Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 – Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMRS 938 – Microbiote, intestin et inflammation

Interactions hôte-microbiote intestinal dans les maladies auto-inflammatoires monogéniques

Par Inès ELHANI

Thèse de doctorat de physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par Pr Sophie GEORGIN-LAVIALLE

Présentée et soutenue publiquement le 23 Octobre 2024

Devant un jury composé de :

M. Arsène MEKINIAN	PU-PH	Président du jury
Mme Marie-Elise TRUCHETET	PU-PH	Rapportrice
M. Marc ANDRE	PU-PH	Rapporteur
M. Achille AOUBA	PU-PH	Examinateur
M. Maxime BREBAN	PU-PH	Examinateur
Mme Sophie GEORGIN-LAVIALLE	PU-PH	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Tout avance, rien ne recule

Sophie Georgin-Lavialle, 2024

Remerciements

Au Professeur **Arsène MEKINIAN**, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse

Au professeurs **Marie-Elise TRUCHETET** et **Marc ANDRE**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail en qualité de rapporteurs

Au Professeur **Maxime BREBAN**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail en qualité d'examinateur

Au professeur **Achille AOUBA,** d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur. Merci également de m'avoir orienté vers l'étude de l'inflammation et pour le soutien constant que vous m'avez apporté durant mon cursus médical et scientifique. Vos précieux conseils et votre collaboration ont été essentiels à la réalisation de cette thèse, et j'espère vivement pouvoir continuer à collaborer avec vous à l'avenir.

Un grand merci à ma directrice de thèse, le professeur **Sophie Georgin-Lavialle**, pour son soutien qui est difficile à décrire en quelques lignes. Merci pour ta disponibilité (particulièrement sur WhatsApp entre 21h et 01h du matin), ta patience et ton écoute bienveillante. Merci pour tes conseils avisés, ainsi que pour les soupes aux queues de radis, les soupes à l'ortie, les tisanes à la verveine, et les yaourts faits maison qui ont égayé bien des moments de travail.

Je remercie l'équipe du laboratoire de spectrométrie de Saint-Antoine, notamment **Aurore DESMONS** et **Dominique RAINTEAU**, ainsi que nos collaborateurs des services de radiologie et d'anatomopathologie de l'hôpital Saint-Antoine et du CHU de Caen, en particulier **Diana ENEA**, le professeur **Magali SVRCEK** et le professeur **Lionel ARRIVE**, pour leur contribution essentielle à ces recherches.

Merci au professeur **Harry SOKOL**, pour son accueil dans le laboratoire et son aide dans la réalisation de mes travaux.

Merci au docteur **Nathalie ROLHION**, pour son soutien pluridisciplinaire et multitâche, sa bonne humeur et son rôle indispensable dans le bon fonctionnement du laboratoire. Tu es un pilier essentiel à la réussite de nos thèses à tous.

Merci à **Marius,** pour avoir réalisé les analyses bio-informatiques /magiques de l'ordinateur pour ce travail, souvent plusieurs fois, entrecoupés de débats philosophiques et de conseils avisés sur la culture de mes plantes vertes.

Merci à mes autres collègues du DouZzZz devenu DouZzZz et OnZzZz, et du six, en particulier **Cyriane, Laura** et **Morgane**, pour leur aide précieuse dans la réalisation de mon travail et pour m'avoir aidé à trouver mes marques dans le laboratoire, mais aussi pour les pauses café et gouter frites (je reste en attente des nouveaux épisodes de Cyriane story saison 3). Merci à **Rodrigo,**

Qing, Yuhang, Coline, Salomé, Léonard, Camille, Virginie et **Zhan** pour les bons moments partagés au laboratoire.

Gracias a **Iria** por su ayuda en mi estudio del español, por las tardes chismeando, por las charlas, por las risas, por los chicles, por su calma en toda circunstancia « No pasa nada », por las mejores tortillas de patatas (Todavía estoy esperando la receta).

Merci à mes collègues et amis du service de médecine interne de l'hôpital Tenon. Merci au Professeur **Gilles GRATEAU** pour m'avoir transmis sa passion des maladies auto-inflammatoires, et m'avoir accompagné au long ce parcours. Merci à **Léa et Loris** pour leur amitié parfois piquante mais toujours sincère et pleine de bonne humeur. Merci à **Marion** pour sa compagnie dans le bureau, qui a probablement nui de manière significative à notre productivité, ainsi que pour sa participation au CLIPS avec un niveau de compréhension comparable au mien. Merci à **Philippe** pour les chismes et notre collaboration prochaine sur le marché des vêtements gonflables

Merci à ma pédiatre référente **Véronique Hentgen,** pour ses conseils et pour les longues discussions de société. Merci pour ton implication constante dans la défense de notre service publique.

Gracias a mis amigos **Khalil** y **Anel** por esucharme quejar todo el rato, desafinar canciones de abuelita y repetir memes sin cesar.

Merci à mes ami.e.s **Claire, Fanny** et **Guillaume** pour leur soutien, leurs reléctures, leurs bons conseils et les bons moments passés ensemble malgré la distance (Paris, c'est mieux …)

Merci à ma curatrice, **Anissa**, pour son assistance dans la gestion de mes intérêts, ainsi que pour ses explications claires et simplifiées sur la survie dans la vie d'adulte.

Merci à mes **parents** et à ma sœur **Sonia** pour notre passion partagée pour la science, leur soutien inconditionnel, les tupperwares remplis de délices, et les dimanches passés ensemble. Je suis également reconnaissante pour leurs encouragements constants, leurs précieux conseils, leur capacité à rendre les moments difficiles plus légers, et pour toutes les petites attentions qui ont rendu cette aventure encore plus spéciale.

RESUME

Les maladies auto-inflammatoires monogéniques sont des maladies génétiques causant une activation excessive de l'immunité innée. Elles se traduisent par des symptômes inflammatoires systémiques chroniques et/ou récurrents. Plusieurs de ces maladies sont caractérisées par une forte prévalence d'atteintes digestives et une association avec des maladies inflammatoires chroniques du tube digestif. C'est le cas de l'haploinsuffisance de A20 (HA20) dont les patients souffrent de douleurs abdominales et d'ulcérations digestives, de la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF) qui est associée à des péritonites aseptiques, des cryopyrinopathies (CAPS) et du déficit en mévalonate kinase (MKD), qui sont associés à des douleurs abdominales. Les perturbations du microbiote intestinal, appelées dysbiose, sont associées à la survenue et au développement de maladies inflammatoires de l'intestin mais aussi de maladies systémiques. Les effets pro-inflammatoires peuvent être directs, découler d'une altération de la barrière intestinale, ou de la modulation de métabolites dérivés du microbiote intestinal, particulièrement les acides biliaires, les acides gras à chaines courtes, et les métabolites dérivés du tryptophane. L'objectif de ce travail était de décrire les atteintes digestives clinico-radiologiques et histologiques des patients atteint de HA20, et de décrire la composition du microbiote intestinal des patients atteints de HA20, de FMF, de CAPS et de MKD. Nos observations ont montré que les patients atteints de HA20 présentent une atteinte gastro-intestinale et hépatique inflammatoire aspécifique. Les patients présentaient une dysbiose caractérisée par une surreprésentation de *R. gnavus*, et une sous-représentation d'espèces bactériennes impliquées dans la production de butyrate et du maintien de la barrière digestive. Ces anomalies étaient associées à une altération du métabolisme des acides biliaires, un déficit d'absorption des acides gras à chaines courtes, et un engagement du tryptophane alimentaire vers la voie neurotoxique de la kynurénine. Chez les patients avec FMF, on observait également une dysbiose caractérisée par une diminution de bactéries anti-inflammatoires, particulièrement Streptococcus salivarius et Streptococcus vestibularis, ainsi qu'une diminution de bactériophages, suggérant un affaiblissement de la barrière intestinale. Contrairement au HA20 et à la FMF, les patients atteints de CAPS et MKD n'ont pas montré de dysbiose similaire. En conclusion, ces résultats soutiennent la participation d'une dysbiose et d'une altération des profils de métabolites dérivés du microbiote intestinal dans le HA20 et dans la FMF

Mots clefs : Microbiote intestinal, maladie auto-inflammatoire héréditaire, Haploinsuffisance de A20, métabolomique

ABSTRACT

Monogenic auto-inflammatory diseases are genetic disorders causing excessive activation of innate immunity. They result in chronic and/or recurrent systemic inflammatory symptoms. Several of these diseases are characterized by a high prevalence of digestive tract involvement and an association with chronic inflammatory diseases of the digestive tract. This is the case with A20 haploinsufficiency (HA20), whose patients suffer from abdominal pain and digestive ulcerations, familial Mediterranean fever (FMF), which is associated with aseptic peritonitis, cryopyrinopathies (CAPS) and mevalonate kinase deficiency (MKD), which are associated with abdominal pain. Disturbances in the intestinal microbiota, known as dysbiosis, are associated with the onset and development of inflammatory bowel diseases, as well as systemic diseases. Pro-inflammatory effects can be direct, resulting from alteration of the intestinal barrier, or from modulation of metabolites derived from the gut microbiota, particularly bile acids, short-chain fatty acids and tryptophan-derived metabolites. The aim of this work was to describe the clinical, radiological and histological digestive involvement of patients with HA20, and to describe the composition of the intestinal microbiota of patients with HA20, FMF, CAPS and MKD. Our observations showed that HA20 patients exhibit nonspecific inflammatory gastrointestinal and hepatic involvement. Patients showed a dysbiosis characterized by an over-representation of *R. gnavus*, and an under-representation of bacterial species involved in butyrate production and maintenance of the digestive barrier. These abnormalities were associated with impaired bile acid metabolism, deficient absorption of short-chain fatty acids, and commitment of dietary tryptophan to the neurotoxic kynurenine pathway. Patients with FMF also showed a dysbiosis characterized by a decrease in anti-inflammatory bacteria, particularly Streptococcus salivarius and *Streptococcus vestibularis*, as well as a decrease in bacteriophages, suggesting a weakening of the intestinal barrier. In contrast to HA20 and FMF, CAPS and MKD patients did not show similar dysbiosis. In conclusion, these results support the involvement of dysbiosis and altered gut microbiota-derived metabolite profiles in HA20 and FMF.

Keywords: Gut microbiota, hereditary autoinflammatory diseases, A20 haploinsufficiency, metabolomics

Sommaire

Remerciements 2
Sommaire 7
Abréviations 8
Valorisation 10
Introduction 11
Les maladies auto-inflammatoires 11
1/ L'haploinsuffisance de A20 12
2/ La fièvre Méditerranéenne familiale 17
3/ Les cryopyrinopathies (CAPS) ou maladies associées aux mutations de *NLRP3*. 22
4/ Le déficit en mévalonate kinase 24
Le rôle du l'immunité dans le tube digestif 28
1/ Organisation du système immunitaire 28
2/ Réponses à l'inflammation 28
Les interactions hôtes-microbe dans le tube digestif 29
1/ Le microbiote intestinal 29
2/ La barrière intestinale 31
3/ Fonctions indirectes du microbiote intestinal : la modulation de métabolites 33
4/ Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 40
5/ Effets des traitements anti-inflammatoires sur le microbiote intestinal 47
6/ Méthodes d'études du microbiote intestinal 53
Hypothèses et objectifs 55
Resultats 57
Article I 57
Article II 80
Article III 90
Article IV 122
Discussion 140
Conclusion 147
Bibliographie 148
Annexes 165
L'échelle de Bristol 165
Annexe 2 : Avis favorable du comité de protection des personne (HO-MICRO-MAI) 166
Annexe 3 : Avis favorable du comité d'éthique de la recherche -Sorbonne Université (HEPA20) 171
Annexe 4 : Table supplémentaire 1. Taxonomie estimée des espèces bactériennes identifiées dans les corrélations de métabolites mentionnées chez les patients avec haploinsuffisance de A20 174
Annexe 4 : Table supplémentaire 2. Nom des voies métaboliques identifiées dans les chez les patients avec haploinsuffisance de A20 175
Table des illustrations 176
Table des tableaux 177

Abréviations

AGCC : acides gras à chaines courtes

AhR : Aryl hydrocarbone

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

ARN : acide ribonucéique

BA : acides biliaires

bDMARDs : biological disease-modifying anti-rheumatic drugs

BSH : Bile salt hydrolyse

CAPS : cryopyrinopathies

CEI : cellules épithéliales intestinales

DSS : Dextrum sodium sulfate

FMF : fièvre Méditerranéenne familiale

FOS : fructo-oligosaccharide

FXR : récepteur Farnesoid X

GWAS : genome-wide association study

HA20 : haploinsuffisance de A20

HDAC : histones désacétylases

HDSH : hydroxysteroid dehydrogenase

IFN : interféron

IL : interleukine

JAK : Janus kinase

KO : invalidation conditionnelle (Knock-out)

LES : lupus érythémateux systémique

LPS : polysaccharides

MAI : maladies auto-inflammatoires

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MKD : déficit en mévalonate kinase

PCR : polymerase chain reaction

PKN1 : protéine kinase N1

PKN2 : protéine kinase N2

PXR : pregnane X

PYD : domaine pyrine

TLR: Toll-like receptor

TMF : transplantation de microbiote fécal

TNF-α : Tumor necrosis factor α

TPH1 : tryptophane hydroxylase 1

TPH2 : tryptophane hydroxylase 2

Treg: lymphocytes T régulateurs

Valorisation

Publications scientifiques

Elhani I, Riller Q, Boursier G, Hentgen V, Rieux-Laucat F, Georgin-Lavialle S. A20 haploinsufficiency: A systematic review of 177 cases. J Invest Dermatol. 2023;S0022-202X(23)03194-9.

Elhani I, Aouba A, Riller Q, Vergneault H, Boursier G, Rieux-Laucat F, et al. L'haploinsuffisance de A20 : que doit connaître le clinicien? La Revue de Médecine Interne . 2023;

Communication orale

Communication orale, 87ème congrès de la Société nationale de médecine interne : Diagnostic et présentation clinique de l'haploinsuffisance de A20 en 2023

Communication orale, 87ème congrès de la Société nationale de médecine interne : Des altérations fonctionnelles du microbiote intestinal sont associées au phénotype inflammatoire et digestif des patients atteints d'haploinsuffisance de A20

Communication orale, 9ème Journée nationale de recherche en rhumatologie pédiatrique : Host-gut microbiota interactions in A20 haploinsufficiency

Communication écrite

Poster présenté, 24ème journées de l'école doctorale « Physiologie, physiopathologie et thérapeutique » : Gut-liver axis in A20 haploinsufficiency. Prix du meilleur poster.

Poster présenté, 17ème forum annuel du centre de recherche de Saint-Antoine : Host-gut microbiota interactions in A20 haploinsufficiency

Introduction

Les maladies auto-inflammatoires

Les maladies auto-inflammatoires (MAI) monogéniques sont des maladies génétiques responsables d'une activation excessive et aberrante de l'immunité innée (1). Les principales cellules impliquées dans la physiopathologie de ces maladies sont les monocytes/macrophages et les neutrophiles. Il s'agit de maladies génétiques, où les cas peuvent donc être familiaux, ou sporadiques dans le cas de mutations *de novo*. Si ces maladies ont des mécanismes génétiques et physiopathologiques différents, elles aboutissent à une inflammation sanguine et des symptômes systémiques par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6, et l'IL-8 (1). Elles se traduisent cliniquement par des poussées de fièvre récurrentes avec diverses manifestations cutanées et articulaires (1). De plus, certaines de ces maladies, notamment l'haploinsuffisance de A20 (HA20), la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), le déficit en mévalonate kinase (MKD) et les cryopyrinopathies (CAPS) causent de fréquentes atteintes digestives (Table 1).

Maladie	Gène/ Protéine	Mutation	Voie impliquée	Signes cliniques	Association avec les MICI
Haploinsuffisance de A20 (HA20)	*TNFAIP3* A20	Perte de fonction	NF-κB	Aphtose bipolaire Aphtose digestive Arthrites Folliculite	Oui
Fièvre méditerranéenne familiale (FMF)	*MEFV* Pyrine	Gain de fonction	Inflammasome pyrine	Fièvre récurrente Péritonite aseptique Arthrites Pseudo-erysipèle de cheville Aphtose buccale	Oui
Cryopyrinopathies (CAPS)	*NLRP3* NLRP3	Gain de fonction	Inflammasome NLRP3		Non
Déficit en mévalonate kinase (MKD)	*MKD* MVK	Perte de fonction	Inflammasome pyrine	Fièvre récurrente Douleurs abdominales Aphtose buccale	Oui

Table 1. Principales caracteristiques des maladies auto-inflammatoires monogéniques associées à des atteintes digestives.

1/ L'haploinsuffisance de A20

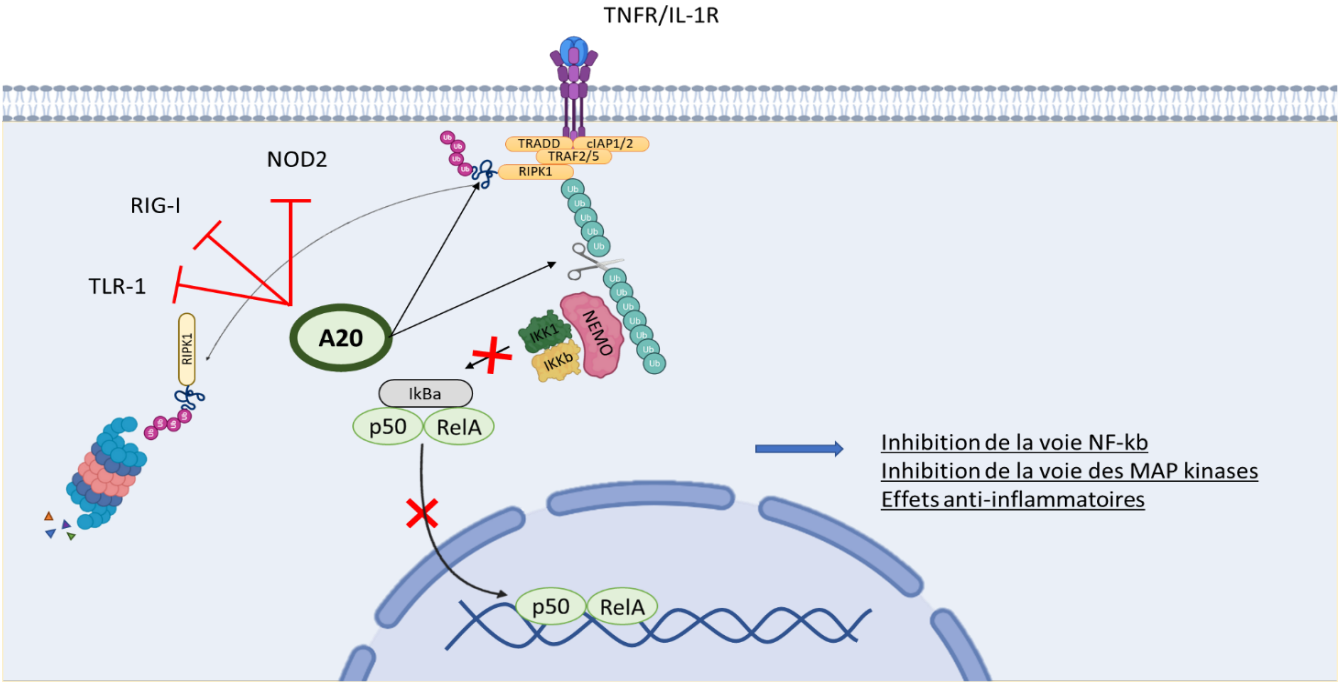
a. Génétique et Pathogénèse

L'haplo-insuffisance de A20 est une maladie associée à une activation excessive et incontrôlée de la voie NF-kB. La protéine A20 est composée de 8 domaines comprenant un domaine OTU et 8 domaines à doigts de zinc (ZnF). L'A20 est codée par le gène TNFAIP3 localisé sur le chromosome 6. Elle est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire par ses actions prolifératives, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. Ses fonctions d'ubiquitination/déubiquitination des protéines permettent l'interruption de l'activation des protéines impliquées dans la voie canonique NF-kB (impliquant la voie de la protéine NF-kB Essential Modulator ou NEMO), la voie des MAP kinases, la voie de l'interféron et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (2).

En pathologie humaine, des associations statistiques mendéliennes entre des variants du gène *TNFAIP3* et la survenue de maladies inflammatoires avaient été mises en évidence dès les années 2010. Ce fut notamment le cas de son association au lupus érythémateux disséminé, de la polyarthrite rhumatoïde et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (3–5). Ce n'est finalement qu'en 2016 qu'a été décrite la première série de patients portant des mutations hétérozygotes avec perte de fonction de *TNFAIP3*, associées à une maladie inflammatoire (6)

Les variants pathogènes de ce gène provoquent chez le patient hétérozygote une perte partielle de fonction, ou haploinsuffisance, de la protéine A20. Dans la majorité des cas, ces variants conduisent à l'apparition d'un codon-stop prématuré. La transmission de la mutation est dominante et l'homozygotie est très probablement létale chez l'homme, comme montré chez la souris invalidée pour le gène *TNFAIP3*, qui décède d'une inflammation multi-systémique peu après la naissance (7).

Les manifestations systémiques du HA20 résultent de l'insuffisance de suppression de l'activité NF-κB dans les cellules myéloïdes par la protéine A20, où elle exerce normalement des effets anti-inflammatoires à la fois en dégradant les chaînes polyubiquitine K63 qui entraînent l'activation de NF-κB, et en marquant des protéines accessoires telles que RIP-I pour la dégradation par le protéasome (Figure 1) (8). A20 est également abondamment exprimé dans les lymphocytes B, où il inhibe la voie NF-κB, ce qui augmente leur seuil de prolifération et de survie. La déficience en A20 dans les lymphocytes B les rends hyper-réactifs aux stimuli d'activation et susceptibles à la perte de tolérance, entraînant la production d'auto-anticorps (8).



1-Figure 1. Représentation schématique du rôle de la protéine A20 dans la régulation négative des voies de signalisation inflammatoires.

A20 inhibe l'activation des récepteurs TLR-1, NOD2 et RIG-I, empêchant ainsi l'activation en aval des voies NF-κB et des MAP kinases. Cette inhibition se traduit par la suppression de la phosphorylation du complexe IKK et la stabilisation d'IκBα, bloquant la translocation du complexe p50/RelA dans le noyau et, par conséquent, la transcription des gènes pro-inflammatoires. A20 exerce ainsi un effet anti-inflammatoire majeur en contrôlant ces voies de signalisation clés. TNFR : Récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF). IL-1R : récepteur de l'interleukine 1.

b. Spectre clinique

Le HA20 a été décrit pour la première fois en 2016 (6). Il s'agit d'une maladie à la croisée des chemins entre une maladie auto-inflammatoire et une maladie auto-immune. En 2024, plus de 200 patients ont été décrits dans la littérature, principalement dans les populations asiatiques et européennes (2). La maladie se caractérise par des aphtes buccaux récurrents, éventuellement associés à des aphtes génitaux, qui sont les signes distinctifs de la maladie. Environ la moitié des patients présentent des manifestations systémiques, notamment une fièvre périodique, des arthralgies/arthrites et des manifestations cutanées diverses (folliculite, érythème noueux, éruption malaire) (2).

c. Traitements

À ce jour, les traitements pour l'haploinsuffisance de A20 (HA20) ne sont pas codifiés et sont orientés en fonction des symptômes (2). La description des traitements et de leur efficacité est hétérogène, et il n'a pas été possible de tirer des conclusions claires. Les traitements sont classifiés selon les symptômes prédominants et les classes thérapeutiques comme suit :

Les manifestations gastro-intestinales ont été traitées selon les principes des traitements des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, avec des réponses variées. Les traitements incluent l'acide 5-aminosalicylique, la thalidomide et les inhibiteurs du TNF-α.

Les manifestations articulaires ont été principalement traitées par des médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie, y compris le méthotrexate, l'azathioprine, la sulfasalazine, la ciclosporine et les inhibiteurs du TNF-α. De plus, certains patients ont reçu du Tofacitinib ou du tocilizumab avec des résultats partiels à bons.

La colchicine est également utilisée dans les formes minimes à intermédiaires, principalement pour prévenir les aphtes buccaux et/ou génitaux, et les crises inflammatoires, avec une bonne réponse. La thalidomide a été utilisée chez 5 patients pour les ulcères buccaux, avec une réponse partielle ou bonne chez 4 d'entre eux.

Les inhibiteurs du TNF-α sont principalement utilisés en traitement des manifestations gastro-intestinales, des arthrites, des atteintes hépatiques, pulmonaires, ainsi que pour des ulcères bipolaires, le lupus érythémateux systémique (LES) et la vascularite

D'autres traitements, tels que le mycophénolate mofétil et le méthotrexate peuvent être utilisés. Les inhibiteurs de JAK ont été utilisés avec une bonne efficacité chez 6 patients pour traiter les atteintes du système nerveux central, l'uvéite et la polyarthrite, tous présentant des niveaux élevés de gènes stimulés par l'IFN avant le traitement.

Enfin, 4 patients ont subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Trois ont bénéficié d'une greffe allogénique en raison de lésions organiques non contrôlées avec des agents immunosuppresseurs. Deux ont atteint une chimérisme complet avec un bon résultat global, malgré le développement d'une neuropathie par anticorps anti-acide glutamique décarboxylase chez un patient. En revanche, un patient est décédé d'une lésion multi-organes médiée par les cytokines peu après l'infusion des cellules souches. Un patient a reçu une greffe

autologue de cellules souches hématopoïétiques pour une vascularite du système nerveux central de type LES, ce qui a permis une amélioration transitoire.

d. Atteintes digestives

Caractéristiques cliniques

Les atteintes gastro-intestinales sont décrites dans 46% des cas (2). Elles incluent les douleurs abdominales, les diarrhées et les rectorragies. Deux phénotypes principaux émergent : Dans 36% des cas, les patients présentent des ulcères gastro-intestinaux isolés ou multiples, tandis que 21% des patients présentent une colite inflammatoire avérée, qui peut être associée à des ulcères gastro-intestinaux. Ce phénotype apparaît le plus souvent avant 6 ans, et peut donc être classé comme une maladie inflammatoire de l'intestin à début très précoce.

Tout le tractus gastro-intestinal peut être affecté par des ulcères, qui ont été décrits dans le côlon, dans l'estomac et/ou le duodénum et dans l'intestin grêle. Il peut également y avoir des signes de gastrite. Les caractéristiques histologiques des lésions sont aspécifiques d'une MICI, incluant un infiltrat neutrophilique, lymphocytaire et éosinophilique, la granulation tissulaire et les anomalies des cryptes (atrophie, cryptite, abcès cryptique). L'inflammation périanale est présente dans 15% des cas et touche plus fréquemment les hommes. Elle inclut des ulcères périanaux, des fistules et des abcès. Quinze d'entre eux présentaient des ulcères gastro-intestinaux associés et pouvaient être classés comme souffrant de Maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI).

Des atteintes hépatiques ont été décrites chez 10% des patients. Le spectre clinique peut aller de la cholestase fluctuante asymptomatique à la cirrhose cryptogénique avec insuffisance hépatique (2).

Données humaines

Une étude a déjà étudié le microbiote intestinal chez les patients avec HA20 (9). En utilisant le séquençage 16S, l'équipe japonaise a mis en évidence une dysbiose chez 16 patients caractérisée par une diminution de la richesse microbienne et une composition

significativement différente des sujets sains. Le microbiote des patients était enrichi en bactéries des genres *Enterococcus, Haemophilus, Butyricioccis, Lactobacillus et Streptococcus*, alors qu'il était déplété en bactéries des genres *Ruminococcus, Clostridium, Parabacteroides et Alistipes.*

Modèles murins

Les études préliminaires mettent en évidence un rôle majeur de la protéine A20 dans l'homéostasie intestinale. Elle maintient une barrière intestinale efficace en augmentant l'expression des protéines composant les jonctions serrées (10). Par conséquent, la perte d'expression d'A20 dans les cellules épithéliales intestinales (CEI) entraîne une incapacité à contrôler le microbiome. Chez les souris, cela cause une apoptose dépendante de la caspase-8 des CEI et une perturbation des jonctions serrées, ce qui entraîne une hyperperméabilité de la barrière intestinale. De plus, cela provoque la perte des cellules de Paneth et des cellules caliciformes, entraînant une diminution de la production de mucus et des peptides antimicrobiens défectueux. Globalement, ces défauts cellulaires conduisent à l'infiltration bactérienne des tissus et à une susceptibilité à la colite. En effet, chez la souris, l'invalidation conditionnelle (KO) de *TNFAIP3* dans les cellules épithéliales intestinales (CEI) est responsable d'une hypersensibilité à la colite induite par le DSS (11). De plus, les souris chez lesquelles l'expression d'A20 est éliminée à la fois dans les CEI et les cellules myéloïdes développent une colite spontanée et sévère (8,11).

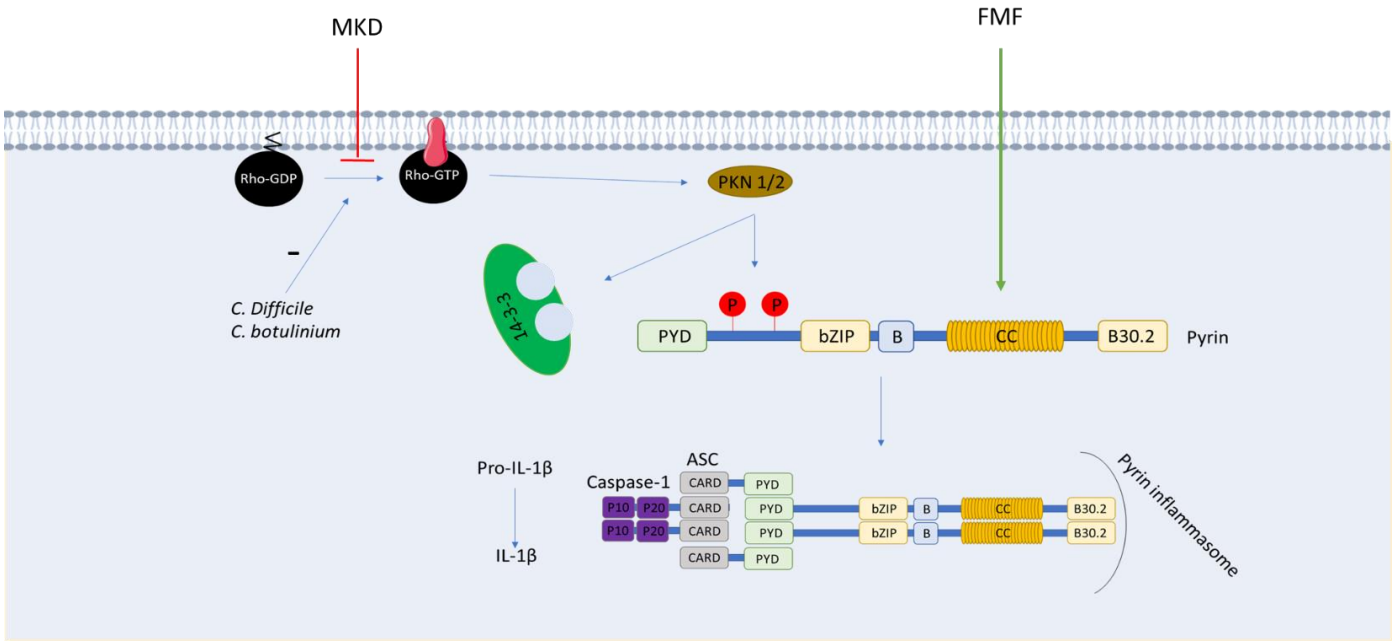
2/ La fièvre Méditerranéenne familiale

a. Génétique et pathogénèse

La fièvre méditerranéenne familiale est une maladie associée à une hyperactivation de l'inflammasome pyrine. Le gène *MEFV* est un gène de 10 exons localisé sur le chromosome 16 (12). Il encode la protéine pyrine, exprimée dans le cytoplasme des cellules mononuclées du sang (monocytes/macrophages, éosinophiles et cellules dendritiques). Cette protéine est composée de cinq domaines différents : le domaine pyrine N-terminal (PYD), le domaine de facteur de transcription bZIP, le domaine doigt de zinc B-box, le domaine en hélice α-coil-coil,

et le domaine C-terminal B30.2 (13). Elle forme l'inflammasome pyrine après polymérisation de plusieurs protéines pyrine. L'activation de la pyrine dépend de la détection de processus moléculaires altérant l'homéostasie, définis comme des perturbations de l'homéostasie cytoplasmique, et de l'inactivation de RhoA. En effet, dans des conditions physiologiques, la protéine RhoA active les molécules de signalisation, la protéine kinase N1 (PKN1) et la protéine kinase N2 (PKN2), phosphorylant la pyrine. Cette modification permet à la pyrine d'interagir avec les protéines 14-3-3, ce qui empêche l'assemblage de l'inflammasome. En conséquence, l'inflammasome de la pyrine reste inactif et la cellule maintient un état inflammatoire équilibré (14).

Les variants pathogènes de *MEFV* sont responsable d'une baisse du seuil de l'activation de l'inflammasome pyrine et donc de son activation excessive (15). La pyrine mutée et active est incapable d'interagir avec les protéines inhibitrices 14-3-3. Par conséquent, la pyrine anormale se lie à la protéine ASC (protéine associée à l'apoptose contenant un domaine CARD), un composant clé de l'inflammasome, entraînant l'activation auto-catalytique de la caspase-1. La caspase-1, à son tour, clive la pro-interleukine-1 bêta (pro-IL-1β) et la pro-IL-18 en leurs formes actives, IL-1β et IL-18, ainsi que la Gasdermin D (GSDMD), qui est principalement responsable de la pyroptose. La GSDMD forme des pores membranaires qui favorisent la libération des formes matures d'IL-1β et d'IL-18. (Figure 2) (12).



2-Figure 2. Physiologie de l'inflammasome pyrine et implication dans les maladies auto-inflammatoires

L'activation de l'inflammasome pyrine est contrôlé par l'inhibition des petites GTPases de la famille Rho, notamment par les toxines produites par *Clostridium difficile* et *Clostridium botulinum*. L'inhibition de l'activité des GTPases Rho par ces toxines empêche la transition de l'état Rho-GDP à Rho-GTP, conduisant à l'activation de la kinase PKN1/2. Cette activation entraîne la phosphorylation du domaine bZIP de Pyrin, favorisant ainsi son interaction avec la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD), et la formation de l'inflammasome Pyrin. Cette structure permet l'activation de la caspase-1, qui clive la pro-IL-1β en IL-1β, une cytokine pro-inflammatoire clé dans la réponse immunitaire. FMF : fièvre Méditerranéenne familiale. MKD : Déficit en mévalonate kinase

La liste des ligands capables d'activer l'inflammasome pyrine reste partiellement inconnue. La toxine B de *Clostridium difficile*, la toxines C3 de *Clostridium botulinum*, la toxine pertussis de *Bordetella pertussis*, VopS de *Vibrio parahaemolyticus*, IbpA de *Histophilus somni* et TecA de *Burkholderia cenocepacia* sont capables d'activer l'inflammasome pyrine (13). Par ailleurs, des ligands internes pourraient provoquer l'activation de l'inflammasome pyrine. C'est le cas de catabolites de la testostérone et de la progestérone qui peuvent activer l'inflammasome pyrine via un mécanisme non-canonique (16).

La FMF est une maladie de transmission autosomique récessive (17). La présence de 2 variants pathogènes est nécessaire pour provoquer la maladie. Les variants sont des mutations gains de fonction causant une hyperactivation de l'inflammasome pyrine (12). Parmi les mutations les plus fréquemment observées, on trouve les mutations M694V, M680I, et V726A, qui sont particulièrement associées à des formes sévères de la maladie (18). Ces mutations affectent principalement le domaine C-terminal B30.2 de la pyrine.

b. Spectre clinique

La FMF est une maladie qui survient le plus souvent dans l'enfance. Elle est caractérisée par une fièvre récurrente associée à des manifestations inflammatoires systémiques (1). Les symptômes s'organisent en crises courtes, avec une fièvre élevée spontanément résolutives sans traitement en moins de 3 jours. Ces épisodes fébriles sont le plus fréquemment associés à des douleurs abdominales intenses correspondant à une péritonite aseptique. De plus des atteintes musculosquelettiques, associant les arthralgies, les arthrites et les myalgies sont fréquentes (19).

Certains patients présentent également des atteintes sérieuses, telles que la pleurésie et la péricardite (20,21). Les symptômes peuvent également inclure une fatigue généralisée et des

signes de malaise général qui persistent entre les crises, contribuant à une réduction significative de la qualité de vie des patients (22,23).

La variabilité du spectre clinique est en partie due aux différences dans les mutations génétiques du gène *MEFV*, qui peuvent influencer la sévérité et la fréquence des crises. Par exemple, certaines mutations, telles que M694V, sont associées à des formes plus sévères de la maladie, avec des épisodes plus fréquents et plus intenses, tandis que d'autres mutations comme V726A peuvent entraîner des formes plus bénignes avec des manifestations cliniques plus limitées (24).

En outre, l'âge d'apparition des symptômes peut également varier, certains individus développant des signes de la maladie dès l'enfance, tandis que d'autres peuvent ne présenter des symptômes qu'à l'adolescence ou à l'âge adulte (25). Cette hétérogénéité clinique est également influencée par des facteurs environnementaux et des variations individuelles dans les mécanismes de régulation de l'inflammation.

La FMF est statistiquement associée à d'autres maladies du système immunitaire, notamment les spondylarthropathies, la vascularite à IgA, et la sclérose en plaques (26,27).

c. Traitements

Le traitement de la FMF vise principalement à gérer les épisodes de fièvre et les manifestations inflammatoires afin d'améliorer la qualité de vie des patients et de prévenir les complications à long terme (12). La prise en charge repose sur une combinaison de médicaments anti-inflammatoires et de thérapies spécifiques.

La colchicine est le traitement de choix pour la FMF et est généralement efficace pour réduire la fréquence et la sévérité des crises inflammatoires. Ce médicament est un alcaloïde qui inhibe la polymérisation des microtubules, empêchant ainsi l'activation excessive de l'inflammasome et la production de cytokines pro-inflammatoires.

En cas de réponse insuffisante à la colchicine ou de manifestations récurrentes malgré le traitement, d'autres médicaments peuvent être ajoutés. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) peuvent être utilisés pendant les crises.

Dans les cas de résistance à la colchicine, lorsque la maladie reste incontrôlée malgré la dose maximale tolérée de colchicine, d'autres traitements peuvent être envisagés. Les inhibiteurs de l'interleukine-1 (IL-1), tels que l'anakinra et le canakinumab, ont montré une efficacité significative dans le contrôle des symptômes de la FMF en ciblant directement la voie inflammatoire médiée par l'IL-1β (28–30).

Les traitements biologiques, comme les inhibiteurs du TNF ou les inhibiteurs de JAK, peuvent également être envisagés dans les cas où la FMF est associée à d'autres maladies du système immunitaire (12).

d. Atteintes digestives

Clinique

La douleur abdominale est le signe cardinal de la crise inflammatoire de la FMF. Elle correspond à une véritable péritonite aseptique (1,31).

Le tableau chirurgical emmène à la réalisation de chirurgie exploratrices dans l'enfance (laparotomies blanches) dans 30% des cas (32). 20% des patients présentent par ailleurs, en dehors des crises inflammatoires abdominales des symptômes digestifs, incluant les douleurs abdominales chroniques, et la dyspepsie (33). Si le stress est le facteur déclenchant le plus fréquent de crises inflammatoires de la FMF, plusieurs études rapportent une association entre l'alimentation et la survenue de crise inflammatoire, avec un meilleur contrôle de la maladie sous régime pauvre en gras (34) et après éviction du gluten (35), ce qui suggère un lien entre l'alimentation et l'activation de l'inflammasome pyrine. De plus, des cas de perte de contrôle de la FMF associés à des infections chronique à Helicobacter pylori ont été rapportés (36). Par ailleurs, la présence d'une mutation de MEFV, même à l'état de porteur sain (hétérozygote), est associé à un surrisque de survenue de MICI (37–39).

Etudes humaines.

Plusieurs études ont mis en évidence une dysbiose chez les patients atteints de FMF, caractérisée par une diminution de la diversité bactérienne globale, ainsi qu'une altération spécifique de la composition bactérienne (40–43). En particulier, le microbiote intestinal des patients était enrichi de *Ruminococcus* gnavus et de *Klebsielles spp.* De manière intéressante, *R. gnavus* est associé à la maladie de Crohn et à la spondylarthrite ankylosante et induit

directement la production de cytokines pro-inflammatoires par le biais d'une activation du TLR4 (44). Par ailleurs, une surreprésentation des klebsielles est associée aux maladies inflammatoires du tube digestif et la spondylarthrite ankylosante (45). Cette dysbiose est associée à des perturbations des métabolites dérivés du microbiote intestinal, notamment de la voie du tryptophane et des acides gras à chaines courtes (42,46–48). Notamment, il a été décrit une élévation des taux sanguins d'AGCC qui pourraient suggérer une hyperperméabilité intestinale. De plus, les patients avec FMF présentent un détournement du tryptophane alimentaire de la voie anti-inflammatoire des indoles vers la voie pro-inflammatoire des kynurénines. Le profil des acides biliaires n'a jamais été étudié dans la FMF mais des agonistes des acides biliaires ont déjà été décrits comme capables d'activer l'inflammasome pyrine in vitro (49).

Modèles murins

Aucun modèle animal n'a spécifiquement étudié les effets de l'inflammasome pyrine sur le microbiote intestinal et l'homéostasie digestive. Cependant, chez la souris, la production d'IL-18 dans le tube digestif est associée à la sévérité de l'atteinte digestive dans un modèle murin de colite via une inhibition de la maturation de cellules caliciformes (50).

3/ Les cryopyrinopathies (CAPS) ou maladies associées aux mutations de *NLRP3*.

Les cryopyrinopathies sont des maladies associée à une mutation pathogène du gène *NLRP3* (51). La protéine NLRP3 est une protéine composante de l'inflammasome NLRP3. Il s'agit d'un complexe multiprotéique intracellulaire qui agit comme un senseur de de perturbations de l'homéostasie cellulaire, notamment par la dysfonction mitochondriale via la production de espèces réactives l'oxygène, la dysfonction lysosomale et l'influx ionique. Son activation est responsable de la maturation de la pro-IL-1β inactive en IL-1β active (52)(Figure 3).

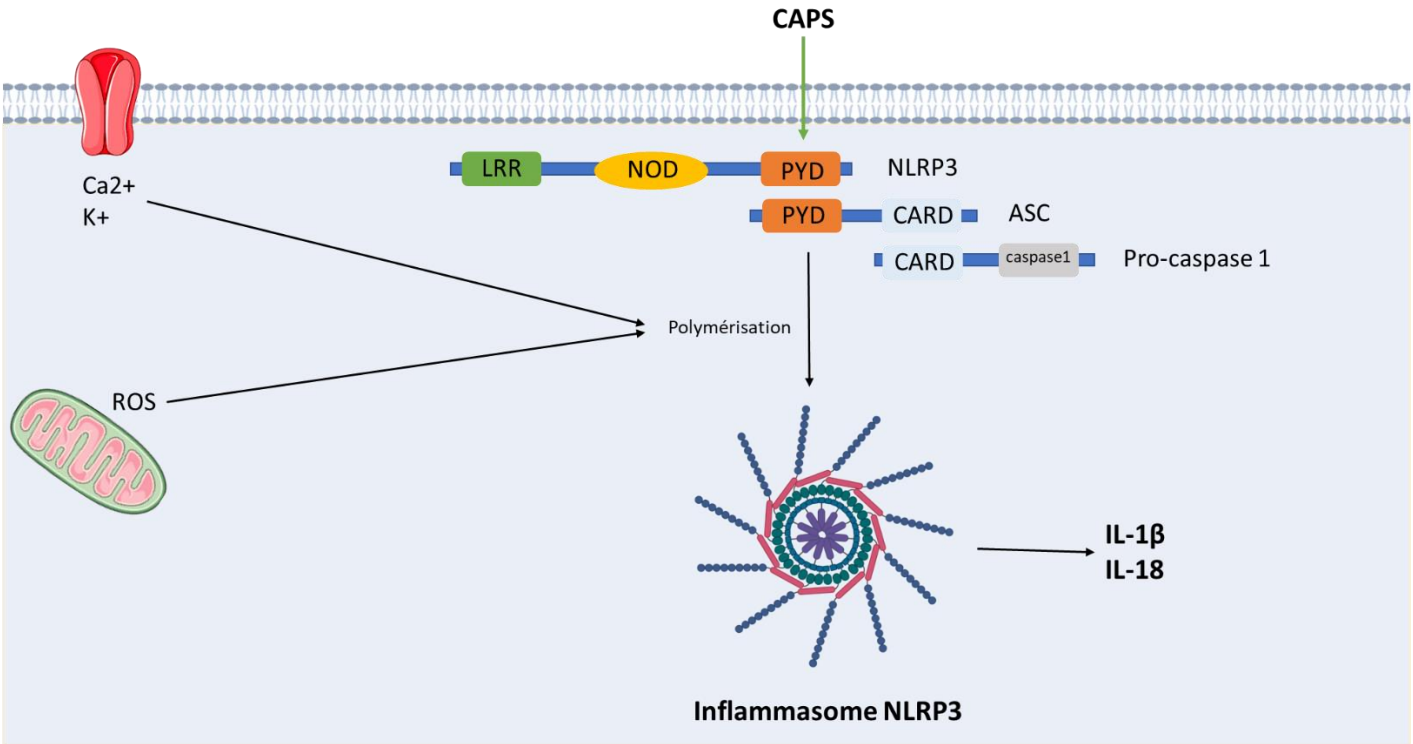
Le syndrome de déficit en cryopyrine, ou CINCA/NOMID, est la forme la plus sévère des cryopyrinopathies, débutant souvent dans la petite enfance et se manifestant par des épisodes persistants de fièvre, des éruptions cutanées, des douleurs articulaires ainsi que des

atteintes neurologiques parfois sévères, comprenant le déficit intellectuel et la méningite aseptique. Les patients peuvent également présenter des complications graves telles que des lésions osseuses, une surdité neurosensorielle et des anomalies oculaires (1).

Le syndrome de Muckle-Wells, bien que moins sévère que le CINCA, se caractérise par des épisodes récurrents de fièvre, des éruptions cutanées, et des douleurs articulaires. Les patients peuvent également souffrir de surdité secondaires à l'inflammation chronique de la cochlée (53)

Les atteintes digestives sont décrites chez 44% des patients et incluent la nausée, les douleurs abdominales, les nausées et l'hépato-splénomégalie (54,55).

Le traitement des CAPS vise principalement à contrôler l'inflammation excessive et à améliorer la qualité de vie des patients (55). Le traitement de choix pour CAPS repose sur les inhibiteurs de l'IL-1β, qui ciblent directement la voie inflammatoire activée par la cryopyrine, tels que l'anakinra et le canakinumab. Ces traitements ont montré leur efficacité pour réduire le nombre de poussées inflammatoires et ont obtenu une autorisation de mise sur le marché dans cette indication (56,57). Le traitement des crises fait appel aux corticostéroïdes peuvent être utilisés pour contrôler les crises aiguës et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (55).



3-Figure 3. Physiologie de l'inflammasome pyrine et implications dans les cryopyrinopathies.

NLRP3 est une protéine intracellulaire composée d'un domaine C-terminal riche en répétitions de leucine (LRR), d'un domaine central NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain ou NACHT), et d'un domaine effecteur N-terminal PYD (pyrin domain), capable de recruter l'adaptateur ASC (protéine associée aux taches apoptotiques contenant un domaine de recrutement de caspase [CARD]) et la procaspase 1. Les signaux activateurs intracellulaires, en particulier les flux ioniques et la production de espèces réactives de l'oxygène (ROS) entrainent la polymérisation des protéines NLRP3 pour former l'inflammasome NLRP3, L'inflammasome clive la pro-IL-1-β et la pro-IL-18 inactives en IL-1-β et IL-18 active. CAPS : cryopyrinopathies.

Etudes humaines

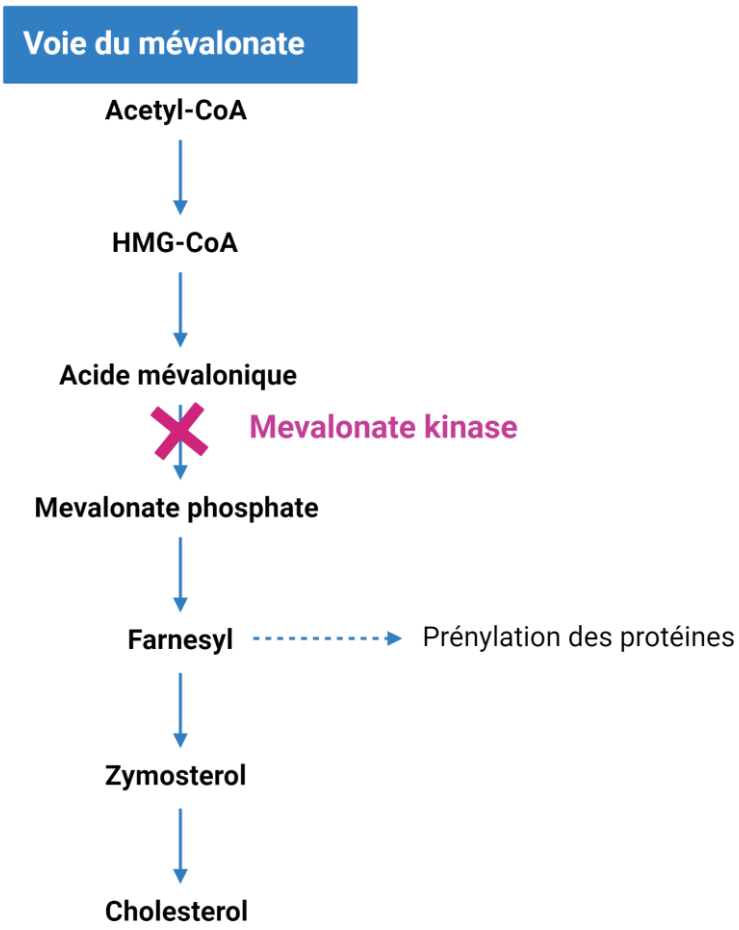
Chez les patients atteints de MICI, il existe une hyperactivation de l'inflammasome NLRP3. De plus, des polymorphismes de *NLRP3* sont associés à la survenue de MICI (58).

Modèles murins

Il n'y a pas de modèle animal spécifique du CAPS étudiant le tube digestif. Néanmoins, dans les modèles murins, l'activation de NLRP3 est associée à une diminution de l'expression des jonctions serrées (59). De plus, l'inflammasome NLRP3 est indispensable à la survenue de la colite induite par le DSS (58).

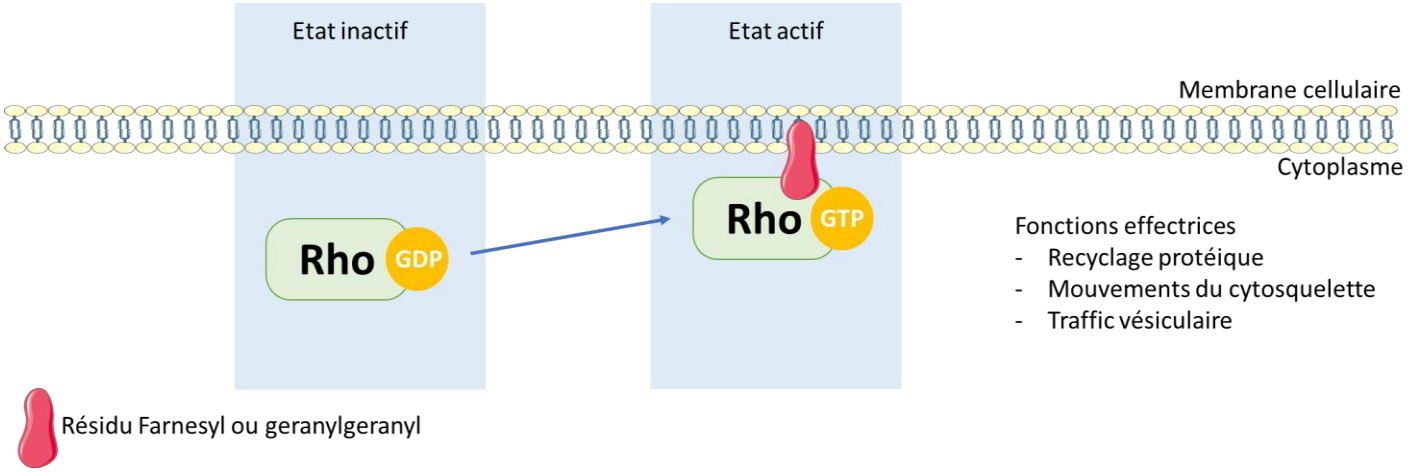
4/ Le déficit en mévalonate kinase

Le déficit en mévalonate kinase est une maladie associée à deux mutations pathogènes du gène *MVK*, qui code pour la protéine mévalonate kinase (1). Cette protéine est une enzyme de la voie du mévalonate qui aboutit à la synthèse du cholestérol (Figure 4). Le déficit de cette enzyme est responsable d'un déficit de production de résidus Farnesyl, qui est indispensable à la prénylation protéique impliquée dans de nombreux mécanismes homéostasiques. En particulier, les Rho GTPases, qui sont de petites protéines de signalisation intracellulaire, sont activées par ce mécanisme de prénylation (60) (Figure 5). Ainsi, toutes les fonctions cellulaires impliquant les Rho-GTPases peuvent être impactées. Notamment, l'état non prénylé des Rho-GTPases est associé à une diminution du seuil d'activation de l'inflammasome pyrine et un état hyperinflammatoire par production d'IL-1β (1).



4-Figure 4. Schéma simplifié de la voie du mévalonate.

La mévalonate kinase catalyse une étape critique de la voie du mévalonate, convertissant le mévalonate en 5-phosphomévalonate. Le déficit en mévalonate kinase impacte la biosynthèse des isoprénoïdes, essentiels pour la production de cholestérol, d'ubiquinone, et d'autres molécules cruciales pour les fonctions cellulaires. L'arrêt de cette voie peut avoir des conséquences biologiques importantes, y compris des dysfonctionnements métaboliques et des syndromes inflammatoires.



5- Figure 5. Mécanisme d'activation des Rho GTPases.

Les protéines Rho sont des protéines cytoplasmiques associées à une protéine guanosine diphosphate (GDP) à l'état inactif. Elles agissent comme un commutateur moléculaire. Les stimuli activateurs entrainent un remplacement du GDP par leguanosine triphosphate (GTP) et l'ancrage à la membrane cellulaire via un résidu Farnesyl ou Geranylgeranyl (isoprenylation). Les fonctions effectrices incluent l'adhésion, la motilité et la migration via les mouvements du cytosquelette, et l'endocytose et le recyclage protéique via le traffic vésiculaire.

Les patients présentent une fièvre récurrente avec des symptômes inflammatoires systémiques, notamment la polyadénopathie et les arthrites aseptiques (55). Ils présentent également des atteintes sévères dépendant de l'activité résiduelle de la mévalonate kinase, en particulier la dysmorphie faciale et les atteintes neurologiques (61). Les crises sont associées à une élévation des protéines de l'inflammation, en particulier la CRP et la SAA (55). Si la maladie est incontrôlée, le MKD peut se compliquer d'amylose AA (62).

Le traitement de première intention du MKD sont les inhibiteurs de l'IL-1β. En effet, l'anakinra, le canakinumab ont montré une efficacité dans le contrôle des symptômes inflammatoires du déficit en mévalonate kinase. permettant de réduire les épisodes de fièvre, les douleurs abdominales et les autres manifestations inflammatoires (63,64). Les corticostéroïdes peuvent également être utilisés pour traiter les poussées sévères ou les complications graves, bien que leur utilisation à long terme soit limitée en raison de leurs effets secondaires potentiels. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) peuvent être employés en traitement des crises inflammatoires (1)

De plus, 88% des patients présentent des douleurs abdominales récurrentes, qui peuvent persister en dehors des crises inflammatoires (62). Enfin, le MKD est considéré comme une cause de MICI monogénique (65,66)

La dysfonction des Rho-GTPases est suspectée de participer au développement d'une inflammation intestinale. En effet, les taux de RhoB sont associés à une dysfonction des jonctions serrées, et la déficience en RhoA est associée à la maladie de Crohn via une migration défectueuse des CIE et de la réparation des lésions intestinales. De plus, la dysfonction de RhoA dans les lymphocytes T promeut la production de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF-a et l'IL-1b (60,67)

Dans les modèles murins, la perte conditionnelle de RhoA dans les IEC est associée à une inflammation intestinale spontanée en lien avec une desquamation cellulaire et une perte de l'intégrité de la barrière intestinale ainsi qu'un afflux de lymphocytes T CD4+ et de granulocytes (68–70).

Le rôle du l'immunité dans le tube digestif

1/ Organisation du système immunitaire

Le maintien de l'homéostasie intestinale nécessite une étroite régulation afin d'assurer une surveillance et une réponse efficaces aux agents pathogènes tout en maintenant la tolérance aux antigènes alimentaires et au bactéries du microbiote intestinal. La lamina propria, située sous l'épithélium intestinal, correspond à une sous-couche de tissu conjonctif qui abrite une vaste population de cellules immunitaires, incluant des macrophages, des cellules dendritiques, des lymphocytes T et B, ainsi que des plasmocytes (71). Les plaques de Peyer, présentes sont des structures lymphoïdes organisés qui jouent un rôle central dans l'immunité intestinale en facilitant la capture des antigènes et l'activation des réponses immunitaires adaptatives (72).

Les macrophages de la lamina propria ont pour rôle la clairance des débris cellulaires et des microorganismes (72). De plus, les plasmocytes sécrétant des IgA sont essentiels pour l'immunité muqueuse en neutralisent les pathogènes et les toxines en limitant la réponse immunitaire. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), également présentes en abondance dans la lamina propria, jouent un rôle crucial dans la suppression des réponses immunitaires excessives, particulièrement via la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et par l'inhibition de l'activité des lymphocytes T effecteurs (73).

2/ Réponses à l'inflammation

La réponse inflammatoire dans le tube digestif est un mécanisme complexe et dynamique destiné à protéger l'organisme contre les infections, les dommages tissulaires et les agents pathogènes, tout en préservant l'intégrité de la muqueuse intestinale. En cas de danger, les cellules épithéliales intestinales libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6, ainsi que des chimiokines qui attirent les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T, au site de l'infection ou de la lésion (74).

Le processus inflammatoire est régulé par des mécanismes anti-inflammatoires pour limiter les dommages tissulaires et restaurer l'homéostasie (75). Les cellules T régulatrices (Treg), jouent un rôle crucial dans la résolution de via la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF-β. Ainsi, la réponse inflammatoire dans le tube

digestif est un équilibre délicat entre l'élimination efficace des agents pathogènes et le maintien de l'intégrité de la barrière digestive.

Les interactions hôtes-microbe dans le tube digestif

L'homéostasie intestinale est un processus complexe qui affecte l'absorption des nutriments et des vitamines, mais aussi le système immunitaire. Elle repose sur un microbiote sain et eubiotique, une barrière intestinale fonctionnelle et le fonctionnement normal de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

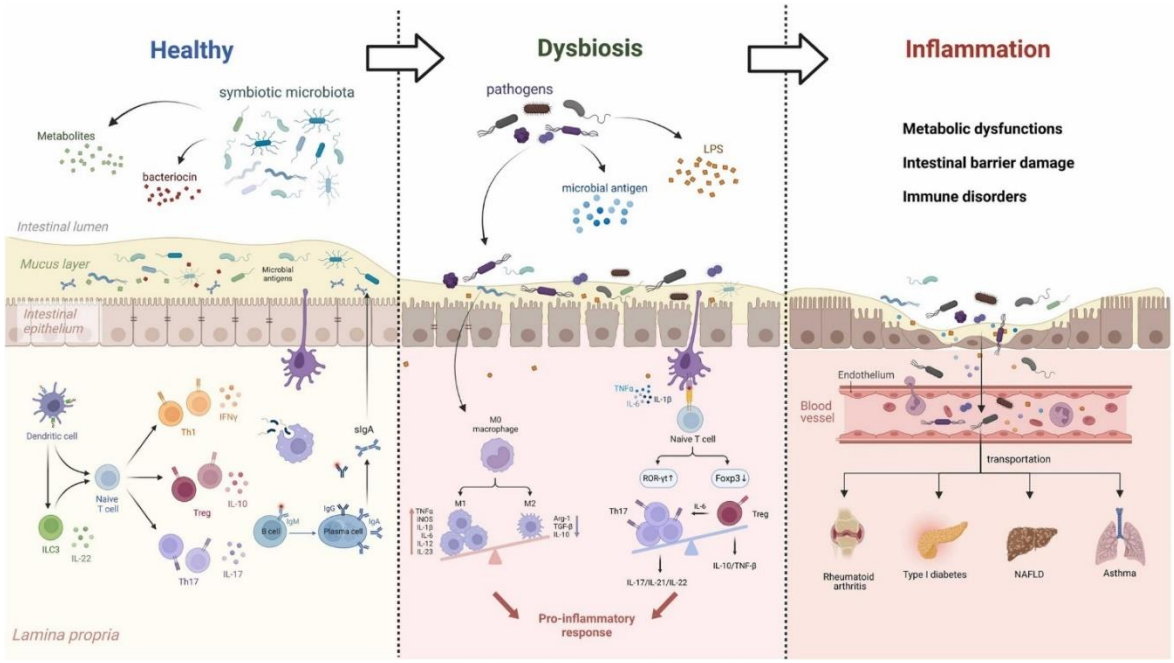
1/ Le microbiote intestinal

Le microbiome intestinal comprend l'ensemble des micro-organismes, y compris les bactéries, les virus et les levures, qui résident dans l'intestin et entretiennent une relation mutualiste avec l'hôte. Il contient plus de 35 000 espèces bactériennes, dont 92 % appartiennent aux embranchements des Firmicutes et des Bacteroides (76). Bien que la composition microbienne varie considérablement d'un individu à l'autre et au cours de la vie, tous les êtres humains en bonne santé présentent un noyau commun d'espèces bactériennes. Trois composantes caractérisent le microbiote intestinal : la diversité alpha résume la distribution des espèces (diversité des espèces) et quantifie l'abondance des espèces (richesse des espèces) dans chaque échantillon, tandis que la diversité bêta compare les profils d'abondance taxonomique entre les échantillons (77). Le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans la maturation du système immunitaire et du métabolisme de l'hôte. Il contribue à la synthèse des vitamines, à la dégradation des fibres alimentaires et à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) (76). Elle fournit des antigènes qui modulent les réponses immunitaires et favorisent le développement de cellules T régulatrices tolérogènes (74). En outre, la composition microbienne affecte directement les sous-produits qui traversent la barrière épithéliale intestinale. Par conséquent, un déséquilibre entre les communautés microbiennes, appelé dysbiose, peut être préjudiciable à l'hôte (Figure 6).

Les bactéries à Gram négatif possèdent des lipopolysaccharides (LPS), qui sont de puissants activateurs pro-inflammatoires des monocytes et des macrophages. Il agit comme un

ligand du récepteur Toll-like (TLR) 4 et induit l'activation de la voie NF-κB (78). Une augmentation des bactéries gram-négatives dans l'intestin est responsable d'une augmentation de la charge en LPS et de l'activation locale des acteurs de l'inflammation. Dans certaines conditions, notamment en cas de dysfonctionnement de la barrière intestinale, l'augmentation de la charge en LPS peut pénétrer dans la circulation portale et induire des réponses inflammatoires systémiques (79).

Au contraire, d'autres bactéries présentent des propriétés anti-inflammatoires. La production d'acides gras saturés par les bactéries de la famille des Firmicutes conduit à . Ils inhibent le recrutement des neutrophiles, la prolifération des cellules T. Ils induisent la production de Tregs. Ils induisent la production de Tregs. Ils inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires via l'atténuation de l'activité HDAC, qui contrôle l'expression génétique des effecteurs inflammatoires tels que NF-κB, tandis qu'ils augmentent la libération de l'IL-10 anti-inflammatoire. En outre, le polysaccharide A, qui est un hydrate de carbone capsulaire provenant du commensal *Bacteroides fragilis*, stimule la production de cellules T et la production d'IL-10 via la stimulation de TLR2 sur les cellules dendritiques plasmocytaires et les T-regs (80). Les vésicules de la membrane externe produites par B. fragilis activent par ailleurs l'autophagie non canonique et induisent la production de T reg (81).



6-Figure 6. Mécanismes du microbiote intestinal conduisant à des maladies inflammatoires.

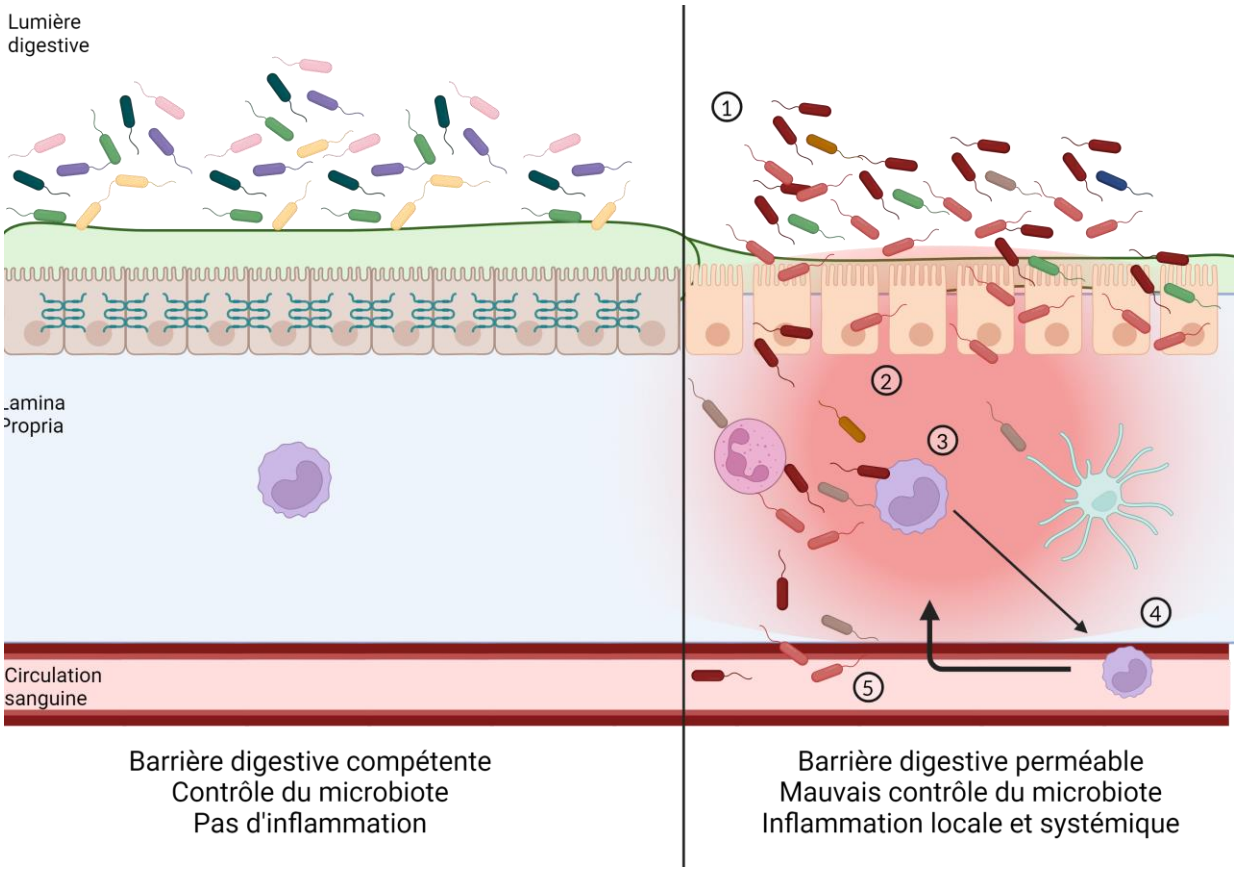
Le microbiote intestinal symbiotique maintient l'organisme dans un état sain par de multiples voies. Il fait partie de la barrière intestinale, produit des bactériocines ainsi que des métabolites bénéfiques tels que les acides gras à chaines courtes et les acides biliaires qui empêchent les agents pathogènes de coloniser l'épithélium intestinal, contribuent au métabolisme digestif de l'organisme et favorisent le développement et l'équilibre du système immunitaire de l'organisme. Cependant, une dysbiose chronique du microbiote intestinal perturbe l'équilibre de la fonction immunitaire sous l'interférence de facteurs internes et externes. Lorsque la barrière intestinale est compromise, les agents pathogènes envahissent l'intestin et déclenchent la libération de multiples facteurs pro-inflammatoires, et l'orientation à long terme du système immunitaire vers des réponses pro-inflammatoires conduit finalement au développement de maladies inflammatoires. En outre, les dommages causés à la barrière intestinale permettent au microbiote intestinal, aux toxines et aux facteurs pro-inflammatoires de pénétrer dans le système circulatoire, où ils sont transportés vers diverses parties du corps et provoquent des maladies inflammatoires dans de nombreux sites. Reproduit à partir de (74)

2/ La barrière intestinale

La barrière intestinale constitue l'interface entre la lumière de l'intestin et le milieu intérieur. Il s'agit d'une couche d'une cellule d'épaisseur composée de cellules épithéliales intestinales spécialisées (CEI), qui comprennent des entérocytes, des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (79). Il protège l'hôte des infections et des stimuli inflammatoires. Les cellules caliciformes produisent une épaisse couche de mucus qui maintient physiquement le microbiote à l'écart des CEI. Avec les cellules de Paneth, elles sécrètent des peptides antimicrobiens qui garantissent l'absence de bactéries au contact des CEI (82). La perméabilité de la barrière est contrôlée par les jonctions serrées, qui maintiennent les CEI proches. Elles empêchent l'entrée des bactéries tout en régulant la perméabilité aux ions et aux petites molécules (79).

Le maintien d'une barrière intestinale efficace est crucial pour l'homéostasie intestinale et la défaillance de l'un ou l'autre de ses composants peut être associée à des maladies inflammatoires (Figure 7). Le dysfonctionnement de la barrière, également appelé « intestin perméable », permet aux antigènes, aux toxines et aux bactéries d'accéder à la circulation sanguine et peut participer à l'apparition ou au maintien d'une inflammation systémique, en particulier au niveau du foie (83). Alors que la barrière intestinale repousse activement les bactéries de la lumière, le microbiote affecte directement l'intégrité de la barrière. Une augmentation des bactéries dégradant la mucine, telles que celles de la famille des *Ruminococcus*, peut entraîner une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus (84). À l'inverse, les bactéries des familles *Lactobacillaceae* et *Akkermansiaceae*, mais aussi les sous-produits microbiens tels que les AGCC, augmentent la sécrétion de mucus et donc la fonction

de barrière (79). Enfin, l'inflammation elle-même peut induire un dysfonctionnement de la barrière intestinale. Les cytokines telles que le TNF-α et l'IFNγ régulent à la baisse l'expression des jonctions serrées, ce qui a un impact sur l'étanchéité de l'épithélium, mais affecte également la maturation des cellules caliciformes et de Paneth et entrave la sécrétion de mucus (85,86).



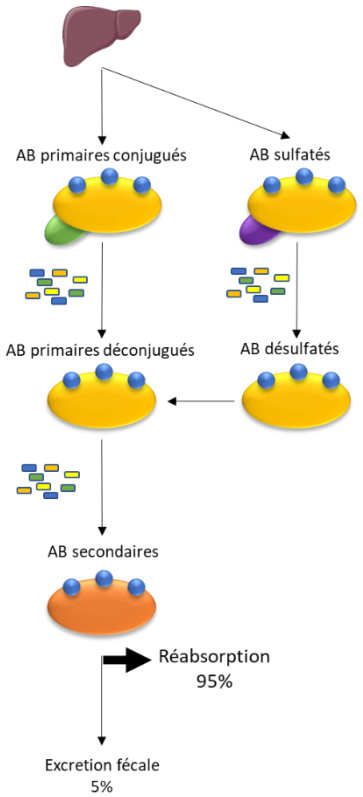
7-Figure 7. Implications de la barrière intestinale dans le contrôle du microbiote intestinal.

À gauche, en état physiologique normal, la barrière épithéliale est intacte, empêchant la translocation des bactéries de la lumière intestinale vers la lamina propria. La flore intestinale est équilibrée, et les cellules épithéliales produisent du mucus et des peptides antimicrobiens pour maintenir l'intégrité de la barrière et prévenir toute invasion microbienne. À droite, les différentes étapes de la translocation bactérienne en cas de dysfonctionnement de la barrière épithéliale. (1) Dysbiose avec prolifération de bactéries pro-inflammatoires. (2) Diminution de l'épaisseur de la couche muqueuse et/ou perte de l'expression des jonctions serrées favorisant l'entrée des bactéries dans la couche sous-muqueuse (3) Activation des macrophages et cellules dendritiques résidentes. (4) Infiltration neutrophilique : Les neutrophiles sont recrutés dans la lamina propria en réponse à l'invasion bactérienne. (5) Dissemination systémique : Les bactéries peuvent atteindre la circulation sanguine, potentiellement menant à une septicémie si non contrôlée.

3/ Fonctions indirectes du microbiote intestinal : la modulation de métabolites

a. Les acides biliaires

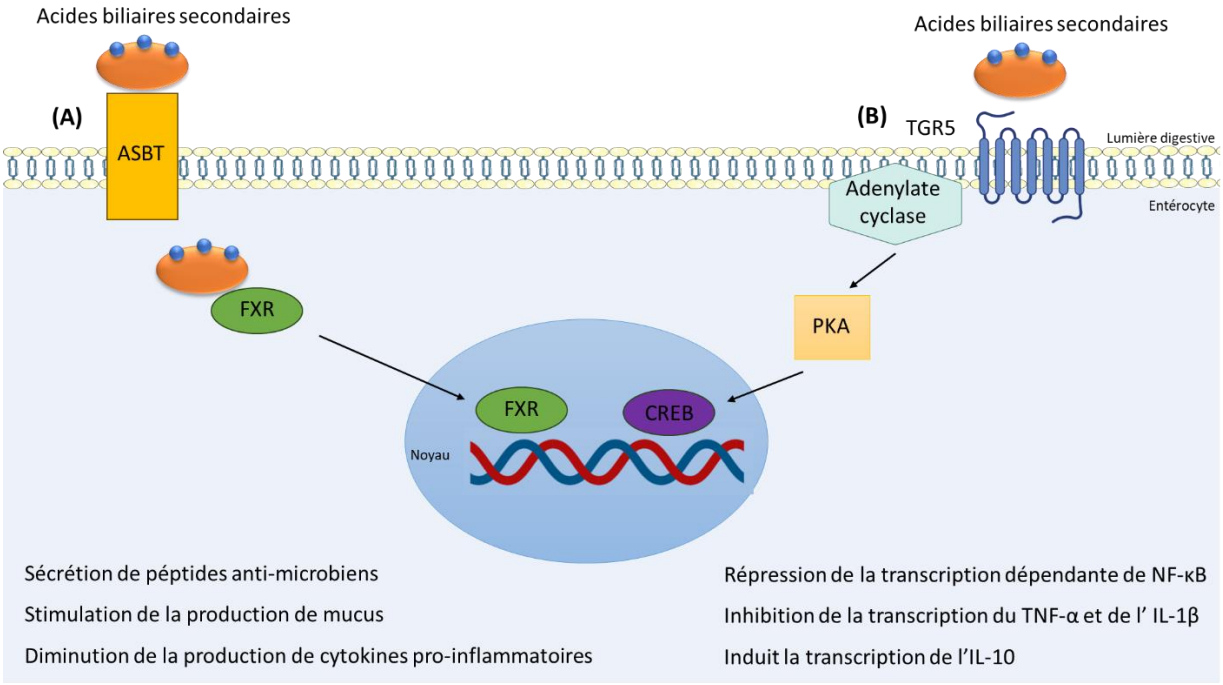
Les acides biliaires (BA) sont des acides stéroïdiens synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol et libérés dans l'intestin par les canaux biliaires sous forme de BA primaires conjugués (Figure 8). Ils contribuent à l'émulsification, à la solubilisation et à l'absorption globale des graisses et des vitamines liposolubles (87). Les BA primaires sont principalement réabsorbés passivement dans l'iléon distal. Les 5 % restants subissent des transformations à médiation microbienne, notamment la déconjugaison, la déshydroxylation et l'hydrogénation, pour être transformés en BA secondaires non conjugués. La déconjugaison des BA primaires est médiée par des bactéries possédant une activité de sel biliaire (BSH), qui est largement exprimée dans de nombreux taxons bactériens. Inversement, la transformation en BA secondaires est médiée par des bactéries exprimant des enzymes hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH), notamment *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* et *Escherichia* (87). Les BA secondaires non conjugués sont soit réabsorbés passivement dans le côlon, soit excrétés dans les fèces. Par conséquent, la composition du microbiote intestinal a un impact important sur le métabolisme des BA et une dysbiose peut être responsable d'un profil anormal de BA dans les selles.



8-Figure 8. Métabolisme des acides biliaires.

Les acides biliaires sont produits dans le foie et excrétés dans le duodénum sous forme d'acides biliaires primaires conjugués et/ou sulfatés. Les bactéries du microbiote intestinal, qui possèdent une activité hydrolase des acides biliaires (BSH), déconjuguent ces derniers. Les acides biliaires primaires déconjugués sont ensuite transformés en acides biliaires secondaires par des réactions successives médiées par les 7α- et 7β-hydroxystéroïde déshydrogénases (HSDH). Les acides biliaires secondaires sont réabsorbés activement dans l'iléon par le récepteur ASBT, et passivement dans l'iléon et le côlon.

Les BA réabsorbés sont recyclés via la circulation portale vers le foie pour former le cycle entéro-hépatique. Ce cycle assure un flux constant de BA, dont les propriétés détergentes les rendent hautement toxiques pour les cellules humaines en cas de contact prolongé. Dans le côlon, la toxicité directe des BA sur les entérocytes a été associée à l'entérocolite nécrosante et au cancer du côlon (87). Dans le foie, l'accumulation d'acides biliaires cytotoxiques active la production de cytokines pro-inflammatoires médiée par NF-kB et expose les hépatocytes à une infiltration inflammatoire, ce qui entraîne la mort cellulaire. Outre leur rôle dans l'absorption, la composition et la taille du pool d'acides biliaires façonnent le microbiote intestinal en favorisant la croissance des bactéries métabolisant les acides biliaires et en inhibant la croissance d'autres bactéries sensibles aux acides biliaires. Ses propriétés bactériostatiques inhibent les bactéries de type Bacteroides, Clostridia (88). En outre, les BA induisent la sécrétion de peptides antimicrobiens et contrôlent l'épaisseur du mucus du côlon via l'activation du récepteur nucléaire Farnesoid-X receptor (FXR) (Figure 9) (89). Globalement, les BA contrôlent la prolifération bactérienne et protègent contre l'inflammation (88). Par conséquent, une diminution de la sécrétion des BA peut participer au développement d'une dysbiose et d'une barrière intestinale défectueuse.



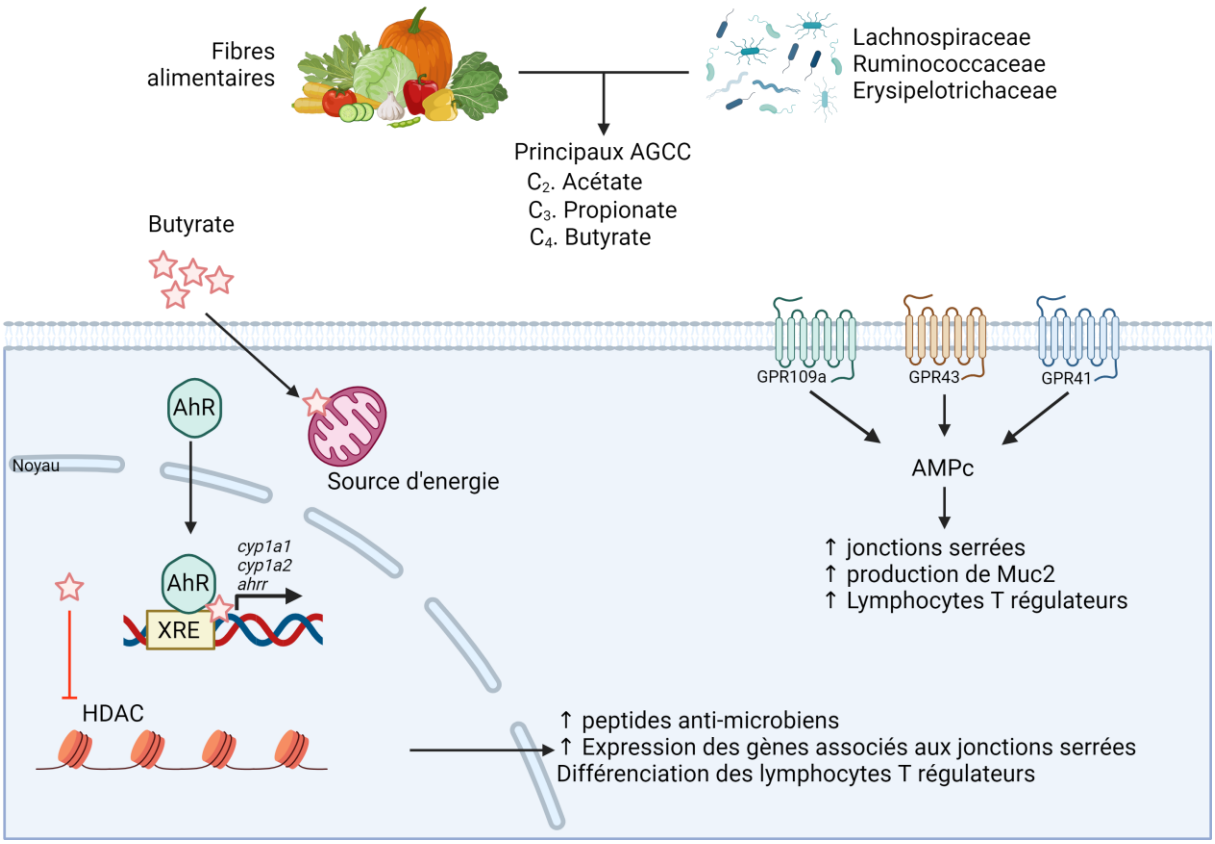
9-Figure 9. Cibles nucléaires des acides biliaires dans les entérocytes.

(A) Les acides biliaires secondaires pénètrent dans les entérocytes via le transporteur dépendant du sodium ASBT situé à la surface apicale. Ils activent ensuite le récepteur nucléaire Farnesoid-X (FXR). Après translocation de FXR dans le noyau, ce récepteur induit la sécrétion de peptides antimicrobiens et la production de mucus, tout en réduisant la production de cytokines inflammatoires. (B) Les acides biliaires secondaires sont reconnus par le récepteur couplé aux protéines G TGR5, situé au pôle apical des entérocytes et des macrophages. La liaison des acides biliaires à TGR5 active la voie de l'adénylate cyclase/protéine kinase A (PKA), ce qui entraîne la phosphorylation de CREB. Cette activation conduit à la répression de la transcription dépendante de NF-κB, inhibant ainsi la transcription du TNF-α et de l'IL-1β, tout en induisant celle de l'IL-10.

b. <u>Les acides gras à chaines courtes (AGCC).</u>

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont produits par la fermentation des fibres alimentaires non digestibles dans le côlon (Figure 10). Ces réactions sont réalisées par le microbiote intestinal et aboutissent à la formation des 3 principaux AGCC, définis par le nombre d'atomes de carbone qu'ils contiennent : acétate (C2), propionate (C3), et butyrate (C4) et des acides gras ramifiés (acide isovalérique et acide isobutyrique) dans une moindre mesure (90). La plupart des bactéries sont capables de cette réaction, mais les firmicutes et les bactéroïdètes sont responsables de la majorité de la production de AGCC (91). Après leur formation, ils sont absorbés passivement ou activement via les récepteurs membranaires MCT-1 et SMCT-1 (92). Après absorption, ils peuvent avoir des effets locaux ou systémiques après

passage dans la circulation portale ou mésentérique. Enfin, ils peuvent agir comme ligands de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) à la surface de l'épithélium digestif, notamment GPR41, GPR43 et GPR109a (90). Ils régulent l'expression des gènes en inhibant les histones désacétylases (HDAC). La plupart des effets des AGCC sont protecteurs et anti-inflammatoires. En effet, le butyrate favorise la fonction de barrière intestinale en induisant l'expression des protéines formant la jonction serrée et la sécrétion de mucine. De plus, le butyrate et le propionate inhibent l'activation de NF-κB via l'inhibition des HDAC dans les cellules mononucléaires (93). Enfin, les AGCC activent le facteur de transcription FOXP3, stimulant la différenciation des cellules T régulatrices et inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (94). Une diminution des AGCC digestifs est en corrélation avec la susceptibilité à la colite induite par le DSS, et la supplémentation en AGCC entraîne une guérison plus rapide dans les modèles murins de MICI. En outre, chez l'homme, des niveaux fécaux réduits d'AGCC sont associés à l'apparition et à la gravité des MICI (94).



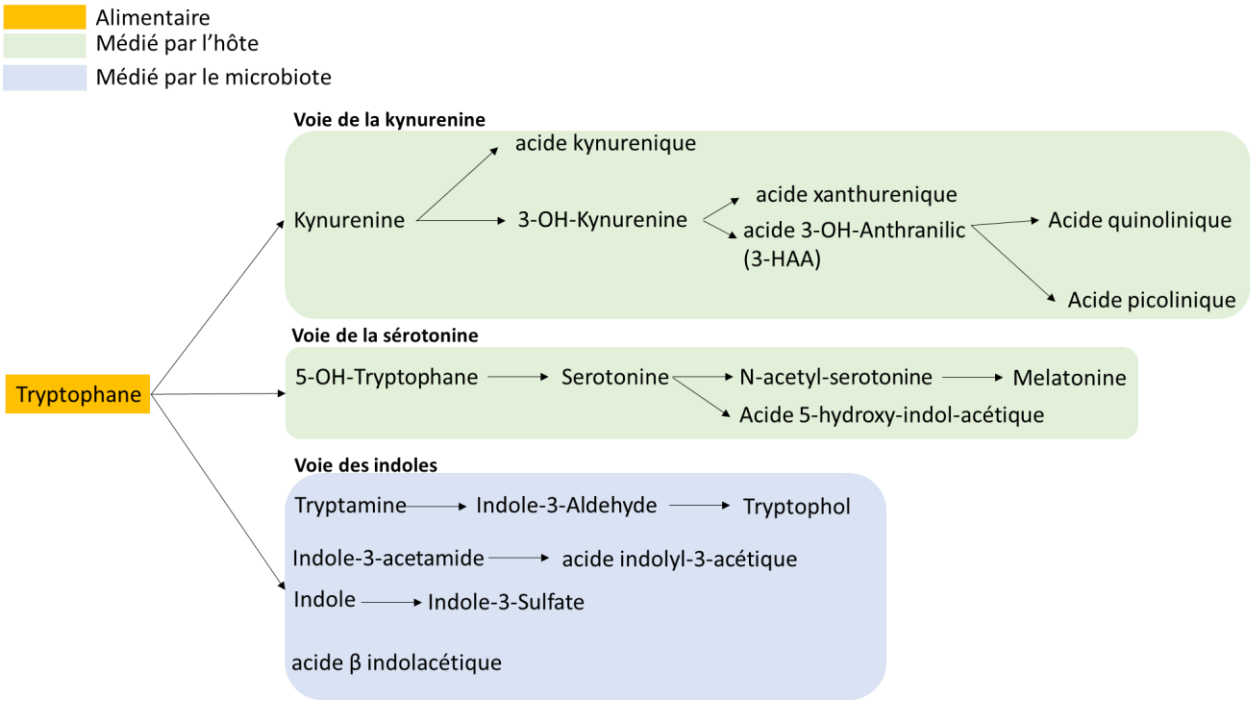
10- Figure 10. Effets des fibres alimentaires sur la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) par le microbiote intestinal et leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire.

Les fibres alimentaires, principalement issues des végétaux, sont fermentées par des bactéries du microbiote intestinal, notamment les Lachnospiraceae, Ruminococcaceae et

Erysipelotrichaceae, conduisant à la production des principaux AGCC : acétate (C_2), propionate (C_3) et butyrate (C_4). Le butyrate joue un rôle central en tant que source d'énergie pour les cellules épithéliales intestinales et en favorisant l'activation du récepteur d'hydrocarbures aryles (AhR), ce qui induit la transcription de gènes cibles via l'élément de réponse à AhR (XRE). De plus, le butyrate inhibe l'activité des histone désacétylases (HDAC), favorisant ainsi l'expression des peptides antimicrobiens, le renforcement des jonctions serrées, la production de mucine (Muc2) et la différenciation des lymphocytes T régulateurs. Les autres AGCC, via les récepteurs couplés aux protéines G (GPR109a, GPR43, GPR41), contribuent également à ces effets protecteurs en augmentant les niveaux d'AMPc, renforçant ainsi les jonctions serrées, la production de Muc2 et la différenciation des lymphocytes T régulateurs, contribuant globalement à l'intégrité de la barrière intestinale et à la modulation de la réponse immunitaire.

c. Le métabolisme du tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé essentiel d'origine alimentaire. Il suit trois voies principales après son ingestion (Figure 11) : La voie de la kynurénine, la voie de la sérotonine et la voie de l'indole. La majeure partie du tryptophane alimentaire est absorbée dans l'intestin grêle. Le tryptophane non absorbé est métabolisé dans le côlon par le microbiote intestinal (95). Environ 5 % du tryptophane est métabolisé dans la voie indole par les bactéries du microbiote intestinal possedant une enzyme tryptophanase (96)., y compris *E. coli, Clostridium* spp et *bacteroides* spp (95). Les indoles ont principalement des propriétés anti-inflammatoires, via l'activation des récepteurs nucléaires Aryl hydrocarbone (AhR) et pregnane X (PXR) (95). L'activation du PXR inhibe l'expression du TNF-α et favorise la différenciation des cellules caliciformes (97). De plus, l'absence de PXR chez la souris est associée à une défaillance de la barrière intestinale et à une augmentation de l'expression de TLR4 (98). L'activation du AhR est associée à la production de cytokines anti-inflammatoires TGF-β et IL-10 dans les cellules dendritiques (99).



11-Figure 11. Métabolisme du tryptophane.

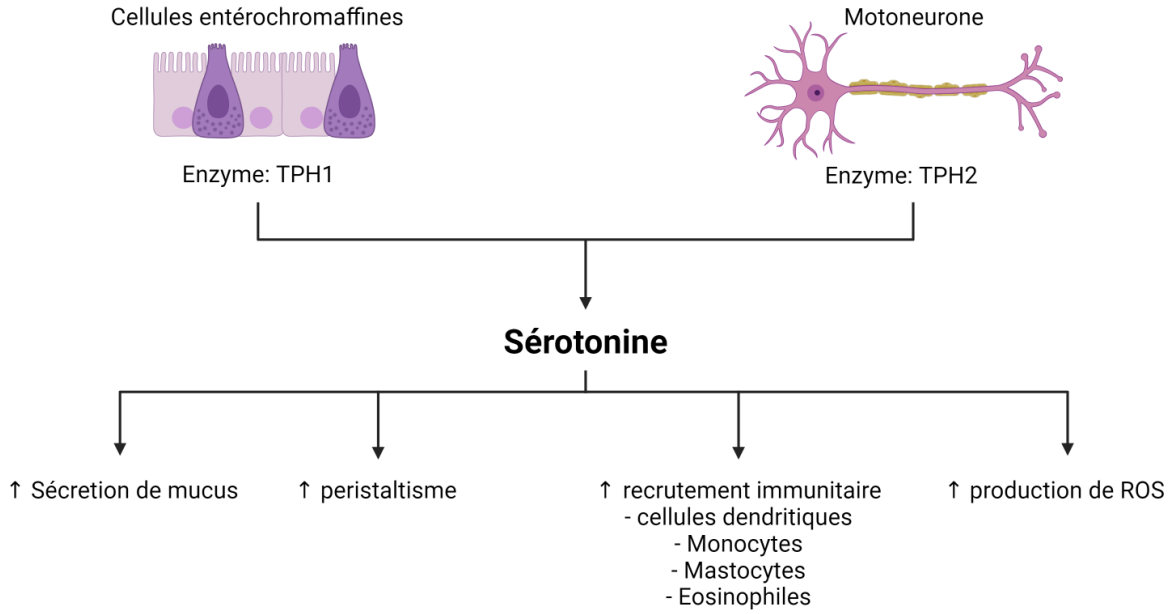
Le tryptophane, un acide aminé essentiel, suit 3 principales voies métaboliques dans l'organisme. La voie de la kynurénine représente la principale voie de dégradation du tryptophane, où environ 95 % de cet acide aminé est converti en kynurénine sous l'action de l'enzyme tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) ou indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette voie aboutit à la production de plusieurs métabolites, l'acide picolinique et l'acide kynurénique qui ont des propriétés immunomodulatrices, ou l'acide quinolinique neurotoxique. La voie des indoles est médiée par les bactéries du microbiote intestinal. Le tryptophane est transformé en indole qui possède une activité anti-inflammatoire via l'activation du récepteur nucléaire (AhR) et le renforcement de la barrière digestive. Enfin, la voie de la sérotonine, transforme le tryptophane en sérotonine via une hydroxylation suivie d'une décarboxylation. La sérotonine est un neurotransmetteur crucial pour la régulation de l'humeur, du sommeil, et de l'appétit.

De plus, il agit sur la barrière intestinale en augmentant la sécrétion de MUC2 et la différenciation des cellules caliciformes (100). Ainsi, dans des modèles murins, l'inactivation des récepteurs AhR et PXR est associée à une hypersensibilité à la colite induite par le DSS (101). En outre, une diminution des indoles dans les selles est observée chez les patients atteints de MICI (102).

L'entrée du tryptophane dans la voie de la kynurénine est limitée par l'enzyme IDO, qui convertit le tryptophane en kynurénine (103). L'activité de cette enzyme est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1β et l'IL-6 (104,105). Ainsi, le tryptophane

alimentaire pourrait être détourné de la voie indole vers la voie kynurénine chez les patients souffrant d'une inflammation locale ou systémique.

L'entrée dans la voie de la sérotonine se fait par la production de sérotonine, dont 90% de la production se fait dans le tube digestif, en particulier par les cellules enterochromaffines, via l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1), et par les motoneurones, via l'enzyme tryptophane hydroxylase 2 (TPH2) (104). De plus, des bactéries du microbiote intestinal, en particulier *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia* spp, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella pneumonia*, et *Morganella morganii* peuvent produire de la sérotonine (106). La sérotonine a plusieurs fonctions dans le tube digestif (figure 12). Elle augmente le péristaltisme en stimulant la motilité du tube digestif. De plus, la sérotonine agit comme un facteur d'attraction des cellules de l'immunité innée, telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes et les éosinophiles sur les sites inflammatoires (107).



12-Figure 12. Rôle de la sérotonine dans le tube digestif

La sérotonine est produite principalement par les cellules entérochromaffines, via l'enzyme TPH1, et par les motoneurones, via l'enzyme TPH2. Elle joue un rôle crucial dans plusieurs processus physiologiques, incluant l'augmentation de la sécrétion de mucus, la stimulation du péristaltisme, le recrutement de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes et les éosinophiles, ainsi que la production de radicaux libres oxygénés (ROS). Ces fonctions mettent en évidence l'importance de la sérotonine dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la réponse immunitaire.

Dans les MICI, on observe une diminution de l'expression des récepteurs de recapture de sérotonine et d'une augmentation du nombre de cellules entérochromaffines, aboutissant à l'augmentation des taux sériques de sérotonine (107–109). L'activation de la voie de la sérotonine semble donc contribuer à la réponse inflammatoire inappropriée observée dans les maladies inflammatoires chroniques.

4/ Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

a. Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des maladies dysimmunitaires chroniques responsables d'une inflammation du tube digestif. Elles affectent 505/100 000 personnes en Europe (110).

Il s'agit de maladies de cause multifactorielles, impliquant une susceptibilité génétique à l'inflammation, des perturbations du microbiote intestinal, des facteurs environnementaux et une altération de la barrière digestive (111–113). Elles sont responsables de symptômes digestifs incluant les douleurs abdominales, les diarrhées et les saignements digestifs, qui traduisent une colite parfois ulcéreuse. Il existe deux formes principales de MICI, qui sont classées en fonction de l'atteinte anatomique et histologique, appelées maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Dans les cas où la présentation clinique et/ou histologique ne répond aux critères diagnostiques d'aucune de ces deux entités, on parle de "MICI inclassée" (114). Cliniquement, la maladie de Crohn peut affecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus, avec une prédilection pour l'iléon et le côlon, et se manifeste souvent par des douleurs abdominales, des diarrhées chroniques (115). En revanche, la rectocolite hémorragique est limitée au côlon et au rectum, se caractérisant par des diarrhées sanglantes et une atteinte continue de la muqueuse (115). En endoscopie, la maladie de Crohn montre des lésions segmentaires, avec des zones saines alternant avec des zones enflammées et des ulcérations profondes, tandis que la rectocolite hémorragique présente une inflammation continue et diffuse, principalement superficielle, commençant au rectum et s'étendant de manière proximale (116). Histologiquement, la maladie de Crohn se distingue par une inflammation transmurale, avec des granulomes non caséeux, alors que la rectocolite hémorragique se limite à la muqueuse et sous-muqueuse, sans granulomes, mais avec des abcès cryptiques fréquents.

b. Génétique

Les études sur les jumeaux ont suggéré un fort facteur génétique dans la pathogénèse des MICI (111). Les analyses d'association pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier de nouvelles voies candidates dans la pathogénèse des MICI. Plus de 150 loci génétiques sont associés aux MICI (111). Il d'agit principalement de gènes liés à la reconnaissance ou l'élimination des agents pathogènes, dont l'hypofonctionnement est responsable d'une prolifération anormale de bactéries pro-inflammatoires dans le tube digestif et d'une inflammation réactionnelle. Plus rarement, il s'agit de gènes associés à la réponse immunitaire elle-même. Parmi ces gènes, *MEFV* et *MKD* sont considérés comme des gènes de susceptibilité aux MICI (37–39,117,118). Ainsi, ces mutations pourraient ne pas être directement responsables de la survenue d'une MICI mais agir comme un des facteurs précipitants l'entrée dans la maladie.

De plus, plus de 40 gènes sont connus pour causer des MICI monogéniques, ce qui signifie que la présence de variants pathogènes dans ces gènes suffisent à ce que le sujet développe la maladie (119). Ces formes de MICI se caractérisent par un phénotype plus sévère et précoce, apparaissant dès la petite enfance (120). Elles sont plus susceptibles de se manifester par une pancolite et/ou une maladie fistulisante et une prévalence plus élevée de symptômes extra-intestinaux (120).

c. Rôle du microbiote intestinal dans les MICI

Le microbiote intestinal est un acteur central dans la pathogenèse des MICI (76,121). Les patients atteints de MICI présentent un microbiote pauvre par rapport aux sujets sains, avec une diminution de l'abondance de bactéries possédant des propriétés anti-inflammatoires, telles que *Bifidobacterium longum, Eubacterium rectale, Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia intestinalis* (122), A l'inverse, le microbiote de ces patients est enrichi en bactéries pro-inflammatoires, en particulier *Bacteroides fragilis* et les bactéries de la famille des Ruminococcus (123). Cette dysbiose perturbe l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, facilitant la translocation bactérienne et l'exposition du système immunitaire à des antigènes bactériens, ce qui déclenche et perpétue une réponse inflammatoire exacerbée (124). En outre,

les altérations du microbiote influencent la production de métabolites, tels que les AGCC, qui sont cruciaux pour la régulation de l'inflammation et l'homéostasie immunitaire. Une surreprésentation de bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (H2S), telle que *Atopobium parvulum* est associée à la sévérité de la maladie de Crohn, probablement via une dysfonction mitochondriale (125–127). De plus, comme précédemment décrit, la dysbiose des patients avec MICI est associée à une diminution de production d'AGCC, en particulier du butyrate, responsable d'un déficit de signaux anti-inflammatoires (128). Le profil du microbiote intestinal des patients est également associé à une altération du cycle des acides biliaires caractérisée par un déficit de déconjugaison et de d'absorption des acides biliaires, ainsi qu'un déficit de transformation des acides biliaires vers les acides biliaires secondaires. Il est décrit une augmentation de l'activité de la voie de la kynurénine et une diminution de l'expression de AhR chez les patients avec MICI. le niveau du métabolisme du tryptophane était associé à la gravité de la maladie (129).

d. Principes de traitement des MICI

Le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comprenant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, vise à contrôler l'inflammation, à soulager les symptômes, et à améliorer la qualité de vie des patients tout en prévenant les complications et les récidives (130). Le traitement médicamenteux des MICI inclut plusieurs classes de médicaments, chacune visant à réduire l'inflammation et à induire une rémission clinique. Les aminosalicylates, tels que la mésalazine (5-ASA), sont souvent utilisés en première ligne pour traiter les formes légères à modérées de la colite ulcéreuse (131).

Les corticostéroïdes par voie orale, comme la prednisone et le budésonide, sont utilisés en traitement d'induction des MICI en raison de leur puissant effet anti-inflammatoire. Cependant, en raison de leurs effets secondaires à long terme, leur utilisation est généralement limitée aux périodes de poussée.

Les immunosuppresseurs, tels que l'azathioprine et la mercaptopurine, sont utilisés pour maintenir la rémission et réduire la dépendance aux corticostéroïdes. Ces médicaments agissent en modifiant la réponse immunitaire et sont particulièrement utiles pour les patients présentant une maladie réfractaire aux traitements conventionnels. Les thérapies biologiques ont

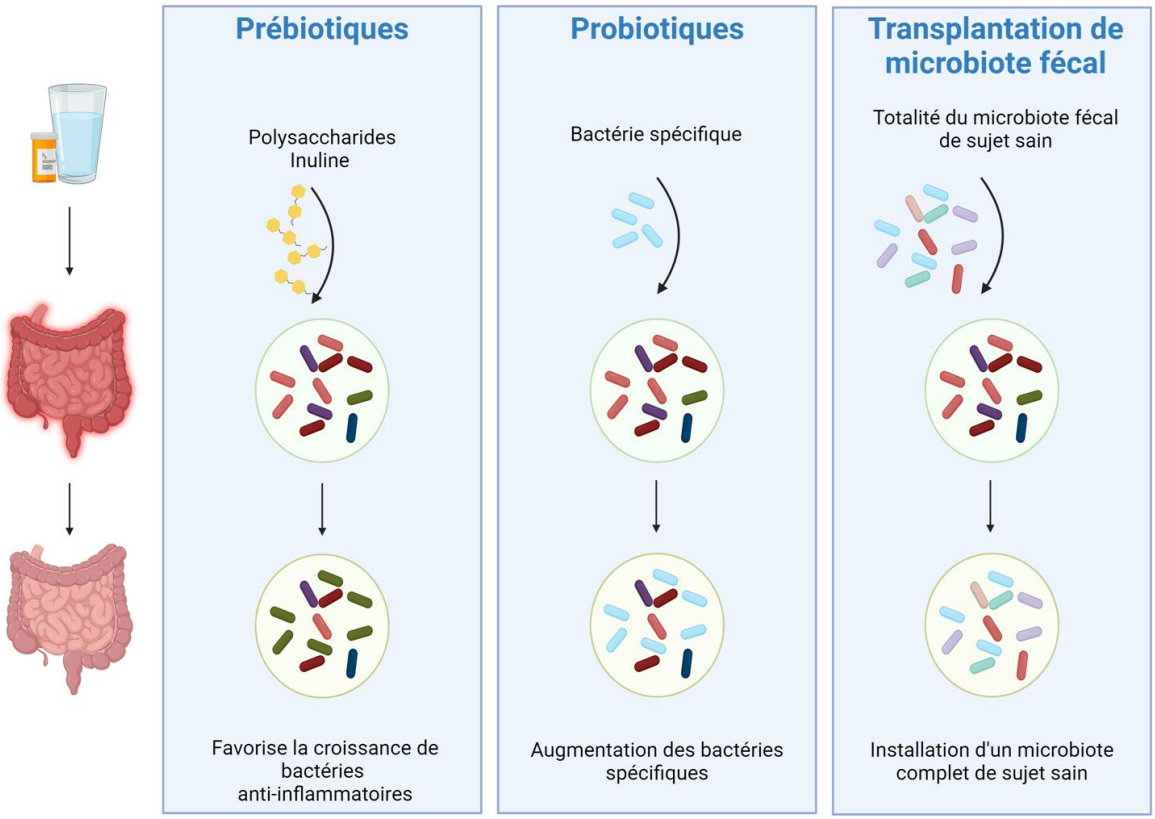
révolutionné le traitement des MICI, en particulier pour les formes modérées à sévères. L'utilisation des inhibiteurs du TNF-α, tels que l'infliximab et l'adalimumab, est recommandée en traitement d'induction des patients atteints d'une MICI de forme modérée à sévère en echec du traitement conventionnel. D'autres biothérapies, comme les inhibiteurs des intégrines (le vedolizumab) et les inhibiteurs de l'IL-12/IL-23 (l'ustekinumab), sont recommandés pour les patients avec des formes sévères résistantes au traitement conventionnel et aux inhibiteurs du TNF-α (131).

Enfin les inhibiteurs de la voie JAK-STAT, en particulier le tofacitinib, est en cours d'évaluation dans le traitement des MICI, dont la place précise reste à déterminer. En particulier, deux essais thérapeutiques ont mis en évidence un bénéfice du tofacitinib dans la mise en rémission de patients atteints de rectocolite hémorragique (132,133).

La prise en charge des MICI peut également nécessiter des interventions chirurgicales, en particulier dans les cas compliqués ou réfractaires aux traitements médicaux. La chirurgie peut inclure la résection de segments intestinaux affectés, la création de dérivations pour la colite ulcéreuse, ou d'autres procédures visant à soulager les symptômes et à traiter les complications telles que les fistules ou les obstructions (134).

e. Place de la modulation du microbiote intestinal dans les MICI et autres maladies dysimmunitaires

Puisque le dysbiose a un rôle majeur dans le développement des MICI, des thérapeutiques de modulation du microbiote ont été pensées : les probiotiques, les prébiotiques et le remplacement du microbiote intestinal (Figure 13).



13-Figure 13. Stratégies de modulation du microbiote intestinal.

Les prébiotiques (à gauche) stimulent la croissance de bactéries anti-inflammatoires en apportant des polysaccharides, comme l'inuline. Les probiotiques (au centre) introduisent des bactéries spécifiques pour augmenter leur proportion dans le microbiote. La transplantation de microbiote fécal (à droite) permet l'implantation d'un microbiote complet provenant d'un sujet sain, favorisant la restauration d'un écosystème microbien équilibré dans l'intestin**.**

Les probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants dont l'administration a des effets bénéfiques sur la santé (135). Il existe une grande diversité de souches probiotiques, chaque souche ayant des propriétés spécifiques et pouvant agir différemment sur l'organisme. Dans le contexte des maladies inflammatoires, le choix des probiotiques se porte sur de souches qui pourraient présenter des propriétés anti-inflammatoires. Par ailleurs, ils peuvent agir en entrant en compétition et prévenir l'expansion de bactéries pathogènes ou au potentiel pro-inflammatoire. Ils peuvent également, par une modification du pH, une augmentation de la production de la couche muqueuse, ou de l'expression des jonctions serrées. Ils peuvent agir directement, ou indirectement par la modulation de métabolites dérivés du microbiote, en particulier les AGCC (136). L'un d'entre eux, VSL#3 contient 4 souches de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* et *L. delbrueckii*), 3 souches de *Bifidobacterium* (*B. longum*,

B. breve, B. infantis) et une souche de *Streptococcus* (*S. salivarius*) est particulièrement étudié dans les maladies inflammatoires et métaboliques. En effet, dans les modèles murins, l'administration de VSL#3 permet une inhibition de l'expression de NF-κB et de TNF-α (137).

Dans les MICI, les effets bénéfiques des probiotiques sont équivoques. Dans la rectocolite hémorragique, plusieurs études ont suggéré l'efficacité de VSL#3, mais aussi de *S. boulardii,* et de *Lactobacillus* reuteri sur le maintien de la rémission des patients en plus du traitement usuel. Néanmoins, une méta-analyse traitant de l'efficacité de VSL#3 et *E. coli* Nissle 1917 dans le traitement d'attaque et d'entretien de la rectocolite hémorragique était limitée. Les effets indésirables des tels traitements sont rares. En conséquence, les recommandations de la société Européenne de nutrition clinique et métabolisme autorisent l'utilisation de certains probiotiques dans le traitement des formes légères et modérés de la rectocolite hémorragique. A l'inverse, leur utilisation dans les formes sévères n'est pas recommandée du fait de l'absence d'argument pour leur efficacité. Dans la maladie de Crohn, l'utilisation de VSL#3 n'était pas efficace dans le traitement d'attaque. De plus, l'utilisation de *L. rhamnosus* pourrait être associé à une augmentation du nombre de rechutes dans la maladie de Crohn pédiatrique. Il n'y a donc pas à ce jour de bénéfice prouvé des probiotiques usuels dans la prise en charge de la maladie de Crohn, et les sociétés internationales ne recommandent pas leur utilisation.

Cinq essais thérapeutiques ont étudié l'utilisation de probiotiques dans la polyarthrite rhumatoïde (138). L'administration de probiotiques, principalement composés de souches de *Lactobacillus,* ont permis la diminution de paramètres inflammatoires biologiques, notamment la protéine C-réactive et le TNF-α. Dans 3 d'entre elles, les patients traités présentaient également un réduction des symptômes cliniques avec l'amélioration de la fonction articulaire et/ une diminution des arthralgies (138). Dans les spondylarthropathies, un essai thérapeutique correspondant à l'administration de *L. acidophilus* et *L. salivarius* permettait une diminution des douleurs, alors qu'une autre ne retrouvait pas de bénéfice par rapport au groupe contrôle (139–141).

Les prébiotiques

Les prébiotiques sont des carbohydrates fermentables qui pourraient causer des bénéfices sur la santé. Les prébiotiques les plus étudiés sont l'inuline et les oligo-saccharides, en particulier le fructo-oligosaccharide (FOS) (136). Ils peuvent modifier significativement la composition du microbiote intestinal, mais aussi agir sur la perméabilité de la barrière digestive. En

particulier, la consommation de FOS était associée à une augmentation de la population fécale de *Bifidobacteria.* En effet, les fibres alimentaires sont métabolisées par les bactéries de la famille des bifidobactéries et *Lactobacillus*, favorisant donc leur croissance (136). Les prébiotiques peuvent donc favoriser la prolifération et les fonctions métaboliques de souches choisies. Les données sur leur efficacité dans le traitement des MICI sont limitées. Des études ont montré que l'utilisation de fibres et de compléments alimentaires riches en fibres comme l'inuline enrichie en oligofructose pouvait soulager les symptômes de la rectocolite hémorragique et aider à maintenir la rémission. Cependant, un essai contrôlé a révélé que l'utilisation de FOS n'apportait aucun bénéfice pour les patients atteints de la maladie de Crohn (135).

La transplantation de microbiote fécal

La Transplantation de Microbiote Fécal (TMF) consiste à administrer une préparation de matière fécale issue d'un sujet sain à un patient atteint d'une pathologie liée à l'altération du microbiote intestinal, en vue d'exercer des effets thérapeutiques. Il s'agit d'un traitement dont l'efficacité est démontrée et utilisé en routine dans le traitement des colites à *Clostridium difficile*. Cette efficacité est similaire chez les patients MICI également atteints d'une colite à *C. difficile,* dont la fréquence y est augmentée (142). Chez les patients avec rectocolite hémorragique, la TMF est associée à une augmentation significative de la fréquence de la rémission clinique et échographique en traitement d'attaque, avec un taux de rémission clinique de 34% (143,144). Dans la maladie de Crohn, la TMF est associée à une modification de la composition du microbiote intestinal avec une augmentation de la diversité microbienne. De plus, le traitement interventionnel était associé à l'obtention de la rémission clinique dans 77% des cas (145). Néanmoins, le maintien de la rémission à distance de la TMF est toujours en cours d'évaluation (135). L'analyse de la réponse à la TMF chez les patients atteints de colite ulcéreuse a montré que la présence de certaines bactéries comme *Eubacterium* et *Roseburia,* ainsi que la production d'AGCC et d'acides biliaires secondaires, étaient liée à la rémission, tandis que la présence de *Fusobacterium* et *Escherichia* était associée à l'absence de rémission (144). La transplantation fécale est un traitement relativement sûr avec toutefois des symptômes abdominaux mineurs décrits (146). La TMF est donc une alternative prometteuse dans le traitement des MICI.

Un cas de FMT en traitement d'une polyarthrite rhumatoïde réfractaire est rapporté dans la littérature. La FMT a permis une diminution des taux de facteur rhumatoïde, une réduction des

doses de corticoïdes et une diminution du nombre d'articulations douloureuses (147). Les symptômes articulaires d'un patient atteint de spondylarthrite ankylosante et de rectocolite hémorragique ont été améliorés après FMT (148).

5/ Effets des traitements anti-inflammatoires sur le microbiote intestinal

a. Les corticostéroïdes

Les corticoïdes sont des hormones stéroïdiennes de synthèse utilisées dans le traitement de maladies inflammatoires. Son effet anti-inflammatoire est dépendant de la modulation de l'expression de gènes cibles après liaison à des récepteurs nucléaires. Il est responsable d'une diminution de la circulation de lymphocytes B et T et des cellules mononuclées du sang et une inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (149).

Chez l'homme, la prise de glucocorticoïdes est associée à un risquer de développer des ulcères peptiques et/ou d'aggraver des ulcères préexistants (150).

Chez le rat, la prise de prednisone était associée à une différence de composition avec la décroissance des bactéries des genres *Isenbergiella*, *Alistipes*, and *Clostridium* XIVb et une augmentation de *Anaerobacterium* sans diminution de la diversité et de l'abondance bactérienne (151). De plus, on retrouve une dysbiose du microbiote fungique et une altération des interactions champignons-bactéries après traitement par prednisone (152). Cette dysbiose est responsable d'une diminution de la production d'AGCC telles que l'acide propionique, l'acide butyrique, l'acide valérique et l'acide isovalérique (152).

Les effets des glucocorticoïdes sur la fonction de la barrière intestinale sont équivoques (153). In vitro, l'exposition de cellules Caco2 à des glucocorticoïdes renforce la barrière intestinale et atténue les effets délétères du TNF-α. A l'inverse, dans les modèles murins, la prise de glucocorticoïdes est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de l'expression des protéines de jonction (153).

b. La colchicine

La colchicine est un alcaloïde tricyclique naturel dérivé des graines de colchique. Il s'agit d'un poison du fuseau, qui agit en inhibant la polymérisation de la tubuline (154). C'est un anti-mitotique. Après absorption, elle subit un cycle entéro-hépatique et est éliminée en partie par la voie biliaire dans les fèces, et minoritairement par le rein. Elle possède des activités anti-inflammatoires en empêchant la migration des cellules myélomonocytaires aux sites inflammatoires. La colchicine est utilisée dans le traitement des maladies inflammatoire depuis les années 1970, principalement dans la goutte, mais aussi dans la fièvre méditerranéenne familiale, où elle constitue le principal traitement de la maladie (12). Elle peut également être efficace dans le traitement des aphtoses buccales.

Elle possède une marge thérapeutique étroite avec des effets toxiques qui affectent principalement le tube digestif, notamment les douleurs abdominales et la diarrhée. De plus, la fréquence des symptômes gastro-intestinaux peut atteindre 20% des patients atteints de FMF (155). Dans les cas de toxicité à la colchicine, les analyses histologiques retrouvent des gastrites aspécifiques associée à une atrophie villeuse. Dans certains cas, on retrouve une abondance de cellules épithéliales bloquées en métaphase et une perte de la polarité épithéliale, spécifique de la toxicité à la colchicine [5,6].

Chez la souris, l'exposition à la colchicine pendant une semaine est associée à la survenue de lésion digestive définie par la perte des jonctions serrées, des lésions cryptiques et d'une hyperperméabilité digestive, associée à une atrophie muqueuse dès 0.5mg/kg/j de colchicine. Ces lésions étaient associées à une perte de la diversité bactérienne, ainsi qu'à une modification de la composition du microbiote intestinal avec un augmentation des bactéries du groupe Firmicutes et une diminution des bactéries du groupe Bacteroidetes (156,157). De plus, la prise de colchicine entraine une diminution de l'expression des régulateurs de la synthèse et des transporteurs des acides biliaires, suggérant une accumulation d'acides biliaires dans le colon et qui pourrait provoquer à une diarrhée aux acides biliaire que l'on retrouve chez les patients (158).

Les effets de la colchicine sur le microbiote intestinal humain sont difficiles à étudier car ce traitement est donné dans des maladies inflammatoire qui sont déjà associées à des perturbations du microbiote intestinal, telles que la goutte, la fièvre Méditerranéenne familiale, la goutte et la maladie de Behçet (159,160). Néanmoins, aux vues de la fréquence des effets indésirables à type de diarrhée, il est probable que la colchicine soit responsable d'une toxicité digestive à minima. Une étude ne retrouvait pas de différence quant à la diversité bactérienne

et la composition du microbiote intestinal de patients traités ou non par colchicine pour un syndrome métabolique [11].

c. Le méthotrexate

Le méthotrexate est un antimétabolite. Il inhibe la prolifération cellulaire et inhibe la néo-synthèse des purines et pyrimidines essentielles à la division cellulaire en inhibant l'enzyme duhydrofolate reductase (161). De plus, il induit la libération d'adénosine dans le milieu extracellulaire. L'adénosine a des effets paracrines anti-inflammatoires : elle inhibe le recrutement des neutrophiles, favorise la transition des macrophages pro-inflammatoires M1 en macrophages anti-inflammatoires M2 et inhibe la formation d'ostéoclastes (162). Il s'agit du traitement de première ligne de la polyarthrite rhumatoïde, mais est également largement utilisée dans les maladies inflammatoires avec un tropisme articulaire.

Les troubles digestifs, incluant les douleurs abdominales, le reflux gastro-oesophagien, la nausée affectent jusqu'à 32% des patients traités pour une polyarthrite rhumatoïde (163). De plus, la survenue d'une cytolyse hépatique est décrite chez 13% des patients (164)

L'exposition au méthotrexate de souris sans germe transfectées avec du microbiote de sujets sains ou atteints de polyarthrite rhumatoïde est responsable d'une diminution des bactéries du genre *Bacteroides*. In vitro, l'exposition de bactéries commensales du tube digestif est responsable d'une cassure de la courbe de croissance bactérienne associée au déficit en acide folique provoqué par le méthotrexate (165,166).

d. Les biothérapies

Les biothérapies désignent un ensemble de traitements basés sur l'utilisation de molécules ou de cellules biologiquement actives, telles que des cytokines et des anticorps monoclonaux, visant à intervenir de manière ciblée sur les mécanismes physiopathologiques, en modulant spécifiquement les réponses biologiques de l'organisme (167). Les biothérapies les plus utilisées dans les maladies auto-inflammatoires sont les inhibiteurs de l'IL-1β (anakinra

et canakinumab), les inhibiteurs de l'IL-6 (Tocilizumab), les anti-TNF-α et les inhibiteurs de JAK.

Inhibiteurs de l'IL-1β

Les anti-IL-1β, tels que l'anakinra et le canakinumab, sont des agents biologiques qui inhibent l'interleukine-1, une cytokine pro-inflammatoire clé dans la pathogénie de diverses maladies auto-inflammatoires (168). Bien que ces traitements soient efficaces dans la réduction de l'inflammation systémique, ils peuvent induire des effets indésirables digestifs, notamment des douleurs abdominales, des nausées, des diarrhées et des aphtes buccaux chez 14% des patients traités par des CAPS (169). Si l'administration d'anakinra dans un modèle murin de diabète de type 1 viro-induit (LEW1.WR1) était associée à une dysbiose significative, l'administration d'anakinra a des souris traitées par melphalan les protégeaient de la dysbiose chimio-induite (170,171).

Inhibiteurs de l'IL-6

Les anti-IL-6 sont des agents biologiques qui neutralisent l'IL-6. La principale molécule utilisée est le tocilizumab. Il est utilisé dans les maladies liées à l'IL-6, telles que la maladie de Still et le HA20. Le traitement par tocilizumab est associé à un risque augmenté de diverticulite et de perforation gastro-intestinale (172). Le mécanisme physiopathologique de la diverticulite induite par le tocilizumab n'est pas connu. Néanmoins, l'IL-6 est une cytokine cruciale au maintien de l'homéostasie intestinale, notamment via l'induction de la prolifération cellulaire et la protection contre l'apoptose suivant un stress (173,174).

Chez les patients atteints de COVID-19, le traitement par tocilizumab n'était pas associé à la survenue d'une dysbiose. Les patients présentaient toutefois une augmentation de l'abondance relative de *Desulfovibrio* (175).

Anti-TNF-α

Les anti-TNF-α, tels que l'infliximab et l'Adalimumab, sont des agents biologiques qui neutralisent le TNF-α. Ils sont utilisés dans le traitement de maladies rhumatologiques telles

que la polyarthrite rhumatoïde et les spondylarthropathies, mais aussi au cours des MICI. Les atteintes gastro-intestinales sont rarement décrites au cours du traitement par anti-TNF-α. La cytolyse hépatique peut survenir chez 37-42% des patients traités (176).

Dans les spondylarthropathies, le traitement par anti-TNF- α était associé à une restauration du microbiote intestinal par rapport au sujet sains (177). Des résultats similaires ont été décrits dans la polyarthrite rhumatoïde, où le traitement par Etanercept permettait une restauration partielle du microbiote intestinal, avec l'augmentation de bactéries des phyla Cyanobacteria, Nostocophycideae et Nostocales (178).

Inhibiteurs de JAK

Les inhibiteurs des Janus kinases (JAK) sont des molécules thérapeutiques ciblant spécifiquement les isoformes JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, qui sont essentielles à la phosphorylation et à l'activation des protéines STAT dans la signalisation intracellulaire des cytokines (179). Elle possède une activité anti-inflammatoire spécifique de la réponse interféron. Les inhibiteurs de JAK sont prescrits dans certaines maladies inflammatoires, notamment la polyarthrite rhumatoïde. De plus, des données suggèrent l'efficacité des inhibiteurs de JAK dans les traitements des MICI (180). L'utilisation d'inhibiteurs de JAK est associé à un surrisque de perforation digestive (181)

Dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, le traitement par tofacitinib, était responsable d'une modification de la composition du microbiote intestinal avec l'augmentation de bactéries des phyla Firmicutes et Actinobacteria associé à un régression des arthrites (182). De plus, le Tofacitinib prévient les altérations de la barrière intestinale induites par l'interféron-γ en augmentant l'expression des protéines qui forment les jonctions serrées, notamment la claudine-2 et ZO-1 (183).

Molécule	**Effets indésirables gastro-intestinaux**	**Effets sur le tractus gastrointestinal et sur le microbiote intestinal**
Corticostéroïdes	Ulcères peptiques	Dysbiose bactérienne et fongique ↘ AGCC fécaux Possible hyperperméabilité intestinale
Colchicine	Diarrhée Douleurs abdominales Gastrite	Modèles murins de toxicité à la colchicine : Dysbiose avec diminution de la diversité bactérienne ↗ Firmicutes ↘Bacteroides Etude clinique : Pas de différence de la ;composition du microbiote intestinal chez les patients avec syndrome métabolique traités par colchicine Gastrite, atrophie villeuse ↘Diminution de l' expression des régulateurs de la synthèse des acides biliaires
Methotrexate	Douleurs abdominales Reflux gastro-œsophagien Cytolyse hépatique	Cassure de la courbe de croissance bactérienne in Vitro Dysbiose avec ↘ des Bacteroides chez la souris
Inhibiteurs de l' IL-1β	Nausée Diarrhée Aphtes buccaux	Dysbiose significative chez les rats LEW1.WR1 traités par anakinra. Protection de la dysbiose par le melphalan chez le rat
Inhibiteurs de L' IL-6	Diverticulite Perforation gastro-intestinale	Pas de dysbiose chez les patients COVID traités par tocilizumab par rapport aux patients COVID non traités
Inhibiteurs du TNF-α	Cytolyse hépatique	Restauration du microbiote intestinal après traitement chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de spondylarthropathies.
Inhibiteurs de JAK	Perforation gastro-intestinale	Restauration du microbiote dans murin modèle murin de polyarthrite rhumatoïde traité par Tofacitinib

Tableau 2. Description des effets secondaires gastro-intestinaux et effets sur le microbiote intestinal des principaux traitements anti-inflammatoires utilisés dans les maladies auto-inflammatoires monogéniques.

6/ Méthodes d'études du microbiote intestinal

a. Culture

La méthode de culture bactérienne pour l'étude du microbiote intestinal repose sur l'isolement et la croissance des bactéries présentes dans les échantillons fécaux sur des milieux de culture spécifiques (184). La technique consiste à cultiver les bactéries sous des conditions contrôlées afin de permettre l'identification des différentes espèces bactériennes. Cette méthode présente des inconvénients majeurs, en particulier le fait que de nombreuses bactéries du microbiote intestinal sont difficiles voire impossibles à cultiver *in vitro,* notamment les bactéries anaérobies strictes. De plus, cette méthode peut sous-estimer la diversité microbienne et manquer certaines espèces non cultivables, limitant ainsi une vue d'ensemble précise du microbiote. De plus, la capacité de culture diffère en fonction des bactéries et le résultat des cultures pourrait ne pas être le reflet de la composition du microbiote intestinal (184). Ainsi, cette méthode n'est plus utilisée dans l'étude du microbiote intestinal.

b. ARN ribosomique 16S :

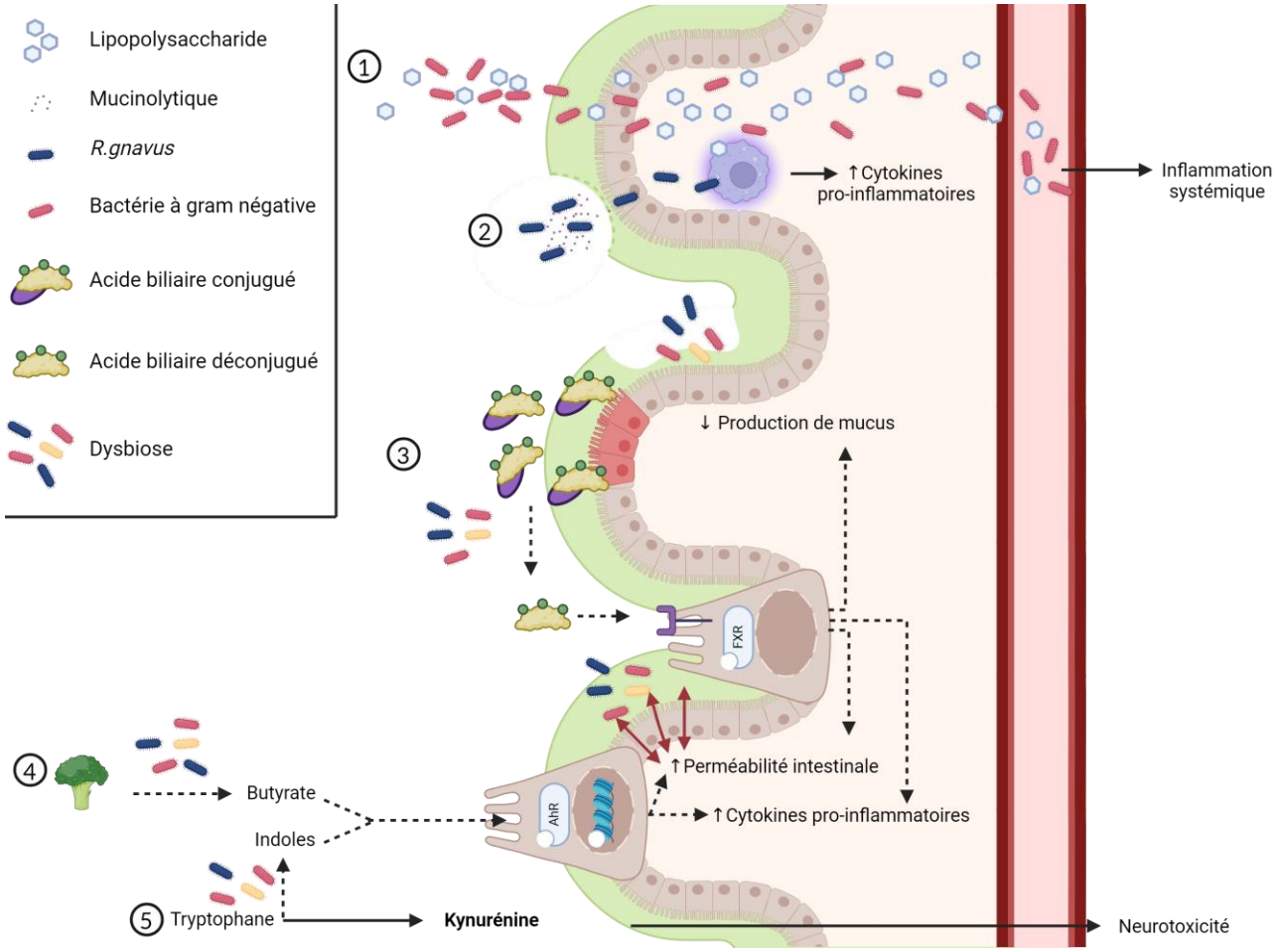
La méthode de séquençage de l'ARNr 16S pour l'étude du microbiote intestinal repose sur l'amplification et le séquençage du gène 16S ribosomal qui est hautement conservé parmi les bactéries. Cette technique permet ainsi l'identification et la classification des différentes espèces présentes. Le principe consiste à extraire l'ADN des échantillons de selles, à amplifier le gène 16S rRNA à l'aide de PCR (Polymerase Chain Reaction), puis à séquencer les amplicons pour analyser les séquences obtenues. Cette méthode offre l'avantage de pouvoir détecter et identifier une large diversité de bactéries, y compris celles qui ne peuvent pas être cultivées en laboratoire. De plus, elle permet une analyse rapide et à grande échelle de la composition microbienne, fournissant une vue d'ensemble détaillée du microbiote (185). Cependant, la méthode présente aussi des inconvénients, tels que sa faible résolution taxonomique, car elle ne permet souvent pas de différencier les bactéries au niveau de l'espèce, et le biais introduit par les étapes d'amplification et de séquençage qui peuvent altérer la représentation réelle des communautés microbiennes (186).

c. Métagénomique shotgun

La méthode de séquençage shotgun pour l'étude du microbiote intestinal consiste à séquencer de manière aléatoire l'ensemble de l'ADN extrait des échantillons fécaux, sans cibler de gènes spécifiques, permettant ainsi une analyse exhaustive du contenu génomique microbien (187). Le principe repose sur la fragmentation de l'ADN en petits morceaux, leur séquençage, puis l'assemblage des séquences pour reconstituer les génomes microbiens présents, incluant les bactéries, virus, champignons et autres microorganismes. Les avantages de cette méthode sont nombreux : elle offre une résolution taxonomique très élevée jusqu'au niveau des espèces voire des souches, permet de détecter la présence de gènes fonctionnels, et de caractériser non seulement la composition mais aussi le potentiel fonctionnel du microbiote. Les analyses fonctionnelles consistent à mettre en correspondance des fragments d'ADN séquencés avec des gènes et des voies métaboliques connus, ce qui permet d'émettre des hypothèses quant aux fonctions biologiques et les activités de la communauté microbienne au sein d'un échantillon. Cette méthode permet une détection plus large des genres bactéries, et de détecter des bactéries de faible abondance, dont les fonctions peuvent être significatives biologiquement (188). Cependant, le séquençage Shotgun présente des inconvénients, tels que son coût élevé, la complexité de l'analyse bio-informatique nécessaire pour traiter les grandes quantités de données générées, et le risque de contamination croisée qui peut affecter les résultats. Malgré ces défis, cette méthode est considérée comme l'approche la plus complète pour explorer la diversité, les interactions, et les fonctions du microbiote intestinal (186).

Hypothèses et objectifs

Notre hypothèse est que les patients atteints de maladies auto-inflammatoires monogéniques, notamment l'haploinsuffisance de A20, la fièvre Méditerranéenne familiale, les cryopyrinopathies et le déficit en mévalonate kinase, présentent une dysbiose spécifique ainsi que des perturbations dans les profils de métabolites dérivés du microbiote intestinal. Ces anomalies pourraient contribuer au maintien d'une inflammation locale et systémique (voir Figure 14), et être liées non seulement aux symptômes digestifs observés chez ces patients, mais également au phénotype inflammatoire digestif de la maladie.



14-Figure 14. Hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la perturbation de la barrière intestinale et l'inflammation.

(1) La dysbiose intestinale entraîne une augmentation de la translocation bactérienne et de la libération de lipopolysaccharides (LPS), ce qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires. (2) Certaines bactéries pathogènes dégradent la couche de mucus protectrice, réduisant ainsi sa production et exacerbant l'inflammation. (3) Une diminution des bactéries anti-inflammatoires entraîne une baisse de la production de butyrate, affaiblissant les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, ce qui augmente la perméabilité intestinale. (4) La réduction

de l'activité des récepteurs FXR et AhR, due à un manque de ligands spécifiques (comme les acides biliaires déconjugués et les métabolites du tryptophane), contribue à la dysfonction de la barrière intestinale. (5) Enfin, la perturbation de ces processus favorise une inflammation chronique, marquée par une infiltration accrue de cellules immunitaires et une production continue de cytokines pro-inflammatoires. Ces hypothèses illustrent un modèle intégratif où la dysbiose et la perturbation des voies de signalisation clés aboutissent à une altération de la barrière intestinale et à une inflammation systémique.

Notre objectif était d'étudier la composition du microbiote intestinal chez des patients atteints de HA20, FMF, CAPS et MKD, suivis au sein du centre de référence des maladies auto-inflammatoires monogéniques, situé dans le service de médecine interne de l'hôpital Tenon. Nous avons utilisé le séquençage Shotgun pour cette analyse. De plus, pour les patients atteints de HA20, nous avons mené des analyses fonctionnelles du microbiote intestinal afin d'identifier des voies métaboliques dont l'abondance relative était différenciée par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, nous avons étudié le profil des acides biliaires, des acides gras à chaîne courte et des métabolites dérivés du tryptophane par spectrométrie de masse pour détecter d'éventuelles anomalies dans ces voies. Enfin, nous avons réalisé des études de corrélation entre les taux de métabolites fécaux et l'abondance relative des bactéries présentes dans les selles.

Resultats

Article I

A20 haploinsufficiency: A systematic review of 177 cases.

Inès Elhani, Quentin Riller, Guilaine Boursier, Véronique Hentgen, Frédéric Rieux-Laucat, Sophie Georgin-Lavialle

Publié dans le *Journal of Investigative dermatology*
DOI : 10.1016/j.jid.2023.12.007

Cette partie de mes travaux de thèse a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Investigative Dermatology* en décembre 2023 (DOI : 10.1016/j.jid.2023.12.007).

Dans ce travail de revue, nous nous sommes intéressés à décrire précisément l'intégralité des manifestations cliniques des patients présentant un variant de *TNFAIP3* et diagnostiqués avec une haploinsuffisance de A20.

Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature de deux bases de données, PubMed et Embase, en nous appuyant sur les recommandations internationales PRISMA.

Nous avons identifié 177 patients de 94 familles différentes. Nous avons mis en évidence que le tube digestif est l'un des organes les plus fréquemment atteints dans l'haploinsuffisance de A20. En effet, 46 % des patients présentaient une atteinte digestive, majoritairement des douleurs abdominales et des ulcères digestifs.

Notre analyse a permis de distinguer deux phénotypes digestifs parmi les patients : d'une part les adultes avec une forme ulcéreuse, présentant des ulcères isolés ou multiples au sein d'une muqueuse saine, et d'autre part, les enfants avec une maladie inflammatoire sévère du tube digestif s'apparentant à une MICI de survenue très précoce. De plus, les atteintes hépatiques affectaient 10% des patients ce qui semble plus fréquent que dans les autres MAI monogéniques.

Nous avons également décrit les atteintes systémiques (la fièvre), cutanées, articulaires, neurologiques et les maladies auto-immunes associées à la maladie.

Enfin, nous avons réalisé une analyse en composante principale qui nous a permis d'identifier trois clusters de patients :

-des patients présentant des variants non-sens et une surreprésentation de maladies auto-immunes (cluster 1),

-des patients présentant fréquemment des atteintes digestives (cluster 2),

-et des patients présentant des atteintes cutanées et articulaires, une aphtose bipolaire et des troubles digestifs (Cluster 3).

Ce travail nous a permis de décrire les atteintes digestives de la maladie afin d'émettre des hypothèses concernant le rôle du microbiote intestinal dans l'haploinsuffisance de A20.

Les résultats de ce travail ont été présentés en communication orale à l'occasion du congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne en Décembre 2023.

ORIGINAL ARTICLE

A20 Haploinsufficiency: A Systematic Review of 177 Cases

Inès Elhani[1,2,3,4,7], Quentin Riller[5,7], Guilaine Boursier[3,6], Véronique Hentgen[3,4], Frédéric Rieux-Laucat[5] and Sophie Georgin-Lavialle[1,2,3]

A20 haploinsufficiency is an autoinflammatory disease caused by defective inactivation of the NF-κB pathway. We conducted a systematic literature review of articles reporting patients with *TNFAIP3* sequence variants from 2016 to August 2023 following PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines. Data from 177 patients from 65 articles were retrieved (108 women). The principal features were mucosal ulcers (n = 129); fever (n = 93) followed by gastrointestinal (n = 81); skin features (n = 76); autoimmunity (n = 61), including thyroiditis (n = 25) and lupus (n = 16); and joint involvements (n = 54). Five patients had died at the time of publication. In 54 of 63 patients, CRP was significantly elevated during flares, with a median of 51 mg/l. The most commonly used treatment included corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (n = 32), TNF blockers (n = 29), colchicine (n = 28), and methotrexate (n = 14). *TNFAIP3* variants impacted the ovarian tumor domain in 92 cases and a Zinc finger domain in 68 cases. Geographic origin, reported sex, and variant type significantly impacted phenotype. A better understanding of the wide A20 haploinsufficiency phenotype could facilitate the diagnosis process. Much remains to be elucidated about pathogenesis and treatment to improve outcome in patients with A20 haploinsufficiency.

Keywords: A20 haploinsufficiency, Autoimmunity, Autoinflammatory disease, TNFAIP3

Journal of Investigative Dermatology (2023) ■, ■–■; doi:10.1016/j.jid.2023.12.007

INTRODUCTION

A20 haploinsufficiency (HA20) is an inborn error of immunity caused by heterozygous loss-of-function variants in the highly conserved gene *TNFAIP3*, which encodes the protein A20 (Yu et al, 2020). In humans, *TNFAIP3* was identified in GWASs long before the discovery of HA20 because SNPs were associated with the development of autoimmune diseases (AIDs) such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, and diabetes (Vereecke et al, 2014). A monogenic *TNFAIP3*-associated disease was described in 2016 in the description of patients with heterozygous loss-of-function variants in this gene. Since then, the analysis of *TNFAIP3* has been added to next-generation sequencing panels worldwide, allowing the diagnosis and publication of hundreds of new cases. These publications have enlarged the clinical spectrum of HA20, which has finally evolved to be considered a distinct entity at the crossroads between autoinflammation and autoimmunity (Yu et al, 2020).

A20 is a 790 amino-acids protein with 8 domains consisting of an N-terminal ovarian tumor (OTU) and a C-terminal region containing 7 zinc-finger motifs (Chen et al, 2020b). A20 possesses unique ubiquitin-editing properties allowing both ubiquitination and deubiquitylation. By tagging important actors of canonical NF-κB activation (RIP1, TRAF6, among others) for degradation to the proteasome and by removing activating keratin (K)63-linked ubiquitin from other proteins of the pathway such as NEMO (IKKγ), A20 acts as a negative regulator of inflammation in a negative regulatory loop. It also suppresses the activation of the MAPK and downregulates the activation of the NLRP3 inflammasome (Catrysse et al, 2014). Therefore, the systemic inflammatory manifestations of HA20 result from the insufficient suppression of NF-κB, MAPK, and NLRP3 activity in immune cells, especially in myeloid cells. A20 is also abundantly expressed in B cells, where it inhibits the NF-κB pathway, and raises the signaling threshold required for B-cell proliferation and survival (Das et al, 2018). As a result, A20-deficient B cells are hyper-responsive to activating stimuli and susceptible to loss of tolerance and to develop AIDs (Das et al, 2018).

To date, the phenotypic spectrum of HA20 remains unsettled, and the understanding of pathogenesis is incomplete. Our objective was to summarize the current knowledge on the genetic, pathophysiology, and clinical features of HA20 through a systematic literature review since the description of the disease.

[1]*Department of Internal Medicine, Tenon Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France;* [2]*Saint-Antoine Research Center (CRSA) INSERM UMRS 938, Sorbonne Université, Paris, France;* [3]*National French Reference Centre for Auto-inflammatory Diseases and Inflammatory Amyloidosis (CEREMAIA), Montpellier, France;* [4]*Department of General Pediatrics, Versailles Hospital, Versailles, France;* [5]*Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, Institut Imagine, Université Paris Cité, Paris, France; and* [6]*Laboratory of Rare and Autoinflammatory Genetic Diseases, Department of genetics, CHU Montpellier, Univ Montpellier, Montpellier, France*

[7]*These authors contributed equally to this work.*

Correspondence: Sophie Georgin-Lavialle, Service de médecine interne, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France. E-mail: sophie.georgin-lavialle@aphp.fr and Inès Elhani, Service de médecine interne, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France. E-mail: ines.elhani@aphp.fr

Abbreviations: AID, autoimmune disease; GI, gastrointestinal; HA20, A20 haploinsufficiency; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; IBD, inflammatory bowel disease; OTU, ovarian tumor; pLOF, predicted loss of function; SLE, systemic lupus erythematosus

Received 13 June 2023; revised 4 December 2023; accepted 11 December 2023; accepted manuscript published online XXX; corrected proof published online XXX

© 2023 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.

RESULTS

Genetics and pathogenesis

Eighty-four different variants have been described, including premature truncating codon and missense variants (Figure 1a). A large proportion of the 177 patients had variants impacting the N-terminal OTU domain (n = 92 patients, 52.3%), 47.8% of them being stop-gained (n = 44) and 28.3% being frameshift (n = 26) mutants. Other patients had variants lying in the C-terminal domain of A20, composed of 7 zinc-finger domains (n = 68 patients, 38.4%), with mostly stop-gain, frameshift, or splice variants (69.1%) (Supplementary Table S1). A deletion of the whole *TNFAIP3* gene was described in 8 patients, including 7 for whom deletion comprised surrounding genes, ranging from 236 kb to 13.3 Mb. Two patients inherited HA20 from a parent with low-frequency gonadal mosaicism. Both were asymptomatic, and the frequency of the mutant allele was 10.06 and 16.7% (Kadowaki et al, 2018). Five patients displayed additional variants in other genes: 3 displayed a class IV *MEFV*; 1 displayed an unclassified *IL-36RN* variant; and 1 patient had a complex genotype with variants in *VPS13B*, *PIK3R1*, and *NFAT5* (Horita et al, 2019; Liang et al, 2019; Niwano et al, 2022). Of note, in this cohort, only 23.2% of the variants have been tested in an ectopic expression system, 47.6% of the missense variants and 15.6% of the sequence variants giving rise to an early stop codon (Supplementary Table S2).

Epidemiology

HA20 was first described in 2016 as a new monogenic Behcet's disease and has finally evolved to be considered a distinct entity. As of August 2023, after eliminating duplicates, 177 cases with sufficient clinical data to be included in the review were identified (Figure 1b). Ethnicity was described in 26 patients (14%), including Chinese Han (n = 16), Hispanic patients (n = 3), Turk (n = 2), and African American and Ashkenazi (n = 1, each). Country of origin was indicated in 51 patients (Great Britain, Japan [n = 27], China [n = 15], Italia [n = 4], Turkey [n = 3], Pakistani/Indian [n = 2], and Great Britain and Spain [n = 1, each]). Finally, eastern European origin was suggested in 26 patients (Caucasian [n = 14], European American [n = 10], and White [n = 2]). Information was incomplete for 74 patients (40%). We classified patients into 4 categories: West Asia (Turkish and Saudi patients, n = 6), East Asia (Chinese, Chinese Han, Japanese patients, n = 58), Europe (Caucasian, European American, White patients, n = 32), and South Asia (Pakistani/Indian patients, n = 2). Statistical analyses compared groups with ≥5 patients (Supplementary Table S2). Patients from West Asia were 2−3 times more likely to suffer from genital ulcers ($P = .03$), autoimmunity, and thyroiditis ($P < .001$) than their counterparts. Moreover, skin features were more frequent in European patients. Finally, patients from West Asia presented with fever twice as frequently as both those from Europe and East Asia ($P < .01$).

Female to male ratio in published patients is 1.1:1 (108 women, 94 men). First symptoms occurred in childhood or teenage years in 132 of 141 patients (94%) with a median age of 3 (0−17) years. HA20 debuted in adulthood in 9 patients, with a median age of 20 (18−35) years (Duan et al, 2019; Harris et al, 2018; He et al, 2020; Horita et al, 2019; Niwano et al, 2022; Tian et al, 2022).

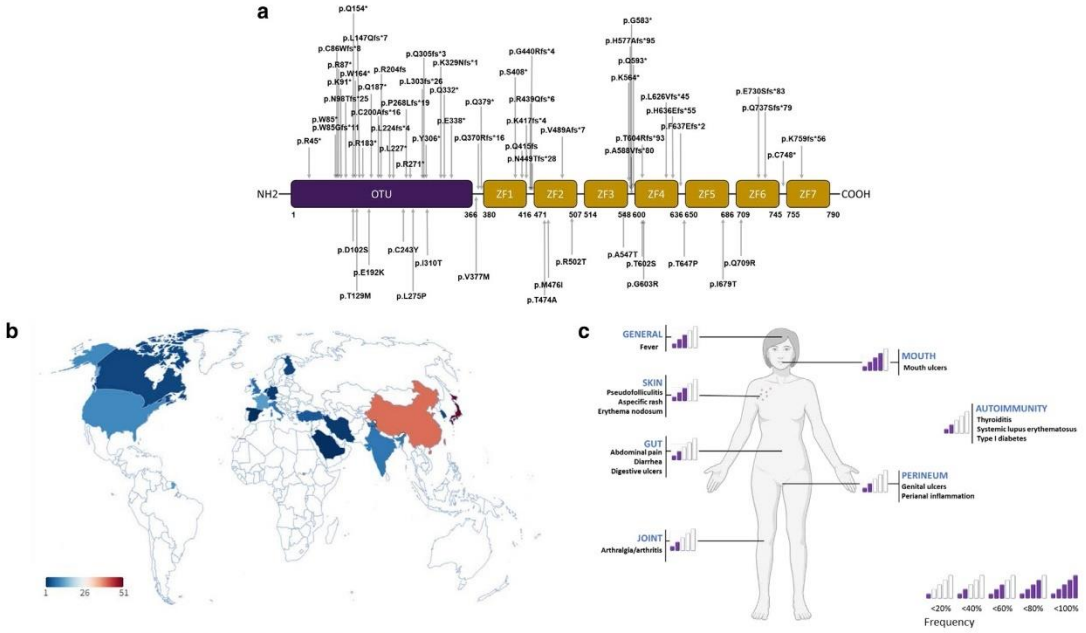


Figure 1. Characteristics of patients with HA20 described. (**a**) Schematic representation of reported variants in *TNFAIP3* gene. (**b**) Geographic distribution. (**c**) Main clinical features.

Clinical features

Clinical features are reported in Table 1 and Figure 1c. Overall, HA20 is a multisystemic disease. In 27 patients, mucosal ulcers (including 9 with genital ulcers), fever, and/or lymphadenopathies were the only symptoms. Besides, 46 patients exhibited a single-organ involvement. Finally, more than 1 organ was affected in 100 patients, in addition to general and mucosal features.

Fever. Half of patients with HA20 exhibit fever during the course of the disease (n = 93). In most cases (n = 80), it consisted of periodic episodes of fever, which lasted for a median duration of 5 days. The duration is variable and goes from 24 hours to 14 days. Fever attacks were not cyclic and may occur several times a month or once a year. In 16 patients, the disease manifested as a protracted fever that required anti-inflammatory treatment to resolve (Aslani et al, 2022; Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2018; Kim et al, 2020; Lawless et al, 2018; Li et al, 2019; Liu et al, 2023; Ohnishi et al, 2017; Shaheen et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019). These 2 types of fever episodes may coexist in the same patient (Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2018; Kim et al, 2020; Lawless et al, 2018; Shaheen et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019).

Mucosal ulcers. Mucosal ulcers are a hallmark of the disease and were present in 129 patients (73%). They can appear with or without inflammatory/febrile episodes. Mouth ulcers resemble common benign ulcers, although extensive stomatitis has been reported. In one of the first descriptions, Aeschlimann et al (2018) described scarring mouth ulcers in a cohort of 16 patients; however, it was never described afterward. Therefore, scarring ulcers do not seem to be a necessary feature of HA20.

More than a third of patients with HA20 have displayed genital ulcers during the course of the disease (n = 63), which can occur as early as infancy. They are significantly more frequent in females than in males (48 vs 15 patients, $P = .004$). Precise localization and characteristics were not described. Genital ulcerations have been described in 6 patients without mouth ulcers.

Gastrointestinal manifestations. Gastrointestinal (GI) involvements affected 81 patients (46%). They include abdominal pain (48 patients), diarrhea (41 patients), and bloody stool (21 patients). Two main phenotypes emerge from gut involvements: 29 patients exhibited isolated or multiple GI ulcers (Aeschlimann et al, 2018; Berteau et al, 2019; Chen et al, 2020a; Deshayes et al, 2021; Dong et al, 2019; Duncan et al, 2018; El Khouri et al, 2023; He et al, 2020; Jiang et al, 2022; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Li et al, 2019; Liang et al, 2019; Mitsunaga et al, 2023; Ohnishi et al, 2017; Sato et al, 2018; Shimizu et al, 2021; Suri et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Wakatsuki et al, 2023; Yan et al, 2021; Zanatta et al, 2022; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018; Zou et al, 2020), whereas 17 patients displayed definite colitis, including 14 who also presented with GI ulcers (Chen et al, 2020a; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2018; Shiraki et al, 2021b; Suri et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Yan et al, 2021; Ye et al, 2017; Zanatta et al, 2022; Zheng et al, 2018; Zou et al, 2020). This phenotype occurs in significantly younger patients (aged 6 months vs 3 years, $P = .02$). It developed before the age of 6 years in all but 1 patient and can therefore be classified as very-early-onset inflammatory bowel disease (IBD). The whole GI tract can be affected by ulcers, and these were described in the colon in 22 cases (Chen et al, 2020a; Dong et al, 2019; El Khouri et al, 2023; He et al, 2020; Jiang et al, 2022; Mitsunaga et al, 2023; Ohnishi et al, 2017; Shimizu et al, 2021; Suri et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Wakatsuki et al, 2023; Yan et al, 2021; Zanatta et al, 2022; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018), the stomach and/or duodenum in 9 cases (Dong et al, 2019; Sato et al, 2018; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Zheng

Table 1. Main Features of the 177 Patients with HA20

Features	n (%) or Median (Range)
n	177
Women	109 (62)
Age at publication, y	15 (1–71)
Age at onset, y	4 (0–35)
Diagnostic delay, y	7 (0–55)
Dominantly inherited variants	93/112 (82)
General	
Fever	93 (54)
Lymphadenopathy	25 (14)
Mucosal inflammation	129 (73)
Mouth ulcers	123 (69)
Genital ulcers	63 (36)
Gastrointestinal involvement	81 (46)
Abdominal pain	48 (28)
Diarrhea	41 (23)
Bloody stool	21 (12)
Gastrointestinal tract ulcer	43 (25)
Perianal inflammation	27 (15)
Liver involvements	17 (10)
Skin features	76 (43)
Pseudofolliculitis/acne/pustulosis	29 (16)
Rash	17 (10)
Panniculitis	10 (6)
Autoimmunity	60 (34)
Thyroïditis	24 (14)
Lupus	16 (9)
Immune cytopenia	11 (6)
Type I diabetes	6 (3)
Arthralgia/arthritis	54 (31)
Central nervous system involvement	17 (10)
Cardiovascular involvement	14 (8)
Pericardial effusion	5 (3)
Venous thromboembolism	4 (2)
Vasculitis	3 (2)
Eye involvement	13 (8)
Anterior uveitis	8 (5)
Retinal vasculitis	3 (2)
Lung involvement	10 (6)
Immune deficiency	9 (5)
Elevated CRP during flares	54/63 (86)
CRP (mg/l) in flare	51 (0–450)

Abbreviation : CRP, c-reactive protein.

et al, 2018), and the small bowel in 6 cases (Deshayes et al, 2021; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2021a; Suri et al, 2021; Tian et al, 2022). In 4 patients, ulcers were restricted to the upper GI tract (Dong et al, 2019; Kadowaki et al, 2021a; Ohnishi et al, 2017; Sato et al, 2018; Zhang et al, 2022). There can be findings of gastritis (4 patients). Endoscopic findings of patients with colitis could be compatible with ulcerative colitis in 2 patients with rectal and descending colon ulcers (Kadowaki et al, 2018; Taniguchi et al, 2021). Moreover, 6 other patients exhibited histological features that could suggest ulcerative colitis, including crypt atrophy, cryptitis, neutrophil infiltration, and crypt abscesses, although anatomical distribution of the lesions went against ulcerative colitis (Chen et al, 2020a; Shimizu et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Zanatta et al, 2022; Zheng et al, 2018; Zou et al, 2020). In 33 patients with GI ulcers with or without colitis, endoscopic investigations could suggest Crohn's disease, although detailed data would be needed to properly classify patients. Histological analyses revealed inflammatory infiltration of neutrophils, lymphocytes, and eosinophils as well as tissue granulation. Granuloma was described in 2 patients (Mitsunaga et al, 2023; Wu et al, 2021).

Perianal inflammation affected 27 patients (Aeschlimann et al, 2018; Franco-Jarava et al, 2018; Girardelli et al, 2021; Hori et al, 2019; Jiang et al, 2022; Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2018; Li et al, 2019; Liu et al, 2023; Rossi et al, 2022; Shimizu et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018; Zhou et al, 2016; Zou et al, 2020). It included perianal ulcers, fistulae, and abscesses. It was significantly more frequent in men (17 vs 10 patients, $P = .01$). Fifteen of them displayed associated GI ulcers and could be classified as IBD.

Only 2 patients exhibited isolated GI involvements: 48 displayed joint (n = 13), skin (n = 18), or both (n = 17) involvements, whereas 17 others had a history of recurrent fever, and 10 others had organ involvements (CNS, autoimmunity, or immune deficiency). The systemic presentation of patients with GI involvement as well as the young age of onset may distinguish HA20 from other forms of IBD.

Liver involvement of HA20 has been reviewed by Deshayes et al (2021). Since then and overall, it has been described in 17 patients (10%) (Cao et al, 2023; Deshayes et al, 2021; Duncan et al, 2018; Gans et al, 2020; He et al, 2020; Hori et al, 2019; Kim et al, 2020; Li et al, 2019; Rajamäki et al, 2018; Schwartz et al, 2020; Takagi et al, 2018, 2017; Taniguchi et al, 2021; Yan et al, 2021; Zheng et al, 2018). The severity ranged from elevated liver enzymes to cryptogenic cirrhosis with liver failure. However, the prevalence of subclinical liver disease may be underreported. When specified, the histologic analyses revealed interface hepatitis with lymphocyte infiltration and fibrosis.

Skin manifestations. Skin features were reported in 76 patients (43%). The most frequent manifestations were pseudo/folliculitis, pustules, acne-like lesions, and dermal abscesses of the face and the trunk (29 patients, 16%). Seventeen patients (10%) displayed nonspecific salmon or erythematous rash, with skin biopsies showing a neutrophilic or lymphocytic infiltrate without sign of vasculitis. Psoriasis, vitiligo, and urticaria were described in 4 patients each (Alhebshi et al, 2020; Berteau et al, 2019; Harris et al, 2018; Kadowaki et al, 2018; Niwano et al, 2022; Rajamäki et al, 2018; Zanatta et al, 2022) (cold urticaria in 3 of the same family and unspecified in 1). Two patients displayed local skin reactions after vaccination (crustose after Bacillus Calmette–Guérin vaccine and severe swelling after pneumococcal unconjugated vaccine) (Berteau et al, 2019; Hori et al, 2019). Malar rash and alopecia were described in 4 different patients, 3 of whom were diagnosed with SLE (Aeschlimann et al, 2018; Shaheen et al, 2021; Zhang et al, 2022, 2021). Panniculitis was described in 10 patients, including erythema nodosum in 8 patients (Chen et al, 2020a; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2018; Sato et al, 2018; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019), necrotic panniculitis of the limbs in 1 patient (Zanatta et al, 2022), and generalized erythematous wheal-like patches in 1 patient (Kim et al, 2020). Seven patients exhibited a vasculitic rash, including 3 patients with IgA vasculitis (Kadowaki et al, 2018; Viel et al, 2018; Zhang et al, 2022), 2 with unspecified vasculitic rashes (Papadopoulou et al, 2019; Zhang et al, 2022), 1 with purpura (Aeschlimann et al, 2018), and 1 with vasculitis of the extremities (Chen et al, 2020a). Three patients displayed eczema (Aeschlimann et al, 2018; Wu et al, 2021) and 1 displayed skin xerosis (He et al, 2020). Finally, other manifestations included geographic tongue (n = 2) (Aeschlimann et al, 2018), pityriasis rosea (Aeschlimann et al, 2018), pernio-like lesion (Tsuchida et al, 2019), Raynaud phenomenon (Tsuchida et al, 2019), toenail ulcer (Liu et al, 2023), aquagenic acrokeratoderma (Ohnishi et al, 2017), neutrophilic dermatosis (Franco-Jarava et al, 2018), and Steven–Johnson syndrome (Aeschlimann et al, 2018) (n = 1, each). Skin features were never isolated and were associated with joint and/or GI symptoms in most cases (60 patients) or with autoimmunity or CNS or cardiovascular involvements in 14 other cases. Overall, 44 patients had a history of fever, and 55 had associated mouth ulcers, including 29 with genital ulcers.

Autoimmunity. Autoantibodies and/or AIDs have been described in 60 patients (34%). The most frequently described were antithyroid autoantibodies (28 patients, 16%), and they manifested themselves as authentic Hashimoto thyroiditis in 24 patients (14%). Thyroiditis was never isolated: 19 patients displayed associated mouth ulcers. The 9 remaining patients exhibited associated GI involvements, genital ulcers, and/or recurrent fever.

SLE had been diagnosed before HA20 diagnosis or as an associated disease in 16 patients, 13 of whom completed the Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics criteria for SLE (Aeschlimann et al, 2018; Duan et al, 2019; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Kim et al, 2020; Li et al, 2019; Miyamoto et al, 2022; Papadopoulou et al, 2019; Petri et al, 2012; Shaheen et al, 2021; Su et al, 2021; Zhang et al, 2022). Fourteen of them were women. Lupus nephritis was diagnosed in 7 patients (Li et al, 2019; Papadopoulou et al, 2019; Su et al, 2021; Zhang et al, 2022, 2021). The median age at first symptoms in patients diagnosed with SLE was 7.5 years. Symptoms suggestive of SLE included arthritis/arthralgia (n = 9), hemolytic anemia (n =

4), lymphadenopathies (n = 3), neuropsychiatric involvements (n = 3), alopecia (n = 2), malar rash (n = 2), and Raynaud's phenomenon (n = 1). However, a history of recurrent fever was described in 9 patients, a history of lung involvements was described in 3 patients, and a history of retinal vasculitis was described in 2 patients. In 1 patient, diagnosis of SLE was questioned because of vertebral arthritis, sacroiliitis, and pediatric onset, leading to genetic analysis and HA20 diagnosis (Zhang et al, 2021).

Sixteen additional patients exhibited antinuclear antibodies, including 5 with anti–double-stranded DNA antibodies and 1 with antiextractable nuclear antigen antibodies (antinuclear ribonucleoprotein, anti-SSA/SSB, anti-scl70).

Immune cytopenia was described in 11 patients (6%), including autoimmune hemolytic anemia (9 patients) (Endo et al, 2022; Rossi et al, 2022; Su et al, 2021; Suri et al, 2021; Viel et al, 2018; Zhang et al, 2022, 2021) and immune thrombocytopenia (4 patients) (Alhebshi et al, 2020; Endo et al, 2022; Viel et al, 2018; Wu et al, 2021). Immune cytopenia was associated with mouth/genital ulcers in 5 cases, fever in 3 cases, joint features and/or lymphadenopathies in 4 cases, and developmental delay in 3 cases.

Five patients were diagnosed with 2 definite AIDs (thyroiditis and type I diabetes, n = 2; thyroiditis and hemolytic anemia, n = 1; SLE and thyroiditis, n = 1; SLE and type I diabetes, n = 1), and 7 families exhibited ≥2 AIDs in a single family.

Joint and musculoskeletal manifestations. Joint involvements were reported in 54 patients with HA20 (31%). Inflamed site was unspecified in 35 cases, affected large joints (wrists, ankles, knees, hip) were described in 12 cases (Berteau et al, 2019; El Khouri et al, 2023; Kim et al, 2020; Rossi et al, 2022; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Zhang et al, 2022; Zou et al, 2020), and small joints (hands, feet) were described in 4 (Aeschlimann et al, 2018; Berteau et al, 2019; Rossi et al, 2022; Tian et al, 2022). Sacroiliitis was described in 2 patients (Su et al, 2021; Zhang et al, 2021). Finally, 1 patient exhibited unspecified osteomyelitis while diagnosed with chronic granulomatous disease (Suri et al, 2021). Among the patients with arthritis/arthralgia, none presented with rheumatoid arthritis–specific antibodies (rheumatoid factor, anti–cyclic citrullinated peptide antibodies), except for a child with isolated sacroiliitis and rheumatoid factor (Su et al, 2021). Thirteen displayed antinuclear antibodies, and 8 of them additionally displayed anti–double-stranded DNA antibodies and antinuclear nuclear antigens. Synovial fluid examination was not described. There has been no description of destructive arthritis or joint deformity. Of the 54 patients with involvement of the joints, 30 had GI involvement, and 28 had skin features, which might distinguish HA20 from more common rheumatic diseases. Moreover, 40 patients displayed mouth ulcers, including 25 with genital ulcers.

Lymphadenopathy. Lymphadenopathies were described in 25 patients (14%) (Deshayes et al, 2021; Dong et al, 2019; Endo et al, 2022, 2020; Franco-Jarava et al, 2018; Hori et al, 2019; Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Liu et al, 2023; Rossi et al, 2022; Shaheen et al, 2021; Sun et al, 2022; Takagi et al, 2017; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Zhang et al, 2022; Zou et al, 2020). They were located in the cervical area for 10 of them, the axillary and popliteal area in 1 each, and generalized in 11. Two patients had a probable diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome according to the 2010 diagnostic criteria (Endo et al, 2022; Oliveira et al, 2010; Takagi et al, 2017). They both exhibited chronic lymphadenopathies, elevated TCRαβ+ double-negative T cells, and elevated serum Fas ligand levels. Genetic testing for sequence variants in autoimmune lymphoproliferative syndrome–associated genes was inconclusive in both patients, including *FAS*, *FASL*, *KRAS*, *NRAS*, *PRKCD*, *PI3KCD*, and *CTLA4*. (Endo et al, 2020; Takagi et al, 2017). Histological analyses of lymph nodes showed follicular hyperplasia with increased numbers of neutrophils and lymphocytes or necrotizing adenitis.

CNS manifestations. Seventeen patients (10%) displayed a wide spectrum of CNS manifestations, whose causative relationship to HA20 remains to be established.

Cerebral vessels were involved in 4 patients; 2 had small vessel vasculitis, and 2 had unspecified stroke during childhood, one of whom additionally displayed central venous thrombosis (Aeschlimann et al, 2018; He et al, 2020).

Four patients had inflammatory CNS involvements, including 2 with aseptic meningitis and another with unspecified neuroinflammation (Hori et al, 2019; Schwartz et al, 2020; Shaheen et al, 2021). Finally, 1 patient exhibited intracerebral calcifications and aseptic necrotizing granulomatous mass lesions in the paracentral lobule and the thalamus with elevated expression of IFN-stimulated genes suggesting interferonopathy (Mulhern et al, 2019).

Five additional patients exhibited developmental disorder without cause (developmental delay, n = 5; Attention-deficit/hyperactivity disorder, n = 1; autism, n = 1) (Aeschlimann et al, 2018; Franco-Jarava et al, 2018; Su et al, 2021; Sun et al, 2022; Viel et al, 2018; Wu et al, 2021). Interestingly, 3 of the 5 patients with neurodevelopmental delay displayed large deletions of chromosome 6 (>5.5 Mb); therefore, these manifestations may not be caused by HA20.

The other manifestations included Epilepsy (n = 2), craniopharyngioma (n = 1), type II Arnold-Chiari malformation (n = 1), and cerebral palsy due to neonatal cardiac arrest (n = 1) (Duan et al, 2019; Hori et al, 2019; Kadowaki et al, 2021a; Suri et al, 2021).

Ophtalmologic manifestations. Ocular involvements of HA20 have recently been reviewed by Maccora et al (2021). Since then and overall, they affected 13 patients. Uveitis was described in 8 of them (anterior, n = 5; unspecified, n = 3) (Aeschlimann et al, 2018; El Khouri et al, 2023; Mulhern et al, 2019; Papadopoulou et al, 2019; Schwartz et al, 2020; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019), and 3 displayed retinal vasculitis (Aeschlimann et al, 2018; He et al, 2020). Finally, 2 had episcleritis and 1 had conjunctivitis, palpebral ulceration, and chorioretinitis (Berteau et al, 2019; El Khouri et al, 2023; Jiang et al, 2022; Mulhern et al, 2019; Ohnishi et al, 2017).

Lung manifestations. Ten patients (6%), including 8 women, had lung involvement. It consisted of interstitial lung disease in 5 patients, one patient who developed it during the course of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), and pulmonary nodules on computed tomography imaging in 4 patients (Duncan et al, 2018; He et al, 2020; Hori et al, 2019; Li et al, 2019; Rajamäki et al, 2018; Yan et al, 2021; Zhang et al, 2022). One additional patient had bilateral pneumonia of unknown origin (Duan et al, 2019). Improvement after treatment was described in 6 patients. None progressed to lung fibrosis. Lung involvements were not isolated and were associated with mouth ulcers and/or autoimmunity in 6 patients each.

Cardiovascular manifestations. Cardiovascular manifestations were described in 14 patients (8%). Pericarditis was found in 5 patients, in 3 of whom it was possibly not related to the immunological disease (infectious pericarditis, anasarca) (Aeschlimann et al, 2018; Deshayes et al, 2021; Li et al, 2019; Zhang et al, 2022). Vascular involvements were rare (5 patients, 3%). Veinous involvements were present in 4 patients and included pulmonary embolism caused by catheter-related veinous thrombosis, bilateral lower limbs thrombophlebitis, superficial thrombophlebitis, and cerebral venous thrombosis (Aeschlimann et al, 2018; Berteau et al, 2019; He et al, 2020). All 4 patients displayed mouth ulcers, and 3 of them (75%) qualified as Behçet's disorders according to the International Criteria for Behçet Disease (Davatchi et al, 2014). However, 3 had a recurrent fever, 2 had GI involvements, and 2 had lung involvements. Arterial involvements mostly affected the CNS (strokes, n = 2), although 1 patient was described with systemic polyarteritis nodosa–like vasculitis causing myocardial and kidney infarction as well as diffuse aneurysms (Niwano et al, 2022). Finally, 2 patients were described as having unspecified CNS vasculitis and 1 child suffered from aortic valve insufficiency (Kadowaki et al, 2018).

Immunodeficiency. Nine patients (5%) were described to have definite immunodeficiency (Aeschlimann et al, 2018; Dong et al, 2019; Gans et al, 2020; Rajamäki et al, 2018; Shaheen et al, 2021; Suri et al, 2021). Recurrent bacterial and/or chronic viral infections were described in 5 of them, including recurrent atypical pneumonia, ear and urinary tract infections, chronic Epstein–Barr virus, and papillomatosis. Immunological investigations revealed humoral deficiency in 5 patients (3%) and NK cell deficiency in 3 patients (2%), including 2 patients with combined immune deficiency. Patients with humoral deficiency exhibited IgG subclass deficiency (n = 5), low response to pneumococcal vaccine (n = 4), and B-cell lymphopenia (n = 3). Isolated IgG deficiency with normal CD19 appeared in 1 patient after several years of treatment with hydroxychloroquine, mycophenolate mofetil, prednisone, and rituximab for SLE and could be secondary to treatments (Shaheen et al, 2021). Finally, unspecified chronic granulomatous disease was described in 1 patient (Suri et al, 2021). Three patients required supplementation with intravenous Ig to reduce the number of infectious episodes.

Others. Ten patients from 7 families had short stature (height < third percentiles) (He et al, 2020; Kim et al, 2020; Rossi et al, 2022; Zhang et al, 2022, 2021). Six (60%) had never received corticosteroids before height evaluation. Two patients had evaluations of growth hormone that were normal. Therefore, short stature could be a consequence of prolonged systemic inflammation.

Two patients have been diagnosed with cancer: 1 patient with Hodgkin's lymphoma at the age of 21 years, who later was diagnosed with craniopharyngioma at the age of 33 years, and the other one with diffuse large B-cell lymphoma at the age of 35 years (Endo et al, 2022; Hori et al, 2019). Therefore, this review does not support the hypothesis of a higher risk of cancer in patients with HA20 However, this result should be confirmed in cohort studies.

HLH was described in 4 patients. It was the first manifestation of HA20 in 2 of them, which occurred very early in life, at the age of 3 and 4 months (Aslani et al, 2022). In 2 other patients, HLH occurred 2 years after the onset of a systemic juvenile idiopathic arthritis–like disease (Li et al, 2019; Sun et al, 2022). Whole-exome sequencing was performed in all patients, which revealed *TNFAIP3* sequence variants. The presence of variants in HLH-related genes was not detailed.

Three patients from 3 different families have been reported to have menstrual cycle anomalies, including premature ovarian failure, late menarche, and dysmenorrhea (Aeschlimann et al, 2018).

Complications and mortality

Inflammatory (ie, AA) amyloidosis has not yet been described as a complication of HA20. Although it may be explained by the young age of the patients described, the absence of AA amyloidosis in other NF-κB–mediated autoinflammatory diseases could suggest a low risk (Nigrovic et al, 2020).

Death was reported in 5 patients (3%). In 4 of them, death was thought to be a complication of HA20 and occurred before adulthood. One patient died of upper airway hemorrhage due to tonsillar ulcerations and carotid artery erosion at age 8 years (Aeschlimann et al, 2018). One patient died of cerebral hemorrhage complicating HLH at age 4 years (Aslani et al, 2022), 1 patient died of cytokine storm after hematopoietic stem cell transplantation at age 15 years (Wu et al, 2021), and 1 died from systemic inflammatory response syndrome (Sun et al, 2022). Finally, 1 adult patient with mild symptoms died of an unknown cause (Dong et al, 2019).

Genotype/phenotype correlation

By comparing patients on the basis of the type of variations (missense variants, n = 41 [23.2%] vs ones leading to no or truncated form of A20, ie, predicted loss of function [pLOF], n = 135 [76.3%]), we showed that pLOF variants were more associated to bipolar aphthosis, GI involvement, and autoimmunity (Supplementary Table S3) ($P < .005$). By splitting patients into 2 groups on the basis of the localization of the protein affected by the sequence variants (OTU domain [n = 92] vs the other domains [n = 85]), patients affected in the OTU domain had more genital aphthosis (47.4% in the OTU group vs 20%, $P < .002$) and skin involvement (53.3% in the OTU group vs 31.8%, $P < .01$), whereas the other had an enrichment in CNS involvement (16.5% vs 4.3%, $P < .02$) (Supplementary Table S4).

We then performed a multiple correspondence analysis on clinical variables and the type of variant (missense vs the

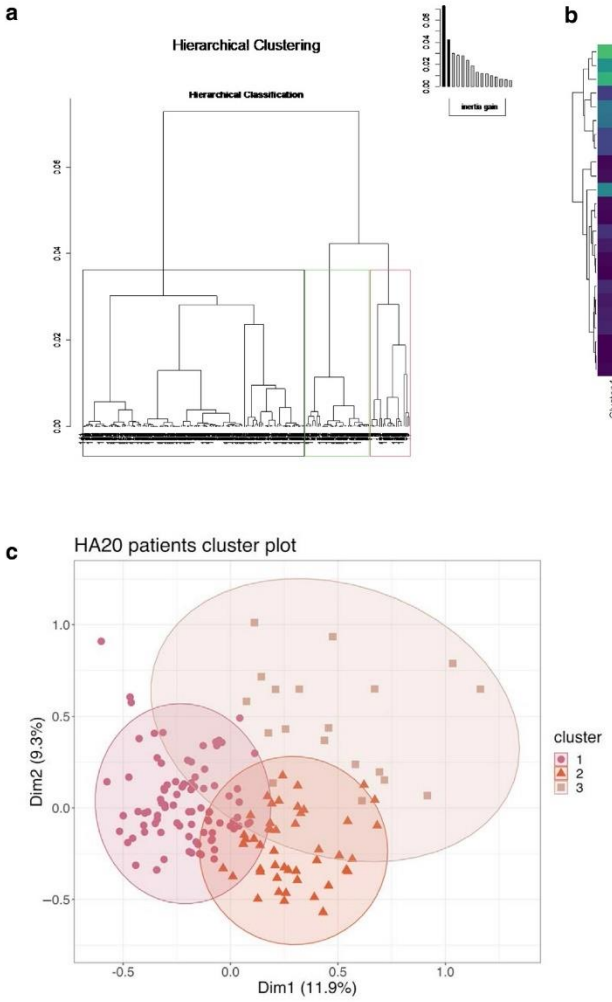


Figure 2. Hierarchical clustering of patients with HA20 based on their characteristics (MCA). (**a**) Hierarchical tree (dendrogram) indicating how patients (x-axis, n = 159) are clustered in 3 groups (vertical lines). Left to right: clusters 1, 2, and 3. (**b**) Heatmap showing the frequency of each characteristic among each cluster. (**c**) Factorial map where each dot represents 1 patient (n = 159), colored on the basis of the cluster they belong to (MCA analysis). MCA, multiple correspondence analysis; pLOF, predicted loss of function.

other). By performing an unsupervised clustering (see Materials and Methods), we ended up with 3 clusters (Figure 2). Supplementary Table S4 shows the repartition of the patients in each cluster with their clinical characteristics. Cluster 1 (n = 108) was driven by the over-representation of autoimmunity (n = 51, 48.1%, $P < .001$) and missense variants ($P < .02$). Cluster 2 (n = 50) is driven by the presence of GI involvement (96%, $P < .001$), whereas patients in this group had less bipolar aphthosis than those in cluster 3. Finally, patients in cluster 3 (n = 19) had a high proportion of skin (89.5%) and joint (84.2%) involvement, with almost all of them having bipolar aphthosis and a high proportion of GI involvement (Supplementary Table S5).

Biological findings

Inflammatory markers usually rise during flares, including leukocyte count and CRP. CRP was elevated in 54 patients (87% of patients for whom it was reported), with a median of 62 mg/l. CRP remained elevated outside of flares in 7 of the 19 patients for whom it was specified. Hypergammaglobulinemia was observed in 13 patients with a median of 26.3 (14.3−31.1) g/l.

Expectedly, serum proinflammatory cytokines, including IL-1β, IL-17, IL-8, IL-6, and TNFα, were elevated but were not systematically investigated.

Type I IFN signature was investigated in 21 patients from 6 different centers and was elevated in 17 of them. The score was reported in 9 patients. The median value was 880% (382−1111) of the respective laboratory normal values. The test was ordered before HA20 diagnosis in 3 patients; one with cerebral calcifications suggesting interferonopathy, one with colitis and panniculitis, and one with recurrent stomatitis. In 5 patients, it was ordered because of refractory HA20 with various manifestations, including colitis, neuroinflammation, membranous nephropathy, and inflammatory liver disease. Finally, 8 patients were included in a study

aiming to describe IFN-stimulated genes in patients with HA20. The disease of the 3 patients with normal IFN signature was quiescent. Therefore, more data are needed to determine the predictive value of this test.

Diagnosis

The diagnosis of HA20 relies on the detection of a germline variant in the gene *TNFAIP3* that is rare in public databases and predicted to be deleterious in silico. More importantly, previously unknown variants should be tested in vitro for their inhibition capacity toward NF-κB.

Previous diagnosis was described in 78 patients. Seventeen of them had received more than 1 diagnosis before the HA20 diagnosis. Previous diagnoses included Behçet's disease (33 patients), PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis) (9 patients), juvenile Idiopathic arthritis (8 patients), recurrent stomatitis (6 patients), Crohn's disease (6 patients), rheumatoid arthritis (5 patients), and connective tissue disease (3 patients). One patient was diagnosed with adult-onset Still disease, Kikuchi-Fujimoto disease, rheumatic fever, Kawasaki disease, familial Mediterranean fever, IgA nephropathy, and unclassified granulomatous neuroinflammatory disorder. Finally, 16 patients were diagnosed with SLE, although it can be considered as an associated diagnosis rather than a differential of HA20 (see the section on autoimmunity).

Treatments

To date, treatments in HA20 are not codified and are symptom oriented. The description of the treatments and their effectiveness was heterogeneous, and it was not possible to draw any clear conclusions. Treatments classified by predominant symptom and by therapeutic class are presented below.

GI manifestations were treated according to the principles of IBD treatment, with heterogenous responses (5-aminosalicylic acid, n = 9 [Berteau et al, 2019; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2018; Li et al, 2019; Taniguchi et al, 2021; Tsuchida et al, 2019; Zheng et al, 2018]; thalidomide, n = 13 (Chen et al, 2020a; He et al, 2020; Mitsunaga et al, 2023; Tian et al, 2022; Uchida et al, 2020; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018]; TNF blockers, n = 17 [Duncan et al, 2018; Girardelli et al, 2021; He et al, 2020; Hori et al, 2019; Kadowaki et al, 2018; Li et al, 2019; Mitsunaga et al, 2023; Ohnishi et al, 2017; Shimizu et al, 2021; Uchida et al, 2020; Wu et al, 2021; Zanatta et al, 2022; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018; Zou et al, 2020]).

Joint manifestations were mainly treated by conventional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate (n = 12, effective in 3), azathioprine (n = 4), sulfasalazine (n = 3), ciclosporin (n = 1), and TNF-α inhibitors (n = 5) (Berteau et al, 2019; Deshayes et al, 2021; El Khouri et al, 2023; He et al, 2020; Lawless et al, 2018; Li et al, 2019; Ohnishi et al, 2017; Rossi et al, 2022; Shimizu et al, 2021; Su et al, 2021; Suri et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018). Moreover, 3 patients received tofacitinib, and 2 received tocilizumab with partial to good results (Mulhern et al, 2019; Ohnishi et al, 2017; Kadowaki et al, 2018; Schwartz et al, 2020).

Corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs were used in 32 patients and were useful in on-demand treatment of inflammatory attacks as well as alleviating autoimmune flares (Berteau et al, 2019; Duan et al, 2019; Duncan et al, 2018; El Khouri et al, 2023; Franco-Jarava et al, 2018; Girardelli et al, 2021; He et al, 2020; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Lawless et al, 2018; Li et al, 2019; Mitsunaga et al, 2023; Mulhern et al, 2019; Ohnishi et al, 2017; Rossi et al, 2022; Su et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Yan et al, 2021; Zanatta et al, 2022; Zhang et al, 2022; Zheng et al, 2018).

Colchicine was used in 28 patients to relieve mucosal ulcers and inflammatory attacks, with good response described in 10 patients, partial and/or transient response in 4 patients, and ineffective in 5 patients (Berteau et al, 2019; Debeljak et al, 2023; El Khouri et al, 2023; Hori et al, 2019; Horita et al, 2019; Jiang et al, 2022; Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Lawless et al, 2018; Mitsunaga et al, 2023; Niwano et al, 2022; Shimizu et al, 2021; Suri et al, 2021; Taniguchi et al, 2021; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Wakatsuki et al, 2023). Thalidomide was used in 5 patients for mouth ulcers with a partial or good response in 4 of them.

TNF inhibitors were prescribed to 29 patients, mainly for IBD (n = 17), arthritis (n = 5), liver involvement (n = 3), lung involvement (n = 2), and bipolar ulcer, SLE, and vasculitis (n = 1 each). Efficacy was good in 11 patients, partial and/or transient in 3 patients, and ineffective in 2 patients. Tocilizumab has been used in 4 patients for joint inflammation (n = 2) and systemic inflammation and IBD (n = 1 each) with partial to good response in 3 of them (Kadowaki et al, 2018; Lawless et al, 2018; Ohnishi et al, 2017; Uchida et al, 2020). Other treatments included mycophenolate mofetil (n = 5) and methotrexate (n = 14).

Jak inhibitors have been used with good efficacy in 6 patients to treat CNS involvements, uveitis, and polyarthritis, all of whom had high levels of IFN-stimulated genes before treatment (Aeschlimann et al, 2018; Mulhern et al, 2019; Schwartz et al, 2020).

Finally, 4 patients underwent hematopoietic stem cell transplantation. Three had allogeneic hematopoietic stem cell transplantation because of organ damage uncontrolled with immunosuppressive agents. Complete chimerism was achieved in 2 patients, with an overall good outcome, despite the development of anti−glutamic acid decarboxylase neuropathy in 1 (Shiraki et al, 2021b; Wu et al, 2021). On the contrary, 1 patient died of cytokine-mediated multiorgan injury a few hours after stem cell infusion (Wu et al, 2021). One patient had autologous hematopoietic stem cell transplantation for SLE-like CNS vasculitis, which allowed transient amelioration (Aeschlimann et al, 2018).

DISCUSSION

In this systematic literature review, we describe the clinical presentation of the 177 patients with HA20 from 94 families published. Although the reported number of patients worldwide is small, HA20 is probably more frequent than reported. First, several family members described in the literature were excluded because they had not undergone genetic testing, whereas they had exhibited symptoms that could suggest

HA20. Moreover, *TNFAIP3* sequencing may not be available worldwide. The diagnosis of systemic juvenile idiopathic arthritis or Behçet's disease in patients with HA20 may not have been reconsidered, especially if the disease is controlled with standard therapy. Finally, we can suspect that many diagnosed patients with HA20 are not published because the variant is already known and/or the clinical picture is similar to what is already described. Although patients mainly originated from Asia and Europe, there is no evidence to suggest that HA20 may have a geographical predominance, which is to be confirmed with the democratization of sequencing techniques

The clinical spectrum of patients with HA20 is large and will probably broaden in the next few years with the generalization of *TNFAIP3* study. The core symptoms of HA20 include mouth, genital, and GI ulcerations, associated with unspecific joint manifestations and acne-like skin disease. However, most organs can be affected with lower frequency (CNS, lymph nodes, cardiovascular system). Similarly, the severity of the disease ranges from asymptomatic to death-threatening organ involvements.

This review summarizes the clinical picture of patients with HA20, which will allow to give better criteria to order genetic testing. Up to now, of the 75 variants referenced in the infevers database (https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=26), only 19 are validated to be pathogenic, and the pathogenic classification remains to be validated for 56 variants. In this review, it is noteworthy that 5 patients had concomitant variants in other genes, and 7 had a genetic deletion comprising other genes than *TNFAIP3*. Therefore, the presence of clinical symptoms unusual to HA20 in patients with *TNFAIP3* variant could suggest either another variant in another gene or complex genetic alterations such as a large deletion of chromosome 6. Indeed, to date, there are no validated criteria for the diagnosis of HA20. It is confirmed upon the discovery of a heterozygous loss-of-function variant in the gene *TNFAIP3*. When the variant has not been previously classified as pathogenic (new private variant, variant rarely reported in a healthy population), functional analysis should be performed to confirm its pathogenicity, especially when the variant is a missense variant. One way to evaluate the mutated allele's ability to inhibit NF-κB activity is by ectopically expressing the mutant in a cell line capable of monitoring NF-κB activity under various stimuli. If the mutated allele does not hinder NF-κB activity, similar to transfecting an empty vector plasmid, it can be classified as a loss-of-function allele. It is worth noting that assessing the capacity of patient cells to activate NF-κB through various techniques is important but may not definitively establish the variant's role in *TNFAIP3* in the observed phenotype. A combination of both ectopic expression and primary cell analysis is always preferable.

The familial segregation should fit with a dominantly inherited and highly penetrant disease. Of note, 4 subjects included in this review were asymptomatic, and *TNFAIP3* variant was discovered upon the diagnosis of 1 of their relatives, including 2 who displayed gonadal mosaicism. This result questions the diagnosis of patients with missense variants in *TNFAIP3* that are not classified as loss of function. Whether these variants act as a predisposing factor to an immune disease is an open question, but they may not drive the disease on their own. Further functional research could improve the robustness of these diagnoses.

The diagnosis of HA20 should be suspected upon the existence of mouth ulcers/stomatitis of dominant inheritance that started early in life, especially when associated with typical skin features, findings of IBD, or the occurrences of several AIDs in the family.

Although symptoms usually begin in childhood, HA20 can also be suspected in late-onset AID. In this series, the first symptoms occurred during adulthood in 7% of patients. Moreover, patients with mild symptoms such as mouth ulcers and acne may not report any symptoms because they have become so accustomed to it. In the end, unless there is a familial history of HA20, the clinical features of HA20 may not be specific enough to order a specific Sanger genetic testing of *TNFAIP3* but rather a next-generation sequencing panel of AID comprising *TNFAIP3* or a whole-exome sequencing followed by a list-of-genes-supervised analysis. It is noteworthy that familial history may be lacking because of de novo genetic alterations. However, genetic testing of both asymptomatic parents should be done because gonadal mosaicism is possible and could impact genetic counseling.

We looked for a genotype–phenotype correlation. Although most patients will present with oral aphthosis or fever that does not depend on the type of sequence variant (pLOF or missense for instance), pLOF variants were more associated with bipolar aphthosis, GI involvement, and autoimmunity. This could suggest that the level of loss of inhibition of NF-κB by missense variants is less severe than pLOF ones. An unsupervised classification of patients in clusters was also performed to see whether a pattern of characteristics may drive any groups. Interestingly, it ended with 3 clusters: 1 of them being over-represented with autoimmunity and less bipolar aphtosis and the 2 others being different by the presence of skin and joint manifestations (mainly in cluster 3) and the presence of a GI involvement (more represented in cluster 2). Although the percentage of variance in the dataset explained by this multiple correspondence analysis is weak, this analysis emphasizes the variability of clinical presentation in HA20. Beyond the scope of this work, it would be interesting to see whether patients of these 3 clusters may respond differently to treatments. Importantly, it should be noted that the majority of the reported variants have not been tested in an ectopic expression system to precisely characterize whether they are hypomorphic or not. Although variants leading to early stop codons are highly predicted to be deleterious, missense variants in *TNFAIP3* that have not been tested in vitro should be approached with caution before definitively classifying them as causing HA20. Our results differ from those of Chen et al (Chen et al., 2020), who found a higher frequency of musculoskeletal disorders in patients with variants disrupting both OTU and zinc finger domains and no difference for genital ulcers, skin involvements, and CNS involvements. This discrepancy can be explained by the higher number of patients included in our series (88 vs 177 patients) and the inclusion of all patients with *TNFAIP3* variants, counting those with concomitant gene variants. As in other monogenic autoimmunity and autoinflammation, the wide variability of

clinical expression in HA20 is challenging, including within the same variant or even in the same family. This strongly suggests that additional factors are at play in the onset of the clinical phenotype that are not elucidated yet, such as microbial triggers, microbiota modifications, second somatic events, and epigenetic modifications.

In 2021, Kadowaki et al (2021b) compared the clinical presentation of patients from inside East Asia with that of patients from outside East Asia. They found that patients from East Asia displayed more recurrent fever and fewer AIDs than patients from outside of East Asia, which is confirmed by our work (Kadowaki et al, 2021b). Several additional clinical items differed between geographical regions, including thyroiditis, skin features, and genital ulcers, although type of variants did not differ between groups. These analyses are limited by the incompleteness and/or ambiguity of ethnic descriptions in the source articles, which resulted in the exclusion of 81 patients.

Men and women may exhibit different clinical symptoms of HA20. Unlike in Behçet's disease, women are significantly more at risk of developing genital ulcers (Cansu et al, 2016). On the other hand, men are more likely to suffer from both perineal inflammation and GI tract ulcers. It is important to note that there are twice as many women described with HA20 as men. Several factors may explain this finding. First, men may have milder diseases for which they do not seek medical advice. Indeed, women exhibit twice as many genital ulcers, and their painfulness could urge them to consult. Moreover, the occurrence of genital ulcers may lead to further investigations because differential diagnoses are limited (Mauskar et al, 2020). On the contrary, males harbor more perianal inflammation, which is a frequent condition in the general population, therefore raising less suspicion of underlying systemic disease (Sahnan et al, 2017).

This work has several limitations intrinsic to its retrospective nature. First, the richness of clinical data was highly heterogeneous between studies. Little is known about variant penetrance in HA20. Moreover, as previously mentioned, variants' pathogenicity was not established in 76.8% of cases. Therefore, we have chosen to include all patients with a variant in *TNFAIP3* gene regardless of their symptoms, including asymptomatic patients. Future work should investigate the significance of untested variants to increase the phenotypic accuracy of HA20. Finally, multiple patients/families were reported in several different papers. However, efforts were made to include all available data for each patient and to ensure that no patient was included twice.

Elements of pathogenesis need to be clarified because HA20 presentation may drastically differ between patients. Although we have provided insight into a genotype/phenotype correlation in HA20, an understanding of the specific involved immune pathways is needed to guide therapeutic decisions. Although strong systemic inflammation could suggest the use of cytokine blockers (Lawless et al, 2018; Ohnishi et al, 2017), the presence of high IFN-stimulated genes could suggest the use of Jak inhibitors (Miyamoto et al, 2022; Mulhern et al, 2019; Schwartz et al, 2020). Patients with HA20 had received several lines of treatments that were not necessarily described in the papers, and therefore the range and efficacy of these treatments require further descriptions because clinical trials are unlikely to take place in the short future.

MATERIALS AND METHODS

A systematic review of clinical studies published in the medical literature was conducted to retrieve case reports and case series reporting patients with *TNFAIP3* variant. This study was not reviewed by an ethics committee because all data used in this study were taken from previously published articles.

Search strategy and selection process

MEDLINE was searched through PubMed and EMBASE using the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyse) guidelines (Page et al., 2021) from the first description of the disease in 2016 until August 2023, with no language restriction or publication date limit. The search strategy included the following search terms: A20 haploinsufficiency and TNFAIP3. All articles describing patients with a sequence variation or alteration of *TNFAIP3* and their clinical symptoms were included. Untested obligate carriers were not included. Only full-text articles in English were included. Information was extracted on characteristics of trial participants, including sex, ethnicity and/or geographic origin, family history, age at disease onset and diagnosis, mutational status, and clinical and biological characteristics. Ethnicity and geographical origin were extracted when mentioned in the original article. When unspecified, patients were classified according to country of publication. Geographical origin was classified as America, Europe, East Asia, West Asia, and South Asia.

Articles were checked to detect patients described in duplicates to ensure that all information published on a patient was considered. We identified 68 articles for inclusion in this review (Aeschlimann et al, 2018; Alhebshi et al, 2020; Aslani et al, 2022; Berteau et al, 2019; Cao et al, 2023; Chen et al, 2020a; Debeljak et al, 2023; Deshayes et al, 2021; Dong et al, 2019; Duan et al, 2019; Duncan et al, 2018; El Khouri et al, 2023; Endo et al, 2022, 2020; Franco-Jarava et al, 2018; Gans et al, 2020; Girardelli et al, 2021; Harris et al, 2018; Hautala et al, 2021; He et al, 20 20; Hori et al, 2019; Horita et al, 2019; Imai et al, 2020; Jiang et al, 2022; Jo et al, 2023; Kadowaki et al, 2021a, 2018; Kim et al, 2020; Lawless et al, 2018; Li et al, 2019; Liang et al, 2019; Liu et al, 2023; Mitsunaga et al, 2023; Miyamoto et al, 2022; Mulhern et al, 2019; Niwano et al, 2022; Ohnishi et al, 2017; Papadopoulou et al, 2019; Rajamäki et al, 2018; Rossi et al, 2022; Sato et al, 2018; Schwartz et al, 2020; Shaheen et al, 2021; Shigemura et al, 2016; Shimizu et al, 2021; Shiraki et al, 2021a, 2021b; Su et al, 2021; Sun et al, 2022; Suri et al, 2021; Suzuki et al, 2017; Takagi et al, 2018, 2017; Taniguchi et al, 2021; Tian et al, 2022; Tsuchida et al, 2019; Uchida et al, 2020; Viel et al, 2018; Wakatsuki et al, 2023; Wu et al, 2021; Yan et al, 2021; Ye et al, 2017; Zanatta et al, 2022; Zhang et al, 2022, 2021; Zheng et al, 2018; Zhou et al, 2016; Zou et al, 2020) describing 177 patients (Supplementary Figure S6). Patients are detailed in Supplementary Table S6)

Statistical analysis

The categorical variables were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact probability test as appropriate. Continuous variables in 2 or 3 groups were compared using the Mann–Whitney test or the Kruskal–Wallis test, respectively. The significance level was set a $P < .05$ for all analyzed data. Statistical analysis was performed with the online application EasyMedStat (version 3.21.5; www.

easymedstat.com). Clustering analyses are described in supplementary files.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

ORCIDs

Inès Elhani: http://orcid.org/0000-0002-9767-2262
Quentin Riller: http://orcid.org/0000-0003-3323-0235
Guilaine Boursier: http://orcid.org/0000-0002-2903-3135
Véronique Hentgen: http://orcid.org/0000-0003-1788-1898
Frédéric Rieux-Laucat: http://orcid.org/0000-0001-7858-7866
Sophie Georgin-Lavialle: http://orcid.org/0000-0001-6668-8854

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENT

IE is the guarantor for this work. QR is a recipient of an Institut Imagine MD-PhD fellowship (funded by the Fondation Bettencourt Schueller) and a Société Nationale Française de Médecine Interne fellowship.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: IE, SG-L; Data Curation, IE, QR; Formal Analysis: IE, QR; Methodology: IE, SG-L; Supervision: SG-L; Writing - Original Draft Preparation: IE, QR; Writing - Review and Editing: IE, QR, GB, VH, FR-L, SG-L

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.12.007.

REFERENCES

Aeschlimann FA, Batu ED, Canna SW, Go E, Gül A, Hoffmann P, et al. A20 haploinsufficiency (HA20): clinical phenotypes and disease course of patients with a newly recognised NF-kB-mediated autoinflammatory disease. Ann Rheum Dis 2018;77:728–35.

Alhebshi A, Abbas H, Alotaibi HM, Attaf M, Al-Yamani A. A Saudi child with chronic immune thrombocytopenia and vitiligo. Cureus 2020;12:e9314.

Aslani N, Asnaashari K, Parvaneh N, Shahrooei M, Sotoudeh-Anvari M, Shahram F, et al. TNFAIP3 mutation causing haploinsufficiency of A20 with a hemophagocytic lymphohistiocytosis phenotype: a report of two cases. Pediatr Rheumatol Online J 2022;20:78.

Berteau F, Rouvière B, Nau A, Le Berre R, Sarrabay G, Touitou I, et al. 'A20 haploinsufficiency (HA20): clinical phenotypes and disease course of patients with a newly recognised NF-kB-mediated autoinflammatory disease. Ann Rheum Dis 2019;78:e35.

Cansu DÜ, Kaşifoğlu T, Korkmaz C. Do clinical findings of Behçet's disease vary by gender?: A single-center experience from 329 patients. Eur J Rheumatol 2016;3:157–60.

Cao C, Fu X, Wang X. Case Report: a novel mutation in TNFAIP3 in a patient with type 1 diabetes mellitus and haploinsufficiency of A20. Front Endocrinol 2023;14:1131437.

Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. Trends Immunol 2014;35:22–31.

Chen Y, Huang H, He Y, Chen M, Seidler U, Tian D, et al. A20 haploinsufficiency in a Chinese patient with intestinal Behcet's disease-like symptoms: a case report. Front Immunol 2020a;11:1414.

Chen Y, Ye Z, Chen L, Qin T, Seidler U, Tian D, et al. Association of clinical phenotypes in haploinsufficiency A20 (HA20) with disrupted domains of A20. Front Immunol 2020b;11:574992.

Chen Y, Ye Z, Chen L, Qin T, Seidler U, Tian D, et al. Association of clinical phenotypes in haploinsufficiency A20 (HA20) with disrupted domains of A20. Front Immunol 2020;11:574992.

Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/tumor necrosis factor α-induced protein 3 in immune cells control development of autoinflammation and autoimmunity: lessons from mouse models. Front Immunol Frontiers 2018;9:104.

Davatchi F, Assaad-Khalil S, Calamia Kt, Crook Je, Sadeghi-Abdollahi B, et al. The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. J Eur Acad Dermatol Venereol 2014;28:338–47.

Debeljak M, Blazina S, Brecelj J, Avčin T, Toplak N. The spectrum of clinical presentation in haploinsufficiency of A20; a case report of a novel mutation in TNFAIP3 gene. Front Pediatr 2023;11:1132596.

Deshayes S, Bazille C, El Khouri E, Kone-Paut I, Giurgea I, Georgin-Lavialle S, et al. Chronic hepatic involvement in the clinical spectrum of A20 haploinsufficiency. Liver Int 2021;41:1894–900.

Dong X, Liu L, Wang Y, Yang X, Wang W, Lin L, et al. Novel heterogeneous mutation of TNFAIP3 in a Chinese patient with Behçet-like phenotype and persistent EBV viremia. J Clin Immunol 2019;39:188–94.

Duan R, Liu Q, Li J, Bian X, Yuan Q, Li Y, et al. A de novo frameshift mutation in TNFAIP3 impairs A20 deubiquitination function to cause neuropsychiatric systemic lupus erythematosus [published correction appears in J Clin Immunol 2020;40:1062–3]. J Clin Immunol 2019;39:795–804.

Duncan CJA, Dinnigan E, Theobald R, Grainger A, Skelton AJ, Hussain R, et al. Early-onset autoimmune disease due to a heterozygous loss-of-function mutation in *TNFAIP3* (A20). Ann Rheum Dis 2018;77:783–6.

El Khouri E, Diab F, Louvrier C, Assrawi E, Daskalopoulou A, Nguyen A, et al. A critical region of A20 unveiled by missense TNFAIP3 variations that lead to autoinflammation. Elife 2023;12:e81280.

Endo Y, Funakoshi Y, Koga T, Furukawa K, Sasaki D, Miura K, et al. Paediatric-onset haploinsufficiency of A20 associated with a novel and de novo nonsense TNFAIP3 mutation. Rheumatology (Oxford) 2020;59:e85–7.

Endo Y, Funakoshi Y, Koga T, Ohashi H, Takao M, Miura K, et al. Large deletion in 6q containing the TNFAIP3 gene associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome. Clin Immunol 2022;235:108853.

Franco-Jarava C, Wang H, Martin-Nalda A, Alvarez de la SD, García-Prat M, Bodet D, et al. TNFAIP3 haploinsufficiency is the cause of autoinflammatory manifestations in a patient with a deletion of 13Mb on chromosome 6. Clin Immunol 2018;191:44–51.

Gans MD, Wang H, Moura NS, Aksentijevich I, Rubinstein A. A20 haploinsufficiency presenting with a combined immunodeficiency. J Clin Immunol 2020;40:1041–4.

Girardelli M, Valencic E, Moressa V, Margagliotta R, Tesser A, Pastore S, et al. Genetic and immunologic findings in children with recurrent aphthous stomatitis with systemic inflammation. Pediatr Rheumatol Online J 2021;19:70.

Harris AL, Blackburn PR, Richter JE, Gass JM, Caulfield TR, Mohammad AN, et al. Whole exome sequencing and molecular modeling of a missense variant in *TNFAIP3* that segregates with disease in a family with chronic urticaria and angioedema. Case Rep Genet 2018;2018:6968395.

Hautala T, Vähäsalo P, Kuismin O, Keskitalo S, Rajamäki K, Väänänen A, et al. A family with A20 haploinsufficiency presenting with novel clinical manifestations and challenges for treatment. J Clin Rheumatol 2021;27:e583–7.

He T, Huang Y, Luo Y, Xia Y, Wang L, Zhang H, et al. Haploinsufficiency of A20 due to novel mutations in TNFAIP3. J Clin Immunol 2020;40:741–51.

Hori T, Ohnishi H, Kadowaki T, Kawamoto N, Matsumoto H, Ohara O, et al. Autosomal dominant Hashimoto's thyroiditis with a mutation in *TNFAIP3*. Clin Pediatr Endocrinol 2019;28:91–6.

Horita N, Gül A, Aksentijevich I, Kastner D, Remmers EF. Pseudodominance of autoinflammatory disease in a single Turkish family explained by co-inheritance of haploinsufficiency of A20 and familial Mediterranean fever. Clin Exp Rheumatol 2019;37:89–92.

Imai T, Shiraishi A, Nishiyama K, Ishimura M, Ohga S. Lipopolysaccharide-induced monocyte death in a novel ZnF7 domain mutation of TNFAIP3. J Allergy Clin Immunol Pract 2020;8:2071–4.e5.

Jiang W, Deng M, Gan C, Wang L, Mao H, Li Q. A novel missense mutation in TNFAIP3 causes haploinsufficiency of A20. Cell Immunol 2022;371:104453.

Jo KJ, Park SE, Cheon CK, Oh SH, Kim SH. Haploinsufficiency A20 misdiagnosed as PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical andenits) syndrome with Kikuchi disease. Clin Exp Pediatr 2023;66:82–4.

Kadowaki S, Hashimoto K, Nishimura T, Kashimada K, Kadowaki T, Kawamoto N, et al. Functional analysis of novel A20 variants in patients with atypical inflammatory diseases. Arthritis Res Ther 2021a;23:52.

Kadowaki T, Kadowaki S, Ohnishi H. A20 haploinsufficiency in East Asia. Front Immunol 2021b;12:780689.

Kadowaki T, Ohnishi H, Kawamoto N, Hori T, Nishimura K, Kobayashi C, et al. Haploinsufficiency of A20 causes autoinflammatory and autoimmune disorders. J Allergy Clin Immunol 2018;141:1485–8.e11.

Kim HY, Song JY, Kim WI, Ko HC, Park SE, Jang JH, et al. The first case of an infant with familial A20 haploinsufficiency in Korea. J Korean Med Sci 2020;35:e252.

Lawless D, Pathak S, Scambler TE, Ouboussad L, Anwar R, Savic S. A case of adult-onset Still's disease caused by a novel splicing mutation in *TNFAIP3* successfully treated with tocilizumab. Front Immunol 2018;9:1527.

Li GM, Liu HM, Guan WZ, Xu H, Wu BB, Sun L. Expanding the spectrum of A20 haploinsufficiency in two Chinese families: cases report. BMC Med Genet 2019;20:124.

Liang J, Zhang H, Guo Y, Yang K, Ni C, Yu H, et al. Coinheritance of generalized pustular psoriasis and familial Behçet-like autoinflammatory syndrome with variants in IL36RN and TNFAIP3 in the heterozygous state. J Dermatol 2019;46:907–10.

Liu J, Lin Y, Li X, Ba H, He X, Peng H, et al. Haploinsufficiency of A20 in a Chinese child caused by loss-of-function mutations in TNFAIP3: a case report and review of the literature. Front Pediatr 2023;10: 990008.

Maccora I, Marrani E, Mastrolia MV, Abu-Rumeileh S, Maniscalco V, Fusco E, et al. Ocular involvement in monogenic autoinflammatory disease. Autoimmun Rev 2021;20:102944.

Mauskar MM, Marathe K, Venkatesan A, Schlosser BJ, Edwards L. Vulvar diseases: conditions in adults and children. J Am Acad Dermatol 2020;82: 1287–98.

Mitsunaga K, Inoue Y, Naito C, Ogata H, Itoh Y, Natsui Y, et al. A case of A20 haploinsufficiency in which intestinal inflammation improved with thalidomide. Rheumatology (Oxford) 2023;62:e193–5.

Miyamoto T, Honda Y, Izawa K, Kanazawa N, Kadowaki S, Ohnishi H, et al. Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: a Japanese multicenter experience. Front Immunol 2022;13: 905960.

Mulhern CM, Hong Y, Omoyinmi E, Jacques TS, D'Arco F, Hemingway C, et al. Janus kinase 1/2 inhibition for the treatment of autoinflammation associated with heterozygous TNFAIP3 mutation. J Allergy Clin Immunol 2019;144:863–6.e5.

Nigrovic PA, Lee PY, Hoffman HM. Monogenic autoinflammatory disorders: conceptual overview, phenotype, and clinical approach. J Allergy Clin Immunol 2020;146:925–37.

Niwano T, Hosoya T, Kadowaki S, Toyofuku E, Naruto T, Shimizu M, et al. An adult case of suspected A20 haploinsufficiency mimicking polyarteritis nodosa. Rheumatology (Oxford) 2022;61:e337–40.

Ohnishi H, Kawamoto N, Seishima M, Ohara O, Fukao T. A Japanese family case with juvenile onset Behçet's disease caused by TNFAIP3 mutation. Allergol Int 2017;66:146–8.

Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. Blood 2010;116:e35–40.

Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ 2021;372. https://doi.org/10.1136/bmj.n71.

Papadopoulou C, Omoyinmi E, Standing A, Pain CE, Booth C, D'Arco F, et al. Monogenic mimics of Behçet's disease in the young. Rheumatology (Oxford) 2019;58:1227–38.

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012;64:2677–86.

Rajamäki K, Keskitalo S, Seppänen M, Kuismin O, Vähäsalo P, Trotta L, et al. Haploinsufficiency of A20 impairs protein-protein interactome and leads into caspase-8-dependent enhancement of NLRP3 inflammasome activation. RMD Open 2018;4:e000740.

Rossi MN, Federici S, Uva A, Passarelli C, Celani C, Caiello I, et al. Identification of a novel mutation in *TNFAIP3* in a family with poly-autoimmunity. Front Immunol 2022;13:804401.

Sahnan K, Adegbola SO, Tozer PJ, Watfah J, Phillips RK. Perianal abscess. BMJ 2017;356:j475.

Sato S, Fujita Y, Shigemura T, Matoba H, Agematsu K, Sumichika Y, et al. Juvenile onset autoinflammatory disease due to a novel mutation in TNFAIP3 (A20). Arthritis Res Ther 2018;20:274.

Schwartz DM, Blackstone SA, Sampaio-Moura N, Rosenzweig S, Burma AM, Stone D, et al. Type I interferon signature predicts response to JAK inhibition in haploinsufficiency of A20. Ann Rheum Dis 2020;79: 429–31.

Shaheen ZR, Williams SJA, Binstadt BA. Case report: a novel TNFAIP3 mutation causing haploinsufficiency of A20 with a lupus-like phenotype. Front Immunol 2021;12:629457.

Shigemura T, Kaneko N, Kobayashi N, Kobayashi K, Takeuchi Y, Nakano N, et al. Novel heterozygous C243Y A20/TNFAIP3 gene mutation is responsible for chronic inflammation in autosomal-dominant Behçet's disease. RMD Open 2016;2:e000223.

Shimizu M, Matsubayashi T, Ohnishi H, Nakama M, Izawa K, Honda Y, et al. Haploinsufficiency of A20 with a novel mutation of deletion of exons 2–3 of *TNFAIP3*. Mod Rheumatol 2021;31:493–7.

Shiraki M, Kadowaki S, Kadowaki T, Kawamoto N, Ohnishi H. Primary immunodeficiency disease mimicking pediatric Bechet's disease. Children (Basel) 2021a;8:75.

Shiraki M, Williams E, Yokoyama N, Shinoda K, Nademi Z, Matsumoto K, et al. Hematopoietic cell transplantation ameliorates autoinflammation in A20 haploinsufficiency. J Clin Immunol 2021b;41:1954–6.

Su G, Lai J, Zhu J, Zhang D, Hou J, Xu Y, et al. Analysis of five cases of monogenic lupus related to primary immunodeficiency diseases. Inflamm Res 2021;70:1211–6.

Sun B, Yang M, Hou J, Wang W, Ying W, Hui X, et al. Chromosomal abnormalities related to fever of unknown origin in a Chinese pediatric cohort and literature review. Orphanet J Rare Dis 2022;17:292.

Suri D, Rawat A, Jindal AK, Vignesh P, Gupta A, Pilania RK, et al. Spectrum of systemic auto-inflammatory diseases in India: a multi-centric experience. Front Immunol 2021;12:630691.

Suzuki T, Sasahara Y, Kikuchi A, Kakuta H, Kashiwabara T, Ishige T, et al. Targeted sequencing and immunological analysis reveal the involvement of primary immunodeficiency genes in pediatric IBD: a Japanese multicenter study. J Clin Immunol 2017;37:67–79.

Takagi M, Hoshino A, Yoshida K, Ueno H, Imai K, Piao J, et al. Genetic heterogeneity of uncharacterized childhood autoimmune diseases with lymphoproliferation. Pediatr Blood Cancer 2018;65.

Takagi M, Ogata S, Ueno H, Yoshida K, Yeh T, Hoshino A, et al. Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. J Allergy Clin Immunol 2017;139:1914–22.

Taniguchi K, Inoue M, Arai K, Uchida K, Migita O, Akemoto Y, et al. Novel TNFAIP3 microdeletion in a girl with infantile-onset inflammatory bowel disease complicated by a severe perianal lesion. Hum Genome Var 2021;8:1.

Tian Y, Wu B, Peng L, Wang J, Shen M. Three Chinese pedigrees of A20 haploinsufficiency: clinical, cytokine and molecular characterization. Front Immunol 2022;13:955079.

Tsuchida N, Kirino Y, Soejima Y, Onodera M, Arai K, Tamura E, et al. Haploinsufficiency of A20 caused by a novel nonsense variant or entire deletion of TNFAIP3 is clinically distinct from Behçet's disease. Arthritis Res Ther 2019;21:137.

Uchida T, Suzuki T, Kikuchi A, Kakuta F, Ishige T, Nakayama Y, et al. Comprehensive targeted sequencing identifies monogenic disorders in patients with early-onset refractory diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2020;71:333–9.

Vereecke L, Vieira-Silva S, Billiet T, van Es JH, Mc Guire C, Slowicka K, et al. A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. Nat Commun 2014;5:5103.

Viel S, Cheyssac E, Pescarmona R, Besson L, Till M, Viremouneix L, et al. Large deletion in 6q associated to A20 haploinsufficiency and thoracoabdominal heterotaxy. Ann Rheum Dis 2018;77:1697–8.

Wakatsuki R, Hatai Y, Okamoto K, Kaneko S, Shimbo A, Irabu H, et al. An infant with A20 haploinsufficiency presenting with periodic fever syndrome: a case report. Int J Rheum Dis 2023;26:973–6.

Wu CW, Sasa G, Salih A, Nicholas S, Vogel TP, Cahill G, et al. Complicated diagnosis and treatment of HA20 due to contiguous gene deletions involving 6q23.3. J Clin Immunol 2021;41:1420–3.

Yan M, Li D, Aknai S, Zhu H, Abudureyim M. Mutation analysis of the TNFAIP3 in A20 haploinsufficiency: a case report. Medicine (Baltimore) 2021;100:e25954.

Ye Z, Zhou Y, Huang Y, Wang Y, Lu J, Tang Z, et al. Phenotype and management of infantile-onset inflammatory bowel disease: experience from a tertiary care center in China. Inflamm Bowel Dis 2017;23:2154–64.

Yu MP, Xu XS, Zhou Q, Deuitch N, Lu MP. Haploinsufficiency of A20 (HA20): updates on the genetics, phenotype, pathogenesis and treatment. World J Pediatr 2020;16:575–84.

Zanatta L, Biscaro F, Bresolin S, Marzaro M, Sarcognato S, Cataldo I, et al. Case Report: an early-onset inflammatory colitis due to a variant in *TNFAIP3* causing A20 haploinsufficiency. Front Pediatr 2022;10:1044007.

Zhang C, Han X, Sun L, Yang S, Peng J, Chen Y, et al. Novel loss-of-function mutations in TNFAIP3 gene in patients with lupus nephritis. Clin Kidney J 2022;15:2027–38.

Zhang D, Su G, Zhou Z, Lai J. Clinical characteristics and genetic analysis of A20 haploinsufficiency. Pediatr Rheumatol Online J 2021;19:75.

Zheng C, Huang Y, Ye Z, Wang Y, Tang Z, Lu J, et al. Infantile onset intractable inflammatory bowel disease due to novel heterozygous mutations in TNFAIP3 (A20). Inflamm Bowel Dis 2018;24:2613–20.

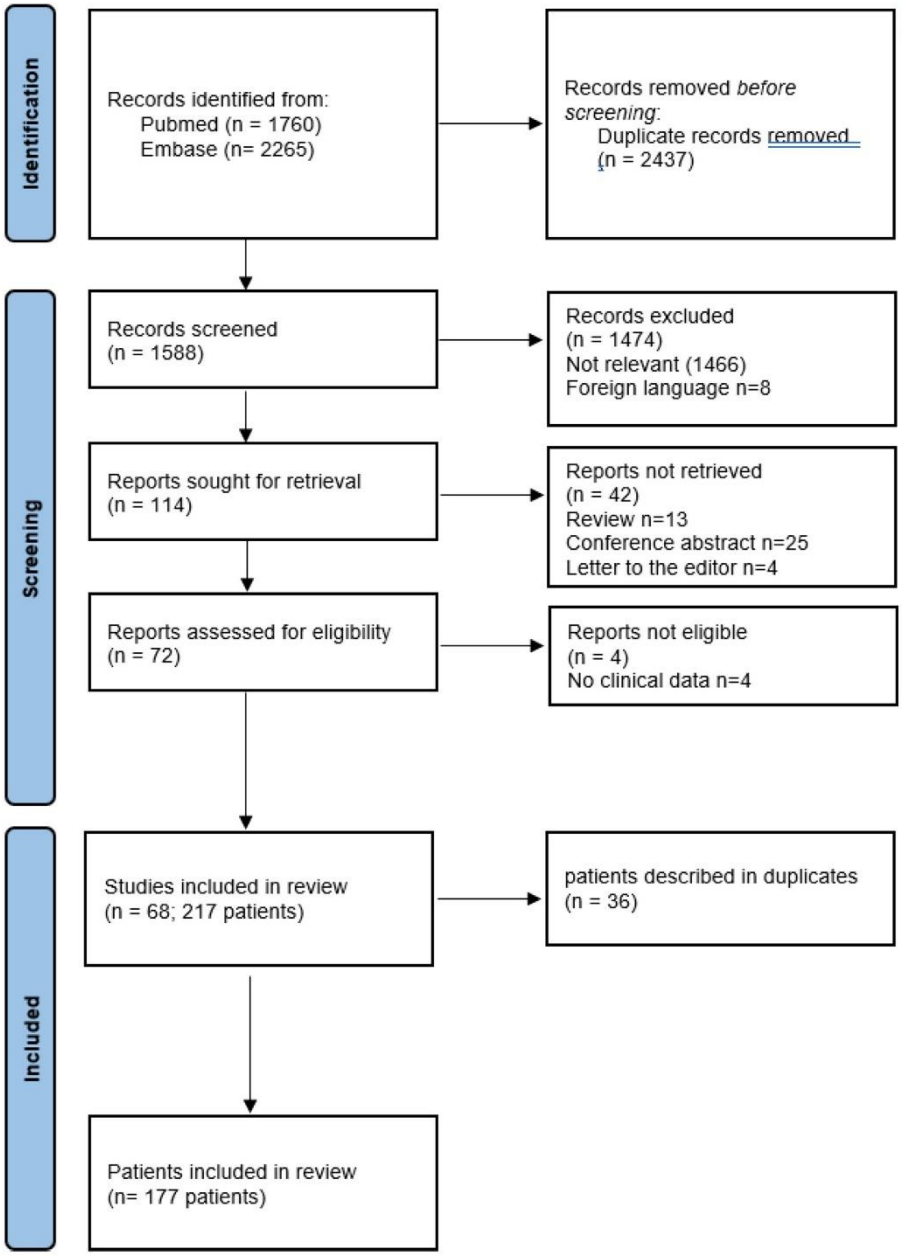
Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat Genet 2016;48:67–73.

Zou D, Zhou S, Wang H, Gou J, Wang S. Knee joint swelling at presentation: a case of pediatric Crohn disease with a *TNFAIP3* mutation. Pediatrics 2020;146:e20193416.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Clustering analyses

Clustering analysis was performed in R, version 4.0.3, using the packages FactoMineR, factoexra, ClusterR, cluster, and missMDA and visualization using ggplot2. Briefly, only categorical variables were kept in this analysis. Missing data were imputed using the function imputeFAMD from the missMDA package with the method regularized. The (regularized) iterative factor analysis of mixed data algorithm first consists of coding the categorical variables using the indicator matrix of dummy variables. Then, in the initialization step, missing values are imputed with initial values such as the mean of the variable for the continuous variables and the proportion of the category for each category using the nonmissing entries. Multiple correspondence analysis on categorical variables was performed with the multiple correspondence analysis function without any modification in the function. Patients were clusterized on the basis of this result with the function hierarchical clustering on principal components, which performs an agglomerative hierarchical clustering on results from a factor analysis with ward method. The number of clusters was set to −1, meaning that the number was unsupervised. Visualization of results and analysis of differences between clusters was performed using TableOne, ggplot2, and ggrepel packages. All methods used here are available on this website https://rpubs.com/nchelaru/famd.



Supplementary Figure S1. Prisma flowchart. We identified 68 articles describing 177 patients for inclusion in this review. The search of MEDLINE database provided 4025 articles. After adjusting for duplicates, 1588 remained. Of these, 1474 were discarded after reviewing the title because they were irrelevant. Forty-two citations were excluded because they were reviews, letters to the editor, or replies. The full texts of the remaining 72 citations were examined in more detail. Four reports were excluded because the clinical data were not detailed. Patients described in duplicate (n = 36) and triplicate (n = 4) were included once. Finally, 177 patients from 66 reports were included.

Supplementary Table S1. Type of Variations and Domains Affected in Patients with HA20

	Overall
n	177
Type of variation (%)	
Deletion	1 (0.6)
Frameshift	64 (36.2)
Large deletion	8 (4.5)
Microdeletion	2 (1.1)
Missense	41 (23.2)
Splice	7 (4.0)
Stop-gained	54 (30.5)
Domain (%)	
Other	16 (9.1)
OTU	92 (52.3)
OTU-ZF1	3 (1.7)
ZF1	2 (1.1)
ZF1-ZF2	4 (2.3)
ZF2	10 (5.7)
ZF3-ZF4	12 (6.8)
ZF4	9 (5.1)
ZF4-ZF5	3 (1.7)
ZF5	8 (4.5)
ZF6	4 (2.3)
ZF7	13 (7.4)
Female	109 (61.6)
Fever	87 (51.8)
Oral aphtosis	115 (65.3)
Genital aphtosis	58 (33.0)
Perinal aphtosis	28 (16.0)
RTI	10 (5.7)
Digestive involvement	81 (45.8)
Digestive aphtosis	42 (24.7)
Liver involvement	12 (7.0)
Joint involvement	54 (30.7)
Skin involvement	76 (42.9)
ENT involvement	5 (3.1)
Adenopathy	26 (15.3)
Eye involvement	13 (7.3)
CNS involvement	17 (9.6)
Cardiovascular involvement	14 (7.9)
Pulmonary embolism	1 (0.6)
Deep vein thrombosis	1 (0.6)
Immunodeficiencies	9 (5.1)
Autoimmunity	61 (35.1)
Hypergammaglobulinemia	1 (0.6)
Lung involvement	10 (5.6)
Menstrual cycle	3 (2.0)

Supplementary Table S2. Clinical Features according to Reported Ethnicity and Sex

Characteristics	East Asia n = 103	Europe n = 39	America n = 16	West Asia n = 10	South Asia n = 8	*P*-Value	Female n = 108	Male n = 69	*P*-Value
Women	60 (58)	25 (64)	13 (81)	5 (50)	5 (63)	.43			
Fever	62 (62)	14 (33)	9 (64)	5 (50)	2 (29)	**.036**	54 (53)	38 (55)	.7
Genital ulcers	30 (29)	18 (46)	8 (50)	6 (60)	1 (13)	**.047**	48 (44)	15 (22)	**.004**
Perianal inflammation	20 (19)	3 (8)	3 (19)	0	0	.2	10 (10)	17 (27)	**.01**
Digestive tract ulcer	32 (31)	5 (13)	2 (13)	1 (10)	2 (25)	.1	19 (18)	24 (35)	**.019**
Skin features	35 (34)	23 (59)	12 (75)	3 (30)	2 (25)	**.003**	53 (50)	23 (32)	.056
Anterior uveitis	2 (2)	2 (5)	3 (12)	0	1 (13)	**.03**	7 (6)	1 (2)	.1
CNS involvement	5 (5)	3 (8)	4 (25)	2 (20)	2 (25)	**.015**	12 (12)	5 (7)	.45
Autoimmunity	26 (26)	20 (51)	7 (44)	6 (10)	1 (13)	**.01**	41 (39)	20 (26)	.28
Thyroiditis	8 (8)	12 (31)	1 (6)	3 (30)	0	**.003**	19 (18)	5 (7)	.07

Abbreviation: CNS, central nervous system.

Supplementary Table S3. Clinical Features According to Type of Variation in *TNFAIP3* (pLOF vs Missense)

	Missense	pLOF	*P*
n	42	135	
Type of variation (%)			<.001
Deletion	1 (2.4)	0 (0.0)	
Frameshift	0 (0.0)	64 (47.4)	
Large deletion	0 (0.0)	8 (5.9)	
Microdeletion	0 (0.0)	2 (1.5)	
Missense	41 (97.6)	0 (0.0)	
Splice	0 (0.0)	7 (5.2)	
Stop-gained	0 (0.0)	54 (40.0)	
Domain (%)			.012
Other	1 (2.4)	15 (11.2)	
OTU	22 (52.4)	70 (52.2)	
OTU-ZF1	0 (0.0)	3 (2.2)	
ZF1	0 (0.0)	2 (1.5)	
ZF1-ZF2	1 (2.4)	3 (2.2)	
ZF2	4 (9.5)	6 (4.5)	
ZF3-ZF4	4 (9.5)	8 (6.0)	
ZF4	4 (9.5)	5 (3.7)	
ZF4-ZF5	3 (7.1)	0 (0.0)	
ZF5	1 (2.4)	7 (5.2)	
ZF6	2 (4.8)	2 (1.5)	
ZF7	0 (0.0)	13 (9.7)	
Ectopic expression system assay	28 (66.7)	81 (60.0)	.552
Functional assay on patients' cells	18 (46.2)	69 (53.5)	.535
Female	28 (66.7)	81 (60.0)	.552
Fever	18 (46.2)	69 (53.5)	.535
Oral aphtosis	19 (45.2)	96 (71.6)	.003
Genital aphtosis	5 (11.9)	53 (39.6)	.002
Perineal aphtosis	1 (2.4)	27 (20.3)	.012
RTI	0 (0.0)	10 (7.6)	.145
Digestive involvement	10 (23.8)	71 (52.6)	.002
Digestive aphtosis	7 (17.1)	35 (27.1)	.274
Liver involvement	0 (0.0)	12 (9.2)	.096
Joint involvement	8 (19.0)	46 (34.3)	.093
Skin involvement	22 (52.4)	54 (40.0)	.216
ENT involvement	2 (5.4)	3 (2.4)	.705
Adenopathy	5 (11.9)	21 (16.4)	.648
Eye involvement	4 (9.5)	9 (6.7)	.779
CNS involvement	4 (9.5)	13 (9.6)	1.000
Cardiovascular involvement	3 (7.1)	11 (8.1)	1.000
Pulmonary embolism	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Deep vein thrombosis	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Immunodeficiency	3 (7.3)	6 (4.4)	.744
Autoimmunity	6 (14.3)	55 (41.7)	.002
Hypergammaglobulinemia	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Lung involvement	1 (2.4)	9 (6.7)	.504
Menstrual cycle troubles	0 (0.0)	3 (2.7)	.727

Abbreviation: pLOF, predicted loss of function.

Supplementary Table S4. Clinical Features According to *A20* Domain Affected (OTU vs non-OTU)

	Missense	pLOF	*P*
n	42	135	
Type of variation (%)			<.001
Deletion	1 (2.4)	0 (0.0)	
Frameshift	0 (0.0)	64 (47.4)	
Large deletion	0 (0.0)	8 (5.9)	
Microdeletion	0 (0.0)	2 (1.5)	
Missense	41 (97.6)	0 (0.0)	
Splice	0 (0.0)	7 (5.2)	
Stop-gained	0 (0.0)	54 (40.0)	
Domain (%)			.012
Other	1 (2.4)	15 (11.2)	
OTU	22 (52.4)	70 (52.2)	
OTU-ZF1	0 (0.0)	3 (2.2)	
ZF1	0 (0.0)	2 (1.5)	
ZF1-ZF2	1 (2.4)	3 (2.2)	
ZF2	4 (9.5)	6 (4.5)	
ZF3-ZF4	4 (9.5)	8 (6.0)	
ZF4	4 (9.5)	5 (3.7)	
ZF4-ZF5	3 (7.1)	0 (0.0)	
ZF5	1 (2.4)	7 (5.2)	
ZF6	2 (4.8)	2 (1.5)	
ZF7	0 (0.0)	13 (9.7)	
Ectopic expression system assay	28 (66.7)	81 (60.0)	.552
Functional assay on patients' cells	18 (46.2)	69 (53.5)	.535
Female	28 (66.7)	81 (60.0)	.552
Fever	18 (46.2)	69 (53.5)	.535
Oral aphtosis	19 (45.2)	96 (71.6)	.003
Genital aphtosis	5 (11.9)	53 (39.6)	.002
Perineal aphtosis	1 (2.4)	27 (20.3)	.012
RTI	0 (0.0)	10 (7.6)	.145
Digestive involvement	10 (23.8)	71 (52.6)	.002
Digestive aphtosis	7 (17.1)	35 (27.1)	.274
Liver involvement	0 (0.0)	12 (9.2)	.096
Joint involvement	8 (19.0)	46 (34.3)	.093
Skin involvement	22 (52.4)	54 (40.0)	.216
ENT involvement	2 (5.4)	3 (2.4)	.705
Adenopathy	5 (11.9)	21 (16.4)	.648
Eye involvement	4 (9.5)	9 (6.7)	.779
CNS involvement	4 (9.5)	13 (9.6)	1.000
Cardiovascular involvement	3 (7.1)	11 (8.1)	1.000
Pulmonary embolism	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Deep vein thrombosis	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Immunodeficiency	3 (7.3)	6 (4.4)	.744
Autoimmunity	6 (14.3)	55 (41.7)	.002
Hypergammaglobulinemia	0 (0.0)	1 (0.8)	1.000
Lung involvement	1 (2.4)	9 (6.7)	.504
Menstrual cycle troubles	0 (0.0)	3 (2.7)	.727

Abbreviation: OTU, ovarian tumor.

Supplementary Table S5. Clinical Features According to Clusters

	Other Domain	OTU	*P*
n	85	92	
Type of variation (%)			<.001
Deletion	1 (1.2)	0 (0.0)	
Frameshift	38 (44.7)	26 (28.3)	
Large deletion	8 (9.4)	0 (0.0)	
Microdeletion	2 (2.4)	0 (0.0)	
Missense	19 (22.4)	22 (23.9)	
Splice	7 (8.2)	0 (0.0)	
Stop-gained	10 (11.8)	44 (47.8)	
Domain (%)			<.001
Other	16 (19.0)	0 (0.0)	
OTU	0 (0.0)	92 (100.0)	
OTU-ZF1	3 (3.6)	0 (0.0)	
ZF1	2 (2.4)	0 (0.0)	
ZF1-ZF2	4 (4.8)	0 (0.0)	
ZF2	10 (11.9)	0 (0.0)	
ZF3-ZF4	12 (14.3)	0 (0.0)	
ZF4	9 (10.7)	0 (0.0)	
ZF4-ZF5	3 (3.6)	0 (0.0)	
ZF5	8 (9.5)	0 (0.0)	
ZF6	4 (4.8)	0 (0.0)	
ZF7	13 (15.5)	0 (0.0)	
Female	51 (60.0)	58 (63.0)	.794
Fever	46 (56.8)	41 (47.1)	.272
Oral aphtosis	50 (59.5)	65 (70.7)	.164
Genital aphtosis	18 (21.2)	40 (44.0)	.002
Perineal aphtosis	16 (18.8)	12 (13.3)	.433
RTI	2 (2.4)	8 (8.9)	.129
Digestive involvement	40 (47.1)	41 (44.6)	.856
Digestive aphtosis	18 (22.2)	24 (27.0)	.590
Liver involvement	7 (8.4)	5 (5.7)	.686
Joint involvement	22 (25.9)	32 (35.2)	.242
Skin involvement	27 (31.8)	49 (53.3)	.006
ENT involvement	2 (2.6)	3 (3.6)	1.000
Adenopathy	16 (19.8)	10 (11.2)	.184
Eye involvement	5 (5.9)	8 (8.7)	.668
CNS involvement	13 (15.3)	4 (4.3)	.027
Cardiovascular involvement	5 (5.9)	9 (9.8)	.495
Pulmonary embolism	0 (0.0)	1 (1.1)	1.000
Deep vein thrombosis	0 (0.0)	1 (1.1)	1.000
Immunodeficiency	4 (4.8)	5 (5.4)	1.000
Autoimmunity	28 (33.3)	33 (36.7)	.763
Hypergammaglobulinemia	1 (1.3)	0 (0.0)	.948
Lung involvement	6 (7.1)	4 (4.3)	.649
Menstrual cycle	0 (0.0)	3 (3.6)	.324

Supplementary Table S6. Clinical Features According to Clusters

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	*P*
n	108	50	19	
Sex	71 (65.7)	20 (40.0)	18 (94.7)	<0.001
Fever	39 (38.2)	36 (75.0)	12 (66.7)	<0.001
Oral aphtosis	55 (51.4)	41 (82.0)	19 (100.0)	<0.001
Genital aphtosis	24 (22.2)	16 (32.7)	18 (94.7)	<0.001
Perineal aphtosis	3 (2.8)	21 (42.9)	4 (22.2)	<0.001
RTI	1 (0.9)	2 (4.2)	7 (38.9)	<0.001
Digestive involvement	20 (18.5)	48 (96.0)	13 (68.4)	<0.001
Digestive aphtosis	1 (1.0)	35 (71.4)	6 (33.3)	<0.001
Liver involvement	10 (9.3)	2 (4.3)	0 (0.0)	.270
Joint involvement	24 (22.2)	14 (28.6)	16 (84.2)	<0.001
Skin involvement	42 (38.9)	17 (34.0)	17 (89.5)	<0.001
ENT involvement	1 (1.0)	0 (0.0)	4 (23.5)	<0.001
Adenopathy	14 (13.5)	8 (16.7)	4 (22.2)	.605
Eye involvement	2 (1.9)	2 (4.0)	9 (47.4)	<0.001
CNS involvement	11 (10.2)	4 (8.0)	2 (10.5)	.901
Cardiovascular involvement	7 (6.5)	3 (6.0)	4 (21.1)	.080
Pulmonary embolism	0 (0.0)	1 (2.3)	0 (0.0)	.251
Deep vein thrombosis	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.2)	.010
Immunodeficiency	6 (5.6)	1 (2.0)	2 (10.5)	.333
Autoimmunity	51 (48.1)	6 (12.2)	4 (21.1)	<0.001
Hypergammaglobulinemia	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	.724
Lung involvement	8 (7.4)	1 (2.0)	1 (5.3)	.390
Menstrual cycle troubles	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (18.8)	<0.001
Variation (pLOF)	75 (69.4)	44 (88.0)	16 (84.2)	.027

Article II

L'haploinsuffisance de A20 : que doit connaître le clinicien ?

I. Elhani, A. Aouba, Q. Riller, H. Vergneault, G. Boursier, F. Rieux-Laucat,V. Hentgen, S. Georgin-Lavialle

Publié dans la *Revue de Médecine Interne*
DOI : 10.1016/j.revmed.2023.12.004

Cette partie de mes travaux de thèse a fait l'objet d'une publication dans la *Revue de Médecine Interne* en décembre 2023 (DOI : 10.1016/j.revmed.2023.12.004).

Dans ce travail de revue, nous avons souhaité décrire de manière clinique et pratique les manifestations associées à l'haploinsuffisance de A20 pour les cliniciens francophones.

Nous avons abordé les principales caractéristiques immunologiques et cliniques de l'haploinsuffisance de A20, notamment son lien avec des pathologies auto-immunes et inflammatoires. Les symptômes incluent des manifestations variées comme des éruptions cutanées, des arthrites, et des troubles gastro-intestinaux, rendant parfois le diagnostic complexe. L'article met en avant l'importance d'une approche multidisciplinaire pour la prise en charge de cette maladie, impliquant immunologistes, généticiens, et rhumatologues. De plus, nous avons discuté des options thérapeutiques actuelles, en soulignant le rôle potentiel des traitements biologiques ciblant les voies inflammatoires spécifiques. Enfin, nous avons proposé un algorithme à destination des médecins cliniciens de la démarche diagnostique devant une suspicion d'haploinsuffisance de A20, en particulier, quand demander une analyse génétique et comment interpréter le résultat.

La Revue de médecine interne 45 (2024) 415–422

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Mise au point

L'haploinsuffisance de A20 : que doit connaître le clinicien?

A20 haploinsufficiency: what do clinicians need to know?

I. Elhani[a,b,*], A. Aouba[c], Q. Riller[d], H. Vergneault[e], G. Boursier[f,g], F. Rieux-Laucat[d], V. Hentgen[a], S. Georgin-Lavialle[b,e,*]

[a] *Centre de référence des maladies auto-inflammatoires rares et des amyloses, service de pédiatrie générale, hôpital de Versailles, Versailles, France*
[b] *Sorbonne université, centre de recherche Saint-Antoine (CRSA) INSERM UMRS-938*
[c] *Département de médecine Interne et immunologie clinique, Normandie Univ, UNICAEN, UR4650 PSIR, CHU de Caen Normandie, Caen, France*
[d] *Université Paris Cité, Institut Imagine, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, 75015 Paris, France*
[e] *AP–HP, hôpital Tenon, Service de médecine interne, Paris, France*
[f] *Centre national de référence des maladies auto-inflammatoires et des amyloses d'origine inflammatoire (CEREMAIA), Montpellier, France*
[g] *Laboratoire de Génétique des Maladies rares et autoinflammatoires, Service de Génétique moléculaire et cytogénomique, CHU Montpellier, Univ Montpellier, Montpellier, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 29 décembre 2023

Mots clés :
Haploinsuffisance de A20
Maladie autoinflammatoire
TNFAIP3
Autoimmunité
Maladie de BEHCET
maladie de Crohn

RÉSUMÉ

L'haploinsuffisance de A20 (HA20) est une maladie auto-inflammatoire monogénique, associée à des mutations de transmission autosomique dominante du gène *TNFAIP3*. Elle entraîne un défaut d'inactivation de la voie pro-inflammatoire du NF-κB. Moins de 200 cas ont été décrits dans le monde. Le tableau clinique de la maladie repose essentiellement sur un triptyque constitué par une fièvre et/ou un syndrome inflammatoire biologique récurrents, une aphtose volontiers bipolaire et une folliculite cutanée. Cependant, le spectre clinique du HA20 est très large et inclut des atteintes digestives, articulaires, cutanées, péricardiques ou ganglionnaires. Il existe également une association fréquente à des manifestations et/ou des marqueurs auto-immuns, dont les anticorps anti-nucléaires et anti-ADN natifs. Ainsi, le diagnostic de nombres d'affections systémiques ou organiques et principalement la maladie de Behçet, la maladie de Crohn, voire le lupus systémique, a pu être redressé en diagnostic de HA20 par la recherche moléculaire d'une mutation hétérozygote avec déficit fonctionnel de *TNFAIP3*. Si les premières manifestations de la maladie surviennent souvent dans les premières années de vie, son diagnostic n'est souvent fait qu'à l'âge adulte et requiert une implication des médecins pédiatres et adultes. Les traitements du HA20 ne sont pas codifiés, reposant sur immunomodulateurs et immunosuppresseurs conventionnels ou biologiques adaptés à la symptomatologie du patient. Cette revue met ainsi la lumière sur les vastes challenges diagnostiques de cette maladie auto-inflammatoire rare mais probablement sous-diagnostiquée.
© 2023 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
A20 haploinsufficiency
Autoinflammatory disease
TNFAIP3
Autoimmunity

ABSTRACT

A20 Haploinsufficiency (HA20) is a monogenic autoinflammatory disease associated with an autosomal dominant mutation in the *TNFAIP3* gene. It induces a defect in the inactivation of the pro-inflammatory NF-κB pathway. Less than 200 cases have been described worldwide. The clinical picture of the disease is essentially based on the association of recurrent fever and/or biologic inflammatory syndrome, aphtosis, often bipolar, and cutaneous folliculitis. However, the clinical spectrum of HA20 is very broad, including gastrointestinal (mainly colonic ulceration), articular, cutaneous, pericardial and lymph node involvement, as well as frequent association with organ-specific or non-specific autoimmune manifestations and/or autoantibodies, including antinuclear antibodies and anti-dsDNA. As a result, the diagnosis of a number of systemic or organic disorders, most notably Behçet's disease, Crohn's disease, and sometimes even systemic lupus, has been corrected to HA20 by molecular research for a heterozygous mutation with functional deficiency of TNFAIP3. Although the first signs of the disease often appear in the first years of

* Auteur correspondant. Service de médecine interne, Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France
Adresses e-mail : ines.elhani@aphp.fr (I. Elhani), sophie.georgin-lavialle@aphp.fr (S. Georgin-Lavialle).

https://doi.org/10.1016/j.revmed.2023.12.004
0248-8663/© 2023 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

life, the diagnosis is often made in adulthood and requires the involvement of both paediatric and adult physicians. Treatment for HA20 is not codified and relies on conventional or biological immunomodulators and immunosuppressants adapted to the patient's symptomatology. This review highlights the enormous diagnostic challenges in this autoinflammatory disease.
© 2023 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'haploinsuffisance de A20 (HA20) est une maladie inflammatoire monogénique, associée à des mutations de transmission autosomique dominante du gène *TNFAIP3*. Elle induit un défaut d'inactivation de la voie pro-inflammatoire du NF-κB. L'activation de cette voie, impliquée à la fois dans l'immunité innée et adaptative, explique le chevauchement de son spectre clinique entre l'auto-inflammation et l'auto-immunité. Son tableau clinique repose essentiellement sur la triade fièvre (et/ou syndrome inflammatoire biologique) récurrente, aphtose volontiers bipolaire et folliculite cutanée. Cependant, le spectre clinique du HA20 est très large et inclut des atteintes digestives, des atteintes articulaires, ainsi qu'une association fréquente à des manifestations et/ou des marqueurs auto-immuns spécifiques ou non d'organes (Fig. 1). Ainsi, le diagnostic de nombreuses d'affections systémiques ou organiques et principalement la maladie de Behçet, la maladie de Crohn, voire le lupus systémique parfois avec néphrite lupique, a pu être redressé en diagnostic de HA20 par la recherche moléculaire d'une mutation hétérozygote avec déficit fonctionnel de TNFAIP3. S'il s'agit d'une maladie rare, sa prévalence réelle est probablement très sous-estimée du fait de sa première description très récente, du recours aux analyses génétiques nécessaire au diagnostic, mais aussi de son spectre clinique insuffisamment défini. En effet, si les premières manifestations du HA20 surviennent le plus souvent dans les premières années de vie, son diagnostic n'est souvent fait qu'à l'âge adulte. Ainsi, l'étude du HA20 à de multiples enjeux ; d'une part, l'analyse des cas décrits permettra de mieux caractériser son spectre clinico-biologique et améliorer la prise en charge diagnostique des patients, à la fois ceux nouvellement symptomatiques mais aussi ceux précédemment incorrectement diagnostiqués. Enfin, la caractérisation de l'arsenal thérapeutique efficace pourra être élargi aux autres maladies impliquant la voie NF-κB.

Cette revue met ainsi la lumière sur cette maladie auto-inflammatoire rare mais probablement sous-diagnostiquée, associée à des errances diagnostiques de plusieurs années, voire décennies [1–18].

1.1. Historique et physiopathologie

Le rôle de la protéine A20 dans l'inflammation est étudié depuis plus de 20 ans [19]. Cette protéine est composée de 8 domaines comprenant un domaine OTU et 8 domaines à doigts de zinc (ZnF). L'A20 est codée par le gène *TNFAIP3* localisé sur le chromosome 6 [20]. Elle est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire par ses actions prolifératives, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires [2,3]. Ses fonctions d'ubiquitination/déubiquitination des protéines permettent l'interruption de l'activation des protéines impliquées dans la voie canonique NF-kB (impliquant la voie de la protéine NF-kB Essential Modulator ou NEMO), la voie des MAP kinases, la voie de l'interféron et l'activation de l'inflammasome NLRP3 [19–23] (Fig. 2).

En pathologie humaine, des associations statistiques mendéliennes entre des variants du gène *TNFAIP3* et la survenue de maladies inflammatoires avaient été mises en évidence dès les années 2010. Ce fut notamment le cas de son association au lupus érythémateux disséminé, de la polyarthrite rhumatoïde et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [22–24]. Ce n'est finalement qu'en 2016 qu'a été décrite la première série de patients portant des mutations hétérozygotes avec perte de fonction de *TNFAIP3*, associées à une maladie inflammatoire [25].

Les variants pathogènes de ce gène provoquent chez le patient hétérozygote une perte partielle de fonction, ou haploinsuffisance, de la protéine A20. Dans la majorité des cas, ces variants conduisent à l'apparition d'un codon-stop prématuré. La transmission de la mutation est dominante et l'homozygotie est très probablement létale chez l'homme, comme montré chez la souris invalidée pour le gène TNFAIP3, qui décède d'une inflammation multi-systémique peu après la naissance [26]. Des cas de mosaïcisme gonadiques ont également été décrits [5]. Plus de 80 mutations de *TNFAIP3* sont actuellement recensées sur la plateforme Infevers (https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php? n = 26). Les mutations affectant à la fois la fonction du domaine OTU et des domaines ZnF semblent être associées à des phénotypes cliniques plus bruyants et des âges de survenue plus précoce [10]. A côté des formes héritées qui sont largement majoritaires (83 % des cas), des mutations *de novo* sont parfois décrites [27].

L'haploinsuffisance de la protéine A20 et l'hyperactivation conséquente de la voie du NF-KB est responsable à la fois d'une activation de l'immunité innée et adaptative. En effet, dans les cellules mononucléées, l'haploinsuffisance de A20 aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à (interleukine (IL)-1β, IL-18, IL-6, TNFα, IFN-γ et CXCL10) et contribue au phénotype autoinflammatoire, notamment la fièvre récurrente, l'aphtose et la folliculite [1,16]. De plus, l'hyperproduction basale d'IL-6 pourrait expliquer la persistance de symptômes chroniques en dehors des crises inflammatoires chez les patients [16]. Dans les lymphocytes B et T, le déficit en A20 est responsable d'une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, favorisant la perte de tolérance et la production d'auto-anticorps, associées à la survenue de manifestations auto-immunes telles que le lupus, la thyroïdite auto-immune et le diabète de type I [21].

1.2. Epidémiologie

Depuis 2016, 177 cas de patients avec mutation de *TNFAIP3* ont été décrits, enrichissant la description clinique d'une symptomatologie complexe et hétérogène [27]. Même si le HA20 apparait être une maladie ubiquitaire, la majorité des cas proviennent d'Asie, d'Europe et d'Amérique du Nord [28]. Le ratio Femme/Homme des sujets décrits est à 1.6 :1. La symptomatologie apparaît le plus souvent tôt dans la vie, mais une survenue à l'âge adulte est possible [1,8,14,17,29,30]. L'âge médian aux premiers symptômes et de 4 ans [0–35] [27].

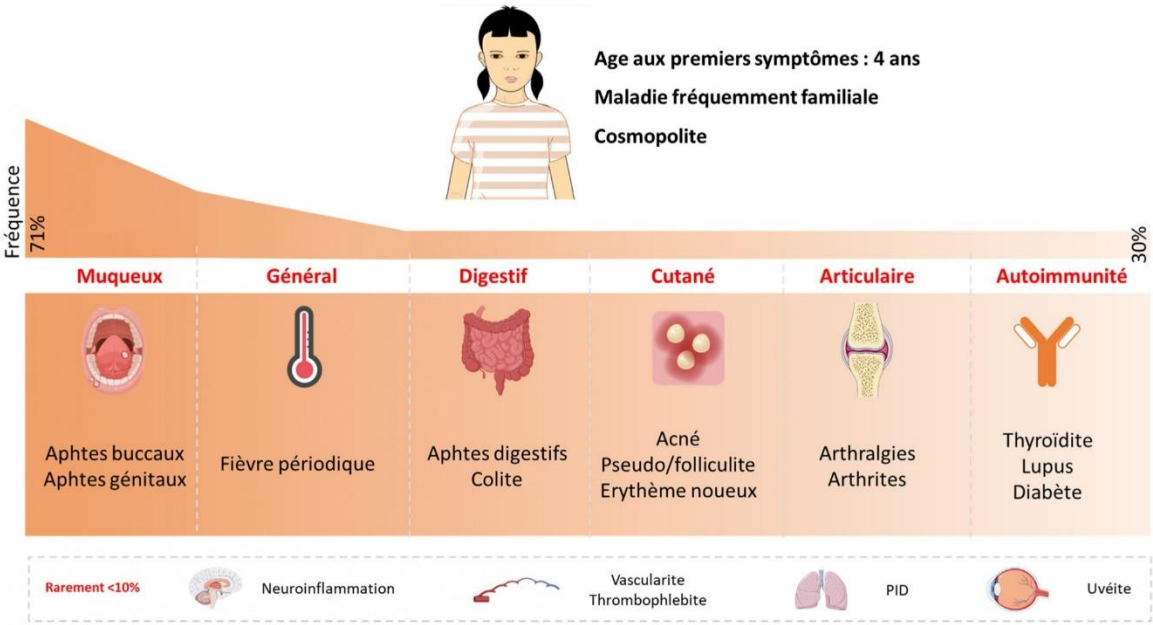


Fig. 1. Physiopathologie de l'haploinsuffisance de A20: exemple du récepteur au TNF. En condition physiologique (gauche), la protéine A20 ubiquitine la protéine RIPK1 ce qui entraine sa dégradation dans le protéasome (1). De plus, la protéine A20 rompt les chaines d'ubiquitines K48 grâce à ses propriétés de déubiquitination (2). Ces deux mécanismes inhibent la voie NF-κB et permettent un contrôle anti-inflammatoire (3). Dans l'haploinsuffisance de A20 (droite), la mutation de *TNFAIP3* est responsable d'une insuffisance de production de A20 fonctionnelle (4). Les protéines fonctionnelles restantes sont insuffisantes pour ubiquitiner la protéine RIPK1 (5) et déubiquitiner les chaines K48 (6), causant une poursuite de la réaction inflammatoire (7). TNFR : récepteur du TNF.

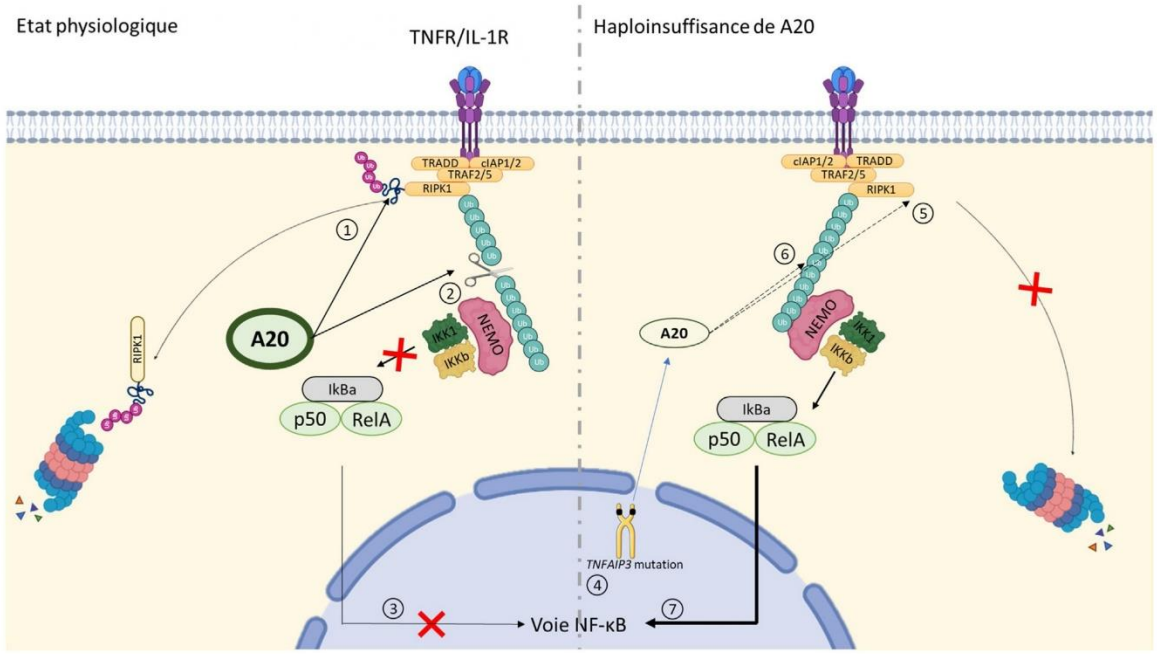


Fig. 2. Synthèse du phénotype clinique de l'haploinsuffisance de A20. Principales caractéristiques épidémiologiques de l'haploinsuffisance de A20. Les aphtes muqueux sont les atteintes les plus fréquentes, suivies de la fièvre, puis des atteintes digestives, cutanées, articulaires et de l'auto-immunité. Rarement, les patients présentent des atteintes neurologiques, vasculaires, pulmonaires et oculaires. PID : pneumopathie interstitielle diffuse. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0.

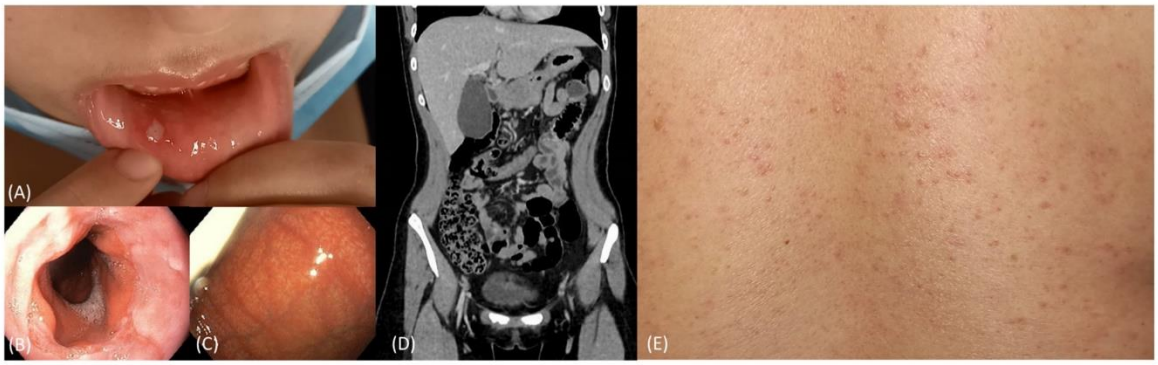


Fig. 3. Caractéristiques clinico-radiologiques associées à l'haploinsuffisance de A20. (A) Aphtose buccale. (B) Oesophagite grade A. (C) gastrite atrophique. (D) Colite transverse (E) Folliculite du dos. Le consentement des patients a été obtenu pour la publication des photographies et imageries.

1.3. Clinique

L'haploinsuffisance de A20 est une maladie systémique dont les atteintes cliniques sont diverses et hétérogènes, parfois au sein d'une même famille. Elle se présente le plus souvent sous la forme de période de crises inflammatoires entrecoupées de périodes d'accalmies sans régularité ni stéréotypie. Cependant, des atteintes d'organe prolongées, notamment cutanées articulaires ou digestives, peuvent constituer un fond chronique de la maladie. La bibliographie correspondant aux atteintes cliniques et aux traitements reçus est détaillée dans le fichier supplémentaire.

1.3.1. Signes généraux

La fièvre est présente chez la moitié des patients et peut prendre la forme d'une fièvre récurrente (de quelques jours à plusieurs semaines) ou d'un épisode de fièvre prolongée dite inexpliquée. Les épisodes de fièvres ne sont ni stéréotypés ni prévisibles. Les adénopathies sont décrites chez 14 % des patients et communément localisées à la région cervicale, ou être plus diffuses.

1.3.2. Signes cutanéomuqueux

L'atteinte cutanéomuqueuse est au premier plan. L'aphtose buccale récidivante est présente dans 69 % des cas. Elle peut se présenter comme une aphtose banale ou comporter des atypies de nombre (aphtes multiples). Il a initialement été décrit des évolutions cicatricielles comme caractéristiques de ces aphtes buccaux, ce qui n'a pas été confirmé dans les séries ou cas cliniques ultérieurs. L'aphtose buccale est associée à une aphtose génitale dans 50 % des cas, soit 1/3 des cas décrits. Cette dernière peut survenir dès l'enfance, ce qui la distingue des autres causes non inflammatoires d'aphtose génitale. Les autres atteintes cutanées sont plus hétérogènes. Seize pour cent des patients présentent une folliculite/acné du dos et du visage. Des rashs saumonés, des érythèmes aspécifiques et des érythèmes noueux sont également décrits. Un test Pathergique cutané positif a été décrit chez 17 % des 41 patients chez qui le test a été réalisé [1,5,8,14,31–33].

1.3.3. Signes digestifs

L'atteinte digestive du HA20 est présente chez 46 % des patients. Elle se caractérise par des douleurs abdominales chroniques pouvant être associées à une accélération du transit. Lorsqu'elles sont réalisées, les endoscopies digestives révèlent un ou plusieurs aphtes digestifs, le plus souvent sur une muqueuse par ailleurs macroscopiquement saine, qui se répartissent de l'œsophage à l'anus.

Dans 10 % des cas, Les endoscopies retrouvent une authentique colite, survenant le plus souvent très tôt dans la vie (avant 2 ans) et faisant poser le diagnostic de MICI à début très précoce (VEO-IBD). L'atteinte digestive est alors au premier plan, et peut se compliquer de lésions sténosantes. Les analyses histologiques peuvent révéler des stigmates évocateurs de MICI, telles que des distorsions cryptiques ou une infiltration aspécifique de lymphocytes et de polynucléaires éosinophiles. L'inflammation du tube digestif peut également se manifester par une gastrite atrophique sans maladie de Biermer, ou d'une oesophagite (Fig. 3).

Les atteintes inflammatoires périnéales sont présentes chez 15 % des patients et peuvent se manifester par des ulcérations, des abcès et des fistules périanales.

Des atteintes hépatiques sont présentes dans 10 % des cas, de sévérité hétérogène allant de la cholestase asymptomatique et fluctuante à la fibrose hépatique [13]. Elles sont associées à des infiltrations hépatiques inflammatoires à prédominance lymphocytaire.

1.3.4. Signes articulaires

Les atteintes articulaires concernent 31 % des patients, sous la forme de polyarthralgies/polyarthrites des grosses articulations (genoux, chevilles, poignets). Les articulations des mains et des pieds peuvent également être touchées. La présence de facteurs rhumatoïde n'a été décrite que chez un seul patient avec un tableau associant sacro-iliite et lupus [34]. Dans les autres cas, on ne retrouve ni d'anticorps anti-CCP, ni de facteur rhumatoïde.

1.3.5. Stigmates et manifestations auto-immuns associés

Des auto-anticorps sont présents chez 34 % des patients, pouvant être associés à des atteintes spécifiques ou non d'organes. La maladie auto-immune la plus fréquente est la thyroïdite auto-immune qui est retrouvée chez 14 % des patients. Des anticorps anti-nucléaires sont présents chez 18 % des patients, et peuvent être associés à des anticorps anti-ADN natifs et/ou anti-antigènes nucléaires solubles. Seize patients (9 %) ont présenté un authentique lupus érythémateux systémique. La glomérulonéphrite lupique a été décrite chez 7 patients (44 % des patients avec HA20-lupus). Les cytopénies auto-immunes affectent 6 % des patients, incluant l'anémie hémolytique auto-immune et le purpura thrombopénique immunologique. Enfin, 3 % des patients présentent un diabète de type I associé à des anticorps anti-GAD.

1.3.6. Autres atteintes rares (<10 %)

Les atteintes ophtalmologiques sont rares dans l'haploinsuffisance de A20. Elles incluent principalement des uvéites qui peuvent être antérieures, postérieures, ou totales (8 %). Les vascularites rétiniennes sont rares (<2 %) [35].

Des atteintes pulmonaires ont été décrites chez 6 % des patients sous la forme d'une pneumopathie interstitielle diffuse non fibrosante.

Un déficit immunitaire symptomatique est décrit dans environ 5 % des cas de HA20, consistant principalement en un déficit de l'immunité humorale. Dans les formes les plus sévères, un traitement par immunoglobulines substitutives a été utilisé avec succès.

Les atteintes cardio-vasculaires incluent la péricardite (3 %), la thrombose veineuse (3 %) et la vascularite/thrombose artérielle (3 %).

Les atteintes neurologiques sont rarement décrites dans le HA20. Des méningites aseptiques et des granulomatoses inflammatoires ont été décrites chez 2 % des patients. Moins de 2 % des patients ont présenté un infarctus cérébral pédiatrique.

Quatre cas de syndrome d'activation macrophagique ont été décrits chez des enfants. Il s'agissait d'une manifestation inaugurale de la maladie chez deux nourrissons de moins de six mois. Chez les deux autres patients, il était survenu après plusieurs années de traitement d'une maladie proche d'une maladie de Still.

1.4. Complications

L'amylose AA n'est pas une complication décrite du HA20 à ce jour. En effet, un seul cas d'amylose AA a été rapporté chez un patient avec une mutation hétérozygote de *TNFAIP3* de signification indéterminée présentant par ailleurs un déficit en ADA2 caractérisé [36]. La causalité de la mutation de *TNFAIP3* dans cette complication rare de l'inflammation chronique n'était donc pas prouvée dans ce cas, ce d'autant qu'il existe d'authentiques cas d'amylose AA chez des patients avec déficit en ADA2 [37].

Le décès de 4 enfants atteints de HA20 a été rapporté ; l'un de ces décès à l'âge de 8 ans était secondaire à une hémorragie pulmonaire suite à une érosion de l'artère carotide en regard d'une ulcération tonsillaire [1] ; un autre patient est décédé d'une hémorragie cérébrale au cours d'un syndrome d'activation macrophagique [38] et les deux derniers d'une tempête cytokinique, dont un quelques heures après une greffe de cellules souches hématopoïétiques [39]. Enfin, un adulte atteint d'un HA20 non sévère est décédé de cause inconnue [40].

1.4.1. Examens complémentaires

Dans la plupart des cas, il existe un syndrome inflammatoire avec une élévation de la CRP au moment des épisodes fébriles. L'inflammation biologique peut néanmoins être absente lors des périodes d'accalmies même lorsque certains symptômes chroniques persistent (aphtes, douleurs abdominales). L'élévation de la CRP est souvent franche avec une médiane de 58 mg/l. La signature interféron est positive en période critique (médiane 42.62 [9,4–51,7]), et peut se négativer en dehors des poussées inflammatoires. Le bilan auto-immunitaire peut retrouver des autoanticorps anti-nucléaires, anti-ADN natifs et anti-antigènes nucléaires solubles. Des anticorps spécifiques d'organes peuvent également être positifs, avec ou sans signification clinique (anticorps anti-TSH, anti-TRAK, anti-GAD).

1.4.2. Diagnostics différentiels

La connaissance des diagnostics différentiels du HA20 permettra à la fois d'améliorer la démarche diagnostique des patients non précédemment diagnostiqués, mais aussi de repérer des atypies chez les patients ayant reçus un diagnostic alternatif, pouvant finalement faire évoquer un HA20. En effet, dans la littérature, près de la moitié des patients avaient reçus un ou plusieurs diagnostics de maladie inflammatoire avant le diagnostic de HA20, notamment la maladie de Behçet, le lupus érythémateux systémique, le syndrome de PFAPA (fièvre périodique - stomatite aphteuse - pharyngite–adénopathie), l'arthrite juvénile idiopathique l'aphtose idiopathique et la maladie de Crohn [27].

Le principal diagnostic différentiel systémique du HA20 est la maladie de Behçet du fait de l'association d'une aphtose typiquement bipolaire et de lésions (pseudo-)folliculitiques. Devant ce tableau clinique, plusieurs caractéristiques permettent de suspecter un HA20. La présence d'une symptomatologie familiale au premier degré ainsi que son début à un âge précoce doivent fortement faire évoquer une maladie inflammatoire monogénique telle que le HA20. De plus la présence d'une atteinte digestive, particulièrement d'aphtes digestifs, décrites dans seulement 10 à 15 % des cas de maladie de Behçet, pourraient orienter vers un HA20 [41]. A l'inverse, la présence d'une atteinte ophtalmologique floride et sévère avec vascularite rétinienne pourrait plutôt orienter vers une maladie de Behçet, sans pour autant éliminer formellement le HA20.

La maladie de Crohn fait partie des diagnostics différentiels du HA20 du fait des aphtes buccaux et de l'atteinte digestive. Si les atteintes extra-digestives sont possibles dans la maladie de Crohn, les lésions cutanées sont représentées par des lésions pseudo-tumorales et végétantes et le *pyoderma gangrenosum*, bien que l'érythème noueux soit décrit dans les deux pathologies [42]. De plus, les ulcérations génitales dans la maladie de Crohn se distinguent de celles du HA20 par son aspect linéaire en coup de poignard.

Le HA20 est associé à un authentique lupus dans 10 % des cas et fait partie des causes de lupus monogénique. L'un des défis sera donc de distinguer les lupus « classiques » de ceux associés à un HA20. La présence d'une histoire familiale auto-immune/autoinflammatoires ainsi que le début pédiatrique pourraient faire suspecter un lupus monogénique [43]. Les patients associant HA20 et lupus semblent se caractériser par une néphrite lupique et une aphtose buccale fréquente (50 % et 40 % des patients décrits), contrairement au syndrome de Raynaud, qui n'a été décrit que chez un de ces patients.

Les diagnostics différentiels incluent par ailleurs les autres maladies autoinflammatoires monogéniques associées à une aphtose mono- ou bipolaire. D'autres mutations sur la voie canonique NF-kB, moins fréquentes, ont une présentation similaire « Behçet-like » à début précoce et souvent associées à un tableau de MICI précoce. On peut citer principalement celles impliquant le gène *RELA* et les mutations hétérozygotes, avec défaut de clivage *(CRIA), et homozygotes de RIPK1* [44–52]. Les mutations hétérozygotes de *NFKB1* peuvent se distinguer du HA20 par la présence d'une hypogammaglobulinémie associée. Des déficits en ELF-4 et des mutations de STAT1 ont également été décrites chez des patients souffrant de forme pédiatrique de syndrome de Behçet [53,54]. Par ailleurs une aphtose buccale émaille fréquemment l'évolution des autres fièvres récurrentes historiques : le déficit en mévalonate kinase, au cours duquel elle s'associe à une aphtose génitale et à des lymphadénopathies cervicales douloureuses très évocatrices du diagnostic. Les cryopyrinopathies (CAPS) se distinguent par une urticaire au froid et des troubles neurosensoriels. De même, la fièvre méditerranéenne familiale associe une aphtose buccale des crises douloureuses abdominales fébriles, qui peuvent la caractériser [55]. Des ulcérations buccales se voient aussi au cours de maladies autoinflammatoires monogéniques encore plus rares, associées à une présentation hématologique au premier plan avec déficit immunitaire et/ou cytopénies, telles que les mutations de TRNT1, WDR1 ou HOIP dont l'expression débute dès la période néonatale [56,57]. Avec le développement des techniques de séquençages ADN, de nouvelles maladies monogéniques associée à une aphtose sont régulièrement découvertes.

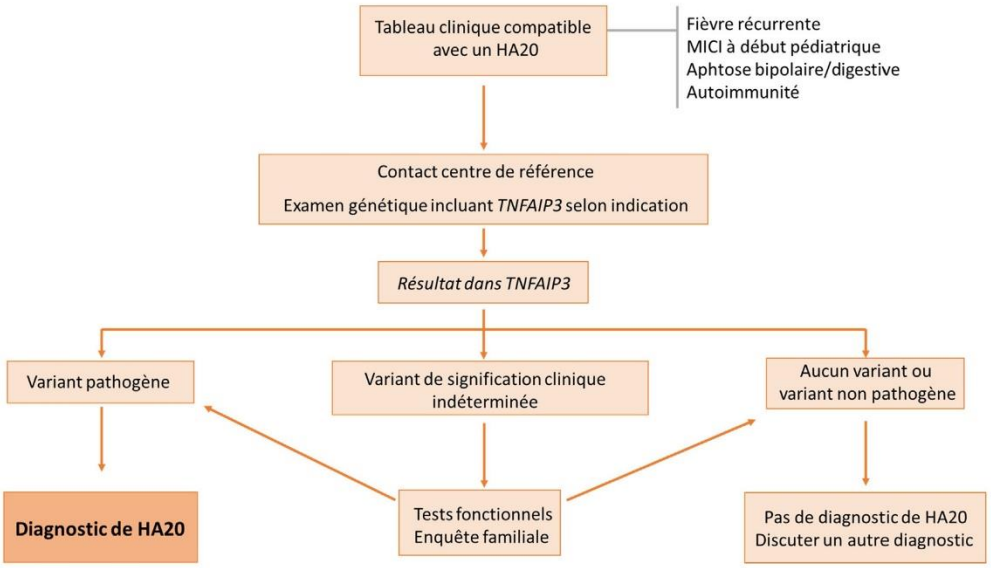


Fig. 4. Démarche diagnostique de l'haploinsuffisance de A20.

1.4.3. Diagnostic

Le diagnostic de HA20 est posé devant la mise en évidence d'une mutation hétérozygote de *TNFAIP3* responsable d'une perte de fonction de A20 (Fig. 4).

La recherche génétique doit être réalisée en relation avec un centre de référence maladies autoinflammatoires/maladies immunitaire (CEREMAIA, FAI2r). En effet, de nombreux remaniements sont décrits dans *TNFAIP3* et les manifestations cliniques peuvent être aspécifiques d'une maladie dysimmunitaire. En conséquence, En l'absence de HA20 prouvé dans la famille, le séquençage ciblé de *TNFAIP3* par la méthode Sanger n'est pas recommandé en première intention et le choix de l'examen génétique (Panel NGS, séquençage de l'exome ou du génome) dépendra de la présentation clinique et des techniques disponibles [58].

La mise en évidence d'une mutation de *TNFAIP3* n'est pas suffisante pour poser le diagnostic de HA20. En effet, à ce jour, seulement 57 des 80 mutations recensées sur la plateforme infevers (https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=26) sont classifiées comme probablement pathogéniques (classe IV) ou pathogénique (classe V). Ainsi, des tests fonctionnels mettant en évidence la perte de fonction de A20 sont recommandés en cas d'identification de variants de signification clinique indéterminée (classe III). De plus, le séquençage de sujets atteints et non atteints dans la famille devra être réalisé afin de mettre en évidence la ségrégation familiale. L'enquête familiale devra rechercher minutieusement des signes compatibles avec le HA20 chez des sujets parfois habitués à des symptômes qu'ils peuvent considerer comme normaux.

Le diagnostic de HA20 doit être suspecté devant une maladie inflammatoire récurrente débutant dans l'enfance associée à une aphtose buccale ou bipolaire. De plus, le diagnostic d'une MICI à début précoce pourrait faire évoquer un HA20. Enfin, la présence de symptômes inflammatoires compatibles à caractère familial suggère une maladie monogénique. Finalement, aucun signe n'est parfaitement sensible ou pathognomonique du HA20 et la suspicion se fera sur un faisceau d'arguments anamnestiques et physiques. Le diagnostic à l'âge adulte, chez des patients présentant des symptômes depuis l'enfance, est fréquent puisque la maladie est de découverte récente. Cependant, un début des premiers symptômes à l'âge adulte a été décrit chez 5 % des patients et ne doit donc pas faire éliminer le diagnostic.

1.4.4. Traitements

Le traitement du HA20 n'est pas codifié du fait de la rareté de la maladie et de l'hétérogénéité des atteintes cliniques. Les traitements utilisés sont le plus souvent transposés d'autres maladies inflammatoires et orientés par les symptômes.

La colchicine et la thalidomide peuvent être utilisés en prévention des aphtes buccaux mais leur efficacité semble être partielle et parfois transitoire selon les séries. En cas de signes lupiques associé, un traitement par hydroxychloroquine est le plus souvent adjoint. Les corticoïdes par voie orale et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont utilisés dans les poussées inflammatoires systémiques et articulaires. Les traitements de fonds, notamment les anti-TNF et le méthotrexate, sont utilisées chez les patients avec atteinte articulaire et systémique sévère. Les patients avec atteinte digestive sont traités selon les principes de traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, incluant le 5-ASA, les anti-TNF et la thalidomide, avec de bons résultats rapportés. Le traitement des maladies auto-immunes associées suit le traitement habituel de la maladie ou de l'atteinte d'organe, notamment la néphropathie lupique à condition d'une preuve histologique et de marqueurs auto-immuns spécifiques. Plusieurs patients ayant présenté une signature interféron positive ont pu bénéficier d'un traitement par inhibiteur de JAK, avec succès sur des atteintes neurologiques et articulaires. Enfin, 3 patients ont reçu une allogreffe et 1 une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec des résultats mitigés, notamment 2 rechutes partielles malgré un chimérisme donneur complet et un décès post-allogreffe rapide.

2. Conclusion

Le HA20 est une maladie inflammatoire génétique rare de découverte récente. Ses mécanismes physiopathologiques restent incomplètement élucidés, le rôle de la mort cellulaire programmée médiée par le TNF reste à explorer. Son spectre clinique est large, et sa présentation clinique parfois aspécifique d'une maladie inflammatoire chronique, rendant l'analyse génétique indispen-

sable au diagnostic. Quoique rare, l'intérêt épidémio-clinique de cette affection est multiple avec notamment : l'augmentation du champ génétique d'affections plus fréquentes, dont principalement l'aphtose idiopathique, la maladie de Behçet, les MICI et certaines formes de lupus systémique ; la correction et la réduction de la durée des errances diagnostiques des patients avec aphtose buccale et/ou génitale mais aussi l'accroissement des connaissances physiopathologiques de la voie du NF-KB.

Protection des droits des sujets humains et animaux

Les auteurs déclarent que la conduite de la recherche décrite dans cet article est en accord avec la Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale révisée en 2013 concernant les expérimentations sur les patients ou sujets, ainsi qu'avec la directive européenne 2010/63/EU concernant les expérimentations animales.

Consentement éclairé et confidentialité des données

Les auteurs déclarent avoir obtenu le consentement éclairé écrit des patients et/ou des sujets auxquels ils font référence dans cet article. Les auteurs déclarent également que tous les détails personnels du (des) patient(s) et/ou des volontaires ont été retirés.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Source de financement

Q.R. est bénéficiaire d'une bourse MD-PhD de l'Institut Imagine (financé par la Fondation Bettencourt Schueller) et d'une bourse de la Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI).

supplément en ligne. Matériel complémentaire

Le matériel complémentaire accompagnant la version en ligne de cet article est disponible sur http://www.sciencedirect.com et https://doi.org/10.1016/j.revmed.2023.12.004.

Références

[1] Aeschlimann FA, Batu ED, Canna SW, Go E, Gül A, Hoffmann P, et al. A20 haploinsufficiency (HA20): clinical phenotypes and disease course of patients with a newly recognised NF-kB-mediated autoinflammatory disease. Ann Rheum Dis 2018;77:728–35.
[2] Ohnishi H, Kawamoto N, Seishima M, Ohara O, Fukao T. A Japanese family case with juvenile onset Behçet's disease caused by TNFAIP3 mutation. Allergol Int 2017;66:146–8.
[3] Berteau F, Rouviere B, Delluc A, Nau A, Le Berre R, Sarrabay G, et al. Autosomic dominant familial Behçet disease and haploinsufficiency A20: A review of the literature. Autoimmun Rev 2018;17:809–15.
[4] Rajamäki K, Keskitalo S, Seppänen M, Kuismin O, Vähäsalo P, Trotta L, et al. Haploinsufficiency of A20 impairs protein-protein interactome and leads into caspase-8-dependent enhancement of NLRP3 inflammasome activation. RMD Open 2018;4:e000740.
[5] Kadowaki T, Ohnishi H, Kawamoto N, Hori T, Nishimura K, Kobayashi C, et al. Haploinsufficiency of A20 causes autoinflammatory and autoimmune disorders. J Allergy Clin Immunol 2018;141:1485–8, e11.
[6] Lawless D, Pathak S, Scambler TE, Ouboussad L, Anwar R, Savic S. A case of adult-onset still's disease caused by a novel splicing mutation in TNFAIP3 successfully treated with tocilizumab. Front Immunol 2018;9:1527.
[7] Tsuchida N, Kirino Y, Soejima Y, Onodera M, Arai K, Tamura E, et al. Haploinsufficiency of A20 caused by a novel nonsense variant or entire deletion of TNFAIP3 is clinically distinct from Behçet's disease. Arthritis Res Ther 2019;21:137.
[8] Horita N, Gül A, Aksentijevich I, Kastner D, Remmers EF. Pseudodominance of autoinflammatory disease in a single Turkish family explained by co-inheritance of haploinsufficiency of A20 and familial Mediterranean fever. Clin Exp Rheumatol 2019;37(Suppl 121):89–92.
[9] He T, Huang Y, Luo Y, Xia Y, Wang L, Zhang H, et al. Haploinsufficiency of A20 Due to Novel Mutations in TNFAIP3. J Clin Immunol 2020.
[10] Chen Y, Ye Z, Chen L, Qin T, Seidler U, Tian D, et al. Association of Clinical Phenotypes in Haploinsufficiency A20 (HA20) With Disrupted Domains of A20. Front Immunol 2020:11.
[11] Kadowaki S, Hashimoto K, Nishimura T, Kashimada K, Kadowaki T, Kawamoto N, et al. Functional analysis of novel A20 variants in patients with atypical inflammatory diseases. Arthritis Res Ther 2021;23:52.
[12] Shaheen ZR, Williams SJA, Binstadt BA. Case Report: A Novel TNFAIP3 Mutation Causing Haploinsufficiency of A20 With a Lupus-Like Phenotype. Front Immunol 2021:12.
[13] Deshayes S, Bazille C, El Khouri E, Kone-Paut I, Giurgea I, Georgin-Lavialle S, et al. Chronic hepatic involvement in the clinical spectrum of A20 haploinsufficiency. Liver Int 2021;41:1894–900.
[14] Tian Y, Wu B, Peng L, Wang J, Shen M. Three Chinese pedigrees of A20 haploinsufficiency: clinical, cytokine and molecular characterization. Front Immunol 2022;13:955079.
[15] Jo KJ, Park SE, Cheon CK, Oh SH, Kim SH. Haploinsufficiency A20 misdiagnosed as PFAPA syndrome with Kikuchi disease. Clin Exp Pediatr 2023;66:82–4.
[16] El Khouri E, Diab F, Louvrier C, Assrawi E, Daskalopoulou A, Nguyen A, et al. A critical region of A20 unveiled by missense TNFAIP3 variations that lead to autoinflammation. eLife 2023;12:e81280.
[17] Harris AL, Blackburn PR, Richter JE, Gass JM, Caulfield TR, Mohammad AN, et al. Whole exome sequencing and molecular modeling of a missense variant in TNFAIP3 that segregates with disease in a family with chronic urticaria and angioedema. Case Rep Genet 2018;2018:6968395.
[18] Debeljak M, Blazina S, Brecelj J, Avčin T, Toplak N. The spectrum of clinical presentation in haploinsufficiency of A20; a case report of a novel mutation in TNFAIP3 gene. Front Pediatr 2023:11.
[19] Jäättelä M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. J Immunol 1996;156:1166–73.
[20] Vereecke L, Beyaert R, Loo Van G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. Trends Immunol 2009;30:383–91.
[21] Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. Trends Immunol 2014;35:22–31.
[22] Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. Nat Genet 2008;40:1216–23.
[23] Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, et al. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. Nat Genet 2008;40:1062–4.
[24] Lodolce JP, Kolodziej LE, Rhee L, Kariuki SN, Franek BS, McGreal NM, et al. African-Derived Genetic Polymorphisms in TNFAIP3 Mediate Risk for Autoimmunity. J Immunol 2010;184:7001–9.
[25] Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat Genet 2016;48:67–73.
[26] Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Science 2000;289:2350–4.
[27] Elhani I, Riller Q, Boursier G, Hentgen V, Rieux-Laucat F, Georgin-Lavialle S. (In press) A20 haploinsufficiency: A systematic review of 177 cases. J Invest Dermatol 2023.
[28] Kadowaki T, Kadowaki S, Ohnishi H. A20 Haploinsufficiency in East Asia. Front Immunol 2021:12.
[29] Niwano T, Hosoya T, Kadowaki S, Toyofuku E, Naruto T, Shimizu M, et al. An adult case of suspected A20 haploinsufficiency mimicking polyarteritis nodosa. Rheumatol Oxf Engl 2022;61:e337–40.
[30] Duan R, Liu Q, Li J, Bian X, Yuan Q, Li Y, et al. A De Novo Frameshift Mutation in TNFAIP3 Impairs A20 Deubiquitination Function to Cause Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. J Clin Immunol 2019;39:795–804.
[31] Papadopoulou C, Omoyinmi E, Standing A, Pain CE, Booth C, D'Arco F, et al. Monogenic mimics of Behçet's disease in the young. Rheumatol Oxf Engl 2019;58:1227–38.
[32] Gans MD, Wang H, Moura NS, Aksentijevich I, Rubinstein A. A20 haploinsufficiency presenting with a combined immunodeficiency. J Clin Immunol 2020;40:1041–4.
[33] Girardelli M, Valencic E, Moressa V, Margagliotta R, Tesser A, Pastore S, et al. Genetic and immunologic findings in children with recurrent aphthous stomatitis with systemic inflammation. Pediatr Rheumatol Online J 2021;19:70.
[34] Su G, Lai J, Zhu J, Zhang D, Hou J, Xu Y, et al. Analysis of five cases of monogenic lupus related to primary immunodeficiency diseases. Inflamm Res 2021;70:1211–6.
[35] Maccora I, Marrani E, Mastrolia MV, Abu-Rumeileh S, Maniscalco V, Fusco E, et al. Ocular involvement in monogenic autoinflammatory disease. Autoimmun Rev 2021;20:102944.
[36] Amikishiyev S, Ince B, Bektas M, Yalçinkaya Y, Artim-Esen B, Inanc M, et al. Ab1300 Aa amyloidosis in a patient with mutations in Both Ada2 and a20 Genes. Ann Rheum Dis 2022;81:1756–7.
[37] Pardinhas C, Santo G, Escada L, Rodrigues J, Almeida MR, Alves R, et al. A case of deficiency of adenosine deaminase 2: 28 years of diagnostic challenges. Case Rep Nephrol Dial 2021;11:340–7.
[38] Aslani N, Asnaashari K, Parvaneh N, Shahrooei M, Sotoudeh-Anvari M, Shahram F, et al. TNFAIP3 mutation causing haploinsufficiency of A20 with a hemophagocytic lymphohistiocytosis phenotype: a report of two cases. Pediatr Rheumatol 2022;20:78.

[39] Wu CW, Sasa G, Salih A, Nicholas S, Vogel TP, Cahill G, et al. Complicated diagnosis and treatment of HA20 due to contiguous gene deletions involving 6q23.3. J Clin Immunol 2021;41:1420–3.
[40] Dong X, Liu L, Wang Y, Yang X, Wang W, Lin L, et al. Novel heterogeneous mutation of TNFAIP3 in a Chinese patient with behçet-like phenotype and persistent EBV Viremia. J Clin Immunol 2019;39:188–94.
[41] Valenti S, Gallizzi R, De Vivo D, Romano C. Intestinal Behçet and Crohn's disease: two sides of the same coin. Pediatr Rheumatol 2017;15:33.
[42] Greuter T, Navarini A, Vavricka SR. Skin manifestations of inflammatory bowel disease. Clin Rev Allergy Immunol 2017;53:413–27.
[43] Lo MS, Monogenic, Lupus. Curr Rheumatol Rep 2016;18:71.
[44] Li Y, Führer M, Bahrami E, Socha P, Klaudel-Dreszler M, Bouzidi A, et al. Human RIPK1 deficiency causes combined immunodeficiency and inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci US A 2019;116:970–5.
[45] An JW, Pimpale-Chavan P, Stone DL, Bandeira M, Dedeoglu F, Lo J, et al. Case report: Novel variants in RELA associated with familial Behcet's-like disease. Front Immunol 2023;14:1127085.
[46] Lorenzini T, Fliegauf M, Klammer N, Frede N, Proietti M, Bulashevska A, et al. Characterization of the clinical and immunologic phenotype and management of 157 individuals with 56 distinct heterozygous NFKB1 mutations. J Allergy Clin Immunol 2020;146:901–11.
[47] Li J, Lei W-T, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Lyu B, et al. Biochemically deleterious human NFKB1 variants underlie an autosomal dominant form of common variable immunodeficiency. J Exp Med 2021;218:e20210566.
[48] Badran YR, Dedeoglu F, Leyva Castillo JM, Bainter W, Ohsumi TK, Bousvaros A, et al. Human RELA haploinsufficiency results in autosomal-dominant chronic mucocutaneous ulceration. J Exp Med 2017;214:1937–47.
[49] Moriya K, Nakano T, Honda Y, Tsumura M, Ogishi M, Sonoda M, et al. Human RELA dominant-negative mutations underlie type I interferonopathy with autoinflammation and autoimmunity. J Exp Med 2023;220:e20212276.
[50] Adeeb F, Dorris ER, Morgan NE, Lawless D, Maqsood A, Ng WL, et al. A novel RELA truncating mutation in a familial behçet's disease–like mucocutaneous ulcerative condition. Arthritis Rheumatol 2021;73:490–7.
[51] Comrie WA, Faruqi AJ, Price S, Zhang Y, Rao VK, Su HC, et al. RELA haploinsufficiency in CD4 lymphoproliferative disease with autoimmune cytopenias. J Allergy Clin Immunol 2018;141:1507–10, e8.
[52] Lalaoui N, Boyden SE, Oda H, Wood GM, Stone DL, Chau D, et al. Mutations that prevent caspase cleavage of RIPK1 cause autoinflammatory disease. Nature 2020;577:103–8.
[53] Tyler PM, Bucklin ML, Zhao M, Maher TJ, Rice AJ, Ji W, et al. Human autoinflammatory disease reveals ELF4 as a transcriptional regulator of inflammation. Nat Immunol 2021.
[54] Aluri J, Schmitt EG, Du M, STAT1 Behçet's working group, Cooper MA. STAT1 Gain-of-Function Leading to Clinical Behçet's Syndrome. J Clin Immunol 2023.
[55] Bader-Meunier B, Florkin B, Sibilia J, Acquaviva C, Hachulla E, Grateau G, et al. Mevalonate kinase deficiency: a survey of 50 patients. Pediatrics 2011;128:e152–9.
[56] Oda H, Beck DB, Kuehn HS, Sampaio Moura N, Hoffmann P, Ibarra M, et al. Second case of HOIP deficiency expands clinical features and defines inflammatory transcriptome regulated by LUBAC. Front Immunol 2019:10.
[57] Standing ASI, Malinova D, Hong Y, Record J, Moulding D, Blundell MP, et al. Autoinflammatory periodic fever, immunodeficiency, and thrombocytopenia (PFIT) caused by mutation in actin-regulatory gene WDR1. J Exp Med 2017;214:59–71.
[58] Shinar Y, Ceccherini I, Rowczenio D, Aksentijevich I, Arostegui J, Ben-Chétrit E, et al. ISSAID/EMQN best practice guidelines for the genetic diagnosis of monogenic autoinflammatory diseases in the next-generation sequencing era. Clin Chem 2020;66:525–36.

Article III

Functional changes in the gut microbiota are associated with the intestinal phenotype in A20 haploinsufficiency

Inès ELHANI, Marius BREDON, Magali SVRCEK, Aurore DESMONS, Lionel ARRIVE, Céline BAZILLE, Antoine LEFEVRE, Achille AOUBA, Hélène BLASCO, Camille DUPUIS, Patrick EMOND, Diana ENEA, Pranvera KRASNIQI, Claire de MOREUIL, Iria ALONSO, Laura CREUSOT, Cyriane OEUVRAY, Dominique RAINTEAU, Antonin LAMAZIERE, Nathalie ROLHION, Harry SOKOL, Sophie GEORGIN-LAVIALLE.

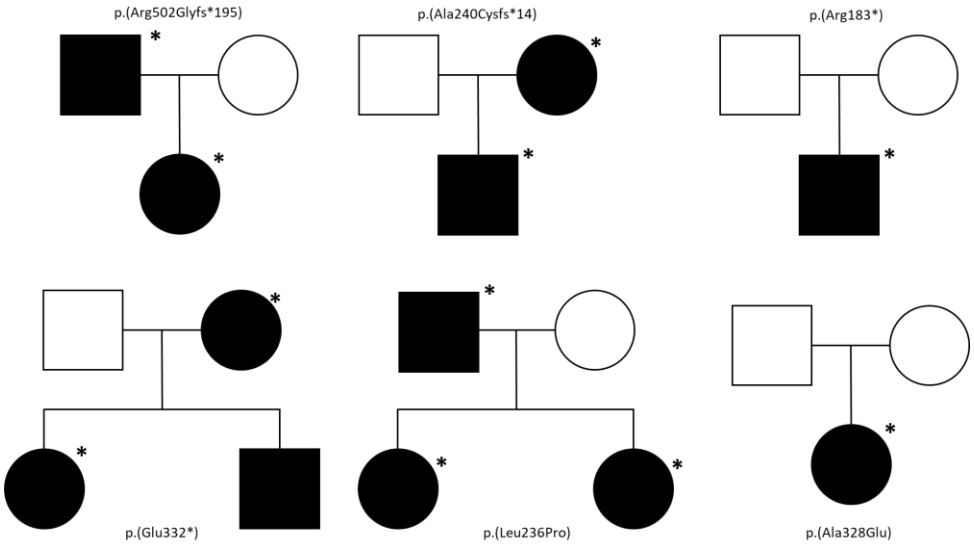
Soumis pour publication dans les *Annals of Rheumatic diseases*

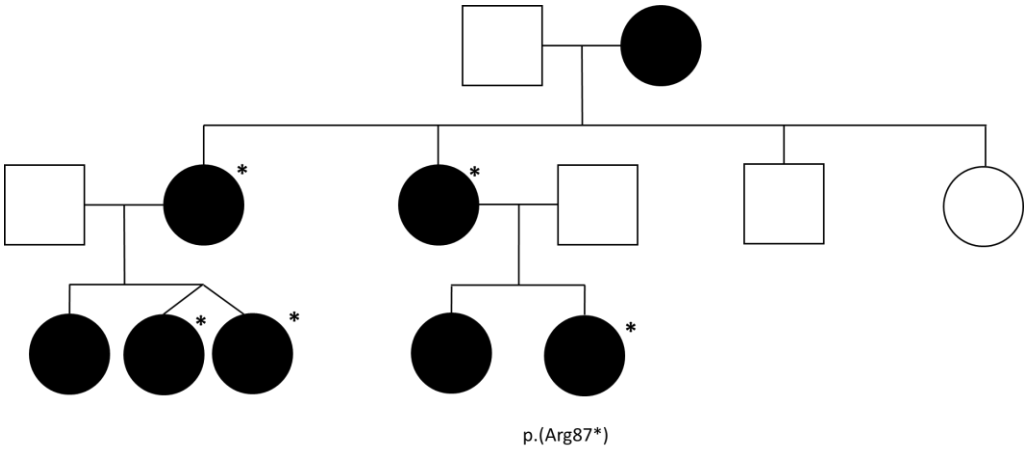
Cette partie de mes travaux de thèse est en cours de soumission dans les *Annals of Rheumatic diseases*.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à décrire les atteintes digestives de la cohorte française de patients atteintes d'haploinsuffisance de A20 (CARHA20) dont je suis l'investigateur principal, et à les mettre en relation avec la composition du microbiote intestinal des patients et des métabolites qui en dérivent.

Nous avons obtenu les accords éthiques permettant la réalisation de ce travail (Comité de protection des personnes Sud-Est III, 2022-A02073-40 et comité d'éthique de la recherche, Sorbonne Université) dont le promoteur est l'AP-HP.

Nous avons inclus 16 patients issus de 7 familles (Figure 15) présentes en France. Les pièces histologiques de tube digestif et de foie collectés dans le cadre du soin courant ont été analysés au sein des laboratoires d'anatomopathologie de l'hôpital Saint-Antoine (Paris) et du Centre hospitalier universitaire de Caen. Les IRM hépatiques réalisées dans le cadre du soin courant ont été réexaminées à la recherche de signe radiologique d'hépatopathie chronique au sein du service de radiologie de l'hôpital Tenon. Les selles des patients ont été collectées puis analysées afin de déterminer la composition du microbiote intestinal ainsi que les profils des acides biliaires, des acides gras à chaines courtes et des métabolites du tryptophane (Centre de Recherche de Saint-Antoine et Centre Hospitalier Universitaire de Tours).





15-Figure 15. Arbres généalogiques des 7 familles atteintes d'haploinsuffisance de A20.

Cette figure illustre les pédigrées de 7 familles affectées par l'haploinsuffisance A20. Les hommes sont représentés par des carrés, et les femmes par des cercles. Les individus atteints par la maladie sont indiqués par des formes noires pleines. Les patients inclus dans l'étude sont marqués d'une étoile (*). Les mutations dans le gène *TNFAIP3* sont identifiées sous chaque arbre généalogique.

Nous avons déterminé que les patients présentaient fréquemment des atteintes digestives, incluant l'aphtose buccale et les douleurs abdominales. 44% des patients ont déjà présenté des ulcères digestifs et 25% ont présenté au moins un épisode de colite.

L'analyse histologique a mis en évidence une atteinte inflammatoire du colon et de l'estomac définie par un infiltrat neutrophilique et lympho-plasmocytaire. Contrairement à ce qui était attendu, les patients ne présentaient pas de diminution de l'expression de Muc2. Radiologiquement, les patients présentaient des stigmates aspécifiques d'hépatopathie chronique, incluant l'hépatomégalie, une hétérogénéité du parenchyme hépatique et de l'hypertension portale.

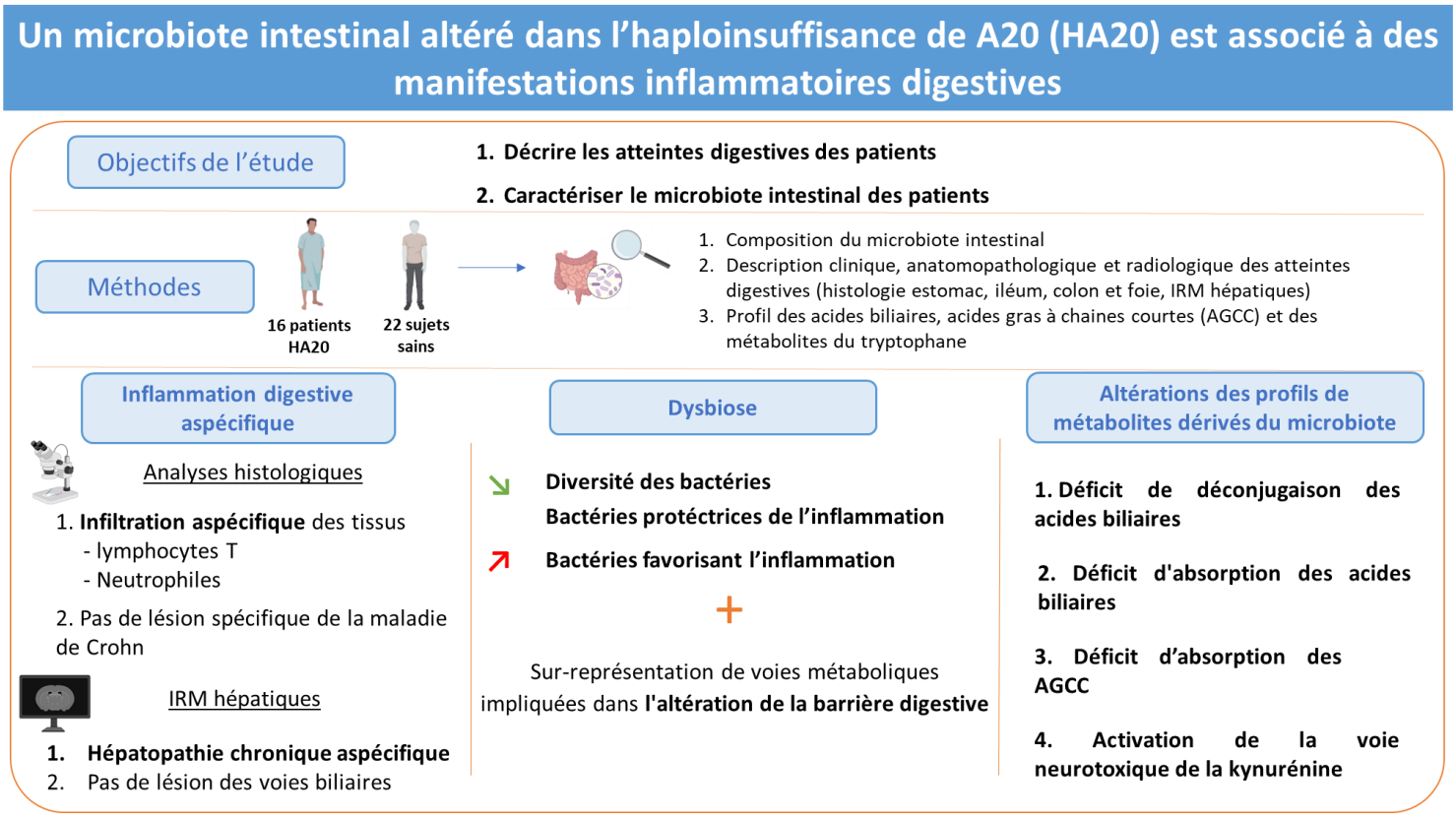
L'analyse du microbiote intestinal mettait en évidence une dysbiose avec une diminution de la richesse microbienne et un profil significativement diffèrent de celui des sujets sains. Deux espèces bactériennes déjà connues pour avoir des effets pro-inflammatoires étaient surreprésentées chez les patients : *Ruminococcus gnavus* et Blautia *Caecimuris*. A l'inverse, 28 espèces bactériennes étaient sous représentées, qui sont impliquées dans la bonne santé digestive (production du butyrate et le renforcement de la barrière digestive).

L'analyse fonctionnelle du microbiote intestinal a mis en évidence un réseau de voies métaboliques significativement différent chez les patients par rapport aux sujets sains, impliquant notamment une augmentation des séquences génomiques liées au métabolisme du sulfure, à la dégradation de la L-thréonine et de la L-arginine, dont des dysfonctionnements sont associés à une altération de la barrière digestive.

Le profil des acides biliaires mettait en évidence un déficit de déconjugaison et de désulfation des acides biliaires, ainsi qu'un déficit de transformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires chez les patients atteints d'haploinsuffisance de A20. De plus, les patients présentaient une élévation de la clairance fécale des AGCC suggérant un déficit d'absorption de ces métabolites.
Enfin l'analyse des métabolites dérivés du tryptophane alimentaire suggéraient une activation de la voie de la kynurénine pour la production des dérivés neurotoxiques acide-3-OH-Anthranilique et acide quinolinique.

Ce travail a ainsi permis de faire un état des lieux des atteintes digestives et hépatiques des patients avec HA20, qui constituent l'un de leur symptôme principal. L'augmentation de bactéries pro-inflammatoires et la diminution de bactéries anti-inflammatoires pourraient participer au phénotype inflammatoire digestif et systémique des patients, directement et par le biais d'une modulation des métabolites dérivés du tryptophane. D'autres études ultérieures prospectives pourraient étudier l'intérêt de thérapies de modulation du microbiote sur les symptômes digestifs et l'état inflammatoire des patients avec HA20 (Figure 8).

Les résultats de ce travail ont été présentés en communication orale lors du congrès de la Société Nationale de Médecine Interne en Décembre 2023 et aux journées nationales de recherche en Rhumatologie Pédiatrique en Décembre 2022, ainsi qu'en poster affiché lors du congrès annuel de la Société Internationale des Maladies Auto-inflammatoires Systémiques (ISSAID) en Avril 2023, au séminaire Annuel du centre de Recherche de Saint-Antoine en Novembre 2022, et aux journées de l'école doctorale en Juin 2024, où il a reçu le prix du meilleur poster.
Ce travail a obtenu deux financements :
-une bourse de recherche de la Société Nationale Française de Médecine interne (SNFMI-REMI) : 10 000 euros
-un financement dans le cadre d'un appel à projet de la Filière de santé des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires rares (FAI2R 2021) : 10 000 euros



16- Figure 16. Résumé graphique des explorations digestives réalisées.

Functional changes in the gut microbiota are associated with the intestinal phenotype in A20 haploinsufficiency

Inès ELHANI[1,2,3]*, Marius BREDON[1,2]*, Magali SVRCEK[4], Aurore DESMONS[5], Lionel ARRIVE[6], Céline BAZILLE[7], Antoine LEFEVRE[8], Achille AOUBA[9], Hélène BLASCO[8], Camille DUPUIS[8], Patrick EMOND[8], Diana ENEA[4], Pranvera KRASNIQI[5], Claire de MOREUIL[10], Iria ALONSO[1,2], Laura CREUSOT[1,2], Cyriane OEUVRAY[1,2], Dominique RAINTEAU[5], Antonin LAMAZIERE[5], Nathalie ROLHION[1.2], Harry SOKOL[1,2,11], Sophie GEORGIN-LAVIALLE[1,2,3].

*Both authors contributed equally to the manuscript

Affiliations :

[1] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Gastroenterology Department, 75012 Paris, France

[2] Paris Center for Microbiome MedICIsne (PaCeMM) FHU, Paris, France

[3] AP-HP, Tenon Hospital, Department of internal medicine, National reference center for autoinflammatory diseases ad AA amyloidosis (CEREMAIA)

[4] Sorbonne University, Department of Pathology, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France.

[5] Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, INSERM, AP-HP, Département Metomics, Hôpital Saint Antoine, 75000 Paris, France.

[6] Department of Radiology, Saint-Antoine Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université, Paris, France.

[7] Department of Pathology, CHU of Caen Normandie, 14000, Caen, France.

[8] R 1253, iBrain, University of Tours, Inserm, Tours, France.

[9] Department of Internal Medicine, Caen University Hospital, Caen, France.

[10] Department of internal medicine, Brest university hospital, Brest, France

[11]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

Corresponding author details:

Dr Inès ELHANI, ines.elhani@aphp.fr

& Pr Sophie Georgin-Lavialle, sophie.georgin-lavialle@aphp.fr

Sorbonne University, AP-HP, Tenon Hospital, Department of internal medicine, National reference center for autoinflammatory diseases ad AA amyloidosis (CEREMAIA)

4 rue de la Chine, 75020, Paris, FRANCE

Abstract

Introduction: A20 haploinsufficiency (HA20) is an autoinflammatory disease driven by pathogenic variants in *TNFAIP3*, which plays a crucial role in regulating immune responses. The clinical manifestations of HA20 resemble those of inflammatory bowel disease (IBD), with prominent gastrointestinal (GI) involvement. Given the well-established association between gut microbiota alterations and IBD, this study aimed to describe the GI involvement of HA20 patients and to investigate their fecal microbiota using shotgun sequencing and metabolomic.

Methods: This study included 16 HA20 patients and 22 healthy age and sex-matched controls. GI clinical phenotype, liver imaging and liver and GI tissue histology were assessed. Shotgun metagenomic sequencing was performed on fecal DNA. Fecal metabolomic profiling of bile acids, short-chain fatty acids (SCFAs), and tryptophan metabolites was performed.

Results: Liver imaging revealed chronic liver disease in several patients, showing as liver dysmorphia and portal hypertension. Histological analysis showed lymphoplasmocytic infiltrate of the GI tract and the liver. The fecal microbiota of HA20 patients was characterized by marked alterations, including a reduction in microbial diversity and an increase in the pro-inflammatory bacterium *Ruminococcus gnavus*. Microbial bile acid deconjugation and desulfation were impaired. Additionally, tryptophan metabolism was altered, with a shift towards the kynurenine pathway.

Discussion: Our results show that HA20 is associated with gut microbiota alterations and significant disruptions in metabolic pathways, particularly involving bile acids. These alterations could contribute to the chronic inflammation observed in HA20. These findings highlight the role of the gut-liver axis and of mucosal barrier dysfunction in HA20.

Keywords: A20 haploinsufficiency, Inflammatory bowel disease, microbiota

Word count

Abstract: 246 words
Manuscript: 3982 words
5 figures, 1 table

Key messages:

What is already known on this topic:

A20 haploinsufficiency (HA20) is an autoinflammatory disease associated with *TNFAIP3* pathogenic variants; patients display significant gastrointestinal involvement resembling inflammatory bowel disease (IBD).

While microbiota alterations are associated with IBD, there has never been any in-depth investigation of patients with HA20.

The role of dysbiosis and metabolic disruptions, particularly involving bile acids, short-chain fatty acids (SCFAs), and tryptophan metabolism, in the pathogenesis of HA20 have not been investigated yet.

What this study adds:

Patients display non-specific liver and gastrointestinal (GI) inflammation, which is not consistent with the typical features of Crohn's disease or ulcerative colitis in MRI and histological findings of HA20.

HA20 patients exhibit notable dysbiosis, characterized by reduced microbial diversity, decreased beneficial bacteria (e.g., *Roseburia hominis*), and increased pro-inflammatory bacteria (*Ruminococcus gnavus*).

Metabolomic profiling revealed altered microbial bile acid, short chain fatty acid uptake and tryptophan metabolite metabolism.

How this study might affect research, practice, or policy:

This study provides a deeper description of the whole spectrum of HA20, including clinical, histological and morphologic characteristics

These results suggest that addressing microbial imbalances and metabolic disruptions could be beneficial in managing HA20 and similar autoinflammatory disorders associated with GI features.

INTRODUCTION

A20 haploinsufficiency is an inherited disease associated with loss-of-function variants of *TNFAIP3*, which encodes A20 (1). It is a newly discovered disease with less than 190 patients described to date (2). HA20 is responsible for excessive innate immunity activation through NF-κB pathway and systemic inflammation. Patients present with recurrent and/or chronic fever and various systemic involvements. Of these, intestinal involvement is the most common, affecting 46% of described patients (2). Recurrent intestinal ulcerations are common and may affect the entire gastrointestinal (GI) tract. Some patients may display episodes of colitis with transmural inflammation that resembles Crohn's disease. In addition, 2/3 of all patients suffer from recurrent mouth ulcers (2). In humans, genome-wide association studies have shown an association between *TNFAIP3* polymorphisms and inflammatory bowel disease (IBD) (3). Moreover, altered expression of A20 correlates to disease severity in IBD (4). Altogether, HA20 is considered by some authors as a monogenic IBD (5).

Although multifactorial, the pathogenesis of IBD is closely linked to gut dysbiosis, which is also associated with systemic inflammation (6). These effects are mediated by direct interactions between the microbiota and the host, and by the conversion of dietary or host-derived metabolites (7). Among these, bile acids, short chain fatty acids (SCFAs) and tryptophan metabolites can exert either pro or anti-inflammatory effects depending on the microbial environment (7). For instance, SCFAs, such as butyrate, a product of fiber fermentation by gut bacteria, are known for their anti-inflammatory properties, promoting regulatory T cell function and maintaining epithelial barrier integrity. Conversely, dysregulation in bile acid metabolism, often observed in IBD patients, can lead to an accumulation of pro-inflammatory bile acid species that exacerbate intestinal inflammation.

Preliminary results from 16S sequencing have suggested dysbiosis in 16 patients with HA20 from Japan compared to their healthy family members (8). Interestingly, the clinical presentation of HA20 may differ according to geographic location (2,9). Moreover, it has been previously reported that ethnicity and geographic origin influence gut microbiome composition (10). Therefore, in this study, we aimed to investigate in depth the GI phenotype of patients with HA20 as well as their fecal microbiota composition and functions using shotgun metagenomics sequencing and targeted metabolomics including bile acid, SCFAs and tryptophan metabolite profiles.

METHODS

Patients' inclusion

We conducted a cross-sectional study in the French reference centers for auto-inflammatory diseases of Tenon hospital (Paris) and Caen university hospitals between 2020 and 2023. All consenting patients with a diagnosis of HA20 were included. Disease characteristics including mutational status, sex, age, organ involvement and current treatment were extracted from medical records. Patients completed a form on the day of collection that included blood in the stool, stool consistency using the Bristol Stool Scale (BSS) (11), current antibiotic use, number of bowel movements per day, and presence of inflammatory symptoms (fever, joint pain, abdominal pain, muscle pain).

Participants collected stool samples at home and stored them in provided containers at -20°C. The samples were returned to the laboratory within 7 days, where they were aliquoted and stored at -80°C. Samples remained frozen at this temperature until DNA extraction for microbiota analysis.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the institutional review boards (Comité de protection des personnes Sud-Est III, 2022-A02073-40 and comité d'éthique de la recherche, Sorbonne Université). Twenty-two age and sex-matched control subjects were selected from "Suivitheque" Biobank (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV, IRB 00003835 Suivitheque study; registration number 2012/05NICB).

MRI analysis

Liver MRI from 5 patients that had been performed during routine care were retrospectively evaluated by an experienced radiologist (LA). For each patient, a standardized evaluation form was used to systematically assess various liver and splenic abnormalities. The form included the following criteria: hepatic dysmorphia, heterogeneity of the parenchyma, liver edge abnormalities, ascites, spleen size, portocaval Shunts, portal Hypertension, perfusion disorders, hepatic vein anomalies, portal vein anomalies, biliary tract abnormalities and focal hepatic lesions. Liver enlargement was defined using the caudate-to-right lobe ratio$\geq$0.9. Spleen enlargement was defined as spleen length>12cm and/or spleen volume>480cm^3.

Histological analysis

Stomach tissue samples were obtained from three patients, colon tissue from four patients, ileum tissue from one patient, and liver tissue from one patient. Histological analysis was conducted to assess inflammatory cell infiltration, erosion, apoptosis, and Paneth cell apoptosis. Biopsy specimens were fixed in formalin and subsequently embedded in paraffin.

Immunohistochemical analysis was performed using an automated immunohistochemistry system, employing antibodies specific for NF-κB p65, CD20, CD4, CD8, and MUC2.

DNA extraction and sequencing

Stool samples were resuspended in MGIEasy Stool Sample Collection Kit (1000005265 / 1000003702) and DNA extraction was performed using MagPure Stool DNA LQ Kit (384 RXN). 700µl stool sample suspension were transferred to 2.0ml deepwell plates containing MagPure grinding beads using MGI-STP7000, and extraction was performed using MGI-SP960 automation robot. Cell lysis was performed by beat-beating plate for 1min at 1600 rpm and thermal lysis at 650C for 20min. For DNA purification, 340µl of sample were used.

DNA libraries were prepared using MGIEasy FS DNA Library Prep Set (1000006988), circularized using MGIeasy circularization module V2.0 (1000005260) and sequenced on DNBSEQ-T7 using High-throughput Sequencing Set (FCL PE150) (1000016106).

Raw sequence data are accessible in the European Nucleotide Archive (accession number PRJNA951620).

Read processing and quality control

Reads quality was checked with FastQC (version 0.11.9), and low-quality reads and sequencing adapters were removed using Trimmomatic (12) (version 0.39). Reads shorter than 75 base pairs were discarded. Host-reads were removed using KneadData with default parameters (version 0.10.0; http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata) by mapping reads to the Homo sapiens reference database (13) (build hg37dec_v0.1).

Microbiota analysis

The samples were taxonomically profiled using MetaPhlAn 4 (14). For the subsequent analyses (except for alpha-diversity calculations), the abundance of each taxon present in a sample was normalized using the relative method to allow sample-to-sample comparison. Taxa whose average abundance and prevalence were less than 0.1% and 3%, respectively, were discarded.

Functional potential analysis of the metagenomic samples (pathway profiles and gene-family abundances) was performed using HUMAnN3 (15) (version v3.0.0, UniRef database release 07-2021).

Principal coordinates analyses (PCoA) were carried out on the Bray-Curtis dissimilarity matrices constructed from the abundance of species and pathways. Communities that emerged were verified using a PERMANOVA test with Vegan package (16) (version 2.5-7). Figures were plotted with the ggplot2 (17) and ComplexHeatmap (18) packages.

Multivariable association between microbial community abundance and timepoint was examined with MaAsLin2 (19). Age and sex factors were included in each analysis.

Spearman correlation analyses were conducted to associate metabolites and microbiota species using the R package energy (version 1.7-8). Correlations with adjusted p-values < 0.1 (Benjamini-Hochberg Procedure) were considered significant.

Estimated taxonomy of unannotated bacteria are described in supplementary table 1.

Targeted metabolomics

Fecal bile acids were analyzed in stool samples using a LC-20ADXR (Shimadzu, Kyoto, Japan) chromatographic system in tandem with a linear ion trap quadrupole MS/MS spectrometer QTRAP 5500 system (SCIEX, Ontario, Canada). Samples were assayed as previously described (20).

Fecal SCFAs were quantified on an Agilent 8890 GC system in tandem with an Agilent 5977B MS (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Extraction and quantification were previously described (21).

Fecal tryptophan metabolites were quantified as previously described (22).

Statistical analysis for fecal metabolite levels comparison.

The categorical variables were analyzed by using the chi-square test or Fisher's exact probability test as appropriate. Continuous variables in two or three groups were compared using the Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test, respectively. The significance level was set as $p<0.05$ for all analyzed data. Statistical analysis was performed with the online application EasyMedStat (version 3.21.5 ; www.easymedstat.com).

RESULTS

RESULTS

Key patients' characteristics

Sixteen patients from 7 families of European ancestry with HA20 were studied and are described in Table 1. Three families had been previously described (23–25). Mouth ulcers were described in 16 patients (100%) and abdominal symptoms, including pain and colitis, in 13 patients (81%). Elevated liver enzymes were noted in 4 patients (25%). The median body mass index was 21.2 kg/m² (range: 15.1-29.7). Comparisons between HA20 patients and healthy controls showed no significant differences in sex, age, or BMI. Interferon-stimulated gene expression was elevated in all 5 patients in whom it was measured, with a median of 18.4 [4.4-23.2] (positive when >2.3). At the time of stool collection, five patients were taking colchicine, six were receiving immunosuppressants. No patients received antibiotics in the month before sampling.

HA20 Patients show an MRI-pattern of chronic liver disease.

Liver MRI findings were assessed in five patients from three families. The MRI results were normal for two patients, with no evidence of structural or functional abnormalities observed. However, the remaining three patients exhibited significant liver dysmorphia, characterized by irregular liver contour and altered lobar anatomy. Among these three patients, two presented with a pattern of chronic liver disease that included heterogeneous liver parenchyma, porto-systemic collateral vessels (portocaval derivation), altered hepatic blood flow and signs of portal hypertension (Fig. 1A). They also presented with an enlarged spleen with a spleen length of 163 and 160 cm and a spleen volume of 879 and 1058 cm^3, respectively. The liver was enlarged in two patients, with a caudate-to-right lobe ratio of 1.5 and 1.2, respectively. None of the patients had abnormalities of the hepatic veins, portal veins or bile ducts.

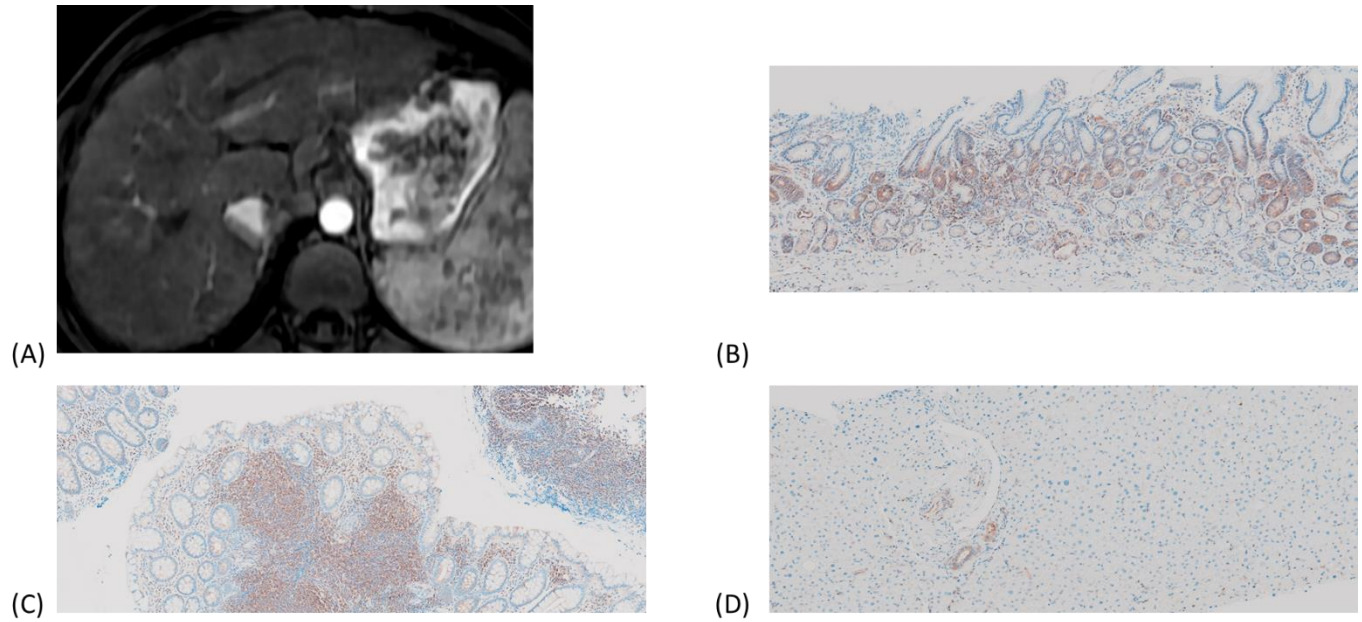


Figure 1. Morphologic analysis of the liver and gastro-intestinal tract in patients with A20 haploinsufficiency
Liver MRI showing characteristics of chronic liver disease. The liver shows irregular margins, dysmorphic shape, and a multinodular pattern. Splenomegaly is also present, suggesting the presence of portal hypertension. NF-κB p-65 labeling in (B) stomach tissue, (C) colon tissue and (D) liver tissue

HA20 Patients display histological features of gastro-intestinal tract inflammation

Stomach tissue was available from 3 patients, all of whom showed lymphoplasmacytic infiltrate. Additionally, one patient exhibited a neutrophilic infiltrate. Weak to intermediate cytoplasmic labeling of the chorion was observed in two samples using the anti-NF-κB p65 antibody, while no staining was detected in one sample (Fig. 1B).

Colon tissue was available from 4 patients. B-cell lymphoid aggregates were observed in 3 patients, one of whom also showed an eosinophilic infiltrate. One patient additionally displayed a lymphoplasmocytic infiltrate of predominantly $CD4^+$ T cells. Rare apoptosis was noted in 1 patient. MUC2 immunostaining was normal in all cases. NF-κB p-65 immunostaining revealed intermediate cytoplasmic staining of the inflammatory infiltrate within the chorion in four samples, with associated staining of lymphoid follicles observed in two of these samples (Fig. 1C).

Ileal tissue was available from 1 patient, who displayed severe neutrophilic and lymphocytic infiltrates of predominantly $CD4^+$ T cells along with mild erosions, but no evidence of apoptosis. MUC2 immunostaining was normal and no Paneth cell apoptosis was observed. NF-κB immunostaining revealed very weak and focal staining of the inflammatory infiltrate and lymphoid follicles.

Lastly, liver tissue was available from 1 patient, revealing a pattern of steatohepatitis with low-grade portal inflammation, mild lobular inflammation, and low-grade steatosis (SAF score

S1A2F0). There was no bile duct inflammatory infiltrate. Immunohistochemical analysis showed slight labeling with NF-κB p65 in rare lymphocytes circulating within the sinusoids (Fig 1D).

HA20 patients display significantly different microbiota composition compared to healthy subjects

Microbial diversity, as measured by the Shannon index, was found to be significantly decreased in patients with HA20 ($p < 0.001$, Fig. 2A). Separate clusters were identified in the beta diversity PCoA plot, indicating a different distribution of gut microbiota between HA20 patients and healthy subjects. ($p=0.001$; Fig. 2B).

Multivariate Association with Linear Models Multivariate 2 (MaAsLin2) pointed out a decrease in the relative abundance of 28 bacteria and an increase of sequences from 2 bacteria in HA20 patients (Fig. 2C). Eleven decreased bacteria had known anti-inflammatory properties, including butyrate production (*Roseburia_hominis* (26), *Oscillospiraceae_sp* (27), *Coprococcus_catus* (28), *Eubacterium_ramulus* (29), *pseudoflavonifractor spp* (30), *Roseburia_hominis* (31) *and Akkermansia_muciniphila* (32)) and gut barrier enhancement (*Akkermansia_muciniphila* (33), *Roseburia hominis* (26)). Conversely, sequences associated with *Ruminococcus gnavus*, which is a known pro-inflammatory mucin-degrading bacteria, was increased in HA20 patients (34).

Altogether, these data suggest that the gut microbiota of HA20 patients was distinct from that of healthy controls and was associated with a depletion in anti-inflammatory taxa, and an enrichment of pro-inflammatory bacteria.

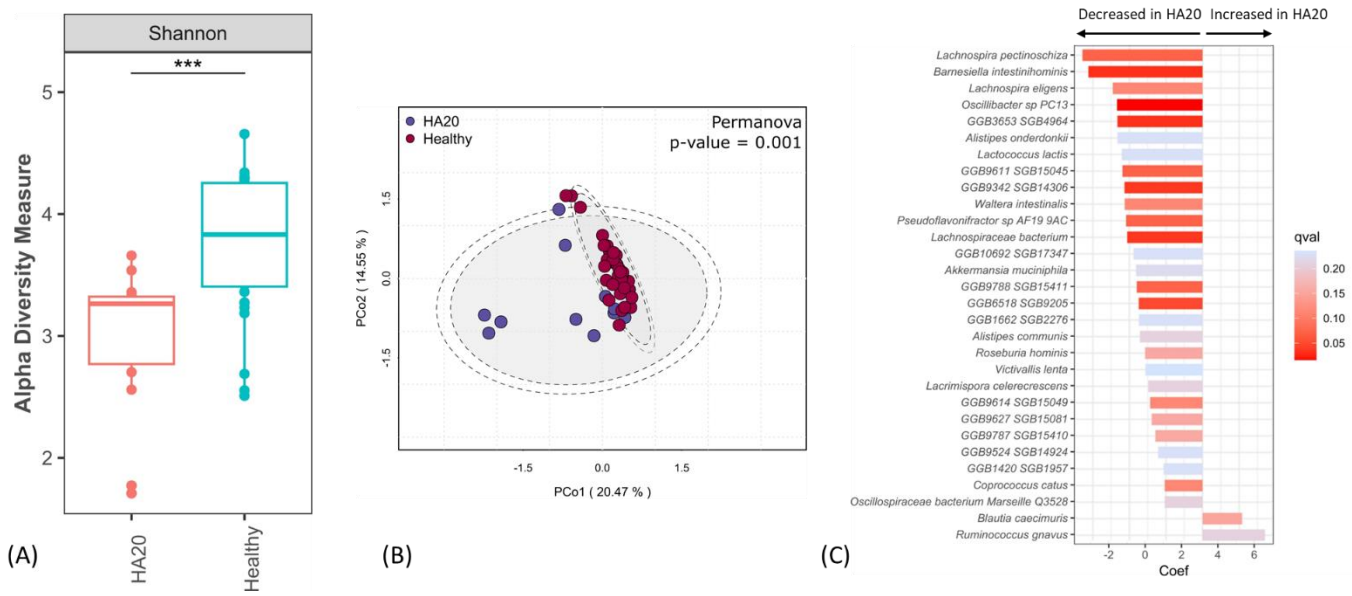


Figure 2. Gut microbiota taxonomic composition in patients with A20 haploinsufficiency.
(A) Boxplot comparing the alpha diversity (Shannon Index) between A20 patients (HA20) patients and healthy controls.
(B) Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity
(C) Bar plot showing the differential abundance of key microbial taxa between HA20 patients and healthy subjects, identified using MaAsLin2

Functional analyses of shotgun metagenomics suggest higher activity of metabolic pathways involved in inflammation and gut barrier disruption in HA20

Functional analyses revealed a significantly different profile of genetic sequences related to metabolic pathways in HA20 patients (p=0.01, Fig. 3A).

In HA20, several pathways involved in gut barrier alterations were increased. It is the case of the superpathway of sulfur oxidation (PWY-53014), which may lead to the production of the toxic hydrogen sulfide, and the superpathway of L-threonine degradation (THREOCAT PWY), which is a major component of mucin. Two microbial L-arginine degradation pathways were increased (ARGDEG PWY and ORNARGDEG PWY). These two pathways lead to the production of leading to the production of putrescine that can be toxic when present in large quantities. Moreover, the pathways for biosynthesis of the pro-inflammatory bacterial components enterobacterial common antigen (ECASYN PWY) and Lipopolysaccharide-associated lipid-A (KDO-NAGLIPASYN-PWY) were increased. HA20 patients also displayed increased relative abundance of metabolic pathways involved in molybdopterin synthesis (PWY-6823) and quinol biosynthesis (PWY-5850, PWY-5860, PWY-6708, PWY-5857, PWY5856, PWY-5855 and UBISYN PWY) (Fig. 3B). The molybdopterin pathway catalyzes the reaction transforming nitrate to nitrite and nitric oxide. Nitric oxide overproduction in the Gi tract is associated with altered gut barrier (35). Quinol biosynthesis is a major source of

energy through the mitochondrial energy chain and increased abundance of quinol biosynthesis related pathways has been described in IBD (36,37).

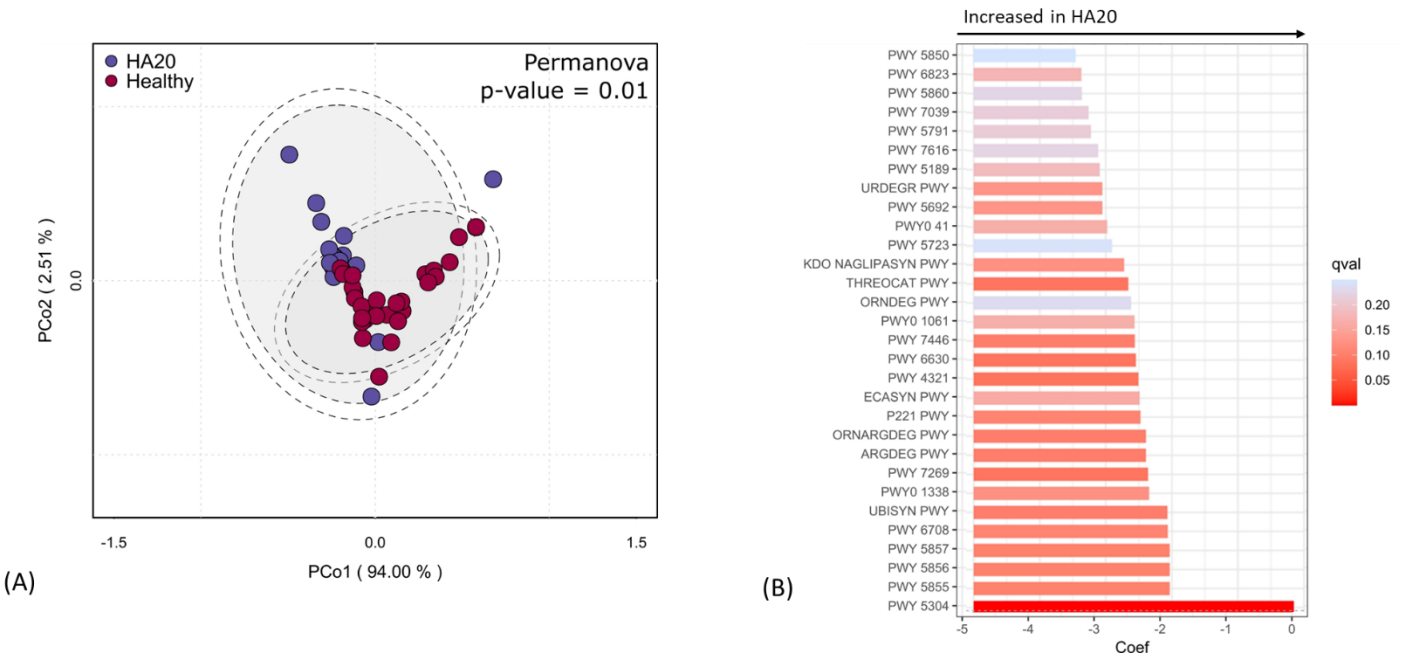


Figure 3. Comparative analysis of gut microbiota functional profiles in A20 haploinsufficiency.
(A) Principal Coordinates Analysis (PCoA) of functional pathway profiles
(B) Bar plot showing the differential abundance of functional pathways between HA20 patients and healthy subjects, identified using MaAsLin2

Bile acids profile suggests microbiota-associated defects in bile acid in HA20 patients

Fecal bile acids were profiled in 13 patients and 20 healthy subjects. The proportion of conjugated (5.7 vs 1.7%, p= 0.002) and sulphated (0.16 vs 0.01 %, p=0.003) bile acids (BA) were significantly increased in HA20 patients, suggesting a defect in BA deconjugation and desulfation (Fig. 4A and 4B). In addition, the proportion of primary BA was significantly increased in HA20 patients, reflecting a lack of transformation into secondary BA by the intestinal microbiota (12.3 vs 3.7%, p=0.01) (Fig 4. C). Finally, global fecal BA concentration was significantly higher in HA20 patients, suggesting a deficit in the ileal absorption of BA (10389.3 vs 4035.91 nmol/g, p=0.01) (Fig 3. A). Moreover, the level of Chenodeoxycholic acid (CDCA), one major primary BA, was significantly higher in patients with looser stool (BSS≥4), suggesting that CDCA is directly associated with stool consistency (1196.3 VS 96.2 nmol/mol, p=0.008).

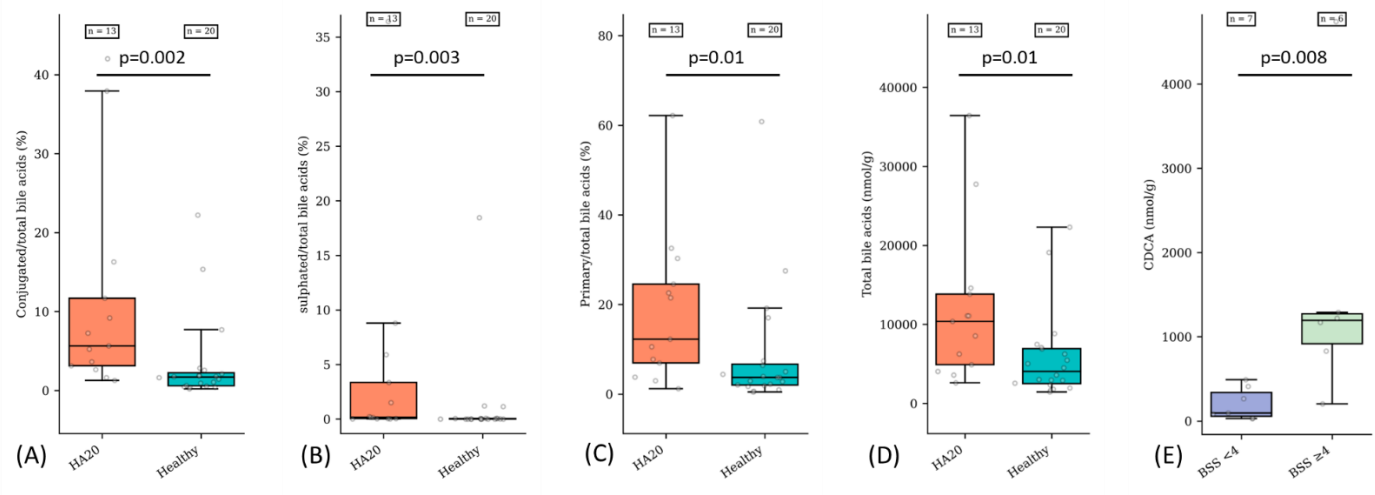


Figure 4. Fecal bile acid profile in patients with A20 haploinsufficiency (HA20) compared to healthy subjects
(A) Conjugated to total fecal bile acids ratio (%)
(B) Sulphated to total fecal bile acids ratio (%)
(C) Primary to total fecal bile acids ratio (%)
(D) Total fecal bile acids (nmol/g of dry stool)
(E) Fecal Chenodeoxycholic acid (CDCA) levels in HA20 patients according to the Bristol stool scale (BSS)

Negative correlations were observed between the abundance of Firmicutes and Bacteroidota phyla and the levels of conjugated bile acids. Moreover, 26 bacterial species, including 20 that belonged to the phylum Firmicutes were negatively associated with levels of primary bile acids (Fig. 5). However, among fully annoted bacteria, none were known to possess 7-α-dehydroxylation activity, which carries transformation of primary bile acids to secondary bile acids.


1
3
2
1
3
4
2
5
matrix_7
1
0.5
0
-0.5
-1
Butyric acid
Propionic acid
Acetic acid
Total SCFA
Picolinic acid
Indole-3-lactic acid
Tryptophol
Isovaleric acid
BCFA
Isobutyric acid
HDCA
5-OH-tryptophane
Indole
LCA
Indole-3-acetic acid
TDCA
dole-3-acetamide
Indole-3-aldehyde
Tryptamine
Valeric acid
Serotonine
Taurin-conjugated BAs
Tryptophane
Conjugated rimary BAs
5-OH-indole acetic acid
GDCA
Secondary BAs
DCA
Total BAs
Sulfo-conjugated BAs
CA
GUDCA
UDCA
TCDCA
GCA
Glycoconjugated BAs
GCDCA
CDCA
Primary BAs
Conjugated BAs
Kynurenic acid
Xanthurenic acid

Figure 5. Correlation between fecal metabolites and gut microbiota in patients with A20 haploinsufficiency

SCFA: short-chain fatty acid, BCFA: branched-chain fatty acid, BAs: bile acids, HDCA: Hyodeoxycholic acid, LCA: lithocholic acid, TDCA: Taurodeoxycholic acid, GDCA: Glycodeoxycholic acid, DCA: Deoxycholic acid, CA: Cholic acid, GUDCA: glycoursodeoxycholic acid, UDCA: Ursodeoxycholic Acid, TCDCA: Taurochenodeoxycholic acid, GCA: Glycocholic acid, GCDCA: Glycochenodeoxycholic acid, CDCA: Chenodeoxycholic acid

HA20 patients harbor altered fecal short-chain fatty acids (SCFA) profile

Global Fecal SCFA concentrations was significantly higher in HA20 patients compared with healthy subjects (p=0.04). The levels of individual SCFAs were not significantly different, suggesting that no single SCFA was more affected (Fig 6. A-E). The interpretation of fecal SCFA level is complex as these molecules are produced by the microbiome but are also massively absorbed. Thus, the fecal levels do not represent the luminal production, especially in proximal colon or terminal ileum. The increased levels of fecal SCFA in HA20 patients, together with the altered microbiota diversity and composition and the intestinal inflammation, suggest a SCFA absorption defect rather than an increased production.

Fecal butyrate levels showed a positive correlation with *Eubacterium rectale*, a well-known butyrate producer. Interestingly, butyrate levels also correlated with two members of the *Veillonella* genus, which are not typically associated with butyrate production (Fig. 5). Rather, these bacteria, including *Veillonella dispar*, are recognized as acetate producers. In HA20 patients, *V. dispar* specifically exhibited a positive correlation with fecal acetate levels.*

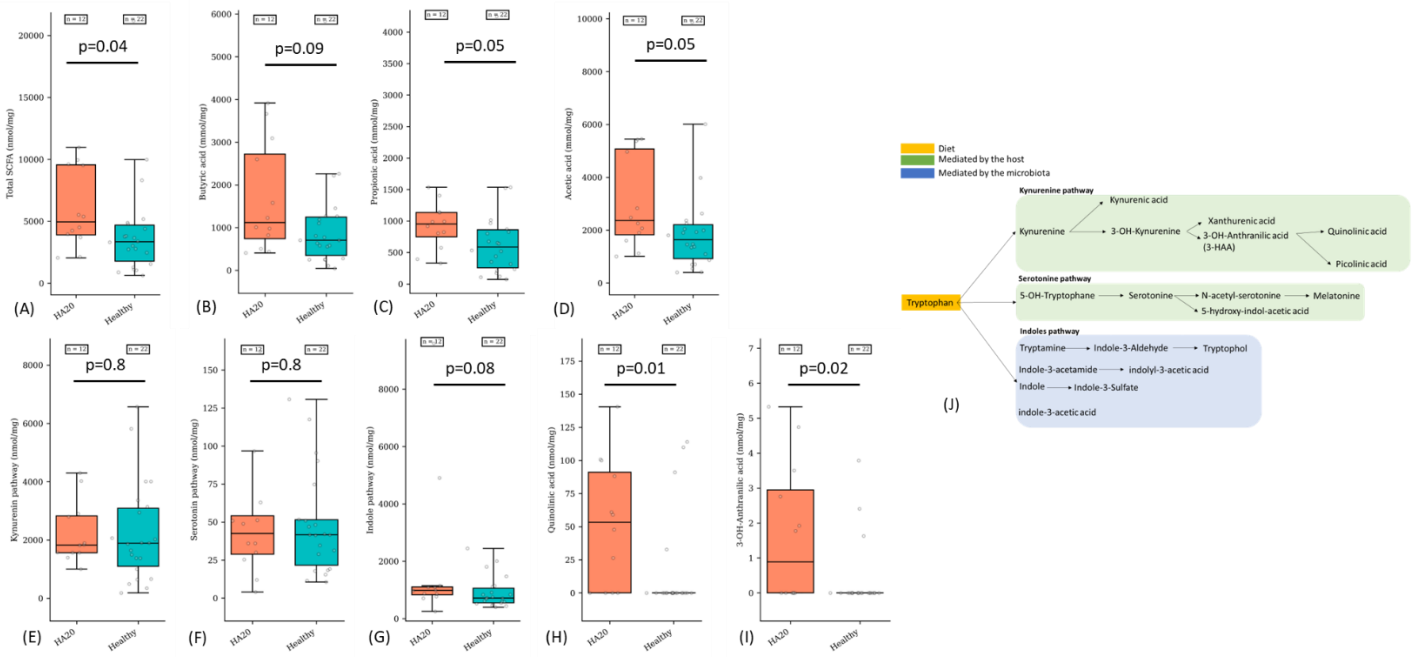


Figure 6. Fecal short-chain fatty acid and tryptophan metabolite profiles in patients with A20 haploinsufficiency (HA20) compared to healthy controls
(A) Total fecal SCFA (nmol/mg) (B) Butyrate to total fecal SCFA ratio (%) (C) Propionate to total fecal SCFA (%) (D) Acetate to fecal total SCFA (%). Total fecal metabolites of the (E) kynurenine pathway (F) serotonin pathway and (G) Indole pathway. (H) Fecal quinolinic acid (nmol/mg) (I) Fecal 3-OH-Anthranilic acid (nmol/mg). (J) Overview of the metabolic pathway derived from dietary tryptophan

Tryptophan profile suggests diversion of dietary tryptophan to the kynurenine pathway in HA20 patients

When metabolites from the kynurenine pathway were summed, no significant differences were observed between HA20 patients and healthy subjects (Fig. 6F). Same results were obtained with serotonin, and indole pathways (Fig. 6G-H). However, within the kynurenine pathway, levels of quinolinic acid (Figure 6I) and 3-HAA, (Figure 6J) were significantly higher in HA20 patients.

Surprisingly, *Coprobacter secundus* was positively correlated to fecal levels of indoles, although it is not a known indole producer.

DISCUSSION

In this study, we described the digestive involvements of HA20 patients and analyzed the microbiota composition of 16 HA20 patients compared to 22 healthy subjects. We found that patients displayed a non-specific pattern of gastro-intestinal inflammation and chronic liver disease. Moreover, we found microbiota alterations in patients with HA20, including the decrease of anti-inflammatory bacteria and the expansion of the pro-inflammatory bacteria such as *Ruminococcus gnavus*. These changes are associated with altered bile acid, SCFA and tryptophan metabolism.

As previously described, HA20 is associated with a nonspecific histological pattern of intestinal inflammation. Notably, the analyses did not show a typical pattern of Crohn's disease or ulcerative colitis, with the absence of crypt alterations and granuloma. Given the data from murine models of TNFAIP3 insufficiency, we would have expected histological clues of a weak gastrointestinal barrier with increased apoptosis and decreased Muc-2 immunostaining (38). However, these murine models do not fully replicate HA20 pathogenesis, as colonic cells completely lack A20 expression, whereas patients typically express about 50% of the normal protein due to one functional gene. Consequently, patients may produce enough A20 to maintain homeostasis under normal conditions but may be insufficient after an external insult.

IBD is associated with hepatobiliary abnormalities in 4.7-29% of patients (39). Specifically, 2-14% of IBD patients present with primary sclerosing cholangitis (PSC), which is associated with the inflammatory infiltrate and fibrosis of intra-hepatic bile ducts (40). IBD and PSC are believed to develop synergistically through the gut-liver axis. In this model, dysbiosis observed in IBD patients increases the translocation of inflammatory components into the hepatic circulation, contributing to inflammatory infiltration of the liver parenchyma. Conversely, the resulting liver inflammation disrupts bile acid metabolism, further exacerbating gut dysbiosis and creating a vicious cycle that drives the progression of both conditions (41). Because liver disease was described in up to 10% of HA20 patients, we had hypothesized that patients may exhibit a pattern resembling PSC due to dysbiosis and increased translocation. However, no patient displayed auto-antibodies specific to PSC. Moreover, there was no histological nor MRI bile duct alterations in HA20 patients, which suggests that liver disease in HA20 differs from that of IBD. These results are concordant with the histological analysis of the liver and digestive tract previously described in HA20 patients (23). Interestingly, A20 is a well-known hepatoprotective agent due to its anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. Indeed, murine models of liver A20 deficiency are characterized by spontaneous chronic liver

inflammation (42). Therefore, A20 haploinsufficiency in the liver may cause the non-specific liver inflammation that patients displayed.

We observed a marked reduction in microbial diversity among HA20 patients compared to healthy controls. The composition shift in HA20 patients was marked by an overrepresentation of *R. gnavus*. This bacteria from the Lachnospiraceae family is characterized by its mucin-degrading properties, which is the main component of the gut barrier. Therefore, it is thought to cause gut barrier disruption (43). It has already been described as overrepresented in ileal Crohn's disease or spondylarthritis, an extra-digestive rheumatic disease (44). In addition, the fecal microbiota of HA20 patients was depleted of anti-inflammatory taxa, including some associated with gut barrier function. Gut barrier alteration is a major event in the development of inflammatory bowel disease (45). It causes the abnormal contact of bacteria with the gut mucosa, which may instigate inflammatory reactions. Moreover, the passage of pro-inflammatory bacterial components and/or secondary metabolites into the bloodstream may cause or worsen systemic inflammation (46).

These results are consistent with Toyofuku et al., who had also reported dysbiosis in patients with HA20 (8). However, the bacterial profile reported differed from our results, particularly with a decrease of *Ruminococcus*, which could be explained by the different population studied but also by the use of 16S sequencing, unlike the shotgun approach used in our study, allowing a better analysis resolution. In addition, Ruminococcus species were not detailed, and there could be an increase in the abundance of R. gnavus concomitant with a global decrease in the abundance of other *Ruminococcus* species. A20 deficiency in intestinal epithelial cells has already been linked to colitis in murine models (38). Dysfunction of the gut barrier, due to increased apoptosis, decreased mucus production and microbial antigen degradation, occurs early (38,47). Along with it are described microbiota changes, associating bacterial invasion of the mucosa and decreased bacterial diversity (38). Interestingly, microbiota transfer from A20-deficient mice to wild-type mice leads to higher sensitivity to DSS-induced colitis, highlighting the synergic role of A20 deficiency and dysbiosis in the development of colitis (48).

Bile acid metabolism alterations were associated with gastro-intestinal symptoms in HA20 patients in this study. Every microbiota-dependent step was altered. Particularly, deconjugation and transformation into secondary bile acids were associated with the depletion of Firmicutes. CDCA is a primary bile acid that possesses detergent properties that stimulate fluid secretion, mucosal permeability, and gut motility. Therefore, its abnormal persistence may cause BA diarrhea (49). Moreover, BA malabsorption may underactivate FXR receptor, which is a

modulator of NF-kb (50). BA-based treatments, such as BA sequestrants, are under investigation in the treatment of BA diarrhea and may be a lead for the treatment of diarrhea in HA20 patients in the future (51).

Unexpectedly, fecal SCFA was increased in HA20 patients. In IBD, fecal concentration of SCFA has been consistently shown to be decreased (52). Especially, butyrate is an anti-inflammatory metabolite that acts as the main source of energy for colonocytes and promotes gut barrier function (53). In our study, while some butyrate-producing bacteria were depleted in HA20 patients, fecal butyrate concentration was increased, which suggests absorption deficiency. Indeed, inflammatory cytokines, such as TNF-α, may downregulate SCFA receptor expression (54). Therefore, the inflammatory state of HA20 patients may cause functional butyrate deficiency and promote gut barrier alterations.

Perspectives of microbiota-targeted treatment in HA20 are appealing. The inflammatory properties of microbiota from A20-deficient mice suggest that its modulation could improve GI symptoms. However, results from clinical studies involving patients with rheumatic diseases are equivocal and seem to show biological improvement at best (55). While most studies have been conducted using readily available probiotics (Lactobacillus, Bacillus, and Bifidobacterium genera), the use of specific bacteria tailored to the dysbiosis profile should be evaluated. Finally, it is unlikely that supplementation of one bacteria alone could alleviate symptoms as the whole host-microbiota network is altered in HA20 patients.

HA20 is associated with an increased production of inflammatory cytokines, including interleukin-1β and TNF-α. In addition, several studies have reported increased interferon signature in HA20 patients (2). In this study, HA20 patients showed a diversion of dietary tryptophan to the kynurenic pathway, which was associated with increased fecal levels of the neurotoxic metabolite picolinic acid. Interestingly, interferon-γ induces the expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO1), which mediates the entry of tryptophan into the kynurenine pathway. Therefore, the inflammatory phenotype of HA20 patients could be directly responsible for the accumulation of neurotoxic metabolites, in particular through high levels of interferon-γ. In this context, modulation of interferon-γ could be an interesting approach for the treatment of HA20. Current treatments for gastrointestinal involvement in HA20 are not codified and are adapted from treatments commonly used in IBD. In particular, oral 5-aminosalicylic acid and TNF-α blockers are most commonly used, with heterogenous responses (2). In IBD, JAK inhibitors have been recently proposed to treat patients resistant to TNF-α blockers (56). Moreover, JAK inhibitors have been used successfully to treat

neurological involvements, uveitis and arthritis in HA20 (2). In this study, one patient treated with TNF-α displayed sustained gastrointestinal inflammation, which was successfully alleviated. Therefore, JAK inhibitors may be an alternative treatment for HA20 with gastrointestinal involvements.

In conclusion, this study identifies distinct gastrointestinal and liver involvement in HA20 patients, marked by reduced microbial diversity and an increase in pro-inflammatory bacteria *like Ruminococcus gnavus*. These changes suggest a compromised gut barrier and altered bile acid metabolism contributing to inflammation. Despite some similarities to IBD, the liver pathology in HA20 appears unique, highlighting the potential for microbiota-targeted therapies and the need for tailored treatment strategies in these patients.

Table

Table 1. Characteristics of included patients with A20 haploinsufficiency and healthy controls.

	HA20 patients n=16	Controls n=22	p-value
Females	12 (71)	25 (78)	0.7
Age (years)	29.5 [12-57]	38 [23-69]	0.1
BMI (Kg/m²)	21.2 [15.1-29.7]	21.4 [17-33.2]	0.7
HA20 symptoms			
Mouth ulcers	16 (100)		
Genital ulcer	13 (81)		
Colitis	4 (25)		
GI ulcer	7 (44)		
Elevated liver enzyme	4 (25)		
Positive interferon signature	5/5 (100%)		
Median	18.4 [4.4 ; 23.2]		
Treatments on collection day			
Colchicine	5 (31)		
TNF-α blockers	5 (31)		
On collection day			
Bristol stool scale	3 [3-5]		
Abdominal pain	4 (25)		
Number of stools/day	1 [1-3]		

Values are median [range] for quantitative variables and number (%) for qualitative variables.
HA20: A20 haploinsufficiency, BMI: Body max index, GI: gastrointestinal

Acknowledgments
The authors would like to express their sincere gratitude to La Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI-REMI) and La Filière de Santé des Maladies Auto-Immunes et Auto-Inflammatoires Rares (FAI2R) for their financial support.
The authors acknowledge the support of the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP) for providing the infrastructure and resources necessary for this research .
Competing Interests
The authors declare no competing interests.
Funding
This research was supported by grants from La Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI-REMI) and La Filière de Santé des Maladies Auto-Immunes et Auto-Inflammatoires Rares (FAI2R). The funding bodies played no role in the design of the study, data collection, analysis, or interpretation of the data, nor in the writing of the manuscript.

References

1. Yu MP, Xu XS, Zhou Q, Deuitch N, Lu MP. Haploinsufficiency of A20 (HA20): updates on the genetics, phenotype, pathogenesis and treatment. World J Pediatr. 5 oct 2019;

2. Elhani I, Riller Q, Boursier G, Hentgen V, Rieux-Laucat F, Georgin-Lavialle S. A20 haploinsufficiency: A systematic review of 177 cases. Journal of Investigative Dermatology. 2023;

3. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. nov 2012;491(7422):119-24.

4. Majumdar I, Ahuja V, Paul J. Altered expression of Tumor Necrosis Factor Alpha - Induced Protein 3 correlates with disease severity in Ulcerative Colitis. Sci Rep. 25 août 2017;7(1):9420.

5. Nambu R, Warner N, Mulder DJ, Kotlarz D, McGovern DPB, Cho J, et al. A Systematic Review of Monogenic Inflammatory Bowel Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 1 avr 2022;20(4):e653-63.

6. Lee M, Chang EB. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. Gastroenterology. 1 janv 2021;160(2):524-37.

7. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. avr 2020;17(4):223-37.

8. Toyofuku E, Takeshita K, Ohnishi H, Kiridoshi Y, Masuoka H, Kadowaki T, et al. Dysregulation of the Intestinal Microbiome in Patients With Haploinsufficiency of A20. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet]. 2022 [cité 12 janv 2024];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.787667

9. Kadowaki T, Kadowaki S, Ohnishi H. A20 Haploinsufficiency in East Asia. Front Immunol. 2021;12:780689.

10. Gaulke CA, Sharpton TJ. The influence of ethnicity and geography on human gut microbiome composition. Nat Med. oct 2018;24(10):1495-6.

11. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. oct 2016;44(7):693-703.

12. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 1 août 2014;30(15):2114-20.

13. Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. Nucleic Acids Research. 28 janv 2015;43(D1):D670-81.

14. Blanco-Míguez A, Beghini F, Cumbo F, McIver LJ, Thompson KN, Zolfo M, et al. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. Nat Biotechnol. nov 2023;41(11):1633-44.

15. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, Dubois L, Asnicar F, Maharjan S, et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. Turnbaugh P, Franco E, Brown CT, éditeurs. eLife. 4 mai 2021;10:e65088.

16. Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. Journal of Vegetation Science. 2003;14(6):927-30.

17. Wickham H. ggplot2 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 20 août 2024]. (Use R!). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24277-4

18. Gu Z. Complex heatmap visualization. iMeta. 2022;1(3):e43.

19. Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. PLoS Comput Biol. nov 2021;17(11):e1009442.

20. Humbert L, Maubert MA, Wolf C, Duboc H, Mahé M, Farabos D, et al. Bile acid profiling in human biological samples: comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 15 juin 2012;899:135-45.

21. Mahdi T, Desmons A, Krasniqi P, Lacorte JM, Kapel N, Lamazière A, et al. Effect of Stool Sampling on a Routine Clinical Method for the Quantification of Six Short Chain Fatty Acids in Stool Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Microorganisms. 19 avr 2024;12(4):828.

22. Lefèvre A, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Attucci S, Dufour D, et al. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. Talanta. 1 avr 2019;195:593-8.

23. Deshayes S, Bazille C, El Khouri E, Kone-Paut I, Giurgea I, Georgin-Lavialle S, et al. Chronic hepatic involvement in the clinical spectrum of A20 haploinsufficiency. Liver Int. août 2021;41(8):1894-900.

24. Berteau F, Rouviere B, Delluc A, Nau A, Le Berre R, Sarrabay G, et al. Autosomic dominant familial Behçet disease and haploinsufficiency A20: A review of the literature. Autoimmun Rev. août 2018;17(8):809-15.

25. El Khouri E, Diab F, Louvrier C, Assrawi E, Daskalopoulou A, Nguyen A, et al. A critical region of A20 unveiled by missense TNFAIP3 variations that lead to autoinflammation. Aksentijevich I, Rothlin CV, Schwartz D, éditeurs. eLife. 21 juin 2023;12:e81280.

26. Patterson AM, Mulder IE, Travis AJ, Lan A, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V, et al. Human Gut Symbiont Roseburia hominis Promotes and Regulates Innate Immunity. Front Immunol [Internet]. 26 sept 2017 [cité 27 août 2024];8. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.01166/full

27. Gophna U, Konikoff T, Nielsen HB. Oscillospira and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features. Environmental Microbiology. 2017;19(3):835-41.

28. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. FEMS Microbiology Letters. 1 mai 2009;294(1):1-8.

29. Rodriguez-Castaño GP, Dorris MR, Liu X, Bolling BW, Acosta-Gonzalez A, Rey FE. Bacteroides thetaiotaomicron Starch Utilization Promotes Quercetin Degradation and Butyrate Production by Eubacterium ramulus. Front Microbiol [Internet]. 29 mai 2019 [cité 27 août 2024];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01145/full

30. Vital M, Karch A, Pieper DH. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. mSystems. 5 déc 2017;2(6):10.1128/msystems.00130-17.

31. Hold GL, Schwiertz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide Probes That Detect Quantitatively Significant Groups of Butyrate-Producing Bacteria in Human Feces. Applied and Environmental Microbiology. juill 2003;69(7):4320-4.

32. Raba G, Adamberg S, Adamberg K. Acidic pH enhances butyrate production from pectin by faecal microbiota. FEMS Microbiology Letters. 1 avr 2021;368(7):fnab042.

33. Mruk-Mazurkiewicz H, Kulaszyńska M, Czarnecka W, Podkówka A, Ekstedt N, Zawodny P, et al. Insights into the Mechanisms of Action of Akkermansia muciniphila in the Treatment of Non-Communicable Diseases. Nutrients. janv 2024;16(11):1695.

34. Crost EH, Coletto E, Bell A, Juge N. Ruminococcus gnavus: friend or foe for human health. FEMS Microbiology Reviews. 1 mars 2023;47(2):fuad014.

35. Mu K, Yu S, Kitts DD. The Role of Nitric Oxide in Regulating Intestinal Redox Status and Intestinal Epithelial Cell Functionality. International Journal of Molecular Sciences. janv 2019;20(7):1755.

36. Park SK, Kim HN, Choi CH, Im JP, Cha JM, Eun CS, et al. Differentially Abundant Bacterial Taxa Associated with Prognostic Variables of Crohn's Disease: Results from the IMPACT Study. J Clin Med. 5 juin 2020;9(6):1748.

37. Palmieri O, Castellana S, Biscaglia G, Panza A, Latiano A, Fontana R, et al. Microbiome Analysis of Mucosal Ileoanal Pouch in Ulcerative Colitis Patients Revealed Impairment of the Pouches Immunometabolites. Cells. 19 nov 2021;10(11):3243.

38. Vereecke L, Vieira-Silva S, Billiet T, van Es JH, Mc Guire C, Slowicka K, et al. A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. Nat Commun. 30 sept 2014;5:5103.

39. Kummen M, Schrumpf E, Boberg KM. Liver abnormalities in bowel diseases. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 1 août 2013;27(4):531-42.

40. van Munster KN, Bergquist A, Ponsioen CY. Inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis: One disease or two? Journal of Hepatology. 1 janv 2024;80(1):155-68.

41. Kim YS, Hurley EH, Park Y, Ko S. Primary sclerosing cholangitis (PSC) and inflammatory bowel disease (IBD): a condition exemplifying the crosstalk of the gut–liver axis. Exp Mol Med. juill 2023;55(7):1380-7.

42. Catrysse L, Farhang Ghahremani M, Vereecke L, Youssef SA, Mc Guire C, Sze M, et al. A20 prevents chronic liver inflammation and cancer by protecting hepatocytes from death. Cell Death Dis. 2 juin 2016;7(6):e2250.

43. Crost EH, Tailford LE, Monestier M, Swarbreck D, Henrissat B, Crossman LC, et al. The mucin-degradation strategy of Ruminococcus gnavus: The importance of intramolecular trans-sialidases. Gut Microbes. 25 mai 2016;7(4):302-12.

44. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. Ann Rheum Dis. sept 2017;76(9):1614-22.

45. Turpin W, Lee SH, Raygoza Garay JA, Madsen KL, Meddings JB, Bedrani L, et al. Increased Intestinal Permeability Is Associated With Later Development of Crohn's Disease. Gastroenterology. déc 2020;159(6):2092-2100.e5.

46. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. J Hepatol. mars 2020;72(3):558-77.

47. Chen RA, Huang TL, Huang KW, Hung YY. TNFAIP3 mRNA Level Is Associated with Psychological Anxiety in Major Depressive Disorder. Neuroimmunomodulation. 2017;24(4-5):271-5.

48. Talpin A, Kattah MG, Advincula R, Fadrosh D, Lynch K, LaMere B, et al. A20 in dendritic cells restrains intestinal anti-bacterial peptide expression and preserves commensal homeostasis. PLoS One. 2019;14(7):e0218999.

49. Sagar NM, Duboc H, Kay GL, Alam MT, Wicaksono AN, Covington JA, et al. The pathophysiology of bile acid diarrhoea: differences in the colonic microbiome, metabolome and bile acids. Sci Rep. 24 nov 2020;10(1):20436.

50. Gadaleta RM, Erpecum KJ van, Oldenburg B, Willemsen ECL, Renooij W, Murzilli S, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. Gut. 1 avr 2011;60(4):463-72.

51. Marasco G, Cremon C, Barbaro MR, Falangone F, Montanari D, Capuani F, et al. Pathophysiology and Clinical Management of Bile Acid Diarrhea. Journal of Clinical Medicine. janv 2022;11(11):3102.

52. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. Frontiers in Immunology [Internet]. 2019 [cité 16 janv 2023];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00277

53. Hodgkinson K, El Abbar F, Dobranowski P, Manoogian J, Butcher J, Figeys D, et al. Butyrate's role in human health and the current progress towards its clinical application to treat gastrointestinal disease. Clinical Nutrition. 1 févr 2023;42(2):61-75.

54. Thibault R, Coppet PD, Daly K, Bourreille A, Cuff M, Bonnet C, et al. Down-Regulation of the Monocarboxylate Transporter 1 Is Involved in Butyrate Deficiency During Intestinal Inflammation. Gastroenterology. 1 déc 2007;133(6):1916-27.

55. Stoll ML. Therapeutic alteration of the microbiota in rheumatic diseases: Hype or potential? Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 1 déc 2022;36(4):101806.

56. Honap S, Agorogianni A, Colwill MJ, Mehta SK, Donovan F, Pollok R, et al. JAK inhibitors for inflammatory bowel disease: recent advances. Frontline Gastroenterology. 1 janv 2024;15(1):59-69.

Article IV

Familial Mediterranean fever is associated with specific microbiota signature different from other inflammasome-related diseases.

Inès ELHANI, Marius BREDON, Nathalie ROLHION, Aurore DESMONS, Pranvera Krasniqi, Dominique RAINTEAU, Antonin LAMAZIERE, Marion DELPLANQUE, Samuel DESHAYES, Iria GONZALES, Laura CREUSOT, Cyriane OEUVRAY, Harry SOKOL, Sophie GEORGIN-LAVIALLE.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à décrire la composition du microbiote intestinal des patients atteints de maladies auto-inflammatoires liées aux inflammasomes, en particulier la FMF, le CAPS et le MKD.

Nous avons obtenu les accords éthiques nécessaires la réalisation de ce travail (Comité de protection des personnes Sud-Est III, 2022-A02073-40). Les selles des patients ont été collectées puis analysées afin de déterminer la composition du microbiote intestinal après séquençage shotgun.

Nous avons inclus 104 patients, dont 88 patients atteints de FMF présentant deux mutations pathogènes du gène *MEFV*, 12 patients CAPS et 4 patients MKD. L'analyse du microbiote intestinal a mis en évidence une dysbiose chez les patients atteints de FMF définie par une diminution de la richesse microbienne, ainsi qu'un profil qualitatif significativement différent de celui des sujets sains. Parmi les espèces microbiennes dont l'abondance était significativement diminuée, *Hafnia alvei* et *Parvula* dont connues pour être productrices d'AGCC. Par ailleurs, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus vestibularis*, qui possèdent des activités anti-inflammatoires via l'inhibition de la voie NF-κB, étaient diminuées.

A l'inverse, les mesures de la diversité microbienne ne retrouvaient pas de différence entre les patients atteints de CAPS, de MKD et les sujets sains. Ces résultats pourraient être limités par le faible effectif des groupes, lié à la rareté de la maladie ou par le bon contrôle de la maladie au moment de la collecte de selles.

Les résultats de ce travail ont permis de confirmer la présence d'une dysbiose chez les patients atteints de FMF en utilisant le séquençage shotgun, plus puissant que le séquençage 16S utilisé jusque-là. Les travaux suivants consisteront à décrire le métabolome fécal des patients afin de rechercher des perturbations des métabolites dérivés du microbiote intestinal qui pourraient participer au phénotype digestif et inflammatoire des patients.

L'article original qui découle de ce travail est en cours de rédaction.

Familial Mediterranean fever is associated with specific microbiota signature different from other inflammasome-related diseases.

Inès ELHANI[1,2,3]*, Marius BREDON[1,2]*, Nathalie ROLHION[1,2], Aurore DESMONS[4], Pranvera Krasniqi[4], Dominique RAINTEAU[4], Antonin LAMAZIERE[4], Marion DELPLANQUE[3], Samuel DESHAYES[5], Iria GONZALES[1,2], Laura CREUSOT[1,2], Cyriane OEUVRAY[1,2], Harry SOKOL[1,2,6], Sophie GEORGIN-LAVIALLE[1,2,3].

[1] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Gastroenterology Department, 75012 Paris, France
[2] Paris Center for Microbiome MedICIsne (PaCeMM) FHU, Paris, France
[3] AP-HP, Tenon Hospital, Department of internal medicine, National reference center for autoinflammatory diseases ad AA amyloidosis (CEREMAIA)
[4] Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, INSERM, AP-HP, Département Metomics, Hôpital Saint Antoine, 75000 Paris, France.
[5] Department of Internal Medicine, Caen University Hospital, Caen, France.
[6] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

Corresponding author details:
Dr Inès ELHANI, ines.elhani@aphp.fr
& Pr Sophie Georgin-Lavialle, sophie.georgin-lavialle@aphp.fr
Sorbonne University, AP-HP, Tenon Hospital, Department of internal medicine, National reference center for autoinflammatory diseases ad AA amyloidosis (CEREMAIA)
4 rue de la Chine, 75020, Paris, FRANCE

Abstract

Introduction: Familial Mediterranean Fever (FMF) is the most common inherited autoinflammatory disease. It is associated with pathogenic variants in *MEFV*, which leads to the hyperactivation of the pyrin inflammasome. It is characterized by recurrent febrile attacks and gastrointestinal (GI) involvement, such as aseptic peritonitis. Dysbiosis, or gut microbiota imbalances, has been linked to inflammatory diseases. Preliminary studies identified dysbiosis in FMF patients using 16S rRNA sequencing, which has a limited resolution. Two other inflammasome-related monogenic autoinflammatory diseases: cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) and mevalonate kinase deficiency (MKD) are associated with GI involvement. We aimed to describe microbiota composition of patients with FMF, CAPS and MKD using shotgun sequencing.

Methods: This cross-sectional study included 88 FMF patients, 13 CAPS patients and 5 MKD patients followed in the French reference center for auto-inflammatory diseases in Tenon Hospital, Paris. Shotgun metagenomic sequencing was performed on fecal DNA.

Results: FMF patients exhibited significant gut dysbiosis compared to healthy controls, with reduced microbial diversity and distinct microbial communities ($p<0.001$ and $p=0.026$, respectively). The abundance of SCFA-producing bacteria, such as *Hafnia alvei* and *Veillonella parvula*, were decreased in FMF patients. Moreover, the gut microbiota of FMF patients was depleted in 3 bacteriophage strains, Lactococcus virus c2, Sterptococcus phage YMC 2011, Lactococcus virus bIL67. Conversely, no significant dysbiosis was detected in CAPS and MKD patients.

Discussion: This study confirms substantial gut microbiota alterations in FMF patients, suggesting a link between dysbiosis and inflammation. The lack of significant microbial changes in CAPS and MKD suggests different pathogenic mechanisms.

Word count
Abstract: 249 words
Manuscript: 2342 words

Keywords: Familial Mediterranean Fever, Gut microbiota, Dysbiosis, Autoinflammatory diseases, Inflammasome

Introduction

Familial Mediterranean Fever (FMF) is the most common monogenic autoinflammatory disease (AID), associated with mutations in *MEFV* and leading to the excessive activation of the pyrin inflammasome (1). Patients typically experience recurrent febrile attacks accompanied by abdominal pain, which may be associated with cutaneous and/or rheumatological symptoms. Gastrointestinal (GI) involvement is a hallmark of FMF, with most patients presenting recurrent aseptic peritonitis, leading to significant abdominal pain and often resulting in frequent unnecessary surgical interventions (2). Moreover, FMF is recognized as a risk factor for the development of inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease (3).

In addition to FMF, two other rare inflammasome-related monogenic AIDs are associated with digestive involvement: cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) and mevalonate kinase deficiency (MKD). The first is associated with pathogenic mutations in *NLRP3* leading to the excessive activation of the NLRP3 inflammasome while the second is associated with mutations in *MVK* leading to the excessive activation of the pyrin inflammasome (4). Abdominal pain is reported in 44% of CAPS patients and 88% of MKD patients (5,6). Furthermore, MKD has been described as a cause of very early onset IBD (7–9).

Perturbations in gut microbial communities, known as dysbiosis, have been linked to the development and severity of several inflammatory diseases, including IBD and rheumatoid arthritis (10,11). Overrepresentation of pro-inflammatory bacteria may disrupt the gut barrier and activate both local and systemic inflammation (12).

Our team has previously shown, using 16S rRNA sequencing, that the gut microbiota of FMF patients differs from that of healthy individuals, particularly with an overgrowth of *Ruminococcus gnavus* (13). However, 16S rRNA sequencing provides limited taxonomic resolution and lacks functional insight, while shotgun metagenomics provides species-level resolution and a comprehensive functional analysis (14).

In this study, we aimed to confirm our previous findings regarding FMF using the more detailed shotgun sequencing method, which offers a deeper and clearer understanding of gut microbiota. Finally, we aimed to describe the gut microbiota profile of CAPS and MKD patients.

Methods

Patients' inclusion

We conducted a cross-sectional study in the French reference center for auto-inflammatory diseases of Tenon hospital (Paris). This study included homozygous and compound heterozygous FMF patients from our previously published cohort (13). Fecal samples that remained from the original collection were utilized for metagenomic sequencing. Inclusion to the study was proposed to all patients diagnosed with CAPS, MKD that were followed-up in the French reference center for adult AID located in Tenon Hospital, Paris, FRANCE.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the institutional review boards (Comité de protection des personnes Sud-Est III, 2022-A02073-40 and comité d'éthique de la recherche, Sorbonne Université). Control subjects were selected from "Suivitheque" Biobank (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV, IRB 00003835 Suivitheque study; registration number 2012/05NICB).
Disease characteristics including mutational status, sex, age, organ involvement and current treatment were extracted from medical records. Patients completed a form on the day of collection that included blood in the stool, stool consistency using the Bristol Stool Scale (BSS) (15), current antibiotic use, number of bowel movements per day, and presence of inflammatory symptoms (fever, joint pain, abdominal pain, muscle pain).
Participants collected stool samples at home and stored them in provided containers at -20°C. The samples were returned to the laboratory within 7 days, where they were aliquoted and stored at -80°C. Samples remained frozen at this temperature until DNA extraction for microbiota analysis.

DNA extraction and sequencing

Stool samples were resuspended in MGIEasy Stool Sample Collection Kit (1000005265 / 1000003702) and DNA extraction was performed using MagPure Stool DNA LQ Kit (384 RXN). 700µl stool sample suspension were transferred to 2.0ml deepwell plates containing MagPure grinding beads using MGI-STP7000, and extraction was performed using MGI-SP960 automation robot. Cell lysis was performed by beat-beating plate for 1min at 1600 rpm and thermal lysis at 650C for 20min. For DNA purification, 340µl of sample were used.

DNA libraries were prepared using MGIEasy FS DNA Library Prep Set (1000006988), circularized using MGIeasy circularization module V2.0 (1000005260) and sequenced on DNBSEQ-T7 using High-throughput Sequencing Set (FCL PE150) (1000016106).

Raw sequence data are accessible in the European Nucleotide Archive (accession number PRJNA951620).

Read processing and quality control

Reads quality was checked with FastQC (version 0.11.9), and low-quality reads and sequencing adapters were removed using Trimmomatic (16) (version 0.39). Reads shorter than 75 base pairs were discarded. Host-reads were removed using KneadData with default parameters (version 0.10.0; http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata) by mapping reads to the Homo sapiens reference database (17) (build hg37dec_v0.1).

Microbiota analysis

The samples were taxonomically profiled using MetaPhlAn 4 (18). For the subsequent analyses (except for alpha-diversity calculations), the abundance of each taxon present in a sample was normalized using the relative method to allow sample-to-sample comparison. Taxa whose average abundance and prevalence were less than 0.1% and 3%, respectively, were discarded.

Functional potential analysis of the metagenomic samples (pathway profiles and gene-family abundances) was performed using HUMAnN3 (19) (version v3.0.0, UniRef database release 07-2021).

Principal coordinates analyses (PCoA) were carried out on the Bray-Curtis dissimilarity matrices constructed from the abundance of species and pathways. Communities that emerged were verified using a PERMANOVA test with Vegan package (20) (version 2.5-7). Figures were plotted with the ggplot2 (21) and ComplexHeatmap (22) packages.

Multivariable association between microbial community abundance and timepoint was examined with MaAsLin2 (23). Age and sex factors were included in each analysis.

Results

Patients with FMF display significant dysbiosis compared to healthy subjects

Eighty-six FMF patients (46 women, 40 men) with 2 pathogenic variants of *MEFV* were included (Table 1). Their median age was 46.5 years [19-80]. Colchicine was prescribed in 85% of the patients at the time of stool collection. Eleven patients were treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs (Bdmards), including 8 (9%) who were treated with anakinra (7 for colchicine resistance, 1 for AA amyloidosis), and one with TNF-α blockers (for spondylitis). No patient had received antibiotics in the month before sampling. Nine patients declared suffering from an FMF attack at stool collection, all of whom reported abdominal pain. Joint and/or muscle pain was reported by 21 patients (24%).

FMF patients displayed significant decrease in microbial diversity as measured by the Chao1 indices (Figure 1A, p<0.001). Moreover, PCoA of Bray-Curtis distances revealed distinct clustering of gut microbiota composition between FMF patients and healthy subjects (p=0.026), suggesting significant alterations in microbial communities.

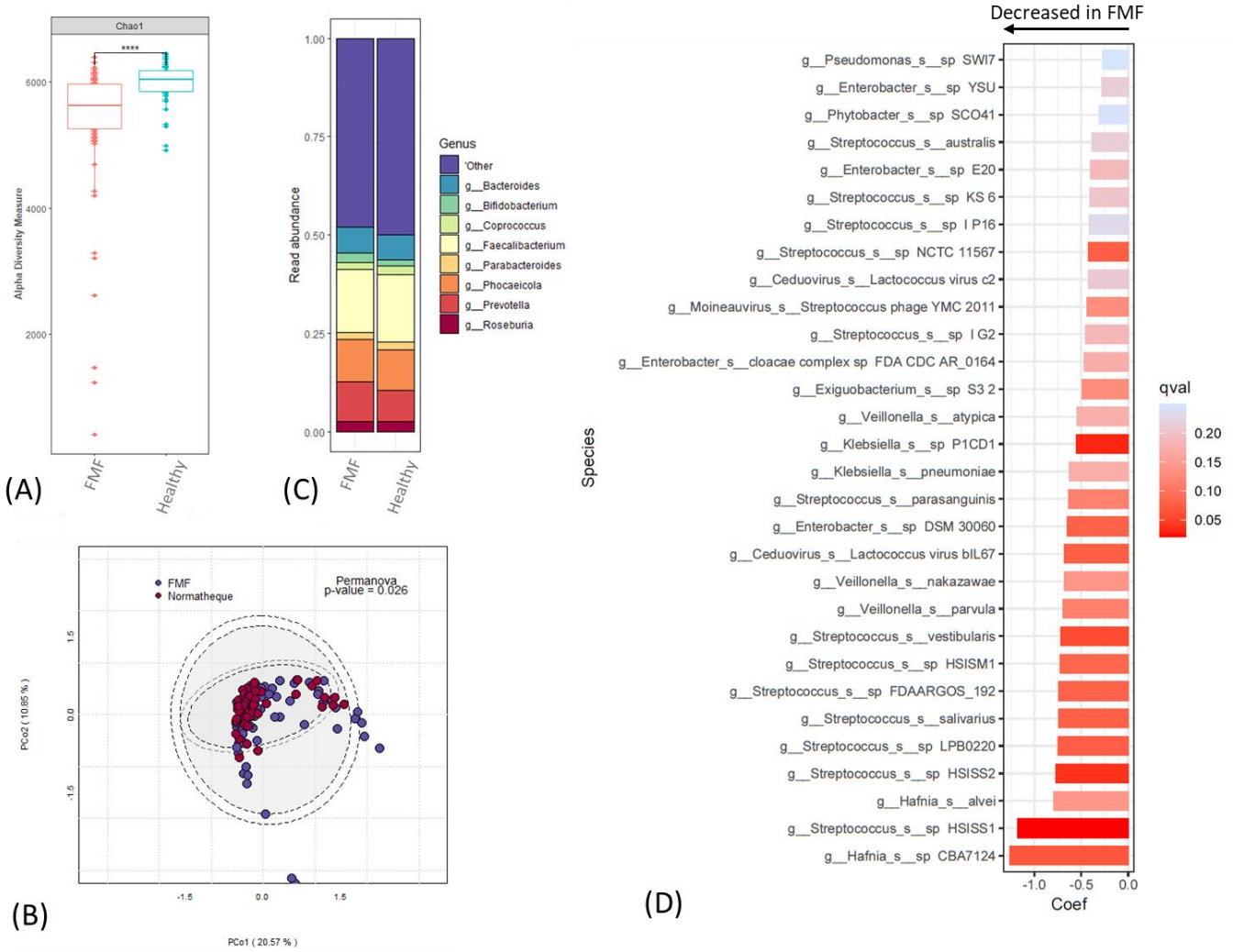


Figure 1. Comparison of gut microbiota between patients with Familial Mediterranean Fever (FMF) and healthy individuals.

(A) Alpha diversity measured with the Chao1 index of the gut microbiota showing a significant reduction in diversity in FMF patients compared to healthy individuals (****$p < 0.0001$). **(B)** Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance, illustrating a significant clustering of gut microbiota samples between FMF patients and healthy subjects (p-value = 0.026). **(C)** Relative abundance of dominant microbial genera in the gut microbiota of FMF patients and healthy individuals. **(D)** Bar plot showing the differential abundance of key microbial taxa between FMF patients and healthy subjects, identified using MaAsLin2

Taxonomic analysis revealed an increase in bacteria from the families Prevotellaceae and Lachnospiraceae, and a decrease in bacteria from the family Oscillospiraceae in FMF patients. At the genus levels, *Prevotella* and *Coprococcus* were decreased, while *Bifidobacterium* was increased in FMF patients (Fig 1C).

Among the 30 microbial taxa that were found to be significantly decreased in FMF (Fig. 1D), 4 belonged to the genre Enterobacter and 12 to the genre Streptococcus. The remaining bacteria belonged to the genres *Pseudomonas, Phytobacter, Moineauvirus, Exiguobacterium, Veillonella* and *Hafnia*. In particular, *Hafnia alvei* and Veillonella parvula was previously suggested to produce SCFAs, especially acetate and propionate (24,25). Moreover, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus vestibularis* have anti-inflammatory properties through NF-kB inhibition (26). Three strains of bacteriophages (Lactococcus virus c2, Sterptococcus phage YMC 2011, Lactococcus virus bIL67) were decreased in FMF patients.

No evidence of specific dysbiosis in CAPS and MKD

Thirteen patients with CAPS and five patients with MKD and sex and age-matched healthy controls were included (Table 1). The median age at stool collection was 47.5 years [20-65] and 9 were women (50%). Abdominal pain was reported in 7 patients on stool collection day (39). Microbiota analyses revealed a non-significant decrease in microbial richness measured with the Chao1 index in CAPS patients, but not in MKD, as compared to healthy subjects (Fig. 2A). Principal component analysis revealed that there was no significant difference in the microbial profiles between the groups (Fig. 2B). In CAPS patients, a decrease of Bacteroides, and an increase in *Prevotella* and *Phocaeicola* was observed. MKD was associated with a decrease in Prevotella and C*andidatus cibionibacter* and an increase in *Ruminococcus* (Fig. 2C)

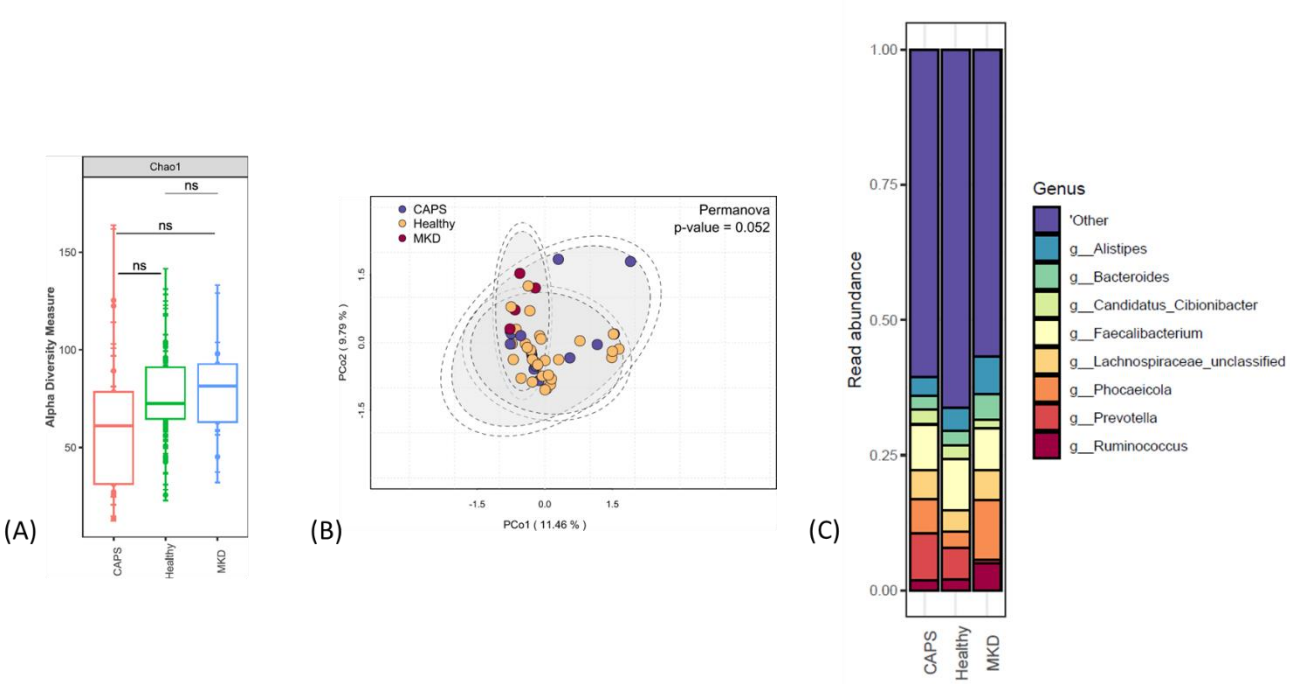


Figure 2. Diversity and taxonomic composition of gut microbiota in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome and mevalonate kinase deficiency,

(A) Boxplot comparing the alpha diversity (Shannon Index) between A20 patients (HA20) patients and healthy controls. (B) Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity. (C) Taxonomic composition to the genre

Discussion

In this work, we investigated the gut microbiota of 106 patients with inflammasome-related diseases, including 88 with FMF, 13 with CAPS, and 5 with MKD. Our findings revealed a significant reduction in microbial diversity in FMF patients, with their microbiota composition differing notably from that of the control group. However, no significant differences in microbiota composition were observed in patients with MKD and CAPS.

FMF is characterized by a high frequency of gastrointestinal (GI) involvement, particularly aseptic peritonitis, which is the primary symptom of the disease. Out-of-flare abdominal pain affects up to 75% of patients and functional GI disorders are reported in nearly 40% of FMF patients (27,28).

The interplay between the gut microbiota and inflammation in FMF is further supported by the observed effects of diet on disease activity. For instance, a high-fat diet and wheat consumption have been associated with increased disease activity, while anti-inflammatory diets and nutritional supplements have shown potential for disease control in smaller studies (29). In this context, our study provides additional evidence that gut dysbiosis may contribute to the inflammatory processes underlying FMF.

Specifically, our analysis revealed a decrease in several bacterial taxa in FMF patients, including *Hafnia alvei* and *Veillonella parvula*, which are known producers of SCFAs, such as acetate and propionate. SCFAs are crucial for maintaining the integrity of the gut barrier. In particular, 3 membrane G-protein-coupled receptors (GPR109a, GPR43 and GPR41) hance the expression of tight junction and mucin proteins through the activation of the AMPc pathway (30).

Therefore, the reduction of these bacteria could weaken gut barrier function, allowing bacteria and their products to translocate into the bloodstream, which could increase systemic inflammation. Disruption of the gut barrier has already been implicated in FMF. First, FMF patients show elevated systemic antibodies against commensal microbiota (31). This may indicate an increased bacterial translocation into the bloodstream, leading to systemic immune reactivity. Additionally, elevated serum SCFAs in FMF patients further support the presence of gut barrier dysfunction (32). In addition, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus vestibularis* were found to be decreased in FMF patients. These bacteria are known to exert anti-inflammatory properties by inhibiting the NF-kB pathway (26). Therefore, the bacterial imbalance observed could participate in the inflammatory state of FMF patients.

Interestingly, our study also found a reduction in specific bacteriophages, such as Lactococcus virus c2 and Streptococcus phage YMC 2011. Bacteriophages are viruses that infect specific bacteria (33). By doing so, they participate in shaping the gut microbiota. While the precise role of these bacteriophages in intestinal inflammation is not fully understood, their reduction may be indicative of broader disruptions in microbial community dynamics (34). A decrease in fecal Lactococcus phages has already been described in non-alcoholic liver disease (35). Bacteriophages play a critical role in regulating bacterial populations, and their decline could lead to an overgrowth of certain pathogenic bacteria, potentially contributing to the inflammatory phenotype in FMF.

The confirmation in this work of dysbiosis with a decrease of the abundance of anti-inflammatory taxa in FMF suggests that there may be a place for gut microbiota modulation in the management of the disease. In particular, probiotics have been studied in regards of GI inflammation in IBD and other immune-related diseases, such as rheumatoid arthritis (43,44). The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) suggests that certain probiotics may be used to induce remission in patients with mild to moderate ulcerative colitis (UC) (45). In FMF, a probiotic containing Lactobacillus acidophilus is associated in vitro with reduced growth of the pathogen *Escherichia coli* (46). In vivo, the same probiotics led to the decrease of *E. coli* and *Shigella* in FMF women. Fecal microbiota transplant has been described in one patient with concurrent *C. difficile* infection and FMF flare, which was associated with resolution of both conditions (47). Further studies are needed to investigate the potential beneficial effects of microbiota modulation therapy in FMF.

While both FMF and MKD involve activation of the pyrin inflammasome, the clinical presentation and gastrointestinal involvement differ significantly between these diseases (6). MKD is additionally associated with defects in Rho-GTPases, which play a crucial role in various cellular processes, including those related to maintaining intestinal barrier function (36,37). Dysfunction of Rho-GTPases has been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, particularly through mechanisms such as impaired tight junctions and aberrant immune responses in the gut (37,38). Therefore, it is particularly surprising that we could not find any significant difference in the microbiota profile. This may be due to the smaller sample size in these groups. Moreover, only one patient had abdominal pain on the day of collection and the disease may have been controlled in the other patients.

In contrast, CAPS is driven by excessive activation of the NLRP3 inflammasome, leading to IL-1β and IL-18 production, but without the same microbiota changes seen in FMF. The NLRP3 inflammasome has a dual effect in the gut (39). NLRP3 deficiency is associated with GI inflammation due to loss of control of the gut microbiota. Moreover, the lack of NLRP3-derived IL-18 is associated with gut barrier dysfunction through upregulation of IL-8. On the other hand, the NLRP3 inflammasome is activated on peripheral blood cells of patients with IBD (39). In addition, NLRP3 inflammasome expression is increased in colonic biopsies, which was correlated to disease activity (40). One study using a hypermorphic variant of NLRP3 was associated with resistance to DSS-induced colitis through upregulation of Tregs (41). Taxonomic composition suggested an increase in *Prevotella* and *Phocaeicola* in CAPS patients. Increased *prevotella* has been described in the gut microbiota of patients with rheumatoid arthritis (42). While abdominal pain is not the main symptom of CAPS, it is still frequently reported (5). In this study, the observed decrease in bacterial richness was not statistically significant. Therefore, further research with a larger patient cohort is needed to confirm these findings.

In conclusion, this study confirms the significant role of gut dysbiosis in the pathogenesis of FMF, highlighting specific microbial changes that may contribute to the inflammatory state in these patients. Although the analysis is limited by small sample size due to the rarity of the diseases, the absence of similar dysbiosis in CAPS and MKD patients suggests that different mechanisms may underlie gut involvement in these conditions. Further research with larger cohorts and functional studies will be crucial to fully elucidate the interactions between the gut microbiota and systemic inflammation in monogenic autoinflammatory diseases.

	FMF n=88	CAPS n=13	MKD n=5
Women	48 (54)	6 (46)	3 (60)
Age at stool collection (years)	46.5 [19-80]	48 [20-65]	42 [25-52]
Genotype *MEFV*			
Homozygotes	63 (72)		
M694V/M694V	46 (52)		
Compound heterozygotes	25 (28)		
Treatments			
Colchicine treatment at stool collection	75 (85)	0	2 (40)
Colchicine dosage (mg/day)	1.5 [0.5-2.5]		
Biological DMARD	11 (13)	8 (62)	2 (40)
IL-1β blocker	10 (11)	8 (62)	2 (40)
Symptoms on collection day			
flare	9 (11)	2 (15)	2 (40)
Abdominal pain	9 (11)	6 (46)	1 (20)
Joint/muscle pain	21 (24)	6 (46)	2 (40)
Diarrhea	15 (17)	1 (8)	1 (20)

Values are median [range] of value (%). DMARD: disease-modifying antirheumatic drugs. FMF: Familial Mediterranean fever, IL: interleukin, DMARD: disease-modifying anti-rheumatic drug

Table 1. Clinical characteristics of patients with familial Mediterranean fever, cryopyrin-associated periodic syndrome and mevalonate kinase deficiency

References

1. Georgin-Lavialle S, Savey L, Cuisset L, Boursier G, Boffa JJ, Delplanque M, et al. French protocol for the diagnosis and management of familial Mediterranean fever. La Revue de Médecine Interne. 1 nov 2023;44(11):602-16.

2. Kaşifoğlu T, Cansu DU, Korkmaz C. Frequency of abdominal surgery in patients with familial Mediterranean fever. Intern Med. 2009;48(7):523-6.

3. Papadopoulos VP, Antoniadou C, Ritis K, Skendros P. MEFV Mutations in IBD Patients: A Systematic Review and Meta- analysis. J Gastrointestin Liver Dis. 19 mars 2022;31(1):85-97.

4. Georgin-Lavialle S, Ducharme-Benard S, Sarrabay G, Savey L, Grateau G, Hentgen V. Systemic autoinflammatory diseases: Clinical state of the art. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 13 juin 2020;101529.

5. Fayand A, Cescato M, Corre LL, Terré A, Wacheux M, Zhu YYJ, et al. Pathogenic variants in the NLRP3 LRR domain at position 861 are responsible for a boost-dependent atypical CAPS phenotype. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1 nov 2023;152(5):1303-1311.e1.

6. Ter Haar NM, Jeyaratnam J, Lachmann HJ, Simon A, Brogan PA, Doglio M, et al. The Phenotype and Genotype of Mevalonate Kinase Deficiency: A Series of 114 Cases From the Eurofever Registry. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2016;68(11):2795-805.

7. Ouahed J. Expanding Contributions of Monogenic Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. Inflammatory Bowel Diseases. 1 nov 2021;27(11):1870-2.

8. Eslamian G, Jamee M, Momen T, Rohani P, Ebrahimi S, Mesdaghi M, et al. Genomic testing identifies monogenic causes in patients with very early-onset inflammatory bowel disease: a multicenter survey in an Iranian cohort. Clinical and Experimental Immunology. 1 juill 2024;217(1):1-11.

9. Stange EF, Schroeder BO. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. oct 2019;13(10):963-76.

10. Tsetseri MN, Silman AJ, Keene DJ, Dakin SG. The role of the microbiome in rheumatoid arthritis: a review. Rheumatology Advances in Practice. 1 janv 2023;7(2):rkad034.

11. Lee M, Chang EB. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. Gastroenterology. 1 janv 2021;160(2):524-37.

12. Delplanque M, Benech N, Rolhion N, Oeuvray C, Straube M, Galbert C, et al. Gut microbiota alterations are associated with phenotype and genotype in familial Mediterranean fever. Rheumatology (Oxford). 2 avr 2024;63(4):1039-48.

13. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. Sci Rep. 4 févr 2021;11(1):3030.

14. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. oct 2016;44(7):693-703.

15. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 1 août 2014;30(15):2114-20.

16. Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. Nucleic Acids Research. 28 janv 2015;43(D1):D670-81.

17. Blanco-Míguez A, Beghini F, Cumbo F, McIver LJ, Thompson KN, Zolfo M, et al. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. Nat Biotechnol. nov 2023;41(11):1633-44.

18. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, Dubois L, Asnicar F, Maharjan S, et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. Turnbaugh P, Franco E, Brown CT, éditeurs. eLife. 4 mai 2021;10:e65088.

19. Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. Journal of Vegetation Science. 2003;14(6):927-30.

20. Wickham H. ggplot2 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 20 août 2024]. (Use R!). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24277-4

21. Gu Z. Complex heatmap visualization. iMeta. 2022;1(3):e43.

22. Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. PLoS Comput Biol. nov 2021;17(11):e1009442.

23. Fontana F, Longhi G, Carli E, Alessandri G, Mancabelli L, Lugli GA, et al. Revealing the genetic traits of the foodborne microbial genus hafnia: Implications for the human gut microbiome. Environ Microbiol. avr 2024;26(4):e16626.

24. Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. The ISME Journal. 1 juin 2014;8(6):1323-35.

25. Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, Pot B, Doré J, Ehrlich SD, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. Appl Environ Microbiol. févr 2014;80(3):928-34.

26. Akman S, Yazici S, Ozturk C. Gastrointestinal evaluation in colchicine-treated familial Mediterranean fever patients with chronic abdominal pain: cases series. Arch Argent Pediatr. 1 oct 2018;116(5):e649-54.

27. Ekinci RMK, Balcı S, Akay E, Tumgor G, Dogruel D, Altintas DU, et al. Frequency of functional gastrointestinal disorders in children with familial Mediterranean fever. Clin Rheumatol. mars 2019;38(3):921-6.

28. Mansueto P, Seidita A, Chiavetta M, Genovese D, Giuliano A, Priano W, et al. Familial Mediterranean Fever and Diet: A Narrative Review of the Scientific Literature. Nutrients. 5 août 2022;14(15):3216.

29. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. J Gastroenterol. janv 2017;52(1):1-8.

30. Manukyan GP, Ghazaryan KA, Ktsoyan ZA, Khachatryan ZA, Arakelova KA, Kelly D, et al. Elevated Systemic Antibodies towards Commensal Gut Microbiota in Autoinflammatory Condition. PLOS ONE. 9 sept 2008;3(9):e3172.

31. Ktsoyan ZA, Beloborodova NV, Sedrakyan AM, Osipov GA, Khachatryan ZA, Kelly D, et al. Profiles of Microbial Fatty Acids in the Human Metabolome are Disease-Specific. Front Microbiol. 2010;1:148.

32. Federici S, Kviatcovsky D, Valdés-Mas R, Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Infect. juin 2023;29(6):682-8.

33. Kirk D, Costeira R, Visconti A, Khan Mirzaei M, Deng L, Valdes AM, et al. Bacteriophages, gut bacteria, and microbial pathways interplay in cardiometabolic health. Cell Rep. 27 févr 2024;43(2):113728.

34. Lang S, Demir M, Martin A, Jiang L, Zhang X, Duan Y, et al. Intestinal Virome Signature Associated With Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. 1 nov 2020;159(5):1839-52.

35. Munoz MA, Jurczyluk J, Simon A, Hissaria P, Arts RJW, Coman D, et al. Defective Protein Prenylation in a Spectrum of Patients With Mevalonate Kinase Deficiency. Front Immunol. 2019;10:1900.

36. Li X, Zhang M, Zhou G, Xie Z, Wang Y, Han J, et al. Role of Rho GTPases in inflammatory bowel disease. Cell Death Discov. 23 janv 2023;9(1):1-13.

37. López-Posadas R, Becker C, Günther C, Tenzer S, Amann K, Billmeier U, et al. Rho-A prenylation and signaling link epithelial homeostasis to intestinal inflammation. J Clin Invest. févr 2016;126(2):611-26.

38. Lazaridis LD, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Georgitsi M, Damoraki G, Polymeros D, et al. Activation of NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Differences Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Dig Dis Sci. sept 2017;62(9):2348-56.

39. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KSB, McIntire CR, LeBlanc PM, et al. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. Immunity. 26 mars 2010;32(3):367-78.

40. Yao X, Zhang C, Xing Y, Xue G, Zhang Q, Pan F, et al. Remodelling of the gut microbiota by hyperactive NLRP3 induces regulatory T cells to maintain homeostasis. Nat Commun. 1 déc 2017;8(1):1896.

41. Zhao T, Wei Y, Zhu Y, Xie Z, Hai Q, Li Z, et al. Gut microbiota and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to novel therapeutic opportunities. Front Immunol [Internet]. 8

sept 2022 [cité 1 sept 2024];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1007165/full

42. Akutko K, Stawarski A. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Inflammatory Bowel Diseases. Journal of Clinical Medicine. janv 2021;10(11):2466.

43. Oliviero F, Spinella P. Benefits of Probiotics in Rheumatic Diseases. Frontiers in Nutrition [Internet]. 2020 [cité 6 sept 2023];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00157

44. Bischoff SC, Escher J, Hébuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. Clin Nutr. mars 2020;39(3):632-53.

45. Pepoyan E, Marotta F, Manvelyan A, Galstyan A, Stepanyan L, Grigoryan H, et al. Placebo-resistant gut bacteria: Akkermansia muciniphila spp. and Familial Mediterranean fever disease. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1336752.

46. Georgin-Lavialle S, Delplanque M, Bachmeyer C, Savey L, Sokol H, FMF Clostridium Study Group. Clostridioides difficile infection as a potential trigger for Familial Mediterranean Fever attacks and fecal transplantation as a rescue. Eur J Intern Med. 7 juin 2024;S0953-6205(24)00228-0.

Discussion

Les maladies auto-inflammatoires monogéniques sont des maladies rares mais associées à une lourde morbi-mortalité. En particulier, le HA20, la FMF, Les CAPS et le MKD sont associées à d'importants troubles digestifs.

Le HA20, qui est associé à une activation excessive de la voie NF-kB, est une maladie encore imparfaitement connue. Ce travail a permis de mettre en lumière l'importance des troubles digestifs de la maladie. En effet, l'analyse de la littérature a recensé que les atteintes digestives étaient présentes chez presque la moitié des patients, et qu'il s'agit de l'atteinte principale du HA20. Dans la cohorte Française présentée ici, tous les patients ont présenté des douleurs abdominales et une aphtose buccale. Le phénotype clinique du HA20 est large. Dans notre revue systématique de la littérature, nous avons retrouvé des atteintes digestives de sévérité hétérogène. Alors que certains patients présentaient des douleurs abdominales isolées, des patients présentaient une inflammation digestive diffuse pouvant affecter l'intégralité du tube digestif. En particulier les patients pouvaient présenter des œsophagites et des gastrites. De plus, des patients présentaient un tableau d'ulcères digestifs isolés ou diffus. Dans les atteintes les plus sévères, les patients présentaient des tableaux de colite grave survenant dans la petite enfance. L'intensité de la maladie et la survenue précoce avait déjà fait évoquer l'association du HA20 avec des MICI de survenue très précoce et la recherche de variant pathogène de *TNFAIP3* fait partie de certains panels spécialisés. Notre analyse histologique a permis de confirmer que l'atteinte digestive du HA20 ne correspond pas à une atteinte de MICI, notamment avec l'absence de lésions spécifiques telles que les cryptites. Sur la base des données issues de modèles murins présentant une insuffisance de TNFAIP3, nous aurions pu anticiper des signes histologiques indiquant une barrière gastro-intestinale affaiblie, avec une apoptose accrue et une diminution de l'immunomarquage de Muc-2 (38). Toutefois, ces modèles murins ne reproduisent pas parfaitement la pathogénèse du HA20, car les cellules coliques des souris sont totalement dépourvues d'expression de A20, tandis que les patients expriment généralement environ 50 % de la protéine normale en raison de la présence d'un seul gène fonctionnel. Ainsi, bien que les patients puissent produire suffisamment de A20 pour maintenir l'homéostasie dans des conditions normales, cette production peut devenir insuffisante en cas de stress externe.

Cette maladie reste probablement insuffisamment diagnostiquée. Au cours de ce travail, nous avons proposé un algorithme de séquençage du gène de *TNFAIP3* pour le diagnostic du HA20 à destination des cliniciens en lien avec les patients (189).

La fréquence élevée des maladies auto-immunes secondaires au HA20, dues à la diminution du seuil d'activation des lymphocytes B, ont fait suspecter une atteinte hépatique auto-immune associée. Néanmoins, aucun élément n'a confirmé cette hypothèse : aucun des patient inclus ne présentaient d'auto-anticorps spécifiques des hépatites auto-immunes ou de la cholangite biliaire primitive. De plus, les imageries hépatiques ne retrouvaient pas d'atteinte de l'arbre biliaire mais confirmait les stigmates d'hépatopathie chronique chez les patients présentant des perturbations du bilan hépatique. Enfin, les analyses histologiques n'ont pas révélé d'infiltration des espaces portes. Les patients présentent un tableau d'hépatopathie inflammatoire aspécifique. Ces résultats sont concordants avec l'analyse histologique du foie et du tractus digestif précédemment décrite chez les patients HA20. Il est intéressant de noter que A20 est un agent hépatoprotecteur bien connu en raison de ses propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. En effet, les modèles murins de déficience hépatique en A20 sont caractérisés par une inflammation hépatique chronique spontanée (42). Par conséquent, l'haploinsuffisance de A20 dans le foie peut être à l'origine de l'inflammation hépatique non spécifique observée chez les patients.

L'analyse du microbiote intestinal a permis de révéler une dysbiose marquée au cours de l'haploinsuffisance de A20. Nous avons pu inclure 16 patients, constituant une cohorte de taille significative, compte tenu du fait que moins de 200 patients ont été décrits dans la littérature à ce jour. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude préliminaire Toyofuku et al., qui avaient également rapporté une dysbiose mesurée par séquençage 16S chez les patients atteints de HA20 (9). Les patients présentaient une diminution de la richesse microbienne. La diversité bactérienne est un déterminant crucial du microbiote intestinal sur le maintien de l'homéostasie intestinale (190). En effet, les maladies inflammatoires digestives et systémiques sont systématiquement associées à une pauvreté du microbiote intestinal. La dysbiose des patients avec HA20 était associée avec une sur-représentation de *R. gnavus*. Cette espèce du genre *Blautia* possède une activité de dégrader la mucine de l'hôte, afin d'extraire les résidus glyqués qui est sa source principale d'énergie. Ainsi, elle peut être responsable d'une altération de la barrière digestive par une altération de la couche muqueuse. De plus, elle métabolise le phénylalanine d'origine alimentaire en sérotonine, ce qui est associé à la survenue de troubles

digestifs fonctionnels (191). Certaines souches de *R. gnavus* possèdent le résidu glyqué glucorhamnan, qui a montré des propriétés inflammatoires via l'induction de la sécrétion du TNF-α médiée par le TLR4 in vitro. Dans les MICI, une augmentation de l'abondance de *R. gnavus* a été décrite dans le microbiote fécal (192–201) mais aussi dans le microbiote biopsies digestives des patients (202–204). De plus, l'abondance relative de *R. gnavus* a été associée à la sévérité de la maladie dans la maladie de Crohn (195). Enfin, l'abondance de *R. gnavus* dans le microbiote de donneur dans le cadre d'une transplantation de microbiote fécale a été associée à une augmentation du risque d'échec de l'intervention (205). *R. gnavus* a aussi été impliqué dans d'autres maladies inflammatoires, en particulier dans le lupus érythémateux systémique et les spondylarthropathies (LES) (206–208). Enfin, les spondylarthropathies, un groupe de maladies polygéniques rhumatologiques, est également associé à une surreprésentation de *R. gnavus*, dont l'abondance est par ailleurs associé à la sévérité de la maladie (207,208). Le microbiote fécal des patients avec HA20 était également enrichi de *Blautia caecimuris,* une bactérie de la famille Lachnospiraceae. Une surreprésentation de ces deux bactéries a été décrite dans le LES (206,209). L'haploinsuffisance a récemment été décrite comme une cause de LES monogénique et il est intéressant d'observer qu'une signature microbiotique puisse être partagée entre ces deux maladies (2). Toutefois, aucun patient inclus dans notre cohorte ne présentait un LES associé au HA20.

A l'inverse, l'abondance de certaines bactéries aux propriétés anti-inflammatoires était diminuée chez les patients. En particulier, 7 taxa sont connus pour être producteur de butyrate. DE plus, deux bactéries étaient associées à l'imperméabilité de la barrière digestive. *Akkermansia muciniphila* est une bactérie qui constitue 1 à 3% du microbiote intestinal normal Elle produit des vésicules extracellulaires qui favorisent l'expression des protéines constituantes des jonctions serrées et de MUC2, et promeut ainsi la barrière intestinale (210,211). Il est intéressant de noter que le transfert de microbiote de souris déficientes en A20 à des souris de type sauvage conduit à une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS, soulignant le rôle synergique de la déficience en A20 et de la dysbiose dans le développement de la colite (212).

La dysbiose observée chez les patients avec HA20 étaient associée à des perturbations des métabolites dérivés du microbiote intestinal. Le métabolisme des acides biliaires est crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale et hépatique. Son caractère détergent, indispensable à ses fonctions d'absorption des lipides et des vitamines liposolubles, les rendent

également toxique pour la muqueuse digestive. Le métabolisme des acides biliaires dépend fortement de la capacité du microbiote intestinal à réaliser les différentes étapes nécessaires à la réabsorption des acides biliaires. En particulier, la déconjugaison des acides biliaires par la BSH est assurée par les bactéries des familles Firmicutes et Lachnospiraceae, et la transformation en acides biliaires secondaires par les HSDH. Chez nos patients, l'augmentation de l'abondance des acides biliaires conjugués fécaux suggéraient un déficit de déconjugaison. En particulier, la déconjugaison et la transformation en acides biliaires secondaires étaient associées à l'appauvrissement des Firmicutes. Le CDCA est un acide biliaire primaire qui possède des propriétés détergentes stimulant la sécrétion de fluides, la perméabilité de la muqueuse et la motilité intestinale (87). La diarrhée aux acides biliaires est un mécanisme physiopathologique du spectre des troubles fonctionnels intestinaux. Cette entité est également associée aux MICI mais aussi aux pathologies hépatobiliaires (213). L'augmentation de l'excrétion totale des acides biliaires indique également un déficit d'absorption des acides biliaires. L'absorption des acides biliaires est passive dans l'iléum mais dépend d'un récepteur membranaire, ASBT, dans le colon. Ainsi, une diminution de l'expression de ce récepteur peut être responsable d'un déficit d'absorption et d'une augmentation de la clairance fécale des acides biliaires. Une diminution de l'expression d'ASBT a été décrite dans les MICI (214,215), alors que les corticoïdes pourraient augmenter l'expression d'ASBT (216). La malabsorption des acides biliaires, possiblement en lien avec une diminution de l'expression des transporteurs des acides biliaire, pourrait être responsable d'un déficit d'activation du récepteur FXR, qui est un régulateur de NF-kb (50). L'implication du métabolisme des acides biliaires dans le HA20 est soutenue par l'association entre les taux de CDCA et la consistance des selles chez nos patients.

Ainsi, les traitements basés sur la séquestration des acides biliaires primaires sont une piste pour la diarrhée aux acides biliaires. Ils agissent en formant un complexe insoluble avec les acides biliaires qui est éliminé dans les selles. La cholestyramine et le Colesevelam ont notamment montré leur efficacité sur la diminution de la diarrhée liées aux acides biliaires et dans les troubles fonctionnels intestinaux (213). A ce jour, ces traitements ont une autorisation de mise sur le marché dans le traitement de l'hypercholestérolémie primaire mais pas de la diarrhée aux acides biliaires. Par ailleurs, les agonistes de FXR pourraient limiter la production d'acides biliaires par le foie. En ce sens, l'acide obéticholique a été associé à une diminution de la diarrhée liée aux acides biliaires dans des études préliminaires (217). Ce traitement a reçu une autorisation de mise sur le marché en traitement de la cholangite biliaire primitive.

De manière surprenante, nous avons observé une augmentation des AGCC dans les selles des patients atteints de HA20. Ce résultat contraste avec les observations habituelles dans les MICI, où les concentrations fécales de AGCC, et en particulier de butyrate, sont constamment diminuées (52). Le butyrate est un métabolite essentiel qui joue un rôle clé en tant que source d'énergie pour les colonocytes, les cellules de la paroi intestinale, et contribue au maintien de la fonction de la barrière intestinale grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (53).

Dans notre étude, bien que certaines bactéries productrices de butyrate soient réduites chez les patients HA20, nous avons paradoxalement constaté une augmentation de la concentration fécale de butyrate. Cette observation pourrait indiquer un défaut d'absorption plutôt qu'une production accrue. En effet, dans un contexte inflammatoire, comme celui rencontré chez les patients HA20, des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α peuvent réduire l'expression des récepteurs des AGCC sur les cellules de la paroi intestinale (54). Cette diminution de l'absorption du butyrate par les colonocytes pourrait alors conduire à son accumulation dans les selles. Ce défaut d'absorption pourrait avoir des conséquences importantes sur l'intégrité de la barrière intestinale. Le butyrate joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale en renforçant les jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium intestinal, réduisant ainsi la perméabilité intestinale. Lorsque cette fonction est perturbée, cela peut favoriser une altération de la barrière intestinale, permettant le passage de pathogènes et de toxines dans la circulation sanguine, ce qui peut aggraver l'inflammation systémique.

Plusieurs études préliminaires réalisées dans mon laboratoire avaient déjà suggéré une dysbiose chez les patients atteints de FMF (40,42). Au cours de ma thèse, nous avons pu confirmer ces résultats en utilisant le séquençage Shotgun, qui permet une exploration plus précise du microbiome. En particulier, nous avons pu mettre en évidence une diminution de bactéries productrices d'AGCC et de certaines souches de virus bactériophages. Les patients atteints de FMF présentent une diminution de la richesse bactérienne avec une diminution de plusieurs taxons bactériens chez les patients FMF, notamment *Hafnia alvei* et *Veillonella parvula*, qui sont connus pour produire des AGCC, et pourraient donc participer à l'imperméabilité de la barrière digestive via l'augmentation de l'expression des jonctions serrées et des protéines de mucine par l'activation de la voie de l'AMPc (90).

Par conséquent, la réduction de ces bactéries pourrait affaiblir la fonction de la barrière intestinale, permettant aux bactéries et à leurs produits de transiter dans la circulation sanguine,

ce qui pourrait augmenter l'inflammation systémique. En outre, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus vestibularis* ont été trouvés en diminution chez les patients FMF. Ces bactéries sont connues pour exercer des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la voie NF-kB (218,219). Ainsi, le déséquilibre bactérien observé pourrait participer à l'état inflammatoire des patients FMF.

Pour la première fois, notre étude a également noté une réduction de certains bactériophages spécifiques, tels que *Lactococcus virus c2* et *Streptococcus phage YMC 2011*dans le microbiote fécal des patients FMF. Les bactériophages sont des virus qui infectent des bactéries (220). Leur rôle dans le microbiote intestinal est incomplètement élucidé. Néanmoins, ils sont capables de modifier la composition du microbiote intestinal. En particulier, une diminution des phages de *Lactococcus* dans les selles a déjà été décrite dans la Stéato-hépatite non alcoolique (221). Les bactériophages jouent un rôle crucial dans la régulation des populations bactériennes, et leur déclin pourrait entraîner une prolifération de certaines bactéries pathogènes, contribuant potentiellement au phénotype inflammatoire dans la FMF.

Bien que la FMF et la MKD impliquent toutes deux une activation de l'inflammasome pyrine, la présentation clinique et l'implication gastro-intestinale diffèrent considérablement entre ces conditions. La MKD est également associée à des défauts des Rho-GTPases, qui jouent un rôle crucial dans divers processus cellulaires, y compris ceux liés au maintien de la fonction de la barrière intestinale (35,36). La dysfonction des Rho-GTPases a été impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin, notamment par des mécanismes tels que l'altération des jonctions serrées et des réponses immunitaires aberrantes dans l'intestin (36,37). Il est donc particulièrement surprenant que nous n'ayons pas trouvé de différence significative dans le profil du microbiote. Cela pourrait être dû aux tailles d'échantillons plus petites dans ces groupes. De plus, tous les patients atteints de MKD recevaient des médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie (bDMARDs) au moment de l'échantillonnage, ce qui pourrait avoir normalisé leurs profils microbiens intestinaux.

En revanche, le CAPS est principalement dû à une activation excessive de l'inflammasome NLRP3, entraînant la production d'IL-1β et d'IL-18, mais sans les altérations du microbiote observées dans la FMF. L'inflammasome NLRP3 a un effet dual dans l'intestin (38). Une carence en NLRP3 est associée à une inflammation GI en raison de la perte de contrôle du microbiote intestinal. De plus, l'absence d'IL-18 dérivé de NLRP3 est associée à

une dysfonction de la barrière intestinale par la régulation à la hausse de l'IL-8. D'un autre côté, l'inflammasome NLRP3 est activé dans les cellules sanguines périphériques des patients atteints de MICI (38). En outre, l'expression de l'inflammasome NLRP3 est augmentée dans les biopsies coliques, corrélée à l'activité de la maladie (39). Une étude utilisant une variante hypermorphique de NLRP3 a été associée à une résistance à la colite induite par le DSS grâce à une régulation à la hausse des Tregs (40). La composition taxonomique suggère une augmentation de *Prevotella* et *Phocaeicola* chez les patients CAPS. Une augmentation de *Prevotella* a été décrite dans le microbiote intestinal des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (41). Bien que la douleur abdominale ne soit pas le principal symptôme du CAPS, elle est encore fréquemment signalée (5). Dans cette étude, la diminution observée de la richesse bactérienne n'était pas statistiquement significative. Par conséquent, des recherches supplémentaires avec une cohorte de patients plus importante sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

La présence de dysbiose avec une diminution de l'abondance des taxons anti-inflammatoires dans la FMF suggère qu'il pourrait y avoir une place pour la modulation du microbiote intestinal dans la gestion de la maladie. En particulier, les probiotiques ont été étudiés en relation avec l'inflammation GI dans les MICI et d'autres maladies liées au système immunitaire, telles que la polyarthrite rhumatoïde (42,43). La Société européenne de nutrition clinique et métabolisme (ESPEN) suggère que certains probiotiques peuvent être utilisés pour induire une rémission chez les patients atteints de colite ulcéreuse (CU) légère à modérée (44). Dans la FMF, un probiotique contenant *Lactobacillus acidophilus* est associé in vitro à une réduction de la croissance du pathogène *Escherichia coli* (45). In vivo, le même probiotique a conduit à une diminution de *E. coli* et *Shigella* chez les femmes FMF. Une transplantation de microbiote fécal a été décrite chez un patient présentant une infection concomitante à *C. difficile* et une poussée de FMF, ce qui a été associé à la résolution des deux conditions (46). Davantage d'études sont nécessaires pour explorer les effets bénéfiques potentiels de la thérapie de modulation du microbiote dans la FMF.

Conclusion

En conclusion, ce travail représente la première description détaillée du microbiote intestinal par séquençage Shotgun chez les patients atteints de HA20 et de FMF, ainsi que la toute première caractérisation du microbiote pour les patients atteints de CAPS et de MKD. Les résultats obtenus mettent en lumière une dysbiose marquée chez les patients avec HA20 et FMF, soulignant le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la pathogenèse de ces maladies auto-inflammatoires. La surreprésentation de bactéries comme *Ruminococcus gnavus* dans le HA20 et la diminution de la richesse bactérienne et des taxons anti-inflammatoires dans la FMF suggèrent des pistes de recherche thérapeutiques prometteuses.

L'absence de dysbiose similaire chez les patients atteints de CAPS et de MKD indique des mécanismes pathogéniques distincts, bien que l'implication du microbiote ne puisse être complètement écartée. Cette étude ouvre des perspectives importantes pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques, incluant l'utilisation de prébiotiques, de probiotiques ou même des interventions plus ciblées telles que la transplantation de microbiote fécal. La séquestration des acides biliaires primaires et l'utilisation d'agonistes de FXR sont également des pistes prometteuses pour traiter les troubles digestifs associés au HA20.

Enfin, il est essentiel de poursuivre les recherches avec des cohortes de patients plus importantes et des études fonctionnelles approfondies pour mieux comprendre les interactions complexes entre le microbiote intestinal et les processus inflammatoires systémiques dans ces maladies. Les résultats de cette étude fournissent une base solide pour de futures recherches visant à explorer le potentiel thérapeutique de la modulation du microbiote intestinal dans les maladies auto-inflammatoires monogéniques.

Bibliographie

1. Georgin-Lavialle S, Ducharme-Benard S, Sarrabay G, Savey L, Grateau G, Hentgen V. Systemic autoinflammatory diseases: Clinical state of the art. Best Pract Res Clin Rheumatol. août 2020;34(4):101529.

2. Elhani I, Riller Q, Boursier G, Hentgen V, Rieux-Laucat F, Georgin-Lavialle S. A20 haploinsufficiency: A systematic review of 177 cases. J Invest Dermatol. 19 déc 2023;S0022-202X(23)03194-9.

3. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. Nat Genet. oct 2008;40(10):1216-23.

4. Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, et al. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. Nat Genet. sept 2008;40(9):1062-4.

5. Lodolce JP, Kolodziej LE, Rhee L, Kariuki SN, Franek BS, McGreal NM, et al. African-Derived Genetic Polymorphisms in TNFAIP3 Mediate Risk for Autoimmunity. The Journal of Immunology. 15 juin 2010;184(12):7001-9.

6. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat Genet. janv 2016;48(1):67-73.

7. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Science. 29 sept 2000;289(5488):2350-4.

8. Shembade N, Harhaj EW. Regulation of NF-κB signaling by the A20 deubiquitinase. Cell Mol Immunol. mars 2012;9(2):123-30.

9. Toyofuku E, Takeshita K, Ohnishi H, Kiridoshi Y, Masuoka H, Kadowaki T, et al. Dysregulation of the Intestinal Microbiome in Patients With Haploinsufficiency of A20. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet]. 2022 [cité 12 janv 2024];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.787667

10. Kolodziej LE, Lodolce JP, Chang JE, Schneider JR, Grimm WA, Bartulis SJ, et al. TNFAIP3 Maintains Intestinal Barrier Function and Supports Epithelial Cell Tight Junctions. PLOS ONE. 21 oct 2011;6(10):e26352.

11. Vereecke L, Vieira-Silva S, Billiet T, van Es JH, Mc Guire C, Slowicka K, et al. A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. Nat Commun. 30 sept 2014;5:5103.

12. Georgin-Lavialle S, Savey L, Cuisset L, Boursier G, Boffa JJ, Delplanque M, et al. French protocol for the diagnosis and management of familial Mediterranean fever. Rev Med Interne. nov 2023;44(11):602-16.

13. Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. Front Immunol. 2019;10:1745.

14. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. Nat Immunol. août 2016;17(8):914-21.

15. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. Nat Genet. sept 1997;17(1):25-31.

16. Magnotti F, Chirita D, Dalmon S, Martin A, Bronnec P, Sousa J, et al. Steroid hormone catabolites activate the pyrin inflammasome through a non-canonical mechanism. Cell Rep. 11 oct 2022;41(2):111472.

17. Ben-Chetrit E, Touitou I. The significance of carrying MEFV variants in symptomatic and asymptomatic individuals. Clin Genet. 31 mai 2024;

18. Grossman C, Kassel Y, Livneh A, Ben-Zvi I. Familial Mediterranean fever (FMF) phenotype in patients homozygous to the MEFV M694V mutation. Eur J Med Genet. juin 2019;62(6):103532.

19. Elhani I, Heydacker P, Tavernier AS, Georgin-Lavialle S, Hentgen V. Physical fitness in adolescent patients with familial Mediterranean fever. Rheumatol Int [Internet]. 24 avr 2024 [cité 2 mai 2024]; Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00296-024-05598-1

20. Demirkaya E, Erer B, Ozen S, Ben-Chetrit E. Efficacy and safety of treatments in Familial Mediterranean fever: a systematic review. Rheumatol Int. mars 2016;36(3):325-31.

21. Padeh S, Berkun Y. Familial Mediterranean fever. Curr Opin Rheumatol. 2016;28(5):523-9.

22. Duruoz MT, Unal C, Bingul DK, Ulutatar F. Fatigue in familial Mediterranean fever and its relations with other clinical parameters. Rheumatol Int. janv 2018;38(1):75-81.

23. Deger SM, Ozturk MA, Demirag MD, Aslan S, Goker B, Haznedaroglu S, et al. Health-related quality of life and its associations with mood condition in familial Mediterranean fever patients. Rheumatol Int. mai 2011;31(5):623-8.

24. El Roz A, Ghssein G, Khalaf B, Fardoun T, Ibrahim JN. Spectrum of MEFV Variants and Genotypes among Clinically Diagnosed FMF Patients from Southern Lebanon. Med Sci (Basel). 17 août 2020;8(3):35.

25. Bourguiba R, Savey L, Dumont A, Ardois S, Vergneault H, Giurgea I, et al. Errance diagnostique dans la fièvre méditerranéenne familiale : à propos de 85 cas dans une cohorte de 560 patients adultes. La Revue de Médecine Interne. 1 juin 2021;42:A59-60.

26. Abbara S, Grateau G, Ducharme-Bénard S, Saadoun D, Georgin-Lavialle S. Association of Vasculitis and Familial Mediterranean Fever. Front Immunol. 2019;10:763.

27. Elhani I, Dumont A, Vergneault H, Ardois S, Le Besnerais M, Levesque H, et al. Association between familial Mediterranean fever and multiple sclerosis: A case series

from the JIR cohort and systematic literature review. Mult Scler Relat Disord. mai 2021;50:102834.

28. Ugurlu S, Ergezen B, Egeli BH, Selvi O, Ozdogan H. Anakinra treatment in patients with familial Mediterranean fever: a single-centre experience. Rheumatology (Oxford). 14 mai 2021;60(5):2327-32.

29. Ben-Zvi I, Kukuy O, Giat E, Pras E, Feld O, Kivity S, et al. Anakinra for Colchicine-Resistant Familial Mediterranean Fever: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Arthritis Rheumatol. avr 2017;69(4):854-62.

30. Ozdogan H, Ugurlu S. Canakinumab for the treatment of familial Mediterranean fever. Expert Review of Clinical Immunology. 4 mai 2017;13(5):393-404.

31. Berkun Y, Ben-Chetrit E, Klar A, Ben-Chetrit E. Peritoneal Adhesions and Intestinal Obstructions in Patients with Familial Mediterranean Fever—Are They More Frequent? Seminars in Arthritis and Rheumatism. 1 avr 2007;36(5):316-21.

32. Kaşifoğlu T, Cansu DU, Korkmaz C. Frequency of abdominal surgery in patients with familial Mediterranean fever. Intern Med. 2009;48(7):523-6.

33. Ekinci RMK, Balcı S, Akay E, Tumgor G, Dogruel D, Altintas DU, et al. Frequency of functional gastrointestinal disorders in children with familial Mediterranean fever. Clin Rheumatol. mars 2019;38(3):921-6.

34. Mansueto P, Seidita A, Chiavetta M, Genovese D, Giuliano A, Priano W, et al. Familial Mediterranean Fever and Diet: A Narrative Review of the Scientific Literature. Nutrients. 5 août 2022;14(15):3216.

35. Carroccio A, Mansueto P, Soresi M, Fayer F, Di Liberto D, Monguzzi E, et al. Wheat Consumption Leads to Immune Activation and Symptom Worsening in Patients with Familial Mediterranean Fever: A Pilot Randomized Trial. Nutrients. 17 avr 2020;12(4):1127.

36. Lacout C, Savey L, Bourguiba R, Giurgea I, Amselem S, Hoyeau N, et al. Helicobacter pylori in familial mediterranean fever: A series of 120 patients from literature and from france. Helicobacter. avr 2021;26(2):e12789.

37. Villani AC, Lemire M, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Fortin G, et al. Genetic variation in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) and risk for Crohn's disease and ulcerative colitis. PLoS One. 28 sept 2009;4(9):e7154.

38. Papadopoulos VP, Antoniadou C, Ritis K, Skendros P. MEFV Mutations in IBD Patients: A Systematic Review and Meta- analysis. J Gastrointestin Liver Dis. 19 mars 2022;31(1):85-97.

39. Uslu N, Yüce A, Demir H, Saltik-Temizel IN, Usta Y, Yilmaz E, et al. The association of inflammatory bowel disease and Mediterranean fever gene (MEFV) mutations in Turkish children. Dig Dis Sci. déc 2010;55(12):3488-94.

40. Delplanque M, Benech N, Rolhion N, Oeuvray C, Straube M, Galbert C, et al. Gut microbiota alterations are associated with phenotype and genotype in familial Mediterranean fever. Rheumatology (Oxford). 2 avr 2024;63(4):1039-48.

41. Ktsoyan ZA, Beloborodova NV, Sedrakyan AM, Osipov GA, Khachatryan ZA, Manukyan GP, et al. Management of familial Mediterranean fever by colchicine does not normalize the altered profile of microbial long chain fatty acids in the human metabolome. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:2.

42. Deshayes S, Fellahi S, Bastard JP, Launay JM, Callebert J, Fraisse T, et al. Specific changes in faecal microbiota are associated with familial Mediterranean fever. Ann Rheum Dis. 3 août 2019;

43. Ozen S, Lutz HL, Rivera VM, Reiff A, Batu ED, Anderson E, et al. Microbiome is not linked to clinical disease severity of familial Mediterranean fever in an international cohort of children. Clin Exp Rheumatol. 2021;39 Suppl 132(5):102-8.

44. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, Vlamakis H, Xavier RJ, Clardy J. Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 juin 2019;116(26):12672-7.

45. Rashid T, Ebringer A, Wilson C. The role of Klebsiella in Crohn's disease with a potential for the use of antimicrobial measures. Int J Rheumatol. 2013;2013:610393.

46. Ktsoyan ZA, Beloborodova NV, Sedrakyan AM, Osipov GA, Khachatryan ZA, Kelly D, et al. Profiles of Microbial Fatty Acids in the Human Metabolome are Disease-Specific. Front Microbiol. 2010;1:148.

47. Ktsoyan ZA, Mkrtchyan MS, Zakharyan MK, Mnatsakanyan AA, Arakelova KA, Gevorgyan ZU, et al. Systemic Concentrations of Short Chain Fatty Acids Are Elevated in Salmonellosis and Exacerbation of Familial Mediterranean Fever. Front Microbiol. 2016;7:776.

48. Manukyan GP, Ghazaryan KA, Ktsoyan ZA, Khachatryan ZA, Arakelova KA, Kelly D, et al. Elevated Systemic Antibodies towards Commensal Gut Microbiota in Autoinflammatory Condition. PLOS ONE. 9 sept 2008;3(9):e3172.

49. Alimov I, Menon S, Cochran N, Maher R, Wang Q, Alford J, et al. Bile acid analogues are activators of pyrin inflammasome. Journal of Biological Chemistry. 8 mars 2019;294(10):3359-66.

50. Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, de Zoete MR, Palm NW, Bailis W, et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. Cell. 3 déc 2015;163(6):1444-56.

51. Hansmann S, Lainka E, Horneff G, Holzinger D, Rieber N, Jansson AF, et al. Consensus protocols for the diagnosis and management of the hereditary autoinflammatory syndromes CAPS, TRAPS and MKD/HIDS: a German PRO-KIND initiative. Pediatr Rheumatol Online J. 17 févr 2020;18(1):17.

52. Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. Annu Rev Immunol. 26 avr 2023;41:301-16.

53. Ahmadi N, Brewer CC, Zalewski C, King KA, Butman JA, Plass N, et al. Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. Otolaryngology–Head and Neck Surgery. 2011;145(2):295-302.

54. Fayand A, Cescato M, Corre LL, Terré A, Wacheux M, Zhu YYJ, et al. Pathogenic variants in the NLRP3 LRR domain at position 861 are responsible for a boost-dependent atypical CAPS phenotype. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1 nov 2023;152(5):1303-1311.e1.

55. Romano M, Arici ZS, Piskin D, Alehashemi S, Aletaha D, Barron KS, et al. The 2021 EULAR/American College of Rheumatology points to consider for diagnosis, management and monitoring of the interleukin-1 mediated autoinflammatory diseases: cryopyrin-associated periodic syndromes, tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome, mevalonate kinase deficiency, and deficiency of the interleukin-1 receptor antagonist. Ann Rheum Dis. juill 2022;81(7):907-21.

56. Curran MP. Canakinumab: in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. BioDrugs. 1 févr 2012;26(1):53-9.

57. Koné-Paut I, Galeotti C. Anakinra for cryopyrin-associated periodic syndrome. Expert Rev Clin Immunol. janv 2014;10(1):7-18.

58. Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. Front Immunol. 28 févr 2019;10:276.

59. Huang L, Ma Z, Ze X, Zhao X, Zhang M, Lv X, et al. Gut microbiota decreased inflammation induced by chronic unpredictable mild stress through affecting NLRP3 inflammasome. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 24 mai 2023 [cité 13 août 2024];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1189008/full

60. Pradhan R, Ngo PA, Martínez-Sánchez LD, Neurath MF, López-Posadas R. Rho GTPases as Key Molecular Players within Intestinal Mucosa and GI Diseases. Cells. 4 janv 2021;10(1):66.

61. Elhani I, Hentgen V, Grateau G, Georgin-Lavialle S. Neurological manifestations in mevalonate kinase deficiency: A systematic review. Molecular Genetics and Metabolism. 1 juin 2022;136(2):85-93.

62. Ter Haar NM, Jeyaratnam J, Lachmann HJ, Simon A, Brogan PA, Doglio M, et al. The Phenotype and Genotype of Mevalonate Kinase Deficiency: A Series of 114 Cases From the Eurofever Registry. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ). 2016;68(11):2795-805.

63. Bodar EJ, Kuijk LM, Drenth JPH, van der Meer JWM, Simon A, Frenkel J. On-demand anakinra treatment is effective in mevalonate kinase deficiency. Ann Rheum Dis. déc 2011;70(12):2155-8.

64. De Benedetti F, Gattorno M, Anton J, Ben-Chetrit E, Frenkel J, Hoffman HM, et al. Canakinumab for the Treatment of Autoinflammatory Recurrent Fever Syndromes. N Engl J Med. 17 2018;378(20):1908-19.

65. Ouahed J. Expanding Contributions of Monogenic Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. Inflammatory Bowel Diseases. 1 nov 2021;27(11):1870-2.

66. Eslamian G, Jamee M, Momen T, Rohani P, Ebrahimi S, Mesdaghi M, et al. Genomic testing identifies monogenic causes in patients with very early-onset inflammatory bowel disease: a multicenter survey in an Iranian cohort. Clinical and Experimental Immunology. 1 juill 2024;217(1):1-11.

67. Li X, Zhang M, Zhou G, Xie Z, Wang Y, Han J, et al. Role of Rho GTPases in inflammatory bowel disease. Cell Death Discov. 23 janv 2023;9(1):1-13.

68. López-Posadas R, Becker C, Günther C, Tenzer S, Amann K, Billmeier U, et al. Rho-A prenylation and signaling link epithelial homeostasis to intestinal inflammation. J Clin Invest. févr 2016;126(2):611-26.

69. López-Posadas R, Fastancz P, Martínez-Sánchez LDC, Panteleev-Ivlev J, Thonn V, Kisseleva T, et al. Inhibiting PGGT1B Disrupts Function of RHOA, Resulting in T-cell Expression of Integrin α4β7 and Development of Colitis in Mice. Gastroenterology. nov 2019;157(5):1293-309.

70. López-Posadas R, Fastancz P, Martínez-Sánchez LDC, Panteleev-Ivlev J, Thonn V, Kisseleva T, et al. Inhibiting PGGT1B Disrupts Function of RHOA, Resulting in T-cell Expression of Integrin α4β7 and Development of Colitis in Mice. Gastroenterology. nov 2019;157(5):1293-309.

71. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Journal of Immunology Research. 2019;2019(1):7247238.

72. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. Nutrients. 9 mars 2021;13(3):886.

73. Jiang Z, Wu C. Reciprocal Interactions Between Regulatory T Cells and Intestinal Epithelial Cells. Front Immunol [Internet]. 4 juill 2022 [cité 2 sept 2024];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.951339/full

74. Zhao M, Chu J, Feng S, Guo C, Xue B, He K, et al. Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 1 août 2023;164:114985.

75. Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. Mucosal Immunol. sept 2015;8(5):969-78.

76. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. avr 2020;17(4):223-37.

77. Liu YX, Qin Y, Chen T, Lu M, Qian X, Guo X, et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. Protein Cell. mai 2021;12(5):315-30.

78. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. Gut. mai 2022;71(5):1020-32.

79. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? Gut. 1 déc 2020;69(12):2232-43.

80. Hou C, Chen L, Yang L, Ji X. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. Int J Biol Macromol. 15 juin 2020;153:248-55.

81. Shen Y, Giardino Torchia ML, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. Cell Host Microbe. 18 oct 2012;12(4):509-20.

82. Martel J, Chang SH, Ko YF, Hwang TL, Young JD, Ojcius DM. Gut barrier disruption and chronic disease. Trends in Endocrinology & Metabolism. 1 avr 2022;33(4):247-65.

83. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. Gut. 1 août 2019;68(8):1516-26.

84. Crost EH, Tailford LE, Monestier M, Swarbreck D, Henrissat B, Crossman LC, et al. The mucin-degradation strategy of Ruminococcus gnavus: The importance of intramolecular trans-sialidases. Gut Microbes. 25 mai 2016;7(4):302-12.

85. Ruder B, Atreya R, Becker C. Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases. Int J Mol Sci. 16 avr 2019;20(8):1887.

86. Vu VTD, Mahmood R, Armstrong HK, Santer DM. Crosstalk Between Microbiota, Microbial Metabolites, and Interferons in the Inflammatory Bowel Disease Gut. Journal of the Canadian Association of Gastroenterology. 1 févr 2024;7(1):78-87.

87. Chen ML, Takeda K, Sundrud MS. Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. Mucosal Immunology. juill 2019;12(4):851-61.

88. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. Cell Metabolism. 12 juill 2016;24(1):41-50.

89. Ticho AL, Malhotra P, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA. Bile Acid Receptors and Gastrointestinal Functions. Liver Res. mars 2019;3(1):31-9.

90. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. J Gastroenterol. janv 2017;52(1):1-8.

91. Martin-Gallausiaux C, Marinelli L, Blottière HM, Larraufie P, Lapaque N. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. Proc Nutr Soc. févr 2021;80(1):37-49.

92. Gonçalves P, Martel F. Regulation of colonic epithelial butyrate transport: Focus on colorectal cancer. Porto Biomed J. 1 juill 2016;1(3):83-91.

93. Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. déc 2004;287(6):G1168-1174.

94. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. Adv Immunol. 2014;121:91-119.

95. Gao K, Mu CL, Farzi A, Zhu WY. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. Adv Nutr. 1 mai 2020;11(3):709-23.

96. Tennoune N, Andriamihaja M, Blachier F. Production of Indole and Indole-Related Compounds by the Intestinal Microbiota and Consequences for the Host: The Good, the Bad, and the Ugly. Microorganisms. mai 2022;10(5):930.

97. Ye X, Li H, Anjum K, Zhong X, Miao S, Zheng G, et al. Dual Role of Indoles Derived From Intestinal Microbiota on Human Health. Frontiers in Immunology [Internet]. 2022 [cité 16 janv 2023];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.903526

98. Gasaly N, de Vos P, Hermoso MA. Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation. Front Immunol. 2021;12:658354.

99. Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, Li H, Sun K, Benechet AP, et al. Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4. Immunity. 21 août 2014;41(2):296-310.

100. Hao N, Whitelaw ML. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. Biochem Pharmacol. 1 sept 2013;86(5):561-70.

101. Yin J, Yang K, Zhou C, Xu P, Xiao W, Yang H. Aryl hydrocarbon receptor activation alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through enhancing the differentiation of goblet cells. Biochem Biophys Res Commun. 18 juin 2019;514(1):180-6.

102. Qazi A, Kumar A, Sharma A, Calzadilla N, Weber CR, Mongan K, et al. Intestinal epithelial specific AhR deficient mice exhibit increased severity of experimentally induced chronic colitis. The FASEB Journal [Internet]. 2022 [cité 18 janv 2023];36(S1). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R6171

103. Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. Nat Med. juin 2016;22(6):598-605.

104. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. Cell Host Microbe. 13 2018;23(6):716-24.

105. Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, et al. Interleukin-1β: a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. Neuropsychopharmacology. mars 2012;37(4):939-49.

106. Barandouzi ZA, Lee J, del Carmen Rosas M, Chen J, Henderson WA, Starkweather AR, et al. Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. Sci Rep. 31 janv 2022;12(1):1648.

107. Mawe GM, Coates MD, Moses PL. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2006;23(8):1067-76.

108. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome 1. Gastroenterology. 1 juin 2004;126(7):1657-64.

109. Banskota S, Ghia JE, Khan WI. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. Biochimie. 1 juin 2019;161:56-64.

110. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology. janv 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.

111. McGovern DPB, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. oct 2015;149(5):1163-1176.e2.

112. Lee M, Chang EB. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. Gastroenterology. 1 janv 2021;160(2):524-37.

113. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. janv 2018;15(1):39-49.

114. Zhou N, Chen W xing, Chen S hua, Xu C fu, Li Y ming. Inflammatory bowel disease unclassified. J Zhejiang Univ Sci B. 1 avr 2011;12(4):280-6.

115. Muzammil MA, Fariha F, Patel T, Sohail R, Kumar M, Khan E, et al. Advancements in Inflammatory Bowel Disease: A Narrative Review of Diagnostics, Management, Epidemiology, Prevalence, Patient Outcomes, Quality of Life, and Clinical Presentation. Cureus. 15(6):e41120.

116. Spiceland CM, Lodhia N. Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. World J Gastroenterol. 21 sept 2018;24(35):4014-20.

117. Bianco AM, Girardelli M, Vozzi D, Crovella S, Kleiner G, Marcuzzi A. Mevalonate kinase deficiency and IBD: shared genetic background. Gut. août 2014;63(8):1367-8.

118. Illig D, Kotlarz D. Dysregulated inflammasome activity in intestinal inflammation – Insights from patients with very early onset IBD. Front Immunol. 29 nov 2022;13:1027289.

119. Uchida T, Suzuki T, Kikuchi A, Kakuta F, Ishige T, Nakayama Y, et al. Comprehensive Targeted Sequencing Identifies Monogenic Disorders in Patients With Early-onset Refractory Diarrhea. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. sept 2020;71(3):333.

120. Nambu R, Warner N, Mulder DJ, Kotlarz D, McGovern DPB, Cho J, et al. A Systematic Review of Monogenic Inflammatory Bowel Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 1 avr 2022;20(4):e653-63.

121. Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. Nat Rev Microbiol. août 2019;17(8):497-511.

122. Vich Vila A, Imhann F, Collij V, Jankipersadsing SA, Gurry T, Mujagic Z, et al. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. Sci Transl Med. 19 déc 2018;10(472):eaap8914.

123. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. Nature. mai 2019;569(7758):655-62.

124. Roy U, Gálvez EJC, Iljazovic A, Lesker TR, Błażejewski AJ, Pils MC, et al. Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. Cell Rep. 24 oct 2017;21(4):994-1008.

125. Stummer N, Feichtinger RG, Weghuber D, Kofler B, Schneider AM. Role of Hydrogen Sulfide in Inflammatory Bowel Disease. Antioxidants (Basel). 6 août 2023;12(8):1570.

126. Khaloian S, Rath E, Hammoudi N, Gleisinger E, Blutke A, Giesbertz P, et al. Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence. Gut. nov 2020;69(11):1939-51.

127. Mottawea W, Chiang CK, Mühlbauer M, Starr AE, Butcher J, Abujamel T, et al. Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. Nat Commun. 23 nov 2016;7:13419.

128. Shin Y, Han S, Kwon J, Ju S, Choi TG, Kang I, et al. Roles of Short-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease. Nutrients. 21 oct 2023;15(20):4466.

129. Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, et al. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. déc 2017;153(6):1504-1516.e2.

130. Torres J, Bao X, Goel A, Colombel JF, Pekow J, Jabri B, et al. The features of mucosa-associated microbiota in primary sclerosing cholangitis. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2016;43(7):790-801.

131. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. J Crohns Colitis. 1 janv 2020;14(1):4-22.

132. Panés J, Sandborn WJ, Schreiber S, Sands BE, Vermeire S, D'Haens G, et al. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. Gut. juin 2017;66(6):1049-59.

133. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, et al. Tofacitinib, an Oral Janus Kinase Inhibitor, in Active Ulcerative Colitis. N Engl J Med. 16 août 2012;367(7):616-24.

134. Adamina M, Bonovas S, Raine T, Spinelli A, Warusavitarne J, Armuzzi A, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Surgical Treatment. J Crohns Colitis. 10 févr 2020;14(2):155-68.

135. Akutko K, Stawarski A. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Inflammatory Bowel Diseases. Journal of Clinical Medicine. janv 2021;10(11):2466.

136. Jadhav A, Jagtap S, Vyavahare S, Sharbidre A, Kunchiraman B. Reviewing the potential of probiotics, prebiotics and synbiotics: advancements in treatment of ulcerative colitis. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 8 déc 2023 [cité 30 août 2024];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1268041/full

137. Theriot C, Thanissery R, O'Flaherty S, Barrangou R. Probiotic colonization dynamics after oral consumption of VSL#3® by antibiotic-treated mice. mrr. 19 juill 2022;1(4):N/A-N/A.

138. Yang Y, Hong Q, Zhang X, Liu Z. Rheumatoid arthritis and the intestinal microbiome: probiotics as a potential therapy. Front Immunol [Internet]. 6 mars 2024 [cité 30 août 2024];15. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1331486/full

139. Oliviero F, Spinella P. Benefits of Probiotics in Rheumatic Diseases. Frontiers in Nutrition [Internet]. 2020 [cité 6 sept 2023];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00157

140. Sanges M, Valente G, Rea M, Della Gatta R, De Franchis G, Sollazzo R, et al. Probiotics in spondyloarthropathy associated with ulcerative colitis: a pilot study. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2009;13(3):233-4.

141. Jenks K, Stebbings S, Burton J, Schultz M, Herbison P, Highton J. Probiotic therapy for the treatment of spondyloarthritis: a randomized controlled trial. J Rheumatol. oct 2010;37(10):2118-25.

142. Khanna S, Shin A, Kelly CP. Management of Clostridium difficile Infection in Inflammatory Bowel Disease: Expert Review from the Clinical Practice Updates Committee of the AGA Institute. Clin Gastroenterol Hepatol. févr 2017;15(2):166-74.

143. Feng J, Chen Y, Liu Y, Lin L, Lin X, Gong W, et al. Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation in the treatment of ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 3 sept 2023;13(1):14494.

144. Paramsothy S, Nielsen S, Kamm MA, Deshpande NP, Faith JJ, Clemente JC, et al. Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis. Gastroenterology. avr 2019;156(5):1440-1454.e2.

145. Cui B, Feng Q, Wang H, Wang M, Peng Z, Li P, et al. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: safety, feasibility, and efficacy trial results. J Gastroenterol Hepatol. janv 2015;30(1):51-8.

146. Boicean A, Birlutiu V, Ichim C, Anderco P, Birsan S. Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease. Biomedicines. avr 2023;11(4):1016.

147. Zeng J, Peng L, Zheng W, Huang F, Zhang N, Wu D, et al. Fecal microbiota transplantation for rheumatoid arthritis: A case report. Clin Case Rep. févr 2021;9(2):906-9.

148. Wang L, Wei Z, Pan F, Song C, Peng L, Yang Y, et al. Case report: Fecal microbiota transplantation in refractory ankylosing spondylitis. Front Immunol [Internet]. 23 févr 2023 [cité 30 août 2024];14. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1093233/full

149. Chapman KE, Odermatt A. Steroids: Modulators of inflammation and immunity. J Steroid Biochem Mol Biol. 31 mai 2010;120(2-3):67-8.

150. Zhang L, Chu CQ. Gut Microbiota–Medication Interaction in Rheumatic Diseases. Front Immunol [Internet]. 3 déc 2021 [cité 14 mai 2024];12. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.796865/full

151. Zhang J, Feng D, Law HKW, Wu Y, Zhu GH, Huang WY, et al. Integrative Analysis of Gut Microbiota and Fecal Metabolites in Rats after Prednisone Treatment. Microbiol Spectr. 22 déc 2021;9(3):e0065021.

152. Li W, Shu Y, Zhang J, Wu M, Zhu G hua, Huang W yan, et al. Long-term prednisone treatment causes fungal microbiota dysbiosis and alters the ecological interaction between gut mycobiome and bacteriome in rats. Front Microbiol [Internet]. 5 juin 2023 [cité 14 mai 2024];14. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1112767/full

153. Tena-Garitaonaindia M, Arredondo-Amador M, Mascaraque C, Asensio M, Marin JJG, Martínez-Augustin O, et al. Modulation of intestinal barrier function by glucocorticoids: Lessons from preclinical models. Pharmacological Research. 1 mars 2022;177:106056.

154. Angelidis C, Kotsialou Z, Kossyvakis C, Vrettou AR, Zacharoulis A, Kolokathis F, et al. Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action. Curr Pharm Des. 2018;24(6):659-63.

155. Ozen S, Kone-Paut I, Gül A. Colchicine resistance and intolerance in familial mediterranean fever: Definition, causes, and alternative treatments. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 1 août 2017;47(1):115-20.

156. Shi Y, Li J, Yang P, Niu Z, Wei L, Chen L, et al. Colchicine increases intestinal permeability, suppresses inflammatory responses, and alters gut microbiota in mice. Toxicology Letters. 1 nov 2020;334:66-77.

157. Shi Y, Cai H, Niu Z, Li J, Pan G, Tian H, et al. Acute oral colchicine caused gastric mucosal injury and disturbance of associated microbiota in mice. Toxicology. sept 2021;461:152908.

158. Shi Y, Wei L, Jin F, Wang J, Cao H, Yang Y, et al. Colchicine disrupts bile acid metabolic homeostasis by affecting the enterohepatic circulation in mice. Journal of

Applied Toxicology [Internet]. [cité 14 mai 2024];n/a(n/a). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jat.4587

159. Wang DW, Pang XT, Zhang H, Gao HX, Leng YF, Chen FQ, et al. Gut microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis: a systematic review protocol of case-control studies. BMJ Open. 1 avr 2022;12(4):e052021.

160. Feng ZP, Wang XY, Xin HY, Huang SL, Huang HY, Xin Q, et al. Gut microbiota plays a significant role in gout. J Med Microbiol. avr 2024;73(4).

161. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. International Journal of Molecular Sciences. janv 2019;20(20):5023.

162. Friedman B, Cronstein B. Mécanisme d'action du méthotrexate dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Revue du Rhumatisme. 1 mars 2020;87(2):92-8.

163. Asai S, Nagai K, Takahashi N, Watanabe T, Matsumoto T, Asai N, et al. Influence of methotrexate on gastrointestinal symptoms in patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. févr 2019;22(2):207-13.

164. Salliot C, Heijde D van der. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. Annals of the Rheumatic Diseases. 1 juill 2009;68(7):1100-4.

165. Nayak RR, Alexander M, Deshpande I, Stapleton-Gray K, Rimal B, Patterson AD, et al. Methotrexate impacts conserved pathways in diverse human gut bacteria leading to decreased host immune activation. Cell Host & Microbe. 10 mars 2021;29(3):362-377.e11.

166. Wu HJJ. Methotrexate works remotely, from the gut. Cell Host & Microbe. 10 mars 2021;29(3):325-6.

167. Sánchez-Piedra C, Sueiro-Delgado D, García-González J, Ros-Vilamajo I, Prior-Español A, Moreno-Ramos MJ, et al. Changes in the use patterns of bDMARDs in patients with rheumatic diseases over the past 13 years. Sci Rep. 23 juill 2021;11(1):15051.

168. Arnold DD, Yalamanoglu A, Boyman O. Systematic Review of Safety and Efficacy of IL-1-Targeted Biologics in Treating Immune-Mediated Disorders. Front Immunol. 2022;13:888392.

169. Kullenberg T, Löfqvist M, Leinonen M, Goldbach-Mansky R, Olivecrona H. Long-term safety profile of anakinra in patients with severe cryopyrin-associated periodic syndromes. Rheumatology. 1 août 2016;55(8):1499-506.

170. Needell JC, Dinarello CA, Ir D, Robertson CE, Ryan SM, Kroehl ME, et al. Implication of the intestinal microbiome as a potential surrogate marker of immune responsiveness to experimental therapies in autoimmune diabetes. PLoS One. 16 mars 2017;12(3):e0173968.

171. Wardill HR, de Mooij CEM, Da Silva Ferreira AR, Havinga H, Harmsen HJM, van der Velden WJFM, et al. Supporting the gastrointestinal microenvironment during high-

dose chemotherapy and stem cell transplantation by inhibiting IL-1 signaling with anakinra. Sci Rep. 11 mai 2022;12:6803.

172. Rempenault C, Lukas C, Combe B, Herrero A, Pane I, Schaeverbeke T, et al. Risk of diverticulitis and gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis treated with tocilizumab compared to rituximab or abatacept. Rheumatology (Oxford). 2 mars 2022;61(3):953-62.

173. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. PLoS One. 2014;9(12):e114195.

174. Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, et al. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. J Immunol. 15 mai 2008;180(10):6816-26.

175. Righi E, Lambertenghi L, Gorska A, Sciammarella C, Ivaldi F, Mirandola M, et al. Impact of COVID-19 and Antibiotic Treatments on Gut Microbiome: A Role for Enterococcus spp. Biomedicines. 2 nov 2022;10(11):2786.

176. Rossi RE, Parisi I, Despott EJ, Burroughs AK, O'Beirne J, Conte D, et al. Anti-tumour necrosis factor agent and liver injury: Literature review, recommendations for management. World Journal of Gastroenterology : WJG. 12 déc 2014;20(46):17352.

177. Yin J, Sternes PR, Wang M, Song J, Morrison M, Li T, et al. Shotgun metagenomics reveals an enrichment of potentially cross-reactive bacterial epitopes in ankylosing spondylitis patients, as well as the effects of TNFi therapy upon microbiome composition. Annals of the Rheumatic Diseases. 1 janv 2020;79(1):132-40.

178. Picchianti-Diamanti A, Panebianco C, Salemi S, Sorgi ML, Di Rosa R, Tropea A, et al. Analysis of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis Patients: Disease-Related Dysbiosis and Modifications Induced by Etanercept. International Journal of Molecular Sciences. oct 2018;19(10):2938.

179. Kubo S, Nakayamada S, Tanaka Y. JAK inhibitors for rheumatoid arthritis. Expert Opin Investig Drugs. avr 2023;32(4):333-44.

180. Herrera-deGuise C, Serra-Ruiz X, Lastiri E, Borruel N. JAK inhibitors: A new dawn for oral therapies in inflammatory bowel diseases. Front Med [Internet]. 2 mars 2023 [cité 2 sept 2024];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2023.1089099/full

181. Hoisnard L, Lebrun-Vignes B, Maury S, Mahevas M, El Karoui K, Roy L, et al. Adverse events associated with JAK inhibitors in 126,815 reports from the WHO pharmacovigilance database. Sci Rep. 3 mai 2022;12(1):7140.

182. Hablot J, Ferhat M, Lavelle A, Salem F, Taieb M, Medvedovic J, et al. Tofacitinib treatment alters mucosal immunity and gut microbiota during experimental arthritis. Clinical and Translational Medicine. 2020;10(5):e163.

183. Sayoc-Becerra A, Krishnan M, Fan S, Jimenez J, Hernandez R, Gibson K, et al. The JAK-Inhibitor Tofacitinib Rescues Human Intestinal Epithelial Cells and Colonoids from

Cytokine-Induced Barrier Dysfunction. Inflammatory Bowel Diseases. 11 févr 2020;26(3):407-22.

184. Goodman AL, Gordon JI. Our Unindicted Coconspirators: Human Metabolism from a Microbial Perspective. Cell Metabolism. 4 août 2010;12(2):111-6.

185. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nat Commun. 6 nov 2019;10(1):5029.

186. Bharti R, Grimm DG. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. Briefings in Bioinformatics. 1 janv 2021;22(1):178-93.

187. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat Biotechnol. sept 2017;35(9):833-44.

188. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. Sci Rep. 4 févr 2021;11(1):3030.

189. Elhani I, Aouba A, Riller Q, Vergneault H, Boursier G, Rieux-Laucat F, et al. L'haploinsuffisance de A20 : que doit connaître le clinicien? La Revue de Médecine Interne [Internet]. 29 déc 2023 [cité 2 mai 2024]; Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0248866323013218

190. Manor O, Dai CL, Kornilov SA, Smith B, Price ND, Lovejoy JC, et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. Nat Commun. 15 oct 2020;11(1):5206.

191. Zhai L, Huang C, Ning Z, Zhang Y, Zhuang M, Yang W, et al. Ruminococcus gnavus plays a pathogenic role in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by increasing serotonin biosynthesis. Cell Host Microbe. 11 janv 2023;31(1):33-44.e5.

192. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. Gastroenterology. déc 2010;139(6):1844-1854.e1.

193. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. Gut. mai 2011;60(5):631-7.

194. Hu S, Png E, Gowans M, Ong DEH, de Sessions PF, Song J, et al. Ectopic gut colonization: a metagenomic study of the oral and gut microbiome in Crohn's disease. Gut Pathogens. 25 févr 2021;13(1):13.

195. Feng L, Zhou N, Li Z, Fu D, Guo Y, Gao X, et al. Co-occurrence of gut microbiota dysbiosis and bile acid metabolism alteration is associated with psychological disorders in Crohn's disease. FASEB J. janv 2022;36(1):e22100.

196. Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. Nat Microbiol. févr 2019;4(2):293-305.

197. Shin SY, Kim Y, Kim WS, Moon JM, Lee KM, Jung SA, et al. Compositional changes in fecal microbiota associated with clinical phenotypes and prognosis in Korean patients with inflammatory bowel disease. Intest Res. janv 2023;21(1):148-60.

198. Machiels K, Sabino J, Vandermosten L, Joossens M, Arijs I, de Bruyn M, et al. Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. Gut. janv 2017;66(1):79-88.

199. Sokol H, Jegou S, McQuitty C, Straub M, Leducq V, Landman C, et al. Specificities of the intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease and Clostridium difficile infection. Gut Microbes. 2 janv 2018;9(1):55-60.

200. Olbjørn C, Cvancarova Småstuen M, Thiis-Evensen E, Nakstad B, Vatn MH, Jahnsen J, et al. Fecal microbiota profiles in treatment-naïve pediatric inflammatory bowel disease - associations with disease phenotype, treatment, and outcome. Clin Exp Gastroenterol. 2019;12:37-49.

201. Dubinsky V, Reshef L, Rabinowitz K, Yadgar K, Godny L, Zonensain K, et al. Dysbiosis in Metabolic Genes of the Gut Microbiomes of Patients with an Ileo-anal Pouch Resembles That Observed in Crohn's Disease. mSystems. 2 mars 2021;6(2):e00984-20.

202. Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, et al. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 1 janv 2018;53(1):95-106.

203. Buisson A, Sokol H, Hammoudi N, Nancey S, Treton X, Nachury M, et al. Role of adherent and invasive Escherichia coli in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. Gut. janv 2023;72(1):39-48.

204. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. Am J Gastroenterol. nov 2010;105(11):2420-8.

205. Fuentes S, Rossen NG, van der Spek MJ, Hartman JH, Huuskonen L, Korpela K, et al. Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after faecal microbiota transplantation. ISME J. août 2017;11(8):1877-89.

206. Azzouz D, Omarbekova A, Heguy A, Schwudke D, Gisch N, Rovin BH, et al. Lupus nephritis is linked to disease-activity associated expansions and immunity to a gut commensal. Ann Rheum Dis. juill 2019;78(7):947-56.

207. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. Ann Rheum Dis. sept 2017;76(9):1614-22.

208. Berland M, Meslier V, Berreira Ibraim S, Le Chatelier E, Pons N, Maziers N, et al. Both Disease Activity and HLA–B27 Status Are Associated With Gut Microbiome Dysbiosis in Spondyloarthritis Patients. Arthritis & Rheumatology. 2023;75(1):41-52.

209. Luo XM, Edwards MR, Mu Q, Yu Y, Vieson MD, Reilly CM, et al. Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus. Applied and Environmental Microbiology. 31 janv 2018;84(4):e02288-17.

210. Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. Exp Mol Med. févr 2018;50(2):e450-e450.

211. Zheng T, Hao H, Liu Q, Li J, Yao Y, Liu Y, et al. Effect of Extracelluar Vesicles Derived from Akkermansia muciniphila on Intestinal Barrier in Colitis Mice. Nutrients. 8 nov 2023;15(22):4722.

212. Talpin A, Kattah MG, Advincula R, Fadrosh D, Lynch K, LaMere B, et al. A20 in dendritic cells restrains intestinal anti-bacterial peptide expression and preserves commensal homeostasis. PLoS One. 2019;14(7):e0218999.

213. Marasco G, Cremon C, Barbaro MR, Falangone F, Montanari D, Capuani F, et al. Pathophysiology and Clinical Management of Bile Acid Diarrhea. Journal of Clinical Medicine. janv 2022;11(11):3102.

214. Jahnel J, Fickert P, Hauer AC, Högenauer C, Avian A, Trauner M. Inflammatory bowel disease alters intestinal bile acid transporter expression. Drug Metab Dispos. sept 2014;42(9):1423-31.

215. Jung D, Fantin AC, Scheurer U, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor. Gut. janv 2004;53(1):78-84.

216. Fitzpatrick LR, Jenabzadeh P. IBD and Bile Acid Absorption: Focus on Pre-clinical and Clinical Observations. Front Physiol [Internet]. 12 juin 2020 [cité 30 janv 2023];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00564/full

217. Hvas CL, Ott P, Paine P, Lal S, Jørgensen SP, Dahlerup JF. Obeticholic acid for severe bile acid diarrhea with intestinal failure: A case report and review of the literature. World J Gastroenterol. 7 juin 2018;24(21):2320-6.

218. Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, Pot B, Doré J, Ehrlich SD, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. Appl Environ Microbiol. févr 2014;80(3):928-34.

219. Kaci G, Lakhdari O, Doré J, Ehrlich SD, Renault P, Blottière HM, et al. Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal Streptococcus salivarius. Appl Environ Microbiol. juill 2011;77(13):4681-4.

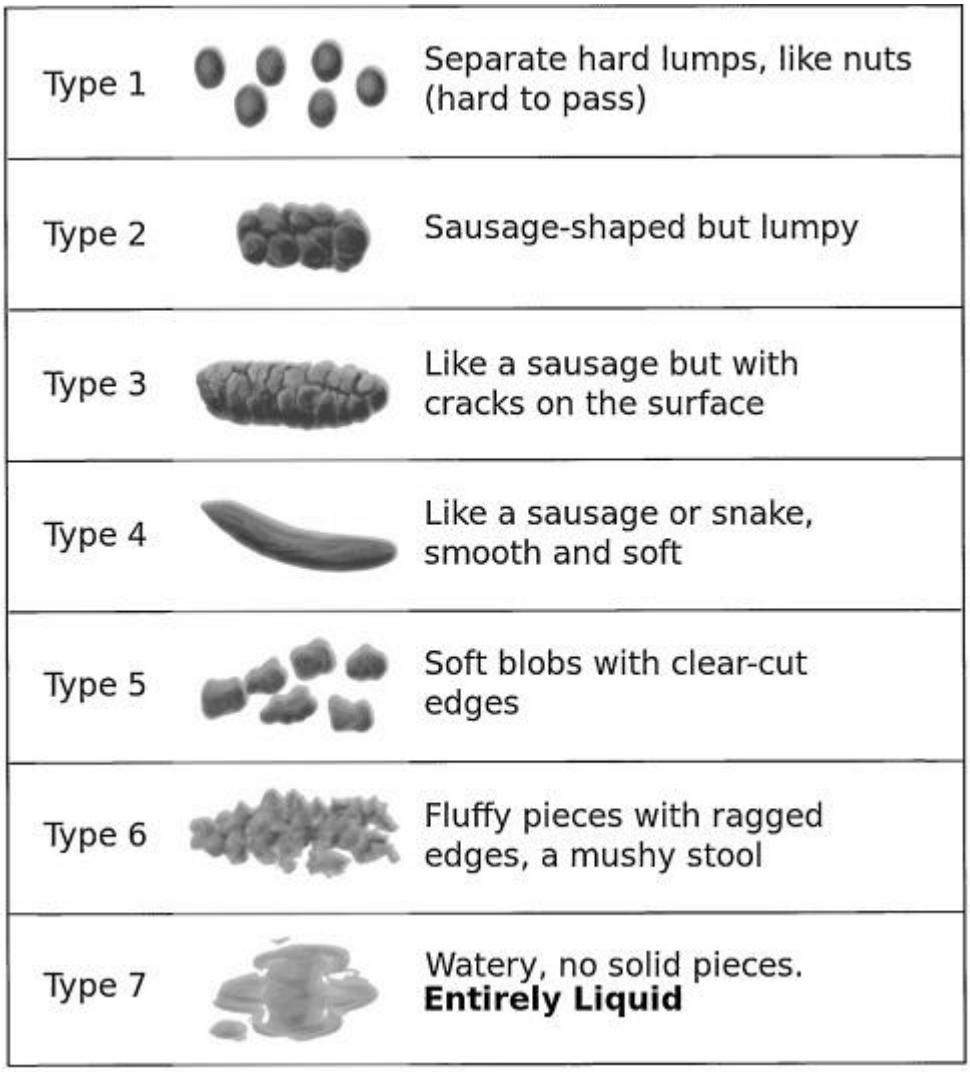
220. Federici S, Kviatcovsky D, Valdés-Mas R, Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Infect. juin 2023;29(6):682-8.

221. Lang S, Demir M, Martin A, Jiang L, Zhang X, Duan Y, et al. Intestinal Virome Signature Associated With Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. 1 nov 2020;159(5):1839-52.

222. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. oct 2016;44(7):693-703.

Annexes

L’échelle de Bristol



Extraite de Blake et al (222)

Annexe 2 : Avis favorable du comité de protection des personne (HO-MICRO-MAI)

Comité de protection des personnes Sud-Est III

Avis sur une demande initiale

CPP

Nom du CPP : Comité de protection des personnes Sud-Est III
Adresse : Groupement Hospitalier Est - Bâtiment Pinel - 59 Boulevard Pinel 69500 BRON France
Courriel : cpp.sud-est-3@chu-lyon.fr
Téléphone : 0427856245

Promoteur / Demandeur

Promoteur : ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
Représentant légal (UE) : -
Mandataire : -

Dossier

Numéro SI : 23.00171.000188
Numéro national : 2022-A02073-40
Référence interne : APHP230035

Règlementation : Loi Jardé
Qualification : Catégorie 3
Produit ou acte : Hors produits de santé (produits non mentionnés à l'article L.5311-11 du code de la santé publique)

Investigateur : Sophie GEORGIN-LAVIALLE

Titre : **Interactions hôte-microbiote dans les maladies auto-inflammatoires**

Ce dossier a été étudié en séance le 31/01/2023 et mandat a été donné au président du CPP d'émettre l'avis à réception des réponses du déposant aux dernières demandes.

Au vu des réponses obtenues, l'avis suivant a donc été émis.

Cet avis court à compter du changement de statut sur le SI.

Considérant que les conditions éthiques sont remplies notamment au regard des éléments de l'article L.1123-7 du code de la santé publique, l'examen du comité permet de conclure que la recherche peut être réalisée et de rendre l'avis suivant :

Avis favorable

Cet avis est valable deux ans. Conformément à l'article L.1123-11 du code de la santé publique, le promoteur doit déclarer au CPP le début de la recherche. Cette déclaration se fait directement sur le SIRIPH2G (bouton "démarrer l'étude").

Si vous n'avez pas été en mesure d'inclure un premier participant à la recherche dans ce délai, vous pouvez demander au CPP une prorogation de cet avis avant la fin de validité de ce dernier (article R.1123-26 du code de la santé publique).

Personnes ayant délibéré

Collège	Catégorie	Nom et prénom
Collège I	Qualification RIPH - Biostatistique ou épidémiologie	CHAPUIS François
Collège I	Qualification RIPH - Biostatistique ou épidémiologie	DECULLIER Evelyne
Collège I	Qualification RIPH - Autre	SAPPEY-MARINIER Dominique
Collège I	Qualification RIPH - Autre	AUROUX Aline
Collège I	Qualification RIPH - Autre	DELPUECH Claude
Collège I	Qualification RIPH - Autre	RAFFIN Mahé
Collège I	Spécialiste de médecine générale	PAMIES Sophie
Collège II	Compétence éthique	BENKHELIFA Sonia
Collège II	Compétence éthique	CHIROSSEL Agathe
Collège II	Compétence en sciences humaines et sociales ou action sociale	TROADEC Laurine
Collège II	Compétence en sciences humaines et sociales ou action sociale	GIROUD-SAVOIE Martine
Collège II	Compétence en sciences humaines et sociales ou action sociale	BERNARD DE DOMPSURE Violaine
Collège II	Représentant d'association agréée	LE MANER Patrick
Collège II	Représentant d'association agréée	Patricia DERICI
Collège II	Représentant d'association agréée	BELLION Evelyne
Collège II	Représentant d'association agréée	CAMPANILE Lucio

Documents analysés par le CPP

Catégorie	Intitulé	Date de dépôt
ATT - Attestation	*2022-A02073-40_ATTESTATION_attestation-conformite-dispositions-csp_20230110_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
COU - Courrier	*2022-A02073-40_COURRIER_ltre-rni-avis-initial-cpp-20230110_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
CVI - CV investigateurs	*2022-A02073-40_CV-invest-GEORGIN-LAVIALLE_20220830_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
DON - Données : preuve de conformité du traitement des données	*2022-A02073-40_DONNEES_declaration-conformité-traitement-données_20230110_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
DON - Données : preuve de conformité du traitement des données	*2022-A02073-40_DONNEES_Recepisse déclaration MR03_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-autorité-parentale_v1.0_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-mineur_v1.0_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-majeur_v1.0_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-mineur_v1.0_AVEC-*	14/02/2023

	modifications_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf	
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-autorite-parentale_v1.0_AVEC-modifications_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-mineur_v1.1_SANS-modifications_20230206_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-majeur_v1.1_SANS-modifications_20230206_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-autorite-parentale_v1.1_SANS-modifications_20230206_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-majeur_v1.0_AVEC-modifications_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-autorite-parentale_v1.1_SANS-modifications_20230206_HO-MICRO-MAI*	27/02/2023
INF - Doc Information	*2022-A02073-40_NI-autorite-parentale_v1.0_AVEC-modifications_20221012_HO-MICRO-MAI*	27/02/2023
INF - Doc Information	2022-A02073-40_NI-majeur_v1.0_AVEC-modifications_20221012_HO-MICRO-MAI	27/02/2023
INF - Doc Information	2022-A02073-40_NI-majeur_v1.1_SANS-modifications_20230206_HO-MICRO-MAI	27/02/2023
PRO - Protocole	*2022-A02073-40_PROTOCOLE-v1.0_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
PRO - Protocole	*2022-A02073-40_PROTOCOLE-v1.0-AVEC-modifications_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
PRO - Protocole	*2022-A02073-40_PROTOCOLE-v1.1-SANS-modifications_20230208_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
QUE - Echelles/questionnaires	*2022-A02073-40_QUESTIONNAIRE_NA_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
REP - Courrier de réponse	*2022-A02073-40_COURRIER-ltre-rni-reponse-CPP_20230213-HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023
RES - Résumé	*2022-A02073-40_RESUME_questionnaire-autoevaluation-riph3_20230112_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023

RES - Résumé	*2022-A02073-40_RESUME_V1.0_20221012_HO-MICRO-MAI.pdf*	16/01/2023
RES - Résumé	*2022-A02073-40_RESUME-questionnaire-autoevaluation-riph3-v1.1_20230213_HO-MICRO-MAI.pdf*	14/02/2023

**Les documents étiquetés non-conformes sur le SI RIPH2G ou transmis pour information/notification dans le cadre de cette demande d'avis n'ont pas été évalués par le CPP.*
**L'intitulé des documents examinés par le comité, listés sur le présent avis, reprend la nomenclature des fichiers utilisée par le déposant sur le SI RIPH2G.*

Pour le CPP SUD-EST III
Le Président, Professeur François CHAPUIS
Fait le 03/03/2023

François Chapuis

Signé par François Chapuis
Signé et certifié par yousign

CPP SUD-EST III
Groupement Hospitalier Est
Bâtiment Pinel
59 Boulevard Pinel
F-69500 BRON
Tél : 04 27 85 62 45

Annexe 3 : Avis favorable du comité d'éthique de la recherche -Sorbonne Université (HEPA20)

COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE
Mail : CER@sorbonne-universite.fr

AVIS
COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE

RÉFÉRENCES ADMINISTRATIVES

Protocole	:	**CER-2023-AMARA-HEPA20**
E-mail pour la correspondance	:	ikrame.amara@aphp.fr
Protocole évalué le	:	**27/02/2023**

AVIS : FAVORABLE AVEC RECOMMANDATIONS

I Résumé

L'étude a pour objectif principal de rechercher des signes histologiques d'inflammation hépatique sur les biopsies hépatiques. Les objectifs secondaires sont de rechercher des signes d'inflammation digestives sur les pièces de biopsies du tube digestif, de rechercher des perturbations métaboliques sur des pièces de biopsies hépatiques et de rechercher une inflammation du foie et des voies biliaires sur les IRM hépatiques. Les participants sont les patients atteints d'haploinsuffisance de A20 définie par la présence d'une mutation de pathogénicité supérieur à 1 dans le gène TNFAIP3 suivi ou ayant été suivi depuis 2000 et présents dans le registre CARHA20; et qui ont bénéficié au cours de leur prise en charge en soin courant d'une biopsie du tube digestif, du foie et d'une IRM hépatique ou une bili-IRM. Le nombre de participant est estimé à environ 25. Des mineurs sont potentiellement concernés.

II Aspects éthiques

La plupart des modifications demandées ont été effectuées.
La lettre d'information a été simplifiée, mais elle devient inquiétante pour les patients car elle pourrait leur laisser croire qu'ils pourraient avoir une anomalie du foie non diagnostiquée.

On suggère :
« Dans la recherche proposée, nous allons rechercher dans votre dossier si les examens dont vous avez bénéficié ont montré la présence d'anomalies métaboliques ou inflammatoires dans le tube digestif et le foie. En l'absence d'opposition de votre part, nous contacterons les services dans lesquels vous avez réalisé une imagerie du foie, et dans lesquels les pièces de biopsies ont été analysées. La mise en évidence d'éventuelles anomalies nous permettra déterminer le mécanisme de la maladie mais ne mènera ni à la réalisation d'examen supplémentaire, ni à une modification de votre prise en charge ».

III Lettre d'information et autres documents

Les modifications sont apportées au traitement des données selon les remarques du CER.
Il manque le droit à la suppression : il conviendrait de le rajouter dans le paragraphe stipulant les droits RGPD

Il n'appartient pas au CER de s'assurer du suivi des recommandations qu'il émet, qui reste de la seule responsabilité des porteurs de projet.

Les investigateurs faisant appel aux services du CER-Sorbonne Université s'engagent à lui signaler tout événement non anticipé survenant en cours d'étude. Ces éléments seront utilisés aux fins d'amélioration des futurs services et conseils que le CER-Sorbonne Université pourrait donner.

A noter, l'avis du CER-Sorbonne Université n'exonère pas des formalités réglementaires. A cet égard, il vous appartient notamment, si vous traitez des données se rapportant à un individu directement ou indirectement identifiable, de vous conformer au règlement européen sur la protection des données (RGPD) en vigueur depuis 2018. Pour cela, vous devez solliciter les conseils du Délégué à la protection des données qui dépend de l'organisme responsable de votre traitement.

Professeur Mohamed CHETOUANI
Président du CER



Annexe 4 : Table supplémentaire 1. Taxonomie estimée des espèces bactériennes identifiées dans les corrélations de métabolites mentionnées chez les patients avec haploinsuffisance de A20

SGB ID	Estimated taxonomy
15278	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
59548	k__Bacteria|p__Firmicutes
4964	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Lachnospiraceae
54347	k__Bacteria|p__Firmicutes
14958	k__Bacteria|p__Firmicutes
14306	k__Bacteria|p__Firmicutes
9205	k__Bacteria|p__Lentisphaerae
15411	k__Bacteria|p__Firmicutes
15075	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15249	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae|g__Oscillibacter|s__Oscillibacter_sp_MSJ_31
15031	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
72479	k__Bacteria|p__Actinobacteria|c__Coriobacteriia|o__Coriobacteriales|f__Coriobacteriaceae
15225	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae|g__Oscillospiraceae_unclassified|s__Oscillospiraceae_bacterium
3959	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Eubacteriales_Family_XIII_Incertae_Sedis
15368	k__Bacteria|p__Firmicutes
15413	k__Bacteria|p__Firmicutes
15260	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
13972	k__Bacteria|p__Firmicutes
14248	k__Bacteria|p__Firmicutes
15398	k__Bacteria|p__Firmicutes
15410	k__Bacteria|p__Firmicutes
15377	k__Bacteria|p__Firmicutes
17347	k__Bacteria|p__Firmicutes
63164	k__Bacteria|p__Firmicutes
15407	k__Bacteria|p__Firmicutes
14124	k__Bacteria|p__Firmicutes
2276	k__Bacteria|p__Bacteroidota
15117	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
63167	k__Bacteria|p__Firmicutes
15389	k__Bacteria|p__Acidobacteria
3952	k__Archaea|p__Euryarchaeota|c__Methanomicrobia|o__Methanomicrobiales|f__Methanomicrobiaceae|g__Methanoculleus|s__Methanoculleus
4367	k__Bacteria|p__Firmicutes
15203	k__Bacteria|p__Firmicutes
6362	k__Bacteria|p__Proteobacteria|c__Gammaproteobacteria|o__Legionellales|f__Coxiellaceae|g__Coxiellaceae_unclassified|s__Coxiellaceae_bacterium
15123	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4894	k__Bacteria|p__Chloroflexi
15045	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4882	k__Bacteria|p__Firmicutes
15385	k__Bacteria|p__Firmicutes
15229	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
14861	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae|g__Oscillospiraceae_unclassified|s__Oscillospiraceae_bacterium_CLA_AA_H250
71759	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Lachnospiraceae
15049	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
3964	k__Bacteria|p__Firmicutes
15356	k__Bacteria|p__Firmicutes
15370	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Eubacteriales_unclassified
15066	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4777	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Lachnospiraceae|g__Lachnospiraceae_unclassified|s__Lachnospiraceae_bacterium_CLA_AA_H215
15265	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
14043	k__Archaea|p__Candidatus_Thermoplasmatota
15395	k__Bacteria|p__Firmicutes
4030	k__Bacteria|p__Acidobacteria
14891	k__Bacteria|p__Firmicutes
15299	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Eubacteriales_unclassified|g__Gemmiger|s__Gemmiger_formicilis
15216	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15233	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15238	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15374	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Eubacteriales_unclassified
14253	k__Bacteria|p__Firmicutes
15115	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4394	k__Bacteria|p__Chloroflexi
1957	k__Bacteria|p__Proteobacteria|c__Alphaproteobacteria|o__Hyphomicrobiales|f__Nitrobacteraceae|g__Bradyrhizobium|s__Bradyrhizobium_guangzhouense
15383	k__Bacteria|p__Firmicutes
4155	k__Bacteria|p__Firmicutes
14921	k__Bacteria|p__Firmicutes
14937	k__Bacteria|p__Firmicutes
15106	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15224	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
15459	k__Bacteria|p__Proteobacteria|c__Deltaproteobacteria|o__Desulfovibrionales|f__Desulfovibrionaceae
3962	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Eubacteriales_Family_XIII_Incertae_Sedis
14842	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4059	k__Bacteria|p__Firmicutes
15234	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae
4063	k__Bacteria|p__Firmicutes
53517	k__Bacteria|p__Firmicutes
15272	k__Bacteria|p__Firmicutes
3991	k__Bacteria|p__Firmicutes
15382	k__Bacteria|p__Firmicutes
15390	k__Bacteria|p__Firmicutes
14940	k__Bacteria|p__Firmicutes
14114	k__Bacteria|p__Firmicutes
14311	k__Bacteria|p__Bacteroidota|c__Flavobacteriia|o__Flavobacteriales|f__Flavobacteriaceae
14924	k__Bacteria|p__Firmicutes
66170	k__Bacteria|p__Firmicutes
63101	k__Bacteria|p__Actinobacteria|c__Coriobacteriia|o__Eggerthellales|f__Eggerthellaceae
15403	k__Bacteria|p__Firmicutes
15402	k__Bacteria|p__Firmicutes
15081	k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Eubacteriales|f__Oscillospiraceae

Annexe 4 : Table supplémentaire 2. Nom des voies métaboliques identifiées dans les chez les patients avec haploinsuffisance de A20

Pathway code	Pathway name
PWY-5850	superpathway of menaquinol-6 biosynthesis
PWY-6823	molybdopterin biosynthesis
PWY-5860	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis I
PWY-7039	phosphatidate metabolism, as a signaling molecule
PWY-5791	1,4-dihydroxy-2-naphthoate biosynthesis II (plants)
PWY-7616	methanol oxidation to carbon dioxide
PWY-5189	tetrapyrrole biosynthesis II (from glycine)
URDEGR PWY	superpathway of allantoin degradation in plants
PWY-5692	allantoin degradation to glyoxylate II
PWY0-41	allantoin degradation IV (anaerobic)
PWY-5723	Rubisco shunt
KDO-NAGLIPASYN-PWY	superpathway of (Kdo)2-lipid A biosynthesis
THREOCAT PWY	superpathway of L-threonine metabolism
ORNDEG PWY	superpathway of ornithine degradation
PWY0-1061	superpathway of L-alanine biosynthesis
PWY-7446	sulfoquinovose_degradation_I
PWY-6630	superpathway of L-tyrosine biosynthesis
PWY-4321	L-glutamate degradation IV
ECASYN PWY	enterobacterial common antigen biosynthesis
P221 PWY-	octane_oxidation
ORNARGDEG PWY	superpathway_of_L-arginine_and_L-ornithine_degradation
ARGDEG PWY	superpathway_of_L-arginine,_putrescine,_and_4-aminobutanoate_degradation
PWY-7629	mitochondrial_NADPH_production_(yeast)
PWY0-1338	Polymixin resistance (E. coli)
UB SYN PWY	superpathway of ubiquinol-8 biosynthesis (early decarboxylation)
PWY-6708	ubiquinol-8 biosynthesis
PWY-5857	ubiquinol-10 biosynthesis
PWY-5856	ubiquinol-9 biosynthesis
PWY-5855	ubiquinol-7 biosynthesis
PWY-5304	superpathway_of_sulfur_oxidation_(Acidianus_ambivalens)

Table des illustrations

1-Figure 1. Représentation schématique du rôle de la protéine A20 dans la régulation négative des voies de signalisation inflammatoires. 14

2-Figure 2. Physiologie de l'inflammasome pyrine et implication dans les maladies auto-inflammatoires 19

3-Figure 3. Physiologie de l'inflammasome pyrine et implications dans les cryopyrinopathies. 24

4-Figure 4. Schéma simplifié de la voie du mévalonate. 25

5- Figure 5. Mécanisme d'activation des Rho GTPases. 26

6-Figure 6. Mécanismes du microbiote intestinal conduisant à des maladies inflammatoires. 30

7-Figure 7. Implications de la barrière intestinale dans le contrôle du microbiote intestinal. . 32

8-Figure 8. Métabolisme des acides biliaires. 34

9-Figure 9. Cibles nucléaires des acides biliaires dans les entérocytes. 35

10- Figure 10. Effets des fibres alimentaires sur la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) par le microbiote intestinal et leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire. 36

11-Figure 11. Métabolisme du tryptophane. 38

12-Figure 12. Rôle de la sérotonine dans le tube digestif 39

13-Figure 13. Stratégies de modulation du microbiote intestinal. 44

14-Figure 14. Hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la perturbation de la barrière intestinale et l'inflammation. 55

15-Figure 15. Arbres généalogiques des 7 familles atteintes d'haploinsuffisance de A20..... 92

16- Figure 16. Résumé graphique des explorations digestives réalisées. 94

Table des tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques des maladies auto-inflammatoires monogéniques associées à des atteintes digestives. ……12

Tableau 2. Description des effets secondaires gastro-intestinaux et effets sur le microbiote intestinal des principaux traitements anti-inflammatoires utilisés dans les maladies auto-inflammatoires monogéniques……52

Résumé :

Les maladies auto-inflammatoires monogéniques sont des maladies génétiques causant une activation excessive de l'immunité innée. Elles se traduisent par des symptômes inflammatoires systémiques chroniques et/ou récurrents. Plusieurs de ces maladies sont caractérisées par une forte prévalence d'atteintes digestives et une association avec des maladies inflammatoires chroniques du tube digestif. C'est le cas de l'haploinsuffisance de A20 (HA20) dont les patients souffrent de douleurs abdominales et d'ulcérations digestives, de la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF) qui est associée à des péritonites aseptiques, des cryopyrinopathies (CAPS) et du déficit en mévalonate kinase (MKD), qui sont associés à des douleurs abdominales. Les perturbations du microbiote intestinal, appelées dysbiose, sont associées à la survenue et au développement de maladies inflammatoires de l'intestin mais aussi de maladies systémiques. Les effets pro-inflammatoires peuvent être directs, découler d'une altération de la barrière intestinale, ou de la modulation de métabolites dérivés du microbiote intestinal, particulièrement les acides biliaires, les acides gras à chaines courtes, et les métabolites dérivés du tryptophane. L'objectif de ce travail était de décrire les atteintes digestives clinico-radiologiques et histologiques des patients atteint de HA20, et de décrire la composition du microbiote intestinal des patients atteints de HA20, de FMF, de CAPS et de MKD. Nos observations ont montré que les patients atteints de HA20 présentent une atteinte gastro-intestinale et hépatique inflammatoire aspécifique. Les patients présentaient une dysbiose caractérisée par une surreprésentation de *R. gnavus*, et une sous-représentation d'espèces bactériennes impliquées dans la production de butyrate et du maintien de la barrière digestive. Ces anomalies étaient associées à une altération du métabolisme des acides biliaires, un déficit d'absorption des acides gras à chaines courtes, et un engagement du tryptophane alimentaire vers la voie neurotoxique de la kynurénine. Chez les patients avec FMF, on observait également une dysbiose caractérisée par une diminution de bactéries anti-inflammatoires, particulièrement *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus vestibularis*, ainsi qu'une diminution de bactériophages, suggérant un affaiblissement de la barrière intestinale. Contrairement au HA20 et à la FMF, les patients atteints de CAPS et MKD n'ont pas montré de dysbiose similaire. En conclusion, ces résultats soutiennent la participation d'une dysbiose et d'une altération des profils de métabolites dérivés du microbiote intestinal dans le HA20 et dans la FMF

Mots clés : [Microbiote intestinal, maladie auto-inflammatoire héréditaire, Haploinsuffisance de A20, métabolomique]

Host-gut microbiota interactions in monogenic auto-inflammatory diseases

Abstract :
Monogenic auto-inflammatory diseases are genetic disorders causing excessive activation of innate immunity. They result in chronic and/or recurrent systemic inflammatory symptoms. Several of these diseases are characterized by a high prevalence of digestive tract involvement and an association with chronic inflammatory diseases of the digestive tract. This is the case with A20 haploinsufficiency (HA20), whose patients suffer from abdominal pain and digestive ulcerations, familial Mediterranean fever (FMF), which is associated with aseptic peritonitis, cryopyrinopathies (CAPS) and mevalonate kinase deficiency (MKD), which are associated with abdominal pain. Disturbances in the intestinal microbiota, known as dysbiosis, are associated with the onset and development of inflammatory bowel diseases, as well as systemic diseases. Pro-inflammatory effects can be direct, resulting from alteration of the intestinal barrier, or from modulation of metabolites derived from the gut microbiota, particularly bile acids, short-chain fatty acids and tryptophan-derived metabolites. The aim of this work was to describe the clinical, radiological and histological digestive involvement of patients with HA20, and to describe the composition of the intestinal microbiota of patients with HA20, FMF, CAPS and MKD. Our observations showed that HA20 patients exhibit nonspecific inflammatory gastrointestinal and hepatic involvement. Patients showed a dysbiosis characterized by an over-representation of *R. gnavus*, and an under-representation of bacterial species involved in butyrate production and maintenance of the digestive barrier. These abnormalities were associated with impaired bile acid metabolism, deficient absorption of short-chain fatty acids, and commitment of dietary tryptophan to the neurotoxic kynurenine pathway. Patients with FMF also showed a dysbiosis characterized by a decrease in anti-

inflammatory bacteria, particularly Streptococcus salivarius and *Streptococcus vestibularis*, as well as a decrease in bacteriophages, suggesting a weakening of the intestinal barrier. In contrast to HA20 and FMF, CAPS and MKD patients did not show similar dysbiosis. In conclusion, these results support the involvement of dysbiosis and altered gut microbiota-derived metabolite profiles in HA20 and FMF.

Keywords: [Gut microbiota, hereditary autoinflammatory diseases, A20 haploinsufficiency, metabolomics]