

Actualités sur l'hémochromatose

MODULE 3

Olivier LORÉAL, Caroline LE LAN, Marie-Bérengère TROADEC, Dominique GUYADER, Pierre BRISSOT

INSERM U-522 et Service des Maladies du Foie, CHRU Pontchaillou, 35033 Rennes Cedex.

TABLE DES MATIÈRES

HÉMOCHROMATOSE GÉNÉTIQUE ET MUTATIONS DU GÈNE HFE

- Anomalies des mouvements du fer et hémochromatose génétique
- Le gène et la protéine HFE
- Mutations du gène HFE et hémochromatose génétique
 - Mutation C282Y et phénotype hémochromatosique.
 - Autres mutations du gène HFE et surcharges en fer
- HFE joue un rôle dans le métabolisme du fer
- Quelle(s) fonction(s) moléculaire(s) pour HFE ?
 - HFE régulateur de l'absorption digestive du fer ?
 - HFE et macrophages
 - HFE et hepcidine

HÉMOCHROMATOSSES GÉNÉTIQUES ET AUTRES GÈNES DU MÉTABOLISME DU FER

- Hémochromatoses juvéniles (hémochromatose HFE-2)
- Surcharges en fer associées à une mutation du gène du récepteur de la transferrine 2 (hémochromatose HFE-3)
- Surcharges en fer liées à la ferroportine (hémochromatoses HFE-4)
- Autres surcharges en fer d'origine génétique non liées à HFE

POUR LA PRATIQUE CLINIQUE

- Le diagnostic de l'hémochromatose génétique HFE-1
 - Présentation clinique
 - Présentation biologique
 - Diagnostic
- Le diagnostic des hémochromatoses génétiques non liées à une mutation du gène HFE
- Traitement et surveillance

CONCLUSIONS

En 1865 une pathologie que résumait l'appellation « cirrhose portale avec diabète bronzé » était identifiée par Trousseau [1] et précisée par Von Recklinghausen [2]. Avec le temps, la description de cette pathologie s'est affinée. Le lien avec une anomalie du métabolisme du fer aboutissant à la constitution progressive d'une surcharge en fer a été fait et le caractère systémique de cette maladie est clairement apparu puisque à côté des atteintes hépatique, pancréatique et cutanée, des manifestations cardiaques, articulaires et endocrines ont été peu à peu décrites. Enfin, le caractère génétique de

CONTENTS

Update on hemochromatosis

Olivier LORÉAL, Caroline LE LAN, Marie-Bérengère TROADEC, Dominique GUYADER, Pierre BRISSOT

(Gastroenterol Clin Biol 2004;28:D92-D102)

INTRODUCTION

GENETIC HEMOCHROMATOSIS AND HFE GENE MUTATIONS

- Iron metabolism and genetic hemochromatosis
- HFE gene and protein
- HFE gene mutations and genetic hemochromatosis
 - C282Y mutation and hemochromatotic phenotype
 - Other HFE gene mutations and iron overload
- HFE plays a role in iron metabolism
- Which molecular function(s) for HFE?
 - HFE a regulator of digestive iron absorption?
 - HFE and macrophages
 - HFE and hepcidin

GENETIC HEMOCHROMATOSIS AND OTHER GENES OF IRON METABOLISM

- Juvenile hemochromatosis (HFE-2 hemochromatosis)
- Iron overload diseases associated with transferrin receptor 2 mutations (HFE-3 hemochromatosis)
- Iron overload linked to ferroportin gene (HFE-4 hemochromatosis)
- Other genetic iron overload diseases

CLINICAL PRACTICE

- Diagnostic of HFE-1 genetic hemochromatosis
 - Clinical presentation
 - Biochemical parameters
 - Diagnosis
- Diagnosis of non HFE related hemochromatosis
- Treatment and follow-up

CONCLUSIONS

cette pathologie, qui avait été évoqué [3], a été affirmé en 1975 par Simon et al. [4, 5] qui ont montré le caractère autosomique récessif de la maladie et la présence du gène incriminé sur le bras court du chromosome 6. Cependant le(s) gène(s) impliqués restaient à identifier.

C'est en 1996 que Feder et al. [6] sont parvenus, après avoir réalisé une approche visant à identifier de façon plus précise la région suspecte du chromosome 6 et les gènes présents au sein de cette région, à mettre en évidence : 1) le gène HFE inconnu

auparavant et 2) l'association entre la mutation C282Y de ce gène et le phénotype d'hémochromatose génétique « classique ».

L'identification du gène HFE, couplée aux développements technologiques notamment dans le domaine de la biologie moléculaire, a représenté le début d'une nouvelle ère dans le domaine des pathologies de surcharge en fer. En effet, ils ont permis : 1) d'améliorer la prise en charge des patients hémochromatosiques, 2) de préciser que la pénétrance de l'hémochromatose génétique liée à HFE était incomplète et 3) de mettre en évidence l'hétérogénéité des pathologies de surcharges en fer puisque, à côté de l'hémochromatose génétique liée au gène HFE, d'autres pathologies de surcharge en fer liées à des mutations d'autres gènes, et correspondant donc à des hémochromatoses génétiques, ont pu alors être identifiées. Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant d'une part au développement des surcharges en fer au cours de ces pathologies et à leurs complications restent imparfaitement connus.

Hémochromatose génétique et mutations du gène HFE

Anomalies des mouvements du fer et hémochromatose génétique

L'hémochromatose génétique, dans sa forme classique (pour une revue voir [7]), est caractérisée par une surcharge en fer polyviscérale qui résulte au moins pour une part d'une hyperabsorption digestive du fer comparable à celle normalement observée au cours des anémies liées aux carences en fer. Cette absorption excessive de fer, qui s'effectue au niveau duodénal, entraîne une augmentation du stock en fer de l'organisme puisque les pertes martiales quotidiennes (1 à 2 mg/jour) qu'elle équilibre ne sont pas régulables. Le fer en excès est avant tout stocké au niveau du foie, la surcharge en fer étant d'abord localisée au niveau hépatocytaire, les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) n'étant, au contraire de ce qui est observé au cours des surcharges transfusionnelles, que très tardivement concernés.

Cette observation histologique, couplée au fait qu'il n'est pas retrouvé de surcharge splénique, fait de plus évoquer une anomalie du métabolisme macrophagique du fer au cours de l'hémochromatose génétique [8]. Le macrophage joue un rôle clé dans le métabolisme du fer car il recycle le fer provenant de l'érythrophagocytose des hématies sénescents. Il redistribue ensuite progressivement du fer dans le plasma. Il est important de noter que la plus grande partie du fer biodisponible présent dans le plasma à un instant donné provient du recyclage macrophagique du fer, la contribution du secteur digestif, bien que nécessaire sur le long terme, n'étant que très faible (pour une revue, voir [9, 10]). Au cours de l'hémochromatose génétique, le macrophage serait incontinent vis-à-vis du fer, le laissant fuir en excès. Il n'est pas exclu que cette anomalie, en favorisant un déséquilibre entre les différents compartiments de l'organisme, participe à l'apparition de l'hyperabsorption digestive de fer.

Le gène et la protéine HFE

C'est donc en 1996 que le gène HFE, localisé sur le chromosome 6, à proximité des gènes codant les molécules HLA, a été décrit pour la première fois [6]. Ce gène comprend 7 exons et code une protéine de type HLA classe I like. Le produit de ce gène, la protéine HFE, possède un domaine transmembranaire et 3 domaines globulaires extracellulaires. Elle est exprimée sur la

membrane plasmique cellulaire avec la bêta 2 microglobuline qui lui est associée durant le processus de synthèse et de maturation du fait d'une interaction de celle-ci avec les domaines globulaires de HFE [6]. Chez l'homme, par immunolocalisation [11], elle a été détectée tout au long du tube digestif, et au niveau des macrophages [12], en particulier dans les cellules de Kupffer [11]. Cette double localisation est importante compte tenu du rôle clé du tube digestif et des macrophages dans le métabolisme du fer. Au niveau du tube digestif, la localisation cytoplasmique ou membranaire de la protéine varie selon la section du tube digestif étudiée. Dans le duodénum, où s'effectue l'absorption digestive de fer, la protéine est exprimée sur la membrane cytoplasmique basale des entérocytes cryptiques alors qu'elle n'est pas visualisée au niveau des entérocytes de l'apex des villosités [11].

Mutations du gène HFE et hémochromatose génétique

Dans leur travail princeps Feder et al. rapportent, à côté de la mutation C282Y du gène HFE, l'existence d'une seconde mutation (H63D). Depuis cette date, d'autres mutations du gène HFE ont été rapportées. Leur importance dans le développement d'un phénotype hémochromatosique reste à préciser.

MUTATION C282Y ET PHÉNOTYPE HÉMOCROMATOSIQUE

La mutation C282Y (remplacement d'une cystéine par une tyrosine en position 282) du gène HFE est retrouvée de façon extrêmement fréquente dans les populations d'origine caucasienne, puisque 1 individu sur 10 présente la mutation à l'état hétérozygote, et 1/200 à l'état homozygote [13]. Cette dernière donnée ferait de l'hémochromatose génétique liée à la mutation C282Y du gène HFE l'une des maladies génétiques les plus fréquentes. Il est alors apparu important de préciser : 1) s'il existait ou non des patients présentant un tableau d'hémochromatose génétique non lié à la mutation C282Y du gène HFE et 2) le niveau de pénétrance de la maladie.

Feder et al. [6] avaient montré dès le départ que la majorité des patients (83 %) présentant un tableau d'hémochromatose génétique classique étaient porteurs de la mutation C282Y à l'état homozygote. La mutation retrouvée à l'état hétérozygote n'était pas associée au tableau d'hémochromatose génétique. Cette donnée a été confirmée par les études ultérieures réalisées dans les populations caucasiennes dont les ancêtres étaient originaires d'Europe du Nord : la présence de la mutation C282Y à l'état homozygote était retrouvée chez 96 % des patients hémochromatosiques en Bretagne [14], 91 % et au Royaume-Uni [15] et, 100 % en Australie [16] notamment. Cependant, un gradient décroissant de l'association entre homozygotie pour la mutation C282Y du gène HFE et phénotype hémochromatosique existe entre le Nord et le Sud de l'Europe, puisqu'elle n'est retrouvée que dans 68 % des cas dans le sud de la France [17], 64 % en Italie [18], et 30 % en Grèce [19]. Ces constatations viennent à l'appui du rôle d'autres mutations du gène HFE ou de mutations dans d'autres gènes du métabolisme du fer comme élément(s) déterminant le développement d'une hémochromatose génétique. La mutation C282Y à l'état homozygote n'est donc pas nécessaire au développement d'une surcharge en fer faisant évoquer une hémochromatose génétique.

La notion que la pénétrance de l'homozygotie C282Y était incomplète est rapidement apparue. En effet, si la majorité des études familiales effectuées dans le cadre de l'enquête qui suit la découverte d'un probant malade homozygote pour la mutation C282Y du gène HFE permettent de retrouver des anomalies du bilan martial dans la fratrie qui présente le même génotype HFE, certaines d'entre elles ont permis de mettre en évidence des sujets

C282Y/C282Y (homozygotie pour la mutation) qui ne présentent aucune anomalie biologique [14]. Les études systématiques de pénétrance de la maladie effectuées dans la population générale avec réalisation du génotypage et d'un bilan martial ont renforcé cette hypothèse [20, 21]. L'étude la plus récente effectuée aux États-Unis sur plus de 40 000 sujets suggère que la pénétrance n'est pas supérieure à 1 % [22]. Même si certains biais méthodologiques ont été mis en évidence et peuvent expliquer ce chiffre très bas, la certitude d'une pénétrance incomplète de la mutation C282Y homozygote est acquise. Les études ultérieures permettront de préciser le chiffre réel. Cette pénétrance incomplète est un élément très important pour la compréhension de la pathologie car elle ouvre de nouvelles portes. En effet, la mutation C282Y/C282Y n'est pas suffisante pour l'apparition d'un tableau d'hémochromatose génétique [23]. Cette constatation suggère, à côté de la mutation C282Y, le rôle d'autres facteurs environnementaux ou génétiques, dans l'apparition de la maladie. Le séquençage, dans des groupes de malades C282Y/C282Y exprimant ou non la maladie, des gènes du métabolisme du fer n'a pas permis pour l'instant d'identifier un polymorphisme génétique déterminant la présentation clinique.

AUTRES MUTATIONS DU GÈNE HFE ET SURCHARGES EN FER

D'autres mutations ont été rapportées dans le gène HFE. Leur impact sur le bilan martial reste souvent à clarifier.

Mutation H63D

La plus fréquente est la mutation H63D (remplacement d'une histidine par un acide aspartique en position 63, qui résulte d'une substitution d'une cystine par une guanine en position 187 au niveau de l'exon 2). Elle a été rapportée dès le départ par Feder et al. [6]. Présente dans 30 % de la population générale, elle n'apparaissait pas initialement surreprésentée dans la population de patients hémochromatosiques surchargés en fer. Un fait d'importance est que la coexistence de la mutation C282Y et H63D sur un même allèle n'a jamais été rapportée, chacune des mutations étant exclusive compte tenu de l'absence de recombinaison génétique dans cette région [6]. Un impact de cette mutation sur le métabolisme du fer n'est pas exclu puisque certains malades porteurs d'une mutation C282Y à l'état hétérozygote sur un allèle et d'une mutation H63D sur l'autre allèle (hétérozygotie composite C282Y/H63D) présentent une faible perturbation du bilan martial avec des élévations en règle modérées de la saturation de la transferrine, de la ferritinémie et de la charge en fer [20, 21]. L'impact de la mutation H63D à l'état hétérozygote est sans doute inexistant, et reste débattu à l'état homozygote [24, 25].

Mutation S65C

Cette mutation provoque la substitution d'une sérine par une cystéine en position 65 [26]. Là encore la mutation n'est jamais retrouvée avec la mutation H63D ou la mutation C282Y sur un même chromosome et apparaît exclusive. Certaines études suggèrent que cette mutation présente chez 1 à 5 % de la population caucasienne pourrait être impliquée dans le développement de surcharges en fer de faible importance notamment dans le cadre d'hétérozygotie composite C282Y/S65C ou H63D/S65C [26, 27].

Autres mutations

D'autres mutations, exceptionnelles, conduisant à des modifications de la structure protéique, ont été rapportées dans la littérature (revue en [28]). Certaines d'entre elles ont été retrouvées en hétérozygotie composite avec une mutation C282Y ou bien H63D. L'impact de ces mutations, souvent retrouvées de façon unique, sur le métabolisme du fer reste à préciser.

HFE joue un rôle dans le métabolisme du fer

Bien que proche structurellement des molécules HLA de classe I, HFE ne jouerait pas de rôle dans la présentation d'antigènes. Si, comme nous le verrons, les fonctions moléculaires qu'elle exerce ne sont pas identifiées, on peut affirmer avec certitude qu'elle joue un rôle dans le contrôle du métabolisme du fer.

L'association de la mutation C282Y et du phénotype hémochromatosique a bien sûr été le premier élément en faveur du rôle de HFE dans le métabolisme du fer. La conséquence de cette mutation est la rupture d'un pont disulfure qui participe à la conformation globulaire de la partie extracellulaire, gênant l'association avec la bêta 2 microglobuline et altérant ainsi l'expression de la protéine sur la membrane des cellules [6, 12, 29]. Les mutations H63D et S65C n'entraînent *a priori* pas de modifications aussi importantes de la zone d'interaction avec la bêta 2 microglobuline. Ainsi pourrait s'expliquer le moindre impact de ces mutations sur le métabolisme du fer.

L'hypothèse du rôle de la protéine HFE dans le métabolisme du fer a été confirmée par l'obtention, par plusieurs équipes, de souris invalidées (*knock-out*) pour le gène HFE qui, alors qu'elles n'exprimaient pas la protéine HFE, ont développé une surcharge en fer comparable à celle observée au cours de l'hémochromatose génétique [30-32]. De plus, Levy et al. [32] générant des souris *knock-in*, c'est-à-dire présentant une mutation du gène HFE identique à la mutation observée C282Y chez l'homme, ont aussi mis en évidence une surcharge en fer « hémochromatosique ». Enfin, un argument supplémentaire est apporté par la constatation chez les souris invalidées pour le gène de la bêta 2 microglobuline (partenaire de HFE) du développement d'une surcharge en fer [33].

Quelle(s) fonction(s) moléculaire(s) pour HFE ?

Le mécanisme moléculaire qui lie HFE au métabolisme du fer reste imparfaitement connu. Un rôle de HFE comme molécule participant, au niveau entérocytaire, aux mécanismes permettant d'apprécier le contenu de l'organisme en fer et d'adapter alors le niveau d'absorption digestive de fer est évoqué. L'impact de l'expression d'HFE au niveau macrophagique apparaît aussi non négligeable. Enfin, plus récemment, le rôle de l'expression d'HFE dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine, molécule clé du métabolisme du fer, a été montré. Malgré tout de nombreuses incertitudes persistent.

HFE RÉGULATEUR DE L'ABSORPTION DIGESTIVE DU FER ?

Très rapidement après la description de l'association entre la mutation C282Y du gène HFE et le phénotype hémochromatosique, un autre élément a permis de rapprocher la molécule HFE du métabolisme du fer, mais cette fois au niveau moléculaire.

En effet, dans une étude structurale, Lebron et al. [34], ont clairement montré l'association possible du complexe HFE -bêta 2 microglobuline avec le récepteur de la transferrine 1. Ce récepteur est une molécule clé du métabolisme du fer car il permet aux cellules d'effectuer la première étape de captation du fer-transferrine à partir du courant plasmatique participant ainsi aux mécanismes qui permettent d'assurer l'approvisionnement en fer de la cellule. Ceci est réalisé (pour une revue voir [9, 10, 35]), après liaison de la transferrine chargée en fer au récepteur de la transferrine, par internalisation du complexe au cours d'un processus d'endocytose. Le récepteur est ensuite recyclé à la surface de la cellule après libération du fer dans la vésicule d'endocytose puis transfert dans le cytosol, probablement grâce au transporteur transmembranaire de fer qu'est DMT1 (Divalent

Metal Transporter 1). Cette liaison du récepteur de la transferrine à HFE a été confirmée biologiquement [34].

Différentes études ont montré que la protéine HFE normale pourrait diminuer l'affinité de la transferrine pour le récepteur de la transferrine et affecter ainsi la quantité de fer-transferrine internalisé dans la cellule, en particulier au niveau entérocytaire au niveau de son pôle basal [36, 37] (figure 1). Cependant, dans cette hypothèse, lorsque existe une mutation C282Y, la non expression de HFE sur la membrane cellulaire devrait conduire à une pénétration plus importante de fer-transferrine dans l'entérocyte, informant la cellule d'un niveau de fer plasmatique trop élevé dans l'organisme. Ceci est paradoxal puisque l'entérocyte apical du malade atteint d'hémochromatose a une absorption de fer augmentée et se comporte en fait comme un entérocyte averti qu'il n'y a pas assez de fer dans l'organisme. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que la régulation de l'expression de la ferritine, du récepteur de la transferrine et de l'*Iron Regulatory Protein* (IRP), protéines régulées par le stock en fer cellulaire, étaient coordonnées [38]. Il faut cependant mentionner que la majorité des résultats sur la relation HFE-récepteur de la transferrine 1 ont été obtenus *in vitro* dans des modèles surexprimant l'un ou l'autre des éléments du complexe ternaire HFE-bêta 2 microglobuline-récepteur 1 de la transferrine ce qui est probablement un élément susceptible d'introduire des biais. Ainsi, Waheed et al. [39] ont montré dans un modèle de cellules de hamster exprimant le récepteur de la transferrine 1 que la protéine HFE normale augmentait la captation du fer-transferrine par ces cellules.

Toutes ces constatations ont fait évoquer la participation de la protéine HFE au contrôle de l'absorption digestive de fer [40, 41]. L'hypothèse est que la molécule HFE qui est exprimée au niveau des entérocytes des cryptes villositaires participerait à la perception du contenu en fer de l'organisme et ainsi à la programmation du niveau d'absorption des entérocytes matures de l'apex des villosités. Plusieurs auteurs ont analysé l'expression de certaines molécules impliquées dans la captation entérocytaire du fer (figure 2). Les résultats obtenus concernant DMT1, qui intervient dans le transport transmembranaire apical du fer à partir de la lumière digestive vers le cytoplasme entérocytaire, sont contradictoires. En effet, une augmentation de l'expression de DMT1 a été rapportée chez la souris HFE *knock-out* et chez l'homme au cours de l'hémochromatose génétique [42-45]. À l'inverse, d'autres auteurs n'ont pas retrouvé de modification significative de ce transporteur dans des modèles murins d'hémochromatose génétique [46, 47]. Certains ont retrouvé des anomalies d'expression de *Dcytb* [45, 47], ferriréductase exprimée sur la membrane apicale de l'entérocyte et dont l'activité permet la captation de Fe^{2+} par l'entérocyte, ou bien de la ferroportine [43, 45], protéine localisée sur le versant plasmatique de l'entérocyte apical et contribuant à la sortie du fer des entérocytes vers le courant plasmatique.

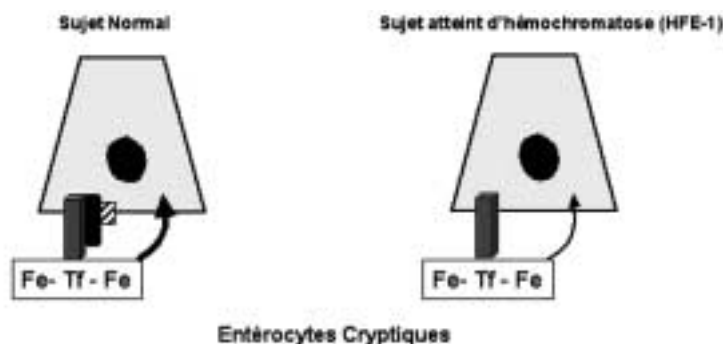


Fig. 1 – Hypothèse locale entérocytaire de l'effet de la mutation C282Y de HFE.
Hypothesis for a local effect of C282Y HFE mutation.

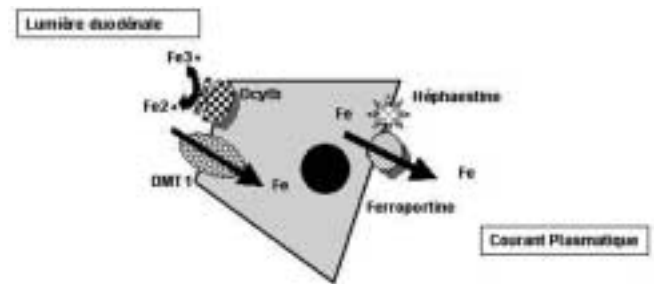


Fig. 2 – Acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans l'hyperabsorption digestive de fer par l'entérocyte apical au cours de l'hémochromatose HFE-1

Molecular actors likely involved in the iron digestive hyperabsorption during HFE-1 hemochromatosis.

HFE ET MACROPHAGES

Le macrophage est une source très importante de fer biodisponible pour l'organisme. Le fait qu'il ne se surcharge que très tardivement au cours de l'hémochromatose génétique a fait évoquer l'hypothèse d'un impact de la mutation C282Y du gène HFE sur le métabolisme du fer macrophagique.

Montosi et al. [48], étudiant des macrophages de patients hémochromatosiques ont montré que ces cellules captaient le fer en quantité comparable à celle retrouvée dans des macrophages de sujets témoins. Par contre, le fer entré dans les macrophages hémochromatosiques était libéré de façon plus rapide. Cette fuite anormale de fer était corrigée lorsque les macrophages des malades hémochromatosiques exprimaient artificiellement la protéine HFE normale. Ces constatations sont en parfait accord avec les observations histologiques et, dans ce cas, la protéine HFE normale jouerait un rôle dans le contrôle du contenu en fer du macrophage. Cette hypothèse est renforcée par les résultats similaires de Drakesmith et al. dans une lignée de monocyte/macrophage et dans des macrophages obtenus de sujets témoins et hémochromatosiques [49].

Dans le but de réconcilier les hypothèses duodénale et macrophagique, les auteurs proposent que la protéine HFE puisse jouer, selon l'état de saturation en fer de la transferrine, deux rôles distincts et exclusifs. Si la saturation de la transferrine est basse, HFE en se liant à son récepteur favoriserait la libération du fer par les macrophages et l'absorption digestive de fer. À l'inverse, si la saturation de la transferrine est haute, la molécule HFE ne pourrait se fixer sur le récepteur de la transferrine, favorisant la rétention de fer dans les macrophages et la diminution de l'absorption digestive de fer. Au cours de l'hémochromatose liée à HFE, ce mécanisme serait perturbé, limitant la capacité de rétention de fer dans les macrophages et favorisant l'absorption digestive du fer.

HFE ET HEPCIDINE

Les premières hypothèses concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du métabolisme du fer par HFE donnaient la priorité à un effet local de la molécule au niveau des cellules qui l'expriment. La mise en évidence récente de l'hepcidine, de ses liens avec le métabolisme du fer et de sa régulation anormale au cours de l'hémochromatose génétique a permis de proposer d'autres hypothèses physiopathogéniques, sans toutefois permettre un décodage complet des mécanismes en cause.

L'hepcidine, dont le gène est localisé sur le chromosome 19, est une molécule identifiée chez l'homme tout d'abord dans le plasma [50] et dans l'urine [51]. La proforme de l'hepcidine est synthétisée par le foie [50-52], et plus particulièrement par les hépatocytes [52]. La molécule a initialement été caractérisée pour ses effets antimicrobiens [50, 51]. Le rôle potentiel de l'hepcidine dans la « défense » de l'organisme a été renforcé par des résultats expérimentaux qui ont montré son induction dans différentes situations de stress [52-55].

Un lien entre hepcidine et métabolisme du fer a été mis en évidence par Pigeon et al. [52] qui ont identifié deux gènes homologues codant l'hepcidine chez la souris (hepcidine 1 et 2) et mis en évidence l'induction de l'expression de l'hepcidine lors d'une surcharge en fer expérimentale. Cette inductibilité était retrouvée, à un niveau plus modeste, chez des souris n'exprimant pas la bêta2 microglobuline présentant une surcharge en fer d'origine génétique. Nicolas et al. [56] étudiant un modèle de souris *knock-out* pour le gène *Usf2*, localisé à proximité des gènes de l'hepcidine, ont observé que ces souris développaient une surcharge en fer comparable à celle observée au cours de l'hémochromatose génétique et mis en évidence la non expression des gènes de l'hepcidine chez ces souris. Ils ont alors émis l'hypothèse que l'hepcidine pouvait être une hormone qui régulerait le métabolisme du fer en contrôlant l'absorption digestive du fer et la sortie du fer des macrophages [56]. Cette hypothèse a été renforcée par la démonstration que des souris transgéniques hyperexprimant le gène codant l'hepcidine 1 présentaient une déficience en fer majeure qui était le plus souvent létale à la naissance [57].

L'hypothèse est donc qu'un faible niveau d'hepcidine serait à l'origine d'une surcharge en fer en favorisant l'hyperabsorption digestive de fer et la libération de fer à partir des macrophages [56]. Cette hypothèse a été largement renforcée par la description par Roetto et al. [58] de mutations homozygotes du gène de l'hepcidine chez des malades qui présentent une hémochromatose juvénile non liée à HFE. À l'inverse, un niveau élevé d'hepcidine serait responsable d'une carence en fer par limita-

tion de la captation de fer par l'organisme et rétention de fer dans les macrophages, comme observé au cours des anémies liées aux maladies inflammatoires chroniques [56, 59]. Le mécanisme moléculaire par lequel l'hepcidine pourrait contrôler le métabolisme du fer n'est actuellement pas connu.

L'hypothèse d'un rôle de l'hepcidine dans l'hémochromatose génétique liée à la mutation C282Y du gène HFE avait été évoquée [56]. Elle est renforcée par la constatation d'un niveau anormalement bas d'ARNm de l'hepcidine chez les souris *knock-out* pour le gène HFE [60] et chez des malades présentant une hémochromatose génétique [61, 62]. Un autre argument a été apporté par un modèle de souris invalidées pour le gène HFE qui exprimaient de faibles niveaux d'ARNm de l'hepcidine et présentaient une surcharge en fer, et dont le phénotype de surcharge a été corrigé en faisant exprimer le gène de l'hepcidine à un niveau élevé chez ces souris. Enfin, il faut signaler que des hémochromatoses « digéniques », associant une mutation du gène HFE à l'état hétérozygote et une mutation hétérozygote du gène de l'hepcidine ont été rapportées [64].

Les mécanismes qui lient HFE et hepcidine doivent aujourd'hui être précisés. Une interaction physique entre hepcidine plasmatique et le complexe membranaire associant HFE, bêta 2 microglobuline et récepteur de la transferrine 1 avait été évoquée mais n'est pour l'instant pas confirmée [56, 65]. Il faut noter que la démonstration d'un effet de la mutation HFE sur l'expression de l'hepcidine et l'hypothèse d'un rôle hormonal de l'hepcidine sur le métabolisme du fer vont dans le sens d'un effet systémique de la mutation HFE, le foie gouvernant alors le métabolisme du fer (figure 3). À l'inverse, tous les résultats obtenus *in vitro* dans des modèles mimant les systèmes entérocytaires et macrophagiques (voir ci-dessus) prônent un effet local de la mutation HFE. Une intégration de l'ensemble de ces données est donc nécessaire.

Le mécanisme impliqué dans le rétrocontrôle de l'expression de l'hepcidine dans l'hémochromatose liée à la mutation du gène HFE doit être précisé. Les facteurs régulateurs identifiés incluent le statut en fer de l'organisme [56, 66, 67], certains médiateurs de l'inflammation [52, 55, 68], une modification du phénotype hépatocytaire [69] et l'anémie [68, 70].

Hémochromatoses génétiques et autres gènes du métabolisme du fer

Il a récemment été identifié d'autres entités de surcharge en fer transmises génétiquement et correspondant donc à des hémochromatoses génétiques, mais non liées aux mutations du

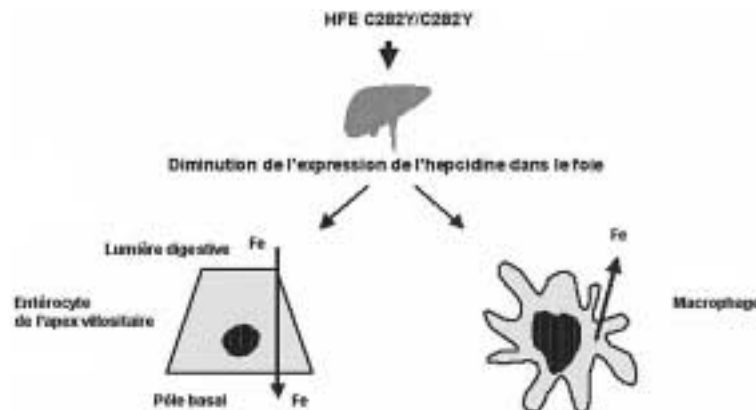


Fig. 3 – Rôle de l'hepcidine dans le développement de l'hémochromatose génétique HFE-1.
Role of hepcidin in the pathogenesis of HFE-1 hemochromatosis.

gène HFE. Une nomenclature a été proposée où l'hémochromatose génétique classique liée à HFE, de très loin la plus fréquente, a été appelée hémochromatose HFE-1, les autres hémochromatoses étant classées numériquement en fonction du gène impliqué.

Hémochromatoses juvéniles (hémochromatose HFE-2)

Classiquement, il a été décrit depuis de nombreuses années des formes juvéniles et très rares (100 patients au maximum) de l'hémochromatose qui sont caractérisées par une symptomatologie très bruyante et dont le pronostic est souvent dominé par l'atteinte cardiaque. Il avait été montré que certaines de ces hémochromatoses étaient liées à un gène localisé sur le chromosome 1, qui n'est aujourd'hui encore pas formellement identifié [73], et d'autres à des mutations homozygotes du gène de l'hepcidine [58]. Compte tenu de l'identification de deux gènes différents, cette entité (HFE-2) est appelée à évoluer, une nouvelle dénomination devant être proposée pour les hémochromatoses juvéniles liées à l'hepcidine.

Surcharges en fer associées à une mutation du gène du récepteur de la transferrine 2 (hémochromatose HFE-3)

Le gène du récepteur de la transferrine 2, homologue du classique gène du récepteur de la transferrine 1, est localisé sur le chromosome 7. Il est produit par épissage alternatif de deux transcrits (a et b). Le transcrit alpha correspond à une protéine transmembranaire exprimée majoritairement par les hépatocytes et à un moindre niveau par les cellules érythroïdes [74, 75]. La forme bêta, exprimée faiblement de façon ubiquitaire pourrait correspondre à une protéine intracellulaire. Le rôle, dans le métabolisme du fer, de ce récepteur dont l'expression n'est, au contraire du récepteur de la transferrine 1, pas régulée par la charge en fer, est inconnu. Cependant, l'association de mutations homozygotes, qui sont extrêmement rares, à un tableau de surcharge en fer atteste d'un tel rôle. Une mutation hétérozygote de ce gène ne semble pas entraîner de surcharge en fer (pour une revue, voir [28]).

Surcharges en fer liées à la ferroportine (hémochromatoses HFE-4)

Ces surcharges en fer, bien que très rares, semblent aujourd'hui être les plus fréquentes après l'hémochromatose HFE-1. La ferroportine 1 a été décrite en parallèle par trois équipes différentes [76-78]. Ce gène code une protéine transmembranaire exprimée surtout au niveau entérocytaire et macrophagique. Au niveau entérocytaire, elle jouerait au pôle basal le rôle de transporteur du fer à partir du cytoplasme vers le plasma. Cette activité nécessite la présence de l'héphaestine [79], protéine homologue de la céruloplasmine qui présente une activité ferroxidase. Au niveau macrophagique, la ferroportine faciliterait la sortie du fer et donc la réintégration de fer biodisponible dans le courant sanguin, après que le phénomène d'érythrophagocytose s'est déroulé.

Plusieurs mutations, présentes à différents niveaux de cette protéine, ont été rapportées associées à une surcharge en fer [80-83]. Le mécanisme qui lie l'existence des mutations à la constitution de la surcharge en fer, gain ou perte de fonction, reste inconnu. Au contraire des pathologies mentionnées précédemment, sa transmission est dominante. Le tableau biologique est dominé par une hyperferritinémie considérable.

Autres surcharges en fer d'origine génétique non liées à HFE

D'autres surcharges en fer d'origine génétique ont été rapportées. L'acéruлоplasminémie congénitale [84] se présente cliniquement comme une anémie par carence martiale, due à un blocage de la libération du fer des cellules. Il existe très fréquemment un contexte neurologique, dont l'intensité est variable [84-87], lié à un dépôt de fer au niveau cérébral [88] qui conditionne le pronostic. Une mutation de la ferritine H, dans la région régulatrice IRE semble favoriser le développement d'une surcharge en fer [89]. Certaines surcharges en fer, comme celle touchant les Africains, ne trouvent aujourd'hui encore pas d'explication.

Pour la pratique clinique

Le diagnostic d'hémochromatose génétique doit être réalisé au plus tôt afin d'éviter le développement des complications viscérales de la surcharge en fer. Réalisé chez un sujet (le probant), il doit, si possible, conduire à la réalisation d'un dépistage familial.

Le diagnostic de l'hémochromatose génétique HFE-1

PRÉSENTATION CLINIQUE

Le diagnostic doit être évoqué très précocement devant une asthénie, non spécifique, et/ou des arthralgies, très évocatrices alors que le tableau biologique ne retrouve parfois, à côté des anomalies du bilan martial qui vont orienter le diagnostic, qu'une discrète hypertransaminémie [90, 91] (tableau I).

Les formes évoluées doivent rester l'exception, associant diversement : 1) des anomalies cutané-phanériennes avec une mélanodermie diffuse grisâtre, atteignant également les zones non exposées à la lumière solaire, 2) une hépatomégalie, 3) un diabète, le plus souvent non insulino-dépendant, 4) des arthralgies touchant en particulier les deuxième et troisième articulations métacarpo-phalangiennes qui sont à l'origine du classique signe de la poignée de main douloureuse, mais aussi les genoux et les poignets, 5) des manifestations cardiaques à type de troubles du rythme et de la conduction auriculo-ventriculaire, voire d'insuffisance cardiaque, 6) une impuissance chez l'homme.

PRÉSENTATION BIOLOGIQUE

Le bilan martial, réalisé lors de toute évocation, est très simple [90, 91]. Il permet d'affirmer l'existence d'une anomalie du métabolisme du fer et d'orienter vers une hémochromatose de type HFE-1. Il doit associer les dosages du fer sérique, de la transferrine (protéine transportant le fer dans le plasma), de la saturation de la transferrine (le plus souvent calculée à partir des deux premiers paramètres), et de la ferritine. Son interprétation fiable nécessite de s'assurer qu'il n'existe aucun argument clinique et biologique pour un syndrome inflammatoire (CRP), une cytolyse marquée (ASAT et ALAT < 3N) ou une hémolyse (haptoglobine).

Au cours de l'hémochromatose HFE-1, fer sérique, saturation de la transferrine et ferritine peuvent être anormalement élevés. Cependant, à un stade précoce, l'élévation de la saturation de la transferrine (> 45 %) est très souvent isolée. Ce signe cardinal est déjà présent alors que les deux valeurs permettant de le calculer sont dans les limites de la normale. Etant donné la place que

Tableau I. – Principales caractéristiques cliniques biologiques discriminantes des surcharges en fer d'origine génétique dans leurs formes typiques.
Main biochemical characteristics of genetic iron overload diseases in their typical form.

Pathologie	Gène	Mutation	Transmission	Age	Tableau neurologique	Fer sérique	Saturation de la transferrine	Ferritine	Hémoglobine	Céruloplasmine
Hémochromatose HFE-1	HFE	C282Y	Récessive	Adulte	Non	↗	↗	↗	Normale	Normale
Hémochromatose Juvénile (HFE-2)	Hémojuvénile	?		< 30 ans	Non	↗	↗	↗	Normale	ND
	Hepcidine	Plusieurs mutations	Récessive	< 30 ans	Non	↗	↗	↗	Normale	ND
Hémochromatose HFE-3	Récepteur de la transferrine 2	Plusieurs mutations	Récessive	Adulte	Non	↗	↗	↗	Normale	ND
Hémochromatose HFE4	Ferroportine	Plusieurs mutations	Dominante	Adulte	Non	→	→	↗↗↗	Normale	ND
Acéruroplasminémie	Céruloplasmine	Plusieurs mutations	Récessive	Adulte	Oui	↓↓↓	↓↓↓	↗↗	Abaissée	Effondrée

L'hémochromatose génétique liée à la mutation C282Y du gène HFE est, de très loin, la plus fréquente. Pour l'hémochromatose HFE, d'autres mutations telles H63D et S65C, en association avec une hétérozygotie C282Y (hétérozygotie composite) pourraient jouer un rôle dans l'apparition de formes peu sévères de la maladie.

prend la transferrine dans son calcul, il est capital de s'assurer de l'absence : 1) d'insuffisance hépatocellulaire (taux de prothrombine) qui serait à l'origine d'un déficit de synthèse et 2) de fuite protéique digestive ou rénale. Au cours de l'hémochromatose HFE-1, la saturation de la transferrine est souvent supérieure à 60 % chez l'homme et 50 % chez la femme.

DIAGNOSTIC

Le diagnostic nécessite la réalisation d'un test génétique pour prouver la présence de la mutation C282Y du gène HFE.

Si la mutation est présente à l'état homozygote (C282Y/C282Y).

Le diagnostic est certain. Il faut alors quantifier la surcharge en fer, apprécier son retentissement et si possible réaliser une enquête familiale.

La surcharge en fer peut être appréciée biochimiquement par la ferritinémie dont la valeur, chez ces malades, est corrélée au stock en fer. Il convient cependant de rappeler que les valeurs normales sont différentes chez la femme et chez l'homme et que les fourchettes de ces valeurs sont très larges, conduisant probablement pour les valeurs basses à une sous-estimation de la charge en fer [91]. La réalisation d'une IRM doit permettre, dans les centres ayant calibré leurs appareils, de calculer une concentration hépatique en fer qui est fiable [92].

Le bilan du retentissement viscéral visera à préciser l'atteinte des différents secteurs [90-91]. L'anamnèse précisera le retentissement général, articulaire et hormonal (impuissance). La réalisation d'une glycémie ou d'une hyperglycémie provoquée permettra de dépister un diabète et une éventuelle atteinte hormonale sera recherchée. Le retentissement articulaire objectif sera évalué par la recherche de signes radiologiques, parfois isolés, évoquant une chondrocalcinoïse ou une arthropathie sous-chondrale. Le bilan du retentissement cardiaque nécessite la réalisation d'un ECG et d'une échocardiographie.

La biopsie hépatique n'a pas d'intérêt diagnostique mais garde un intérêt pronostique pour dépister les malades ayant une fibrose sévère (score de Metavir ≥ 3). Un index simple reposant sur 3 variables, permet d'écarter le diagnostic de fibrose sévère avec une excellente fiabilité chez les malades n'ayant pas d'hépatomégalie, et chez qui la ferritinémie est $\leq 1\ 000\ \mu\text{g/L}$ avec un taux sérique d'ASAT normal [93]. La biopsie hépatique n'est donc plus indiquée chez ces malades. Elle reste cependant indispensable lorsque l'un de ces 3 paramètres est modifié, en raison de la faible valeur prédictive positive de cet index.

L'enquête familiale repose, dans le cadre des règles d'éthique, sur l'évaluation du phénotype clinico-biologique et sur la recherche de la mutation C282Y chez les apparentés du premier degré qui auront été contactés par le probant informé par son médecin de la nécessité de cette enquête [91]. Les parents sont généralement âgés et le dépistage phénotypique guidera la réalisation d'un test génétique. Dans la fratrie, compte tenu du mode de transmission, 1/4 des frères ou sœurs est susceptible de présenter la mutation C282Y à l'état homozygote et donc la maladie, sous réserve des éléments mentionnés auparavant concernant la pénétrance. Le résultat du test génétique guidera l'exploration de la descendance des sujets dépistés. Le diagnostic étant maintenant porté chez des probants de plus en plus jeunes, la question est posée du dépistage de l'hémochromatose chez les enfants des sujets homozygotes et hétérozygotes dépistés. Le Comité Consultatif National d'Éthique n'est pas en faveur d'un dépistage avant la majorité. Dans ce cadre, le dépistage de la mutation C282Y peut être proposée au second parent. Si le résultat est négatif, sous réserve d'un problème de paternité, l'enfant n'est pas atteint d'hémochromatose HFE-1. Il peut par ailleurs être proposé, chez l'enfant, la réalisation d'un bilan martial à partir de 15 ans qui vise à dépister une forme sévère à expression précoce.

Si le malade n'est pas homozygote pour la mutation C282Y du gène HFE.

D'emblée il faut s'interroger sur la relation de causalité entre l'hétérozygotie C282Y et la surcharge en fer et donc exclure formellement une hémochromatose secondaire. En l'absence d'explication, il faut évoquer, dans un cadre qui sera discuté plus loin, une surcharge en fer d'un autre type dont il faut rappeler qu'elles sont très rares.

Lorsque le malade est hétérozygote pour la mutation C282Y du gène HFE, la recherche du génotype H63D ou S65C sur l'autre allèle peut amener une information puisque des hétérozygoties composites (C282Y/H63D et C282Y/S65C) sont à l'origine de surcharges en fer qui sont toujours d'une faible intensité [26, 27]. D'autres mutations très rares du gène HFE, dont la mise en évidence est du domaine de la recherche, peuvent entraîner chez ces malades hétérozygotes l'apparition d'un phénotype hémochromatosique [28]. De plus, récemment, il a mis en évidence quelques hémochromatoses digéniques associant une mutation C282Y à l'état hétérozygote et une mutation du gène de l'hepcidine [64].

Lorsque le malade ne présente pas de mutation C282Y du gène HFE.

Certains ont évoqué le rôle potentiel d'une homozygotie H63D dans la genèse d'anomalies du métabolisme du fer. Cependant, cette réalité est très contestée et des anomalies importantes du métabolisme du fer doivent conduire à la recherche de mutations dans d'autres gènes du métabolisme du fer.

Le diagnostic des hémochromatoses génétiques non liées à une mutation du gène HFE

Certains éléments, dont l'histologie hépatique qui garde ici sa place, peuvent permettre d'orienter préférentiellement la recherche diagnostique. Des anomalies dissociées du bilan martial peuvent orienter vers une hémochromatose liée à la ferroportine (hémochromatose HFE-4) ou bien vers une acéruoplasminémie congénitale (tableau I).

HÉMOCHROMATOSE JUVÉNILE (HFE-2)

Un tableau d'hémochromatose juvénile (HFE-2) orientera vers la recherche d'une mutation homozygote dans le gène de l'hepcidine [58]. Si ce gène n'est pas muté chez le malade, le diagnostic reposera sur le séquençage du gène impliqué, qui est localisé sur le chromosome 1, et dont l'identification est certainement proche [28]. Durant le processus éditorial de ce manuscrit, le gène localisé sur le chromosome 1 et impliqué dans une des formes d'hémochromatose juvéniles a été identifié. Papanikolaou et al. *Nat Genet* 2004;36:77-82.

HÉMOCHROMATOSE HFE-3

Cette entité, rapportée à ce jour essentiellement sous forme de quelques cas dans la population italienne, est le plus souvent caractérisée par une élévation des paramètres du bilan martial. Toutefois ces anomalies sont parfois absentes [94] (tableau I). Plusieurs mutations du gène codant le récepteur de la transferrine 2 ont été rapportées. Le mode de transmission semble récessif.

HÉMOCHROMATOSE (HFE-4)

L'hémochromatose HFE-4, liée à la ferroportine, est caractérisée par une hyperferritinémie très importante contrastant avec une saturation de la transferrine qui est normale ou presque normale [80-83] (tableau I). Histologiquement la surcharge en fer des cellules de Kupffer est considérable et s'associe à une surcharge hépatocytaire importante. La tolérance de la déplétion en fer est souvent modérée pouvant justifier le recours à une adjonction d'érythropoïétine qui permet d'éviter l'apparition d'une anémie.

ACÉRUOPLASMINÉMIE CONGÉNITALE

L'acéruoplasminémie congénitale est évoquée devant une hyperferritinémie contrastant avec l'existence d'un effondrement du fer sérique et de la saturation de la transferrine reflétant la baisse de biodisponibilité du fer, et une anémie microcytaire qui peut faire errer le diagnostic [84-88]. Cette pathologie très rare a été rapportée au Japon, mais aussi de façon exceptionnelle dans la population caucasienne. Le tableau biologique peut avoir été décelé isolément ou associé à des anomalies neurologiques (dyskinésies). La connotation neurologique, l'existence d'une surcharge en fer hépatique et cérébrale, jugée sur l'IRM, doivent conduire à évoquer le diagnostic qui est affirmé sur l'effondrement de la céruloplasmine qui est indétectable (tableau I). La recherche de la mutation est du domaine de la recherche.

AUTRES SURCHARGES EN FER

Les autres surcharges d'origine génétique actuellement rapportées sont exceptionnelles : hémochromatose HFE-3, liée au

récepteur de la transferrine 2 (voir [28]), chez quelques malades d'origine sicilienne, et mutation dans l'IRE de la ferritine H chez un patient Japonais [89].

Traitement et surveillance

Ils concernent les probants et les malades dépistés par enquête familiale.

HÉMOCHROMATOSE HFE-1

Traitement et surveillance de cette pathologie sont aujourd'hui étroitement codifiés [90-91]. La phlébotomie reste le traitement de choix de cette affection. La phase d'induction comporte des saignées hebdomadaires 400 à 500 mL de sang. Son efficacité est suivie sur le bilan martial, le but étant d'obtenir une saturation de la transferrine inférieure à 45 % et une ferritinémie inférieure à 50 µg/L. Sa tolérance est évaluée cliniquement (asthénie, dyspnée) et biologiquement par la réalisation d'un hémogramme (hémoglobine). Lorsque la désaturation en fer est obtenue, un traitement d'entretien est poursuivi avec souvent réalisation d'une saignée de 300 mL une fois tous les 2 mois, encadrée par les critères de surveillance déjà mentionnés afin d'adapter, si besoin, le rythme des saignées. Une contre-indication aux saignées (anémie, insuffisance cardiaque), impose le recours à des molécules chélatrices du fer, classiquement la desferrioxamine qui est administrée en infusion sous-cutanée, 12 h par jour [95]. De nouveaux chélateurs du fer, administrables par voie orale pourraient présenter un intérêt chez ces malades. Enfin, il faut rappeler l'importance du dépistage représenté par l'enquête familiale.

Le dépistage des complications de la cirrhose (varices œsophagiennes, carcinome hépatocellulaire) est indiqué chez les malades à risque (cirrhose ou fibrose ≥ 3 à la biopsie hépatique).

AUTRES SURCHARGES GÉNÉTIQUES

Le traitement de ces atteintes n'est pas complètement codifié. L'hémochromatose HFE-2 nécessite le recours à des phlébotomies, associées à des chélateurs du fer. Le déficit en ferroportine (HFE-3) relève de phlébotomies qui peuvent conduire au développement d'une anémie. La surveillance sera donc particulièrement étroite [80-83]. L'acéruoplasminémie congénitale ne peut, compte tenu de l'anémie, être traitée par phlébotomie. L'utilisation d'un chélateur du fer (desferrioxamine) permet de réaliser une déplétion systémique en fer [86]. Cependant l'efficacité de ce traitement sur la surcharge cérébrale qui règle le pronostic apparaît incomplète.

Conclusions

La mise en évidence récente de nombreux gènes du métabolisme du fer a permis de préciser, pour partie, les mécanismes impliqués dans la constitution de l'hémochromatose génétique (HFE-1) liée à la mutation C282Y du gène HFE. Le rôle de l'hepcidine est probablement central. La pénétrance incomplète de la maladie suggère le rôle d'autres gènes dans le contrôle de l'expression de la maladie.

D'autres surcharge en fer d'origine génétique beaucoup plus rares ont été caractérisées, de transmission récessive (mutations du gène de l'hepcidine, du récepteur de la transferrine 2 ou de la céruloplasmine) ou dominante (mutation de la ferroportine). L'identification de ces gènes et la caractérisation progressive de leur rôle pathologique laissent entrevoir l'existence d'un polymorphisme génétique contrôlant l'expression phénotypique des

pathologies de surcharges en fer génétiques et en particulier celle de l'hémochromatose HFE-1. Ces données ont permis d'améliorer la prise en charge diagnostique des malades. La caractérisation des mécanismes moléculaires précis de ces pathologies devrait permettre de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques.

Remerciements - Ce travail a été soutenu par la Communauté Européenne CQLK1-CT-25002-00444 et l'Association Fer et Foie.

RÉFÉRENCES

1. Trousseau. Diabète Sucré. Leçon de Clinique Médicale de l'Hôtel Dieu. Paris : Baillière, 1865:663-7.
2. Von Recklinghausen F. Über hämochromatose. Tagebl Versamml Natur Ärzte Heidelberg 1889;62:324-5.
3. Sheldon JH. Haemochromatosis. Oxford University Press, 1935.
4. Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen. *Nouv Presse Med* 1975;4:1432.
5. Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976;17:332-4.
6. 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* 1996;13:399-408.
7. Brissot P, Deugnier Y. Haemochromatosis. In : Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizetto M, Rodes J, eds. *Oxford Textbook of clinical Hepatology*. Volume 2 : Oxford University Press, 1999:1379-91.
8. Barton JC BL. Histochemistry of iron and iron-associated proteins. In : *Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology diagnosis and treatment*. Cambridge University Press, 2000.
9. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-95.
10. Loréal O, Pigeon C, Deugnier Y, Brissot P. Iron metabolism. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:B56-61.
11. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2534-9.
12. Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Britton RS, Zhou XY, Fleming RE, et al. Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes. *Haematologica* 2000;85:340-5.
13. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997;34:275-8.
14. Brissot P, Moirand R, Jouanolle AM, Guyader D, Le Gall JY, Deugnier Y, et al. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as « genetic hemochromatosis » on « classical » phenotypic criteria. *J Hepatol* 1999;30:588-93.
15. The U.K. Haemochromatosis Consortium. A simple genetic test identifies 90 % of UK patients with haemochromatosis. *Gut* 1997;41:841-4.
16. Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996;14:249-51.
17. Borot N, Roth M, Malfroy L, Demangel C, Vinel JP, Pascal JP, et al. Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* 1997;45:320-4.
18. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997;60:828-32.
19. Papanikolaou G, Politou M, Terpos E, Fourlemadis S, Sakellaropoulos N, Loukopoulos D. Hereditary hemochromatosis : HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:163-8.
20. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718-24.
21. Burt MJ, George PM, Upton JD, Collett JA, Frampton CM, Chapman TM, et al. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population : implications for screening. *Gut* 1998;43:830-6.
22. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G-> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-8.
23. Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003;101:3347-50.
24. Aguilar-Martinez P, Bismuth M, Picot MC, Thelcide C, Pageaux GP, Blanc F, et al. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes : are genetic modifiers the cause ? *Gut* 2001;48:836-42.
25. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK. A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 2002;122:646-51.
26. Mura C, Ragueneas O, Ferec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands : evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502-5.
27. Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, Perera G, Arambepola M, Arichchi DS, et al. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *Am J Hum Genet* 1999;64:1056-62.
28. Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M. Genetic haemochromatosis : genes and mutations associated with iron loading. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:261-76.
29. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997;272:14025-8.
30. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2492-7.
31. Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, et al. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency : immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13312-7.
32. Levy JE, Montross LK, Cohen DE, Fleming MD, Andrews NC. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 1999;94:9-11.
33. De Sousa M, Reimao R, Lacerda R, Hugo P, Kaufmann S, Porto G. Iron overload in beta2-microglobulin-deficient mice. *Immunology* 1994;39:105-11.
34. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998;93:111-23.
35. Brissot P, Deugnier Y. Normal iron metabolism. In : McIntyre N, Benhamou J, Bircher J, Rizetto M, Rodes J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford : Oxford University Press, 1999:1379-91.
36. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1472-7.
37. Salter-Cid L, Brunmark A, Li Y, Leturcq D, Peterson PA, Jackson MR, et al. Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE : implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5434-9.

38. Pietrangelo A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Physiol* 2002;282:G403-G414.
39. Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Costaldi ME, et al. Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3117-22.
40. Parkkila S, Niemela O, Britton RS, Fleming RE, Waheed A, Bacon BR, et al. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001;121:1489-96.
41. Philpott CC. Molecular aspects of iron absorption : Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 2002;35:993-1001.
42. Fleming RE, Migas MC, Zhou X, Jiang J, Britton RS, Brunt EM, et al. Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis : increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3143-8.
43. Zoller H, Theurl I, Koch R, Kaser A, Weiss G. Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:488-97.
44. Zoller H, Pietrangelo A, Vogel W, Weiss G. Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet* 1999;353:2120-3.
45. Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Borot N, Radosavljevic M, Loréal O, et al. Inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strains. *Gastroenterology* 2002;122:745-51.
46. Canonne-Hergaux F, Levy JE, Fleming MD, Montross LK, Andrews NC, Gros P. Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders. *Blood* 2001;97:1138-40.
47. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, DeGraaf J, Montross LK, et al. Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and *Cybrd1* expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;34:102-7.
48. Montosi G, Paglia P, Garuti C, Guzman CA, Bastin JM, Colombo MP, Pietrangelo A. Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis. *Blood* 2000;96:1125-9.
49. Drakesmith H, Sweetland E, Schimanski L, Edwards J, Cowley D, Ashraf M, Bastin J, et al. The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15602-7.
50. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147-50.
51. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-10.
52. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-9.
53. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002;277:37597-603.
54. Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 2002;269:2232-7.
55. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461-3.
56. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8780-5.
57. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4596-601.
58. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21-2.
59. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003;102:783-8.
60. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, et al. Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:361-6.
61. Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, et al. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis : evidence for a regulation in response to serum transferrin saturation and non-transferrin-bound iron. *Blood* 2003;102:371-6.
62. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003;361:669-73.
63. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, et al. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;34:97-101.
64. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 2003;12:2241-7.
65. Fleming RE, Sly WS. Hepcidin : a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8160-2.
66. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia : implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776-81.
67. Ilyin G CB, Troadec MB, Pigeon C, Alizadeh M, Leroyer P, Brissot P, et al. Comparative analysis of mouse HEP1 and HEP2 genes encoding hepcidin, a regulator of iron metabolism : evidence for different pattern of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett* 2003;542:22-6.
68. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.
69. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, Inoue J, Gonzalez FJ, Leroyer P, et al. C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem* 2002;277:41163-70.
70. Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, A New Iron Regulatory Peptide. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:327-35.
71. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002;123:835-44.
72. Loréal O, Gosriwatana I, Guyader D, Porter J, Brissot P, Hider RC. Determination of non-transferrin-bound iron in genetic hemochromatosis using a new HPLC-based method. *J Hepatol* 2000;32:727-33.
73. Roetto A, Totaro A, Cazzola M, Cicilano M, Bosio S, D'Ascola G, Carella M, et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1999;64:1388-93.
74. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999;274:20826-32.
75. Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF, et al. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood* 2001;98:1949-54.

76. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000;403:776-81.
77. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell* 2000;5: 299-309.
78. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275: 19906-12.
79. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999;21:195-9.
80. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619-23.
81. Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, Stephenson P, Searle JW, Powell LW, et al. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood* 2002;100:692-4.
82. Devalia V, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, et al. Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood* 2002;100:695-7.
83. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001;28:213-4.
84. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, Nakamura A, Yamamoto K, Morita H, et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet* 1995;9:267-72.
85. Takahashi Y, Miyajima H, Shirabe S, Nagataki S, Suenaga A, Gitlin JD. Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet* 1996;5:81-4.
86. Loréal O, Turlin B, Pigeon C, Moisan A, Ropert M, Morice P, et al. Aceruloplasminemia : new clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *J Hepatol* 2002;36:851-6.
87. Kohno S, Miyajima H, Takahashi Y, Inoue Y. Aceruloplasminemia with a novel mutation associated with parkinsonism. *Neurogenetics* 2000;2: 237-8.
88. Yoshida K, Kaneko K, Miyajima H, Tokuda T, Nakamura A, Kato M, Ikeda S. Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasminemia patients. *J Neurol Sci* 2000;175:91-5.
89. Kato J, Fujikawa K, Kanda M, Fukuda N, Sasaki K, Takayama T, et al. A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet* 2001;69:191-7.
90. Brissot P, Guyader D, Loréal O, Laine F, Guillygomarc'h A, Moirand R, et al. Clinical aspects of hemochromatosis. *Transfu Sci* 2000;23:193-200.
91. Brissot P, Lainé F, Guillygomarc'h A, Guyader D, Loréal O, Deugnier Y, et al. Comment affirmer et traiter une hémochromatose en 2002 ? *Journées de Diabétologie de l'Hôtel Dieu* 2002:69-82.
92. Guyader D, Gandon Y, Robert JY, Heautot JF, Jouanolle H, Jacquelinet C, et al. Magnetic resonance imaging and assessment of liver iron content in genetic hemochromatosis. *J Hepatol* 1998;15:304-8.
93. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J, et al. Non invasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;115:929-36.
94. Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, et al. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 2001;97:2555-60.
95. Hersko C, Link G, Konijn AM. Chelation therapy in iron overload. In : JC Barton, CQ Edwards. *Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment.* Cambridge University Press, 2000:339-54.