

Fièvres récurrentes héréditaires : Étude fonctionnelle des gènes connus – Clonage positionnel des gènes non encore identifiés.

BIOLOGIE & SANTÉ 2011



- Laurence Cuisset – Institut Cochin, Paris
- Gilles Grateau – Médecine Interne, Hôp Tenon, Paris
- Serge Anselem – INSERM U933, Hôp Trousseau, Paris
- Jean-Claude Lecron – EA 3806, Université de Poitiers

HEREFEVER – MRAR 2006

Introduction

Les fièvres récurrentes héréditaires constituent un groupe particulier de maladies où une anomalie génétique permanente s'associe à des signes cliniques inflammatoires généraux et focaux intermittents. Quatre entités ont été jusqu'ici définies par leur aspect clinique et leur cause génétique et dont la plus fréquente est la fièvre méditerranéenne familiale (FMF- gène *MEFV*- protéine PYRINE). Les autres sont : le syndrome TRAPS (gène *TNFRSF1A*- protéine Récepteur 1 du TNFa) ; les déficits en mévalonate kinase (gène *MVK* – protéine Mévalonate Kinase) qui regroupent le syndrome Hyper IgD (HIDS) et l'acidurie mévalonique (MA) ; les cryopyrinopathies (gène *NLRP3/CIAS1* – protéine CRYOPYRINE) qui regroupent l'urticaire familiale au froid (UFF), le syndrome de Muckle-wells (MWS) et le syndrome CINCA.

Nos objectifs étaient les suivants :

- 1- Caractériser de nouveaux gènes de fièvre récurrente héréditaire
- 2- Élucider les mécanismes de l'auto-inflammation

Résultats majeurs

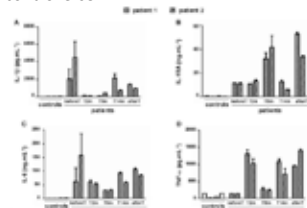
Identification d'un nouveau gène de fièvre récurrente héréditaire

Nous avons identifié deux familles présentant des mutations non ambiguës du gène *NLRP12* : mutation non sens prématurée et mutation d'épissage dont l'étude a montré qu'elle conduisait également à un codon stop prématuré (analyse de transcrits générés à partir de minigènes *NLRP12*). Des études fonctionnelles réalisées sur *NLRP12* ont démontré l'absence de redondance fonctionnelle entre *NLRP3* et *NLRP12* et apporté des arguments convaincants en faveur du rôle inhibiteur de *NLRP12* sur la voie NF- κ B induite par différents agents activateurs (TNFa, IRAK1 et p65) ; en effet, jusqu'alors, le rôle de *NLRP12* sur cette voie était très controversée.

Plus récemment, nous avons identifié une mutation faux-sens récurrente du même gène conduisant à l'activation de la pro-caspase 1.

Etude de la réponse au traitement chez des patients présentant une mutation non-sens de *NLRP12*

Les profils de sécrétion cytokinique *ex-vivo* de 2 jumeaux monozygotes porteurs d'une mutation non-sens de *NLRP12* (étudiés sur 15 mois) ont révélé des taux anormalement élevés d'IL1 β (100 à 200 fois supérieur à la normale). Le traitement à l'anakinra a conduit à une amélioration clinique très nette, accompagnée d'une quasi normalisation des taux d'IL1b. Après 2 mois de traitement, il a été observé une augmentation de la sécrétion de TNF alpha. Les patients ont alors développé des myalgies très sévères (comme 95% des patients qui ont un syndrome TRAPS associé à une anomalie de la voie de signalisation du TNF). Cette augmentation s'accompagne d'une sécrétion élevée d'IL6 (dont l'expression est induite par l'IL1b et le TNF), et d'une réaugmentation progressive des taux d'IL1b (dont l'expression est induite par le TNF). La concordance entre l'évolution des profils de sécrétion cytokinique et la réponse au traitement permet ainsi d'expliquer l'échappement thérapeutique observé chez ces patients. Ce travail démontre le rôle crucial de l'IL1b dans la physiopathologie des FRHs associées aux mutations de *NLRP12*, alors controversé.



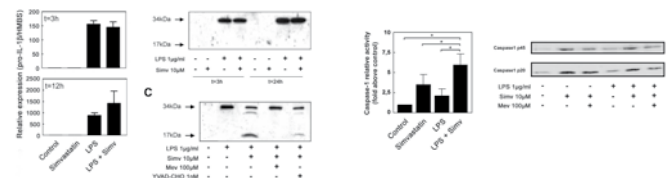
Sécrétion spontanée de l'IL1b (A), IL1Ra (B), IL6 (C) et TNF alpha (D) par les PBMC de témoins et des 2 patients porteurs d'une mutation de *NLRP12* avant traitement, après 2 mois (T2m), 8 mois (T8m), et 14 mois (T14m) de traitement par l'anakinra, et après arrêt du traitement.

Cryopyrine : études fonctionnelles

Des mutations du gène *NLRP3*, codant la cryopyrine, ont été associées à trois FRHs : l'urticaire familiale au froid (UFF), le syndrome de Muckle-wells (MWS) et le syndrome CINCA. Nous avons étudié une forme familiale de cryopyrinopathie associée à une mutation particulière de *NLRP3* localisée dans le domaine LRR (leucine rich repeats) de la protéine. Nous avons mis en évidence dans des tests fonctionnels que ce variant a un effet activateur très modéré sur le clivage protéolytique de la pro-caspase 1 alors que nous montrons que les monocytes de ce patient CAPS atypique ont des capacités spontanées ou induites à produire environ 50 fois plus d'IL-1b que les sujets normaux, illustrant la limite des tests fonctionnels disponibles.

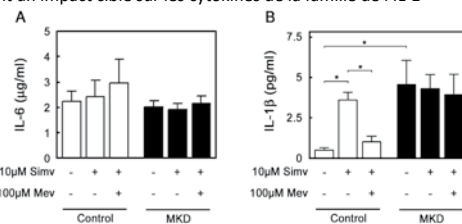
Mévalonate kinase : études fonctionnelles

Grâce à un modèle *in vitro* utilisant des statines pour mimer l'effet de la mutation de la MVK, nous avons montré que les statines augmentent fortement et spécifiquement la production d'IL-1 β et d'IL-18 par les monocytes. La maturation post-traductionnelle de ces cytokines par la caspase-1 est activée. Ces résultats ont été confirmés sur les cellules de la lignée monocyttaire THP-1, montrent aussi que la génylation et Rac-1 sont impliqués dans ces mécanismes.



THP-1 cells were cultured with or without 1 μ g/ml LPS in the absence or presence 10 μ M simvastatin, 100 μ M mevalonate and 1 μ M Caspase-1 inhibitor. (A) Relative pro-IL-1 β intracellular expression was determined by quantitative RT-PCR analysis. Each bar represents mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B) Pro-IL-1 β (54kDa) and mature IL-1 β (17kDa) intracellular levels were analyzed by western blot in THP-1 lysates (representative of 2 independent experiments). (C) Pro-IL-1 β (54kDa) and mature IL-1 β (17kDa) extracellular levels were assessed by western blot in 48 hours THP-1 culture supernatants (representative of 2 independent experiments). (D) Caspase-1 activity was measured in 50-fold concentrated 48 hours culture supernatants using a fluorimetric Caspase-1 activity assay. Each bar represents mean \pm SEM of 4 independent experiments. *p<0.05 based on Student's paired t test. (E) Pro-Caspase-1 (p45) and mature Caspase-1 (p20) extracellular levels were assessed by western blot in 50-fold concentrated 48 hours culture supernatants (representative of 3 independent experiments).

Nous avons analysé la sécrétion de ces cytokines par des fibroblastes dermiques (FD) de sujets contrôles (SC) et de patients MKD et montrons que les FD MKD produisent plus d'IL-1 β que les SC. Notons que le traitement par la simvastatine de FD SC permet d'atteindre le niveau de sécrétion des FD MKD, qui sont eux insensibles à la simvastatine. Précisons que la production d'IL-6 n'est pas modifiée dans toutes ces conditions, confirmant un impact ciblé sur les cytokines de la famille de l'IL-1



Human dermal fibroblasts from healthy donors or MKD patients were pre-activated with 10ng/ml IL-1 α and 10ng/ml TNF- α during 24 hours and stimulated with or without 10 μ M simvastatin, and 100 μ M mevalonate for additional 24 hours. Supernatants were collected, and IL-6 (A) and IL-1 β (B) were assayed by ELISA. Each bar represents mean \pm SEM (n=4 for control and n=3 for MKD). *p<0.05 based on Student's t test.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats a permis l'identification d'une nouveaux gène dont les mutations sont responsables d'une FRH et contribué à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces maladies auto inflammatoires.

Publications - Valorisation

- 1- JÉRU I *et al Pathol Biol*. 2008, Jun 11.
- 2- JERU I *et al Proc. Natl Acad USA*, 2008,105:1614-1619.
- 3- NORMAND S *et al Eur Cyt Network*, 2009 Sep;20(3):101-7
- 4- JÉRU I *et al PLoS One*. 2009 Oct 30;4(10):e7676.
- 5- MASSONNET *et al Eur Cyt Network*, 2009 Sep;20(3):112-20
- 6- JERU I *et al Arthritis Rheum*, 2010, Apr;62(4):1176-85.
- 7- CUISSET L *et al Ann Rheum Dis*. 2011 Mar;70(3):495-9.
- 8- JÉRU I *et al Arthritis Rheum*, in press, 2011
- 9- JÉRU I *et al Arthritis Rheum*, 2011, May;63(5):1459-74

CONTACT :

laurence.cuisset@inserm.fr

