

## INTRODUCTION

L'hémochromatose génétique liée au gène *HFE* est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive de pénétrance variable. Cette affection est caractérisée par une absorption intestinale en fer anormalement élevée, au-delà des seuls besoins physiologiques, qui conduit à une surcharge progressive en fer des cellules parenchymateuses de nombreux tissus et organes. La symptomatologie clinique s'exprime habituellement chez l'homme entre 30 et 40 ans et plus tardivement chez la femme en raison d'une relative protection du fait des pertes menstruelles et des grossesses. Le tableau classique associe de façon variée asthénie, mélanodermie, rhumatisme chronique, diabète insulino-dépendant, hépatomégalie pouvant évoluer vers la cirrhose, insuffisance cardiaque, hypophysaire à prédominance gonadotrope et atteinte

cardiaque (troubles du rythme, insuffisance cardiaque congestive).

Son diagnostic est confirmé, chez le sujet symptomatique, par la mise en évidence d'une homozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr (génotype : [p.Cys282Tyr]+[p.Cys282Tyr]). Des surcharges en fer sont aussi observées chez les sujets hétérozygotes composites associant les mutations p.Cys282Tyr et p.His63Asp (génotype : [p.Cys282Tyr]+[p.His63Asp]) [2,3].

La fréquence allélique de la mutation p.Cys282Tyr est de l'ordre de 5 à 10 % dans la population d'Europe du nord tandis que celle de la mutation p.His63Asp est supérieure, de l'ordre de 15 à 20 %.

## CAS CLINIQUE

Un diagnostic génétique d'hémochromatose est demandé par un clinicien, pour Madame C., 47 ans, présentant un bilan martial perturbé :

Coefficient de Saturation de la Transferrine	40.01 %	n < 35
Ferritine	184 ng/ml	n < 150
Transferrine	3.87 g/l	n < 3.60
Fer sérique	216 µg/100 ml	n < 193

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

**1** Le service de Biologie Moléculaire Génétique est entièrement automatisé. Tous les automates travaillent en connexion. Pour la réalisation de la recherche des mutations p.Cys282Tyr (C282Y) et p.His63Asp (H63D) du gène *HFE*, les échantillons primaires respectent le processus suivant :

- Extraction à partir de 200µl de sang total EDTA à l'aide de l'automate MagNA Pure 96 (Roche Applied Science), kit DNA/viral NA SV.
- Préparation de la PCR à l'aide de l'automate Biomek Nx (Beckman Coulter)
- Discrimination allélique par PCR temps réel réalisée sur le thermocycleur ABI Prism™ 7500 (Applied Biosystems) : Amplification de la région cible à l'aide de 2 amorces oligonucléotidiques,

en présence de 2 sondes TaqMan-MGB, l'une spécifique de l'allèle sauvage et l'autre spécifique de l'allèle muté [5].

**2** Séquençage direct de l'exon 2 du gène *HFE* au laboratoire Biomnis par la technique de Sanger, (séquenceur ABI Prism 3130xl-Kit BigDye terminator v1, Applied Biosystems), logiciel de comparaison SeqScope 2.7, séquence de référence NM\_0000410.3).

**3** Séquençage de contrôle dans le laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité du Pr Ferec, CHU de Brest : séquençage direct de l'exon 2 et des jonctions intron-exon du gène *HFE* par la technique de Sanger (Kit BigDye terminator v1, Applied Biosystems), logiciel de comparaison SeqPilot v.4.5.2 (ISI), séquence de référence NM\_0000410.3.

## RÉSULTATS

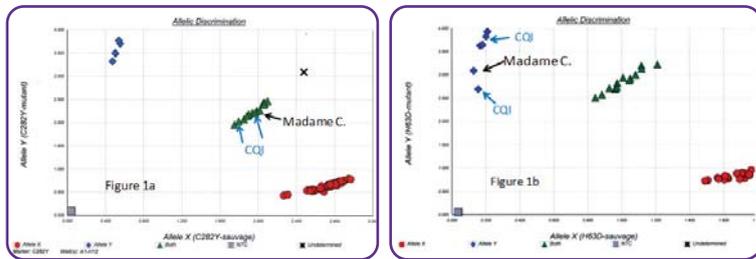
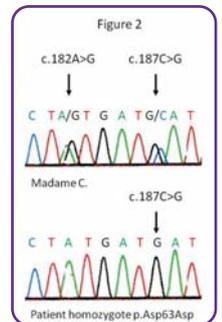


Figure 1 : Résultats du génotypage par discrimination allélique : Madame C. présente une hétérozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr (Fig.1a) associée à une homozygotie pour la mutation p.His63Asp. (Fig.1b).

■ En raison de la règle de l'exclusion allélique pour les mutations p.Cys282Tyr et p.His63Asp, le prélèvement a été envoyé dans le service du Pr Ferec au C.H.U. de Brest pour un contrôle par séquençage. Le résultat met en évidence une hétérozygotie composite [p.Cys282Tyr] + [p.His63Asp] associée à un nouveau variant : p.Tyr61Cys (c.182A>G).

■ Pour vérifier la fiabilité des résultats dans le service de Biologie Moléculaire Génétique de Biomnis, soixante-dix patients, rendus homozygotes par discrimination allélique pour la mutation p.His63Asp, et Madame C. ont été séquencés (142 allèles testés au total). Le variant p.Tyr61Cys n'a été retrouvé que chez Madame C. (Fig.2). L'homozygotie a été confirmée chez nos 70 patients. Aucun autre variant n'a été mis en évidence.



## DISCUSSION

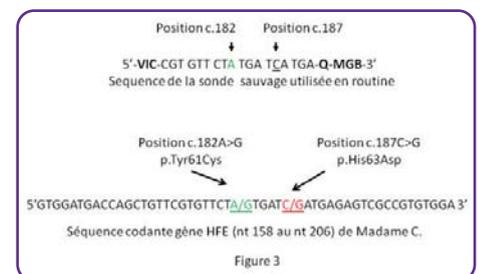
La technique de discrimination allélique par PCR temps réel, pour le dépistage des mutations p.Cys282Tyr et p.His63Asp, est une méthode rapide et fiable avec un taux de concordance de 100 % des résultats avec la méthode de référence : le séquençage par la méthode de Sanger [1,4]. La mise en évidence d'une hétérozygotie pour la mutation p.Cys282Tyr associée à une homozygotie pour la mutation p.His63Asp a soulevé, dans notre service, des interrogations compte tenu du principe de l'exclusion allélique et des données disponibles dans la littérature. En effet, seulement deux cas d'allèles complexes sont rapportés à ce jour ([p.Cys282Tyr ; p.His63Asp]+[p.Cys282Tyr]) [6,7].

L'automatisation complète dès la prise en charge de l'échantillon primaire jusqu'à l'obtention du résultat nous a fait écarter toute erreur humaine et/ou technique. Ce résultat justifiait donc une vérification par la technique de référence : le séquençage par la méthode de Sanger. Par souci d'objectivité, le prélèvement a été envoyé, pour contrôle, dans un service hospitalier faisant autorité dans le domaine du diagnostic génétique de l'hémochromatose. Le résultat du séquençage révèle chez Madame C., une variation de séquence, p.Tyr61Cys (c.182A>G), qui n'a été retrouvée ni dans les différentes bases de données consultées ni dans la littérature, situé en cis de la mutation p.Cys282Tyr.

Le résultat du génotypage par discrimination allélique s'expliquerait par la non hybridation de la sonde sauvage à l'allèle porteur de ce nouveau variant (Fig.3), ce qui conduirait à un

résultat faussement homozygote pour la mutation p.His63Asp. Cette observation nous a obligés à critiquer les résultats homozygotes pour cette mutation obtenus par discrimination allélique. Afin de pouvoir valider les sondes que nous utilisons depuis huit ans et la méthode qui satisfait pourtant tous les contrôles de qualité internes et externes (UKNEQAS), nous avons contrôlé par séquençage 70 patients rendus homozygotes pour p.His63Asp et confirmé ces résultats.

Sur le plan fonctionnel, cette nouvelle variation de séquence génère une cystéine qui pourrait perturber la structure protéique via la création d'un pont disulfure. Néanmoins, cette patiente présentant déjà une hétérozygotie composite, dans le contexte d'une pathologie de pénétrance variable, l'impact de ce nouveau variant est difficilement interprétable.



## CONCLUSION

Cette nouvelle variation de séquence semble n'avoir aucune conséquence. La confirmation de nos résultats, pour la série de 70 patients homozygotes pour la mutation p.His63Asp, et 8 ans de recul d'activité de dépistage par discrimination allélique nous permettent de considérer ce polymorphisme comme extrêmement rare. Cette erreur de génotypage est donc une exception et ne nous fait pas remettre en cause la technique et les sondes employées.

### Bibliographie :

- 1- Jouanolle AM, Géromel V, Ged C, Grandchamp B, Le Gac G, Pissard S, Rochette J, Aguilar-Martinez P. 2012 Molecular diagnosis of HFE mutations in routine laboratories. Results of a survey from reference laboratories in France. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2012, May-Jun;70(3):305-13.
- 2- Santos PC, Krieger JE and Pereira AC Molecular Diagnostic and Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 1497-1511.
- 3- Pedersen P, Milman N Genetic screening for HFE hemochromatosis in 4,020 Danish men: penetrance of C282Y, H63D, and S65C variants. *Ann Hematol.* 2009; Aug;88(8):775-84.
- 4- Cukjati M, Vaupotic T, Rupret R, Curin-Serbec V. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay. *BMC Med Genet.* 2007; Nov 23;8:69.
- 5- De Kok JB, Wiegierck ET, Gesenodorf BA, Swinkels DW. Rapid Genotyping of single Nucleotide Polymorphisms Using Novel Minor Groove Binding DNA Oligonucleotides (MGB Probes) - *Human Mutation* 2002;19 :554-559.
- 6- Best LG, Harris PE, Spriggs EL. Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in 'cis' phase. *Clin Genet.* 2001-Jul;60(1):68-72.
- 7- Thorstensen K, Asberg A, Kvitland M, Svaasand E, Heem K, Bjerve KS. Detection of an unusual combination of mutations in the HFE gene for hemochromatosis. *Genet Test.* 2000;4(4):371-6.