre 2003.

A la fin de l'étude, vous pourrez, à votre demande, être informé des résultats globaux obtenus en vous adressant à :

Monsieur le Professeur Claude FEREC
Directeur Médical et Scientifique
Etablissement Français du Sang - Bretagne
46 rue Félix Le Dantec
BP 62025
29220 Brest cedex 2



Annexe 4 : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Je soussigné(e), (Nom et Prénom)
déclare avoir été informé(e) par le Docteur
de l'Etablissement Français du Sang – site de
de la nature, des buts et des contraintes de l'étude épidémiologique «Recherche et analyse des
facteurs génétiques et environnementaux à l'origine des surcharges en fer observées chez les
patients admis dans un protocole de saignées au sein des Etablissements de Transfusion Sanguine
du Grand Ouest» et donne mon accord de participation.

Cette étude est dirigée par le Professeur Claude FEREC, Directeur Médical et Scientifique de
l'Etablissement Français du Sang – Bretagne.

Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser.

J'accepte de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans la fiche d'information et
mon consentement ne décharge en rien les organisateurs de leurs responsabilités.

Je conserve tous mes droits garantis par la loi. Si je le désire, je serai libre à tout moment d'arrêter
ma participation en informant le médecin.

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation
que par des personnes qui collaborent à la recherche désignée par l'organisateur, et les
représentants des autorités de santé. Je pourrai à tout moment demander des informations
complémentaires au Docteur (Tél :/...../...../...../.....)

Fait à

Le

Signature de l'investigateur,

Signature du patient,



**CONSENTEMENT ECRIT
POUR UNE ETUDE DE GENETIQUE A DES FINS MEDICALES**

Je soussigné,, après avoir reçu
les informations nécessaires du Docteur
sur la maladie
accepte que soit réalisées :

- sur moi-même
- sur mon enfant mineur : nom, prénom
- sur la personne placée sous ma tutelle : nom, prénom

les analyses qui permettront de déterminer si mon patrimoine génétique contient une ou plusieurs mutations associées avec la maladie envisagée ou présente.

Fait à

Le

Signature,

Résumé

Hémochromatose *HFE* : influence de facteurs génétiques et non génétiques sur l'expression phénotypique

L'hémochromatose *HFE* est une maladie du métabolisme du fer liée au gène *HFE* dont la principale mutation est C282Y. L'objectif général de ce travail était d'étudier l'influence de facteurs génétiques et non génétiques sur l'expression phénotypique de patients atteints d'hémochromatose *HFE*. Cette étude prospective incluait les patients C282Y/C282Y et C282Y/H63D inclus en protocole de saignées entre janvier 2004 et décembre 2011 au centre de santé brestois de l'EFS-Bretagne. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du génotype C282Y/H63D sur la survenue d'une surcharge en fer. Nous avons confirmé que le variant H63D doit être considéré comme un facteur de susceptibilité dont l'expression est liée à la présence de co-facteurs responsables d'une hyperferritinémie. Ensuite, nous avons étudié le rôle des grossesses et de l'alimentation sur l'expression phénotypique du génotype C282Y homozygote. Nous avons montré qu'il existe bien une différence d'expressivité clinique liée au sexe chez les patients C282Y/C282Y. Cependant, nos données n'ont pas confirmé l'effet protecteur typiquement attribué aux grossesses pour expliquer la plus lente accumulation de fer chez les femmes. Cette étude a également mis en évidence une association modérée entre la consommation d'aliments riches en fer et le degré de surcharge en fer des patients C282Y homozygotes traités par phlébotomies. Ce travail contribue à mieux comprendre l'hétérogénéité phénotypique observée dans l'hémochromatose *HFE*. La finalité est de pouvoir repérer précocement les sujets les plus à risque de développer les surcharges en fer les plus sévères et par conséquent des complications cliniques.

Mots-clés : Hémochromatose *HFE* - C282Y - Maladie multifactorielle - Surcharge en fer - Pénétrance incomplète – Epidémiologie – Grossesse - Alimentation

Abstract

HFE hemochromatosis : influence of genetic and non genetic factors on phenotypic expression

HFE hemochromatosis is a disorder of iron metabolism related to the *HFE* gene whose main mutation is C282Y. The overall aim of this study was to investigate the influence of genetic and non genetic factors on phenotypic expression of patients with *HFE* hemochromatosis. This prospective study included the C282Y/C282Y and C282Y/H63D patients enrolled in a phlebotomy program between 2004 and 2011 in a blood centre of western Brittany (Brest, France). First, we assessed the weight of the C282Y/H63D genotype in the occurrence of iron overload. We confirmed that H63D is a discrete genetic susceptibility factor whose expression is most visible in association with other co-factors responsible for hyperferritinemia. Then we investigated the effect of pregnancies and iron-rich diet on phenotypic expressivity of the C282Y/C282Y genotype. We have shown that there is a difference in clinical expression related to gender in C282Y/C282Y patients. However our findings did not confirm that pregnancies protect against iron accumulation in women. This study established a moderate link between dietary iron intake and the degree of iron overload in *HFE* hemochromatosis patients who come to medical attention. This work contributes to a better understanding of the phenotypic heterogeneity observed in *HFE* hemochromatosis. The purpose is to identify precociously subjects the most at risk of developing iron overload and therefore clinical complications.

Keywords: *HFE* hemochromatosis - C282Y - Multifactorial disease - Iron overload - Incomplete penetrance – Epidemiology – Pregnancy - Diet