

Université 
de Montréal



Microbiologie, Immunologie et Infectiologie/ Université de Montréal/CHU Ste-Justine/Faculté
Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Un modèle macrophagique humain pour étudier la dynamique d'activation de
l'inflammasome**

Présenté par :

Lorie Marchitto

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche :

Dr. Fabien Touzot, MD, Ph.D.

Président rapporteur:

Dr. Étienne Caron, Ph.D.

Membre du jury:

Dr. Jean-Sébastien Delisle, MD, Ph.D.

30 avril 2020

Identification des membres du jury :

Président Rapporteur :
Dr. Étienne Caron Ph.D.
CHU Ste-Justine

Directeur de recherche :
Dr. Fabien Touzot M.D. Ph.D.
CHU Ste-Justine

Membre du jury :
Dr. Jean-Sébastien Delisle M.D. Ph.D.
Hopital Maisonneuve-Rosemont

Résumé :

Les inflammasomes sont des complexes protéiques impliqués dans l'immunité innée, qui sont activés par de multiples signaux de danger. Des mutations héréditaires des protéines de l'inflammasome peuvent être responsables de son activation excessive et *in fine* de la survenue de pathologies auto-inflammatoires chez l'être humain. À l'heure actuelle, aucun modèle cellulaire ne permet d'étudier spécifiquement la dynamique d'activation des inflammasomes et de préciser les conséquences des mutations activatrices sur celles-ci. J'ai donc généré un modèle humain macrophagique exprimant une protéine recombinante FLAG3x-ASC endogène, commune aux différents inflammasomes dans la lignée cellulaire humaine monocytaire/macrophagique THP-1. Cette lignée a été générée par édition génique par la technologie CRISPR-Cas9 en utilisant un substrat de recombinaison permettant d'insérer la séquence codant pour le FLAG3X *in frame* du locus *PYCARD* codant pour ASC. J'ai pu générer 6 clones FLAG3x-ASC dans la lignée THP-1. Les clones générés ont été validés en confirmant l'expression et la fonctionnalité de la protéine recombinante FLAG3x-ASC et en vérifiant l'absence de mutations indésirables hors-cible générée par la nucléase Cas9. Une fois ce modèle généré, j'ai pu également reproduire un variant génétique du gène *NLRC4*, protéine sensor de l'inflammasome du même nom, retrouvé chez un patient présentant une maladie auto-inflammatoire. La validation des clones mutant pour *NLRC4* est en cours. Ce projet permettra la caractérisation de la dynamique d'activation de l'inflammasome dans un modèle physiologique et pathologique. Ceci permettra une avancée importante dans la compréhension de l'inflammasome et son agrégation ainsi que la régulation de ce complexe face aux signaux de danger.

Mots clés : Inflammasome, NLRC4, ASC, CRISPR-Cas9, Monocytes/Macrophages

Abstract :

Inflammasomes are multiproteic complexes that are involved in innate immunity and are activated by multiple signals of dangers. Hereditary mutations in inflammasome components lead to its excessive activation that is responsible for human auto-inflammatory disease. While these mutations are supposed to alter the dynamic of inflammasome activation, there is no current human model allowing the dynamic study of this complex. I generated a human cellular model expressing an endogenous FLAG3x ASC protein, an adaptator protein common to several inflammasomes, in the human monocytic/macrophagic THP-1 cell line. This model was created through CRISPR-Cas9 genome engineering using a recombination template allowing the in frame integration of the sequence encoding the FLAG3X peptide at the *PYCARD* locus encoding ASC. I generated and validated the expression and the functionality of 6 FLAG3x-ASC THP-1 cell lines. Furthermore, these cell lines are devoided of CRISPR-Cas9 off-target effect. In this model, I further reproduced a genetic variant of the inflammasome component NLRC4 observed in a patient presenting with autoinflammatory manifestation. The functional validation of the FLAG3x-ASC THP-1 harboring the NLRC4 variant is on-going. This project will allow to study the dynamic of the activation of the inflammasome in healthy and pathological conditions. Those results will help refine our comprehension of inflammasome complexation and regulation in response to danger signals.

Key Words: Inflammasome, NLRC4, ASC, CRISPR-Cas9, Monocytes/Macrophages

Table des matières

IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY :	2
RÉSUMÉ :	3
ABSTRACT :	4
LISTE DES TABLEAUX :	1
LISTE DES FIGURES :	2
ABRÉVIATIONS:	3
REMERCIEMENTS:	4
.....	1
1.INTRODUCTION :	1
PROJET :	1
1.1. PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION	1
1.1.1 <i>L'inflammation</i>	1
1.1.2 <i>Les inflammasomes</i>	3
1.1.3 <i>Les stimuli de l'inflammasome</i>	6
1.1.4 <i>Inflammasome NLRC4</i>	8
1.2 LES PATHOLOGIES AUTO-INFLAMMATOIRES	10
1.3 ÉDITION GÉNIQUE	13
1.3.1 <i>CRISPR- Cas9</i>	15
1.3.2 <i>Système de réparation par recombinaison Homologue et Non-Homologue</i>	18
1.3.3 <i>HDR dans l'édition génique</i>	19
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1 CULTURE CELLULAIRE	22
2.2 INSERTION GÉNOMIQUE DU FLAG3X PAR ÉDITION GÉNIQUE DANS LE CADRE DE LECTURE DU GÈNE CODANT ASC DANS LES CELLULES THP-1	22
2.3 CULTURE DES CLONES APRÈS ÉDITION GÉNIQUE	22
2.4 DÉTECTION DES CLONES ASC-FLAG POSITIFS	23
2.5 DÉTECTION DES OFF-TARGETS ASC GUIDE ASC_CUT	24
2.6 WESTERNBLOT ASC.....	26
2.7 MICROSCOPIE À FLUORESCENCE DES CELLULES THP-1 ASC-FLAG	27
2.8 MESURER L'ACTIVATION DE LA CASPASE DES CLONES ASC-FLAG DANS LES CELLULES THP-1 PAR <i>FLUROCHROME-LABELED INHIBITORS OF CASPASES (FLICA)</i>	27
2.9 INSERTION GÉNOMIQUE DE LA MUTATION EN POSITION HISTIDINE 392 NLRC4 EXON 4 DU CLONE ASC-FLAG PAR ÉDITION GÉNIQUE CRISPR-CAS9 DANS LES CELLULES THP-1	27
2.10 DÉTECTION DES CLONES ÉDITÉS HISTIDINE 392 ASC-FLAG	28
3. RÉSULTATS	29
3.1 INSERTION GÉNOMIQUE DU ASC-FLAG PAR ÉDITION GÉNIQUE CRISPR-CAS9 DANS LES CELLULES THP-1	29
3.2 SCREENING DES OFF-TARGETS DU CLONE 32 THP-1 ASC-FLAG3x	32
3.3 VALIDATION D'EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA PROTÉINE ASC-FLAG3x	33
3.4 VALIDATION DE PRÉSERVATION DE LA FONCTION PROTÉIQUE ASC-FLAG3x.....	34
.....	35
3.5 INSERTION GÉNOMIQUE DU VARIANT GÉNÉTIQUE P.HIS392DEL NLRC4 PAR ÉDITION GÉNIQUE CRISPR-CAS9 DANS LE MODÈLE CLONE 32 FLAG3x-ASC THP-1	37
4. DISCUSSION :	40

5. CONCLUSION :	45
BIBLIOGRAPHIE	46
FIGURES SUPPLÉMENTAIRES :	57

Liste des tableaux :

Tableau I : Résumé des principales pathologies hyper-inflammatoires et leur degré de sévérité

Tableau II : Manifestations cliniques du MAS

Tableau III : Causes diverses du MAS

Tableau IV : Étapes PCR amorces ASC_E3_F et ASC_E3_R

Tableau V : Étapes PCR amorces ASC_E3_F et FLAG3x_R

Tableau VI : Amorces utilisées pour les différents Off-Target

Tableau VII : Étapes PCR Off-Target 1

Tableau VIII : Étapes PCR Off-Target 2

Tableau IX : Étapes PCR Off-Target 3

Tableau IX : Étapes PCR Off-Target 4-10

Tableau X : Composition du Swelling Buffer

Tableau XI : Étapes PCR amorces NLRC4_T7His_F et NLRC4_T7His_R

Liste des Figures :

Figure 1 : Schéma représentant l'activation de l'inflammasome.

Figure 2 : Schéma représentant l'activation des différents inflammasomes.

Figure 3 : Cascade de signalisation de l'inflammasome NLRC4

Figure 4 : Schéma de la réponse inflammatoire suite à de subséquents stimuli

Figure 5 : Représentation des différents systèmes d'édition génique.

Figure 6 : Représentation schématique des composantes protéiques et génique de CRISPR-Cas9.

Figure 7 : Édition génique de CRISPR-Cas 9 et les réparations de coupures double brin en édition génique.

Figure 8 : Efficacité d'édition génomique sur le 1er exon du gène ASC

Figure 9 : Détection des clones THP-1 ASC-FLAG3x

Figure 10 : Les 10 off-targets les plus probables selon l'algorithme CRISPOR du guide ASC_Cut utilisé pour générer le modèle cellulaire THP-1 ASC-FLAG3x.

Figure 11 : Validation d'expression protéique du FLAG3x et de ASC.

Figure 12 : Détermination de la viabilité et de l'activation de la Caspase 1 par la méthode FLICA dans le clone 32 ASC-FLAG3x-THP-1 et dans les cellules contrôles.

Figure 13 : Efficacité d'édition génomique sur le 4e exon du gène NLRC4

Figure 14 : Détection des clones NLRC4-delH392-FLAG3x-ASC THP-1

Abréviations:

AIM2: *Absent In Melanoma 2*
ALR: *AIM2-like receptor*
ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*
CAPS: *Syndromes périodiques associés à la cryopyrine*
CARD: *Caspase-Recruitment Domain*
Cas: *Crispr-associated sequence*
CD: *Cellule dendritique*
CLR: *C-type lectine receptor*
CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
crRNA: *CRISPR RNA*
DAMP: *Danger Associated Molecular Pattern*
FCAS: *Familial cold autoinflammatory syndrome*
FLICA: *Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases*
HLH: *Haemophagocytic lymphohistiocytosis*
K.O: *Knock-out*
LRR: *Leucine-Rich Repeat*
LKK2: *Leucine Rich Repeat-containing Kinase-2*
MAS: *Macrophage Activation Syndrome*
MSU: *Mono Sodium Urate crystal*
NATCH: *Nucleotide-binding and oligomerization domain*
NBD: *Nucleotide-Binding Domain*
NLR: *Nod Like-Receptor*
NLRC: *Nod Like-Receptor containing a CARD domain*
NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*
NOMID: *Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*
PAM: *Protospacer Adjacent Motif*
PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PRR: *Pattern recognition receptor*
PYD: *Pyrin Domain*
RIG: *retinoic acid-inducible gene*
RLR: *retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*
ROS: *reactive oxygen species*
T3SS: *Système de sécrétion de type 3*
TLR: *Toll-Like Receptor*

Remerciements:

J'aimerais d'abord remercier le Dr. Touzot de m'avoir fait confiance au travers ce processus. Merci pour vos conseils, merci pour votre patience avec mes idées parfois farfelues. Merci pour votre écoute et votre implication tout au long du projet. Ces deux années dans votre laboratoire ont marqué pour moi un environnement d'apprentissage agréable et enrichissant, me poussant au meilleur de mes capacités.

Merci au comité d'évaluation, Dr. Caron et Dr. Delisles ayant accepté de réviser ce mémoire en ces temps plus difficiles.

Merci aux membres du laboratoire qui ont su me soutenir au travers mes doutes et me féliciter lors de mes réussites, Blandine Monjarret, Daniela Stanga, récemment arrivé, mais qui m'a aidé lors de la rédaction de ce mémoire. Merci à Aissa Benyoucef, qui a été un mentor stimulant, me poussant constamment au défi et à l'amélioration, la réflexion et bien sûr, merci pour l'aide aux calculs mathématiques.

J'aimerais remercier mes collègues d'étage qui ont su faire de ces deux années de belles rencontres.

Merci à mon amie Chloé Berthe, qui m'a épaulé lors des moments difficiles, qui m'a conseillé lors de mes doutes et était présente en première ligne lors des réussites. Merci de ton implication dans mes projets auxquels tu te joins et me supporte toujours.

Merci à mon copain, Zachari Boucher, qui a su être à l'écoute, qui s'est intéressé à mon domaine, merci d'avoir écouté mes présentations orales à de nombreuses reprises et d'avoir toujours cru en moi.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, ma sœur, Roxanne Marchitto, mes parents Suzelle Vincent et Louis Marchitto, qui me change les idées chaque fois que nécessaire, qui n'ont jamais douté de moi une seule fois et qui sans eux, rien de tout cela ne serait possible.

1.Introduction :

Projet :

Le complexe de l'inflammasome est un acteur central de la réponse de l'immunité innée - système de première défense vis-à-vis des agressions et infections qui intègre barrières anatomiques, cellules immunitaires (dont les cellules phagocytaires) et système du complément.

Il existe plusieurs sous-types d'inflammasomes définis selon leurs signaux d'activation. Tous aboutissent à la sécrétion de cytokines inflammatoires tels que l'IL-1 β et IL-18, responsables de la réponse inflammatoire. Une dérégulation des protéines de ce complexe causée par des mutations génétiques est à l'origine de pathologies humaines auto-inflammatoires. Si les signaux responsables de l'activation des différents inflammasomes ont été partiellement définis, il existe peu de données sur la dynamique d'activation de ce complexe, autant en situation physiologique que pathologique. Le but de mon projet est de générer un modèle cellulaire humain permettant d'étudier les conséquences des mutations génétiques affectant les composants du complexe de l'inflammasome sur sa dynamique d'activation.

1.1. Physiologie de l'inflammation

1.1.1 L'inflammation

L'inflammation est un processus de défense vital impliquant le système immunitaire qui permet au corps de se défendre adéquatement contre un signal de danger tel que l'invasion par des pathogènes, des dommages cellulaires ou contre des molécules toxiques (Medzhitov, 2010). Lors de la réponse inflammatoire, différents mécanismes moléculaires et cellulaires prennent place. Les structures moléculaires microbiennes «*Pathogen Associated Molecular Pattern*» (PAMP) ainsi que les signaux de danger «*Danger Associated Molecular Pattern*» (DAMP) sont reconnues par les cellules immunes résidentes dans les tissus (Tang, Kang, Coyne, Zeh, & Lotze, 2012) qui expriment des

récepteurs dédiés ou «Pattern recognition receptor» (PRR), pouvant enclencher l'activation cellulaire (Suresh & Mosser, 2013).

Les PRRs sont catégorisés en deux familles, l'une composée de protéines transmembranaires comme les Toll-Like Receptor (TLR) et les C-type lectine receptors (CLRs), et l'autre comportant les récepteurs cytosoliques. Cette dernière inclut les Nucleotide-binding oligomerization domain- (NOD-) like receptors (NLRs), like receptors containing a Card domain (NLRC) retinoic acid-inducible gene- (RIG-) I-like receptors (RLRs), and AIM2-like receptor (ALR) (Takeuchi & Akira, 2010). Cette diversification permet aux protéines PRRs de reconnaître des signaux intracellulaires et extracellulaires potentiellement dangereux pour l'organisme. L'activation des PRRs par la reconnaissance de ces signaux enclenche divers mécanismes de défense résultant en une réponse inflammatoire soutenue et amplifiée. L'un de ces mécanismes de défense est l'activation de la cascade du complément. La cascade du complément est initiée par l'activation de PRRs lectine type C. La voie classique du complément nécessite la protéine Cq1, acteur principal du complexe C1 reconnu lors de l'activation de la voie du complément, tandis que la voie alterne des lectines repose plutôt sur le Mannose Binding Lectine (Kerrigan & Brown, 2009). Chaque voie de la cascade du complément permet ultimement de renforcer l'action des anticorps, de promouvoir la phagocytose par les cellules immunitaires, fonction servant à englober et digérer des particules étrangères ainsi que de maintenir une réponse inflammatoire (Basset, Holton, O'Mahony, & Roitt, 2003).

La phagocytose est activée principalement via la cascade de signalisation dépendante de NF- κ B, mais aussi via des voies de signalisation connexes (AP-1, STAT, IRAF) (H. Liu, Kang, Liu, Chen, & Zhao, 2002; Smale, 2012). Ces facteurs de transcriptions permettent de moduler les gènes indispensables à l'activation de la réponse innée, comme la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β /IL-18) (Basset et al., 2003) et adaptative cellulaire (lymphocytes T) et humorale (lymphocytes B) qui permettra l'acquisition d'une mémoire immune (Chaplin, 2010). En effet, une fois activé, les PRRs permettent aux cellules résidentes (macrophages, cellules dendritiques, cellules de Kupfer, mastocytes ...) d'initier la réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines, mais également des chimiokines,

attractant moléculaire permettant de recruter des cellules immunitaires du sang et du plasma dans le tissu infecté (Struyf et al., 2005). L'action des cytokines et chimiokines permet de modifier la perméabilité des vaisseaux et de stabiliser l'entrée des cellules par diapédèse et par interaction récepteurs spécifiques (Sage & Carman, 2009; Szekanecz & Koch, 2004). Les cellules entrantes sont majoritairement des neutrophiles, monocytes/macrophages et cellules Natural Killer (NK) (Oth et al., 2018; Sokol & Luster, 2015). Ces cellules une fois recrutées au site d'inflammation peuvent à leur tour sécréter des signaux inflammatoires afin de non seulement maintenir la réponse, mais également de l'amplifier afin de recruter une réponse cellulaire et humorale. La réponse inflammatoire se résout lorsque les dommages tissulaires sont réparés et que l'homéostasie est restaurée (Serhan & Savill, 2005).

1.1.2 Les inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes protéiques cytosoliques dont le cœur est formé de protéines issues de la famille des NLRs et de la forme inactive de caspase, la pro-caspase. La pro-caspase 1 est la caspase majoritairement présente au sein du complexe, mais d'autres caspases peuvent y être recrutées (caspase 2, 3 et 8) (Boucher et al., 2018; Bronner et al., 2015; Schneider et al., 2017). Certains inflammasomes contiennent également la protéine adaptatrice *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain* (ASC) (Strowig, Henao-Mejia, Elinav, & Flavell, 2012).

La classification des différents inflammasomes repose sur les protéines NLRs qui les composent. Comme évoqué précédemment, les protéines NLRs appartiennent à la famille des PRRs cytoplasmiques qui inclut les protéines NODs, NLRs et NLRCs (Kawai & Akira, 2009). Ils sont très bien conservés chez les plantes et les mammifères en lien avec leur fonction primaire qui est de reconnaître les signaux de danger PAMPs/DAMPs (Pontillo & Crovella, 2017). Leur structure protéique comporte 3 principaux domaines : un domaine Leucine-Rich Repeat (LRR) en C-terminal, responsable de la liaison avec les agents pathogènes, un domaine central Nucleotide-Binding Domain (NBD) ou également appelé Nucleotide-binding and oligomerization domain (NATCH) permettant l'oligomérisation de la protéine et finalement, le domaine en N-terminal qui peut contenir soit un domaine

Caspase-Recruitment (CARD) ou un domaine Pyrin (PYD) (Meylan, Tschopp, & Karin, 2006). Ces deux domaines ont un rôle effecteur, recrutant la pro-caspase et initiant son activation par clivage (Martinon, Burns, & Tschopp, 2002).

Ainsi, les inflammasomes NLRPs contiennent les protéines NLRs avec un domaine N-terminal PYD tandis que les inflammasomes NLRC comportent des protéines NLR possédant un domaine N-terminal CARD (Y. Yang, Wang, Kouadir, Song, & Shi, 2019). Le recrutement de la pro-caspase s'effectuant via le domaine CARD (Srinivasula et al., 2002), les inflammasomes NLRPs comportent systématiquement une protéine ASC qui est formée de deux domaines : un domaine PYD en N-terminal et un domaine CARD en C-terminal, permettant la liaison entre les NLRP via le domaine PYD et la pro-caspase par le domaine CARD (Srinivasula et al., 2002). Les inflammasomes NLRC, en revanche, sont capables de s'associer à la pro-caspase de manière indépendante d'ASC, via leur domaine CARD (Poyet et al., 2001). L'activation de NLRC4 peut mener à la pyroptose ou permet d'augmenter le recrutement de pro-caspase 1 (Duncan & Canna, 2018).

La pyroptose est une mort cellulaire différente de la mort cellulaire classique (apoptose). Lors de la mort cellulaire, la pyroptose permet de répandre des composantes pro-inflammatoires qui étaient contenues dans la cellule, permettant un relais de la réponse inflammatoire aux cellules voisines (Duncan & Canna, 2018). Ceci engendre la perturbation de l'environnement pour les pathogènes puisque les signaux pro-inflammatoires sont relâchés dans le milieu (Jorgensen, Zhang, Krantz, & Miao, 2016). Ce mécanisme est majoritairement décrit dans les cellules phagocytaires macrophagiques (Duncan & Canna, 2018).

L'activation de l'inflammasome est un processus en deux étapes. La première étape (ou priming (Patel et al., 2017)) est initiée par un signal de danger reconnu par les PRRs membranaires (TLR), enclenchant ainsi une cascade de signalisation dépendante de la protéine Myd-88 (Kader et al., 2017). Celle-ci permet l'activation du facteur de transcription NF- κ B, menant à l'activation de la transcription de gènes codant pour les composantes de l'inflammasome (NLR/NLRC) et les substrats de la caspase (pro-IL-1 β et pro-IL-18) (Hiscott et al., 1993). La deuxième étape requiert un signal spécifique médié

par la reconnaissance d'un stress cellulaire par les PRRs cytosoliques dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés.

Après activation du NLR par le signal de danger, son domaine NATCH, capable d'activité ATPase, permet l'oligomérisation des protéines NLR (Latz, Xiao, & Stutz, 2013), jusqu'ici sous forme de monomère, en oligomère de forme concentrique avec le domaine LRR à l'extérieur et le domaine PYD/CARD vers l'intérieur (Figure 1). La protéine ASC, reconnaissant ensuite ce complexe, se lie au domaine PYD du NLR (Martinon & Tschopp, 2005). Le domaine CARD de la protéine ASC permet de recruter la pro-caspase 1 (Martinon & Tschopp, 2005). La liaison de pro-caspase 1 avec le domaine CARD entraîne l'auto-clivage de pro-caspase 1, menant ainsi à sa forme mature avec son activité protéolytique (X. Yang, Chang, & Baltimore, 1998). Caspase-1 maintenant active clive ses substrats pro-IL-1 β et pro-IL-18 les rendant actifs à leur tour (Figure 1) (Ghayur et al., 1997; Howard et al., 1991). La Caspase-1 permet aussi le clivage de la protéine pro-Gasdermine-D. Les fragments N-terminal de ce clivage s'assemblent et forment des pores Gasdermine-D dans la membrane plasmique (X. Liu et al., 2016). Ces pores permettent ainsi la sécrétion des cytokines inflammatoires produites (IL-1 β /IL-18), mais sont aussi importante pour la pyroptose, un mécanisme de mort cellulaire programmée liée à l'inflammation (X. Liu et al., 2016). Ce processus a été décrit initialement dans les monocytes infectés par certains pathogènes intracellulaires ou toxines. Il est caractérisé par une perte d'intégrité de la membrane plasmique, un gonflement cellulaire et une lyse cellulaire (Fink & Cookson, 2006). Les pores Gasdermin-D ont un rôle important dans la régulation négative de l'inflammasome et le contrôle de la réponse inflammatoire (Boucher et al., 2018).

L'inflammasome est exprimé et étudié majoritairement dans les cellules myéloïdes (macrophages, monocytes, Cellules Dendritiques mais également dans des cellules non myéloïdes comme les kérancocytes ou les cellules hépatiques (Kupffer et endothéliales sinusoidales) (Boaru, Borkham-Kamphorst, Tihaa, Haas, & Weiskirchen, 2012; Henao-Mejia, Elinav, Thaïss, & Flavell, 2013; Schroder & Tschopp, 2010)

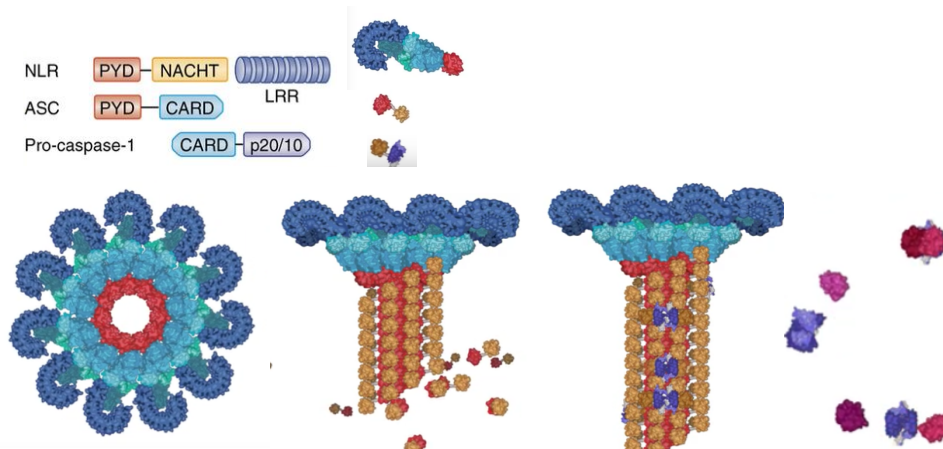


Figure 1 : Schéma représentant l'activation de l'inflammasome

Les protéines NLRs sont activées par un signal de danger. Se faisant, elles s'agrègent ensemble avec le domaine PYD vers l'intérieur et le domaine LRR vers l'extérieur de l'agrégation. La protéine ASC vient interagir avec les NLR grâce à son domaine PYD qui peut se lier au domaine PYD des NLRs. La protéine ASC vient former une structure tubulaire en dessous des protéine NLRs. Par la suite, la pro-caspase vient se lier aux protéines ASC par une interaction CARD-CARD, domaines présents sur les deux protéines. Ceci mène à l'inflammasome activé qui peut ensuite permettre l'auto-clivage de la caspase afin de générer sa forme active. La Caspase peut maintenant cliver les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18.

Tiré de : K.Schroder, University of Queensland

1.1.3 Les stimuli de l'inflammasome

Les protéines NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4, NOD2 et AIM2 peuvent entraîner l'activation de l'inflammasome *in vitro*. Toutefois, seules les protéines sensor NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2 semblent pouvoir déclencher une activation de l'inflammasome *in vivo* (Davis, Wen, & Ting, 2011).

L'inflammasome NLRP1 est activé suite à la reconnaissance de la toxine létale anthrax, produit par *Bacillus anthrax* (Boyden & Dietrich, 2006) (Figure 2). La toxine déstabilise la membrane plasmique et le facteur létal, peuvent entrer, clivant NLRP1 au site N-terminal résultant en l'activation de l'inflammasome. En effet, le facteur létal de *Bacillus anthrax* est une protéase Zinc dépendante qui clive MAPK, dérégulant ainsi des voies de signalisation menant à la mort cellulaire (Pannifer et al., 2001). NLRP1 peut aussi être

activé par diverses toxines bactériennes tel que *Toxoplasma gondii* (Ewald, Chavarria-Smith, & Boothroyd, 2014).

L'inflammasome NLRP3 est le mieux caractérisé. Il est activé par de nombreux ligands, comme les composantes de la paroi bactérienne, les acides nucléiques, les cristaux environnementaux (acide urique), des signaux endogènes comme l'ATP et l'ADN mitochondrial oxydé, le flux potassique, NEK7 etc. (Braga et al., 2017; Hari et al., 2014; He, Zeng, Yang, Motro, & Nunez, 2016; Mariathasan et al., 2006; Munoz-Planillo et al., 2013; Sha et al., 2014) (Figure 2). La grande diversité de reconnaissance de NLRP3 suggère l'existence d'une voie commune d'activation empruntée par tous ces signaux de danger (He, Hara, & Nunez, 2016).

L'inflammasome AIM2 reconnaît l'ADN double-brin viral (cytomégalovirus) ou bactérien (*Listeria*) (Sharma & Kanneganti, 2016) (Figure 2).

NLRC4 reconnaît la flagelline bactérienne et les composantes du système de sécrétion de type III (T3SS) (Y. Zhao et al., 2011) (Figure 2). Ce système de sécrétion est un complexe bactérien des espèces *Yersinia* et *Salmonella* leur permettant d'injecter des protéines microbiennes directement au cytoplasme, déjouant la membrane cellulaire qui, normalement, agit comme première barrière de protection (Coburn, Sekirov, & Finlay, 2007). L'interaction protéine-pathogène de NLRC4 passe par les protéines NAIPs, qui reconnaissent le pathogène et permettent secondairement la transduction du signal d'activation à NLRC4 (Vance, 2015).

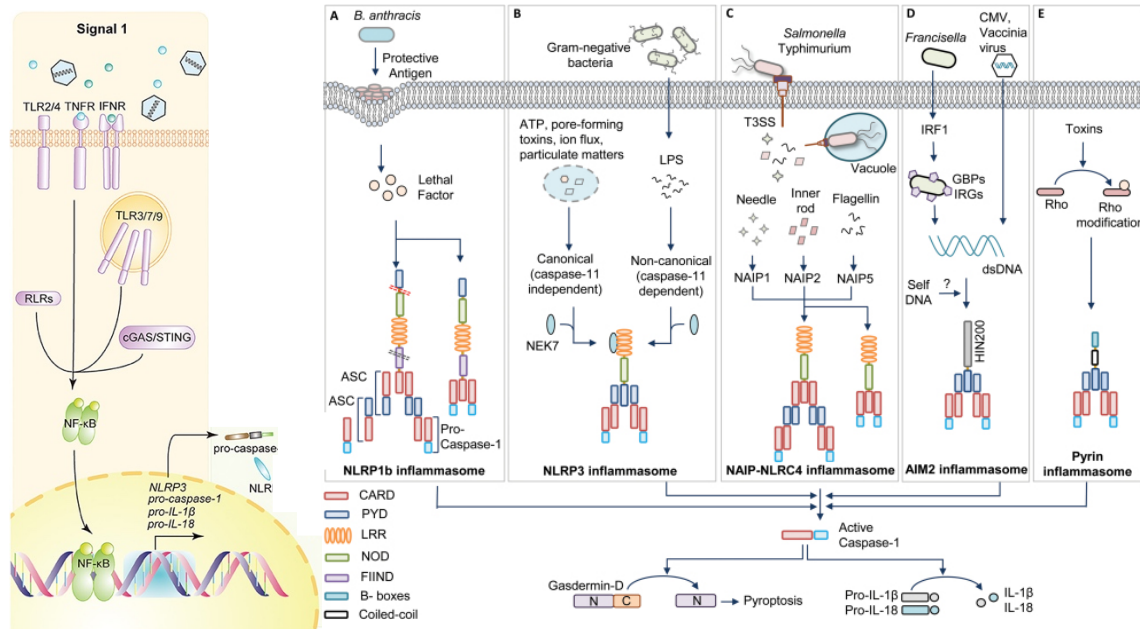


Figure 2 : Schéma représentant l'activation des différents inflammasomes

Les inflammasomes sont activés par un premier signal (priming). Ceci engendre une cascade de signalisation permettant ultimement aux facteurs de transcriptions (NFκB) de transloquer au noyau et d'augmenter la transcription des protéines NLR/ASC ainsi que des précurseurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et IL-18). Ensuite, un second signal est requis afin d'activer les complexes protéiques et enclencher l'inflammation. NLRP1 est activé par des toxines bactériennes ou des ligands muramyl dipeptides (MDP). L'inflammasome NLRP3 est activé par de multiples signaux comme des bactéries Gram négatives, de l'ATP etc. L'inflammasome NLRC4 est activé par des toxines propriétés bactériennes tel que les T3SS et la flagelline. L'inflammasome AIM2 est activé par l'ADN double-brin (viral ou bactérien). L'inflammasome Pyrin est activé par des protéines de toxines (Rho). Suite à cette activation spécifique, les protéines NLRs, ASC et Caspase s'agglomèrent afin de former le complexe de l'inflammasome. Celui-ci permet le clivage des protéines pro-inflammatoires afin de permettre leur maturation et leur sécrétion.

Tiré de : (Kesavardhana & Kanneganti, 2017; C. Zhao & Zhao, 2020)

1.1.4 Inflammasome NLRC4

Le « priming » de l'inflammasome NLRC4 est enclenché par des stimuli bactériens tel que les lipopolysacharides qui se lie au PRR TLR4. Ceci aboutit à la transcription des protéines du complexe de l'inflammasome et à leur substrat (les précurseurs des cytokines inflammatoires pro-IL1b et pro-IL18) via une cascade de signalisation dépendante de Myd88. L'activation directe de NLRC4 passe d'abord par le système de sécrétion de type III, activant les NAIPs de la cellule. Ceux-ci activés sont reconnus par NLRC4 qui s'oligomérisent et s'activent, menant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et à la

formation de pores Gasdermin-D. Ces pores ont un rôle important pour la sécrétion des cytokines et la pyroptose, mais ils permettent également la production de prostaglandine (PGE2) et leucotriènes (LTB4), qui ont un rôle de vasodilatation et de recrutement des cellules immunes respectivement, actions importantes pour l'activation et le maintien de la réponse inflammatoire (Figure 3) (von Moltke et al., 2012).

Lors de la phase de « priming », la transcription de NLRC4 est régulée positivement par TNF- α et par des facteurs de stress tel que p53. Néanmoins, le niveau basal d'expression est suffisant pour l'activation de l'inflammasome dans les cellules immunitaires et épithéliales (Gutierrez, Pipaon, & Fernandez-Luna, 2004; Sadasivam et al., 2005). Par ailleurs, NLRC4 peut interagir avec différents NLRs comme NOD1, NOD2, NLRP3, et NAIP (Damiano, Oliveira, Welsh, & Reed, 2004; Gutierrez et al., 2004; Sadasivam et al., 2005).

L'activation de NLRC4 quant à lui est régulée par des mécanismes post-transcriptionnels (Matusiak et al., 2015). La phosphorylation de NLRC4 sur la Serine533 est, en effet, une étape majeure de l'activation dans les macrophages (Qu et al., 2012). Cette phosphorylation est dépendante de la protéine kinase C δ ainsi que de la « Leucine Rich Repeat-containing Kinase-2 » (LRRK2) (W. Liu et al., 2017; Qu et al., 2012). Un autre moyen de régulation est assuré par le domaine LRR de la protéine qui la maintient dans un état conformationnel inactif (Hu et al., 2013). Il est probable que l'hyperactivation de NLRC4 dans les pathologies auto-inflammatoires soit liée à l'état conformationnel de la protéine.

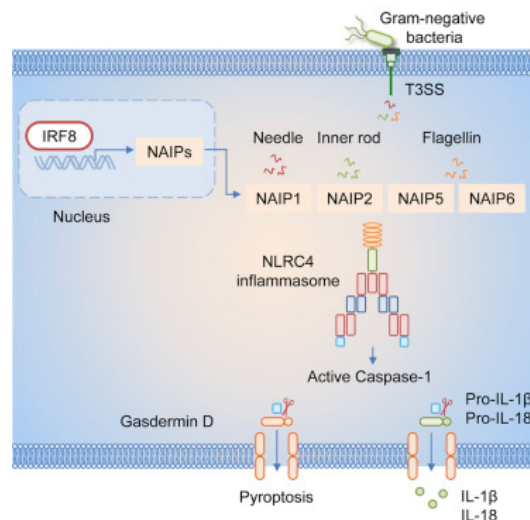


Figure 3 : Cascade de signalisation de l'inflammasome NLRC4

L'activation de NLRC4 peut se faire via le récepteur TLR suite à la reconnaissance de LPS ou par le système de sécrétion de type III passant directement au travers la membrane. Le récepteur TLR4 induit la cascade Myd88 qui active les facteurs de transcriptions notamment NF- κ B, IRF8, augmentant la transcription des pro IL-1 β , IL-18 et des NAIPs. Les composantes du système de sécrétion de type III active l'oligomérisation des protéines NLRC4 et peuvent activer l'inflammasome sans le recrutement d'ASC menant à la pyroptose des cellules ou encore former le complexe NLR-ASC-Caspase formant l'inflammasome NLRC4 menant à la forme active et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires ou à la pyroptose

Tiré de : (Karki et al., 2018)

1.2 Les pathologies auto-inflammatoires

Les pathologies auto-inflammatoires sont causées par des mutations causant un gain ou une perte de fonction dans les gènes régulant la réponse inflammatoire (McGonagle & McDermott, 2006). Ces mutations ont pour conséquence une sécrétion augmentée et dérégulée de cytokines inflammatoires, de manière systémique ou locale, causant des atteintes cutanées, digestives et articulaires importantes (Weaver & Behrens, 2014). Les pathologies auto-inflammatoires sont caractérisées par une réponse inflammatoire excessive, parfois indépendante de la perception d'un signal de danger (de Jesus, Canna, Liu, & Goldbach-Mansky, 2015).

En situation physiologique, la reconnaissance d'un pathogène par l'immunité innée et adaptative permet, par un travail en symbiose, la destruction de l'agent pathogène. L'immunité adaptative permet de générer une mémoire immunologique afin de rapidement éradiquer l'agent lors d'une infection subséquente par une réaction plus intense. Cependant, dans le cas des pathologies auto-inflammatoires, la réponse inflammatoire est importante dès la première stimulation pathogénique et se répète avec la même intensité à chaque stimulation subséquente, résultant en un état d'hyper-inflammation (Arts, Joosten, & Netea, 2018) (Figure 4). Les patients atteints de maladies auto-inflammatoires peuvent également développer une réponse inflammatoire sans stimulation antigénique liée à un agent pathogène, appelée inflammation aseptique (G. Y. Chen & Nunez, 2010). Ceci mène

à la sécrétion continue de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , et de manière soutenue, indépendamment des infections (Gul, 2018).

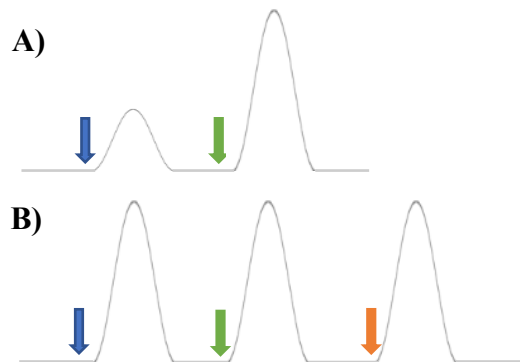


Figure 4 : Schéma de la réponse inflammatoire suite à de subséquents stimuli

Courbe : Réponse inflammatoire. Flèches bleues : premier contact avec un agent pathogène. Flèches vertes : Second contact avec l'agent pathogène. Flèche orange : Troisième contact avec l'agent pathogène. **A)** Réponse inflammatoire chez un sujet sain. **B)** Réponse inflammatoire vue chez un patient atteint d'hyper-inflammation.

Les pathologies auto-inflammatoires représentent un groupe hétérogène de maladies dont le spectre phénotypique est très large, et ceci de manière indépendante de l'étiologie génétique identique. À titre d'exemple, les mutations gain de fonction de NLRP3 (Bonar et al., 2012; Rowczenio et al., 2013) peuvent donner des tableaux aussi variés que des urticaires récidivant au froid («*Familial cold autoinflammatory syndrome*» (FCAS)), ou des maladies inflammatoires systémiques sévères comme le CAPS «*Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*» (NOMID) (Gul, 2018). Cette énorme variation clinique s'accompagne également d'une grande variabilité de pénétrance : par exemple la mutation *NLRP3* V198M se retrouvant aussi bien chez des porteurs asymptomatiques que des patients avec manifestations cliniques (Rowczenio et al., 2013).

Le tableau I illustre les différentes pathologies auto-inflammatoire avec leurs symptômes ainsi que leurs degrés de sévérité.

Tableau I : Résumé des principales pathologies hyper-inflammatoires, leurs atteintes cliniques et leur degré de sévérité

Gène	<i>NLRP3</i>	<i>NLRP3</i>	<i>MEFV</i>	<i>MEFV</i>	<i>NOD2</i>	<i>NOD2</i>	<i>MVK</i>	<i>TNFRSF1A</i>
Phénotype	FCAS	NOMID	PAAND	FMF	Crohn	S.D.B	MKD	TRAPS
Fièvre	x			x	x		x	x
Éruption cutanée	x	x	x			x	x	x
Articulation				x				
Atteintes organes		x				x		
Atteinte SNC		x					x	
Douleur abdominale			x	x	x			
Auto-inflammation	++	++	+	+++	+++	+	++	+++

(Bashardoust, 2015; Favier & Schulert, 2016; Figueras-Nart, Mascaro, Solanich, & Hernandez-Rodriguez, 2019; Gul, 2018; Ha & Khalil, 2015; Hull et al., 2002; Rosengren et al., 2007; Wouters, Maes, Foley, Bertin, & Rose, 2014; Yu & Leslie, 2011)
 Abréviations: CAPS, Cryopyrin associated periodic syndrome; FCAS, Familial cold autoinflammatory syndrome; FMF, Familial Mediterranean fever; MKD, Mevalonate kinase deficiency; NOMID, Neonatal-onset multisystem inflammatory disease; PAAND, Pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis; S.D.B, Syndrome de Bleu; TRAPS, TNF receptor associated periodic syndrome.

À l'extrême du spectre clinique, les pathologies auto-inflammatoires peuvent engendrer un dysfonctionnement majeur de la réponse inflammatoire, résultant en une activation prolongée des cellules immunes, dont les macrophages (Weaver & Behrens, 2014). Cette activation excessive des cellules immunitaires est appelée Syndrome d'Activation Macrophagique (MAS) et mène à des dommages tissulaires importants (Das et al., 2015). Le MAS est défini par des critères clinico-biologiques tels que décrits au Tableau II (Marsh & Haddad, 2018). Le MAS peut être primitif (liée à des mutations génétiques de gènes impliqués dans la réponse immunitaire) ou secondaire (Tableau III).

Tableau II : Manifestations cliniques du MAS

Manifestations cliniques
Fièvre prolongée ($\geq 38,5$ °C)
Hépatosplénomégalie
Cytopénie (neutrophile, hémoglobine, plaquettes)
Atteintes hépatiques
Atteinte système nerveux central

(Marsh & Haddad, 2018)

Tableau III : Causes diverses

Génétiques	Secondaires
Défaut cytotoxicité	Lymphome
Inflammasomopathies (NLRC4, XIAP etc.)	Infections

(Bracaglia, Prencipe, & De Benedetti, 2017; Canna et al., 2014)

Les MAS secondaires à des désordres de l'inflammasomes sont caractérisés par une hypersécrétion des cytokines inflammatoires dépendantes de l'inflammasome (IL-1 β et l'IL-18) (Dinarello, 2018; Harrison et al., 2015; Weiss et al., 2018).

1.3 Édition génique

L'édition génique est le processus permettant de modifier l'information génétique de manière ciblée grâce à l'utilisation de nucléase ciblant des régions déterminées de l'ADN génomique. Les principales nucléases utilisées sont les «*Zinc Finger Nuclease*», les TALENs ainsi que les CRISPR-Cas. Il existe également une technique de thérapie génique utilisant des virus modifiés afin d'introduire des séquences au génome ou encore de produire des protéines d'intérêts.

L'édition génique ainsi que la thérapie génique par les virus a été développée grâce à leur capacité de pénétrer la cellule lors d'une infection. Dépendamment du virus infectant la cellule, certains restent dans le cytoplasme tandis que d'autre peuvent entrer dans le noyau (Fay & Pante, 2015; Yamauchi & Helenius, 2013). Une fois à l'intérieur de la cellule, ils peuvent produire des protéines virales encodées dans leur génome en exploitant la machinerie cellulaire (Cohen, 2016). Ces capacités ont mené au développement de l'édition ainsi que de la thérapie génique. En effet, les virus de la famille des adénovirus, rétrovirus et lentivirus peuvent intégrer leur séquence virale au génome cellulaire (Ciuffi, 2008; Hindmarsh & Leis, 1999; Zheng, Baum, Iadarola, & O'Connell, 2000). Ces familles de virus sont utilisées majoritairement lors de l'édition génique. Une partie de leur génome est retiré et une séquence d'intérêt est insérée afin que lors de l'infection, la séquence d'intérêt soit intégrée au génome cellulaire. La taille de la séquence d'intérêt dépend du type de virus utilisé (Lundstrom, 2018).

Les virus restant dans le cytoplasme comme les picornavirus, les nodavirus ou les coronavirus sont utilisés en thérapie génique (den Boon, Diaz, & Ahlquist, 2010). Leurs capacités à produire des protéines au sein du cytoplasme permet de les exploiter afin d'encoder des séquences en leur génome pour qu'ils synthétisent une protéine déficiente caractéristique de certaines pathologies. Les virus comme vecteur génique ont été popularisés en 1990. Toutefois, certaines complications sévères comme la mort d'un patient sous thérapie avec un adénovirus ou encore la guérison de patients atteints de maladie immunitaire (SCID) par un rétrovirus corrigeant le phénotype génique ont développé des lymphomes ont freiné leur utilisation et d'autres approches ont été développées comme l'utilisation de nucléase (McCormack & Rabbitts, 2004; Raper et al., 2003). Leur utilisation est maintenant plus sécuritaire et ils sont encore utilisés dans certains domaines tel que les thérapies du cancer (J. Bell & McFadden, 2014).

Les «*Zinc Fingers Nuclease*» sont des endonucléases chimériques générées par fusion d'une nucléase (domaine catalytique FokI) avec un domaine de liaison à l'ADN en doigt de Zinc «*Zinc Finger Proteins*» (L. Li, Wu, & Chandrasegaran, 1992; Miller, McLachlan, & Klug, 1985). L'activation du domaine FokI requiert une dimérisation (Smith et al., 2000). La spécificité des «*Zinc Finger Nuclease*» repose sur leur domaine de fixation des «*Zinc Finger proteins*», chaque «*Zinc Finger*» reconnaissant environ 3 paires de bases (Berg, 1988) (Figure 5).

L'activité nucléase des TALENs repose également sur un domaine FokI. Le domaine de liaison à l'ADN des TALEN est le TALE, facteur de transcription présent chez les plantes (Boch & Bonas, 2010). Le TALE comporte un domaine central composé de séquences répétitives d'ADN séparées pour chacune d'elles par des séquences d'acides aminés qui confèrent la spécificité de liaison (Deng et al., 2012) (Figure 5).

Le système CRISPR-Cas9 est une technologie dérivée du système immunitaire des bactéries et des archées (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura, & Nakata, 1987; Mojica, Juez, & Rodriguez-Valera, 1993). Lorsqu'un génome étranger vient se loger dans l'ADN de l'hôte, le système CRISPR-Cas vient reconnaître cette région et génère une coupure

double brin afin de permettre sa dégradation. La spécificité du système CRISPR-Cas est assurée par le crRNA, un ARN complémentaire à la séquence cible qui, complexée à un RNA transactivateur (trRNA) et à l'endonucléase Cas, permet la localisation de cette dernière à une région génomique précise où elle générera une coupure double brin de l'ADN (Jinek et al., 2012). Le système CRISPR-Cas 9 est le plus utilisé, car il a l'avantage d'induire une cassure double brin avec un seul système et permet de cette manière une édition génique facilitée (Figure 5).

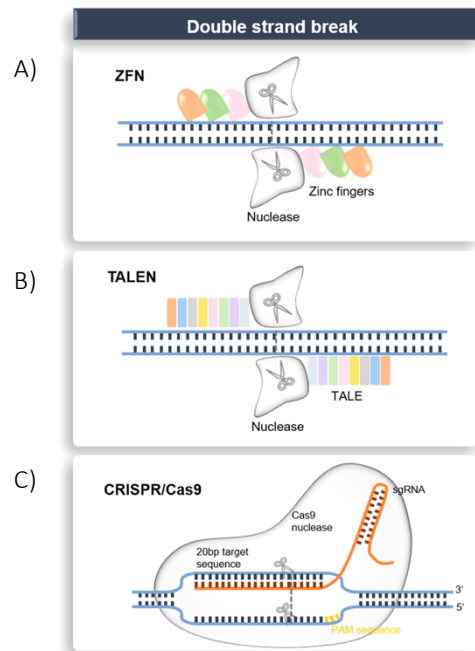


Figure 5 : Représentation des différents systèmes d'édition génique.

A) Zinc Finger Nuclease. Les ZF reconnaissant les ions zinc et le domaine Fok1 permettent de cliver l'ADN. **B) TALEN.** Les séquences répétitives TALE sont présentes et permettent de lier l'ADN tandis que les séquences entre ces régions confèrent la spécificité d'édition. Le domaine Fok1 permet la coupure des brins. **C) CRISPR-Cas9** l'ARN guide couplé à la Cas9 reconnaît la région à éditer par homologie de séquence. La Cas9 reconnaît la structure de l'ARN guide et vient induire la cassure double brin. Ces cassures doubles brins peuvent ensuite se réparer par recombinaison homologue ou non homologue.

Tiré de : (H. Li et al., 2020)

1.3.1 CRISPR- Cas9

Le système d'édition génique CRISPR-Cas 9 a été conçu à partir du système de CRISPR présent dans les bactéries ainsi que les archées (Ishino et al., 1987; Mojica et al., 1993). En effet, ces organismes comportent des «Clustered regularly interspaced short palindromic repeats» (CRISPR) consistant en des séquences répétitives alternant avec des séquences

d'origines diverses, comme des éléments génétiques mobiles (Bolotin, Quinquis, Sorokin, & Ehrlich, 2005) ou encore d'un organisme s'ayant préalablement inséré dans le génome de l'hôte comme peuvent le faire certains virus ou des phages (Barrangou et al., 2007).

La protéine Cas («Crispr-associated sequence») permet couper l'ADN étranger afin de l'insérer dans le génome de l'hôte au travers les séquences CRISPR, cette insertion d'ADN étranger se nomme «spacers» (Barrangou et al., 2007). Les séquences CRISPRs sont transcrites et ensuite fragmentées en de plus courts ARNs comportant une séquence répétitive ainsi qu'une séquence variable : les « spacers», complémentaire à l'ADN étranger s'étant préalablement inséré dans le génome de l'hôte. Ces ARNs sont des «CRISPR RNAs» (crRNA) (Hale et al., 2009). Il y a également des trans-activateurs crRNA (tracRNA) qui agit avec le crRNA formant l'ARN guide et permet de recruter et de complexer la protéine Cas. Le complexe effecteur crRNA-tracRNA-Cas reconnaît une séquence d'insertion étrangère grâce à la complémentarité du crRNA et induit une coupure double brin, prévenant la propagation des éléments étrangers au génome de l'hôte (Jore et al., 2011) (Figure 6).

La reconnaissance de la séquence ADN à cliver est conditionnée par la reconnaissance de la séquence cible par le crRNA et par l'existence d'un motif ADN la jouxtant, le Protospacer Adjacent Motif (PAM). Cette séquence, composée de 2 à 8 nucléotides, en amont du guide RNA est obligatoire à l'induction de la coupure (Jinek et al., 2012). La coupure survient généralement quelques nucléotides en aval du PAM (Jinek et al., 2012).

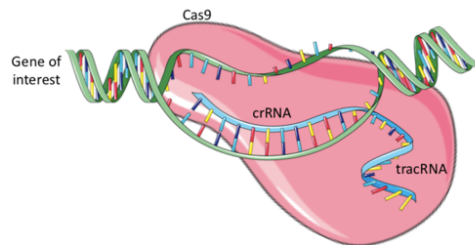


Figure 6 : Représentation schématique des composantes protéiques et génique de CRISPR-Cas9.

Tout d'abord, le gène d'intérêt est lié par le complexe crRNA-tracRNA-Cas. En effet, le crRNA agit comme guide et permet de localiser la séquence d'intérêt par complémentarité de séquence. Le tracRNA lié au crRNA est un trans-activateur permettant de recruter la protéine Cas9 afin d'induire le clivage double brin.

Il existe presque autant de systèmes de CRISPR-Cas que d'espèces bactériennes protéines Cas (Diez-Villasenor, Almendros, Garcia-Martinez, & Mojica, 2010). Si le principe de fonctionnement du système d'édition est assez similaire d'une espèce à l'autre, la différence réside essentiellement dans la nature de la séquence PAM (Tableau II) Le plus connu et utilisé est le système CRISPR-Cas9 qui comporte deux domaines nucléases (HNH et RuvC) permettant de générer la coupure (H. Chen, Choi, & Bailey, 2014).

Tableau II : Séquence PAM selon l'espèce bactérienne adaptée pour la technologie CRISPR d'édition génique

Espèces	PAM	Références
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG	(Hsu et al., 2013)
<i>Streptococcus pyogenes (VQR)</i>	NGAG	(Kleinstiver et al., 2015)
<i>Streptococcus pyogenes (VRER)</i>	NGCG	(Kleinstiver et al., 2015)
<i>Streptococcus mutans</i>	NGG	(van der Ploeg, 2009)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NNGGGT	(Kleinstiver et al., 2015)
	NNGAAT	(Kleinstiver et al., 2015)
	NNGAGT	(Kleinstiver et al., 2015)
<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR 3)	NGGNG	(Deveau et al., 2008)
<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR 1)	NNAAAW	(Fonfara et al., 2014)
<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNACA	(Fonfara et al., 2014)
<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT	(Hou et al., 2013)
<i>Pasteurella multocida</i>	GNNNCNNA	(Fonfara et al., 2014)
<i>Francisella novicida</i>	NG	(Fonfara et al., 2014)
<i>Treponema denticola</i>	NGNAAAN	(Esvelt et al., 2013)

Tiré de : (Carroll, 2014)

La spécificité ainsi que la capacité d'induire une coupure double brin du système CRISPR a été exploitées afin d'en faire un outil d'édition génique *in vitro*, mais également *in vivo*

dans de nombreux organismes. (Cong et al., 2013). Les guides ARN peuvent être facilement synthétisés et exploités afin de cibler une séquence spécifique du génome.

1.3.2 Système de réparation par recombinaison Homologue et Non-Homologue

Lors d'une cassure d'ADN double brin, le système de réparation de la cellule peut remédier au clivage de l'ADN par deux mécanismes : le système de réparation homologue «Homology-directed repair» (HDR) ou la liaison des extrémités non-homologues «Non-Homologous-End-Joining» (NHEJ) (G. G. Wang, Allis, & Chi, 2007).

Le NHEJ est le système utilisé préférentiellement pour la réparation des cassures double brin (M. Liu et al., 2018). C'est un système générateur d'erreur qui constitue la base de processus physiologiques tels que la recombinaison des segments V(D)J codant pour les parties variables des récepteurs des lymphocytes T et B (Budman & Chu, 2005). Il fait intervenir de nombreuses protéines clés : essentiellement KU70/80, le complexe DNA-PKc/XLF/XRCC4/Artemis et la Ligase4. (Ma et al., 2004). Ce système de réparation est non conservatif, puisque comparativement au système HDR, il ne requiert aucun substrat de recombinaison. Il introduit des insertions ou délétions de nucléotides de manière aléatoires, ou « *indels* », générant ainsi des hauts taux de mutations/délétions au génome qui n'étaient pas présents sur la séquence avant la cassure. (Figure 7). C'est un système assurant une grande diversité génétique.

À l'opposé, le système de recombinaison homologue (HDR) permet de réparer la cassure double brin de manière conservatrice. Il permet l'échange de nucléotides entre deux séquences identiques ou hautement similaires. L'HDR nécessite la présence d'un modèle de réparation et est donc par conséquent essentiellement activé dans les cellules en phase S et G2 où les cellules en division ont accès à la chromatide sœur afin d'assurer une réparation de la cassure *in integrum* (Lans, Marteiijn, & Vermeulen, 2012). Pour se faire, des exonucléases (BRCA1) retirent des nucléotides sur un seul brin, générant ainsi une séquence simple brin (M. Liu et al., 2018). Cette séquence simple brin s'hybride avec une séquence homologue ou fortement homologue et forment une boucle D d'où s'initie la

réplication de l'ADN à partir de la séquence homologue (K. P. Kim & Mirkin, 2018) (Figure 7).

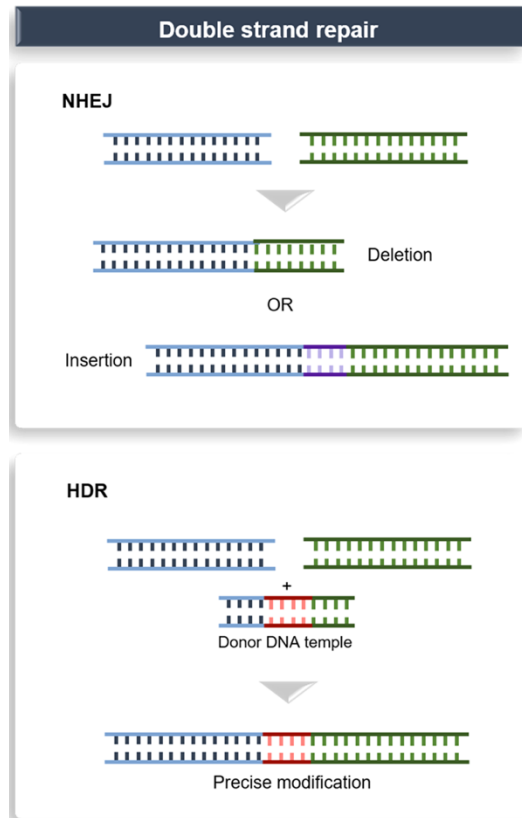


Figure 7 : Édition génique de CRISPR-Cas 9 et les réparations de coupures double brin en édition génique.

Le complexe protéique crRNA-tracrRNA-Cas induit une coupure double brin au génome. La réparation de cette cassure peut se faire par NHEJ ou par HDR. La réparation NHEJ introduit des indels menant à des mutations et délétions, entraînant une perturbation de la protéine, souvent associée à une forme alternative inactive par terminaison précoce. La réparation HDR nécessite une réparation par homologie, avec une plateforme de recombinaison afin d'introduire la mutation désirée.

Tiré de : (H. Li et al., 2020)

1.3.3 HDR dans l'édition génique

La technique d'édition de génome permet de modifier les gènes de manière précise et efficace. La technologie d'édition génique tire avantage du système de recombinaison homologue (HDR) suite à une cassure double brin afin d'insérer des modifications au génome de manière dirigée. En effet, lors de la génération de la coupure double brin, le système HDR a besoin d'un substrat de réparation comportant une séquence ADN

homologue à celle nécessitant la réparation afin de garder la fidélité de séquence et ainsi réduire le risque de mutations. Les techniques développées consistent en la transfection ou l'électroporation des cellules avec la forme Cas9 et le substrat ADN de recombinaison au sein de la cellule. Afin de maximiser la probabilité de recombinaison homologue, les cellules doivent idéalement être en phase S ou G2.

Plusieurs techniques utilisant le principe de HDR existent en fonction de la taille de la région à insérer ou modifier. Pour les modifications de grande taille (> 100 paires de bases), avec un ADN de grande séquence, la technique privilégiée est l'apport de l'ADN à insérer/modifier par un plasmide ou un virus (Okamoto, Amaishi, Maki, Enoki, & Mineno, 2019) qui comportera la séquence d'intérêt et son flanqué de deux bras d'homologie permettant de stabiliser la reconnaissance de séquence homologue et induire le HDR.

Pour les modifications portant sur quelques nucléotides (< 100 paires de bases), la technique de choix est l'utilisation d'un oligonucléotide de synthèse (ssODN). Le ssODN comporte une séquence d'insertion flanquée de bras d'homologie beaucoup plus courts, C'est la méthode de choix pour introduire ou corriger des mutations ponctuelles de génome (Benyoucef, Marchitto, & Touzot, 2020; Dong, Peng, et al., 2019; Hallmann et al., 2017).

1.4 [Projet de recherche](#)

Les pathologies auto-inflammatoires induisent de sévères complications et ne sont que partiellement élucidées. Elles sont causées par diverses problématiques dont des désordres du complexe de l'inflammasome. Des mutations dans les protéines de ce complexe mènent à son activation excessive, étant responsable de symptômes auto-inflammatoires chez les patients. Toutefois, aucun modèle humain permet de caractériser la dynamique d'activation de ce complexe ainsi que les événements qui en découle. Le but de mon projet est de générer un modèle macrophagique humain comprenant diverses mutations touchant les protéines de l'inflammasome et ayant été observées chez des patients atteint de pathologies auto-inflammatoires.

Pour ce faire, le premier objectif est de générer une ligne cellulaire qui exprimera une protéine ASC conjuguée à un peptide FLAG3x à partir de cellules THP-1. La protéine ASC étant commune à plusieurs inflammasomes, ce premier modèle me permettra donc de cibler différents inflammasomes et de générer plusieurs modèles avec diverses mutations touchant le complexe et attribuées à des pathologies auto-inflammatoires. Le marqueur FLAG permettra de faciliter les expériences subséquentes quant à l'étude de l'activation du complexe protéique. La lignée cellulaire THP-1 a été choisie car ce sont des cellules monocytaires ayant la capacité de se différencier en cellules macrophagiques.

Une fois cette lignée obtenue, le second objectif est d'introduire une mutation observée chez un patient atteint de MAS touchant la protéine NLRC4 dans le modèle ASC TAG-FLAG. Ce second modèle permettra d'étudier la dynamique d'activation de l'inflammasome dans un contexte pathologique.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules THP-1 proviennent de ATCC (ATCC-TIB-202) et sont maintenues à 2.10^5 cellules/mL d'un milieu complet comportant RPMI 1640 (GIBCO), avec 10% Sérum de Veau Fœtal (SVF) (MULTICELL), et supplémenté de de pénicilline à 5U/mL, streptomycine à 5ug/mL (Pen/Strep GIBCO) et 0.05 mM de 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich).

2.2 Insertion génomique du FLAG3x par édition génique dans le cadre de lecture du gène codant ASC dans les cellules THP-1

$4,0 \times 10^5$ cellules/mL Les THP-1 non différenciées ont été électroporées en présence de 100pg de Cas9nucléase et 250pg de guide 100pg de template en cuve de 100 uL avec le programme THP-1 high efficiency V-001

ARN guide : ASC_Cut (5' CCGGGGATCCTGGAGCCATG 3') permet une coupure double brin après le premier codon du premier exon du gène *PYCARD* codant pour la protéine ASC.

ssODN :ssODN_ASC

(5'TCCTGGTTCGGCGGCTGCAGCGGGGTGAGCGGCGGCAGCGGCCGGGGATCC TGGAGCCATGgactacaaagaccatgacggtgattataaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaagG GCGCGCGCGACGCCATCCTGGATGCGCTGGAGAACCTGACCGCCGAGG AGCTCAAG 3')

2.3 Culture des clones après édition génique

Les cellules THP-1 génétiquement modifiées sont clonées par dilution limite à raison d'une cellule par puit dans des plaques 96 puits contenant 100 µL de milieu de culture complet. Après trois semaines de culture, les clones ayant proliférés ont été transférés dans une plaque 24 puits avec 500 µL de milieu de culture complet. Après deux semaines d'expansion, les clones ayant proliféré adéquatement ont été sélectionnés. Une extraction d'ADN suivi par les PCRs respectives ont subséquemment été réalisées.

2.4 Détection des clones ASC-FLAG positifs

Afin de vérifier l'insertion du FLAG complexé en N-terminal au gène *ASC*, j'ai réalisé deux PCRs. La première comportant deux amorces : ASC_E3_F (5' GAG GGGACCAAGGGTGTAGT 3') et ASC_E3_R (5' TCCGGTAGAGCAGCTTTGTT 3') de part et d'autre de la région ciblée. La PCR a été performée avec l'enzyme Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher 11304011).

Tableau IV : Étapes PCR amorces ASC_E3_F et ASC_E3_R

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	62	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

La seconde PCR est réalisée avec l'amorce ASC_E3_F et l'amorce FLAG3X_R (5' CCCTTGTCATCGTCATCCTT 3') spécifique de la séquence codante pour le FLAG3x. La PCR a été performée avec l'enzyme Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher 11304011).

Tableau V : Étapes PCR amorces ASC_E3_F et FLAG3x_R

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	62	20 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Les clones positifs ont ensuite été analysés par séquençage SANGER.

2.5 Détection des Off-targets ASC guide ASC_Cut

La technologie CRISPR-Cas9 est reconnue pour générer des Off-Target. Ils ont été évalués avec l'aide de l'algorithme CRISPOR, déterminant les 10 Off-Target les plus probables du guide ASC_Cut (5' CCGGGGATCCTGGAGCCATG 3'). <http://crispor.tefor.net/>. Ces séquences ont été amplifiées par PCR grâce à des amorces spécifiques. Le tableau VI contient les amorces utilisées pour analyser les Off-targets.

Tableau VI : Amorces utilisées pour les différents Off-Target

Off-Target 1	ASCOFF1_F (5'GCAGGTATGGGGACTTTGAA3')	ASCOFF1_R (5'CAGAGCAGCAGTGATGAAGC3')
Off-Target 2	ASCOFF2_F (5'CCC AGCCCTCAGAGTCTTTT 3')	ASCOFF2_R (5' CCTTGGGATTGGGACTATTT 3')
Off-Target 3	ASCOFF3_F (5' TGTTTGTTCGGGCTTCAGG 3')	ASCOFF3_R (5'AGGGGAAGGGCCCTCGTAGG 3')
Off-Target 4	ASCOFF4_F (5' CCAAGAAACACTGCCTTCGT 3')	ASCOFF4_R (5'TGGCCAGGGTGACAGGAAGC 3')
Off-Target 5	ASCOFF5_F (5' CCAGCGGTCACTGATGCCTC 3')	ASCOFF5_R (5' GTTGGGAAATTTCAAATGTA 3')
Off-Target 6	ASCOFF6_F (5' TCTCCTCAGACCTCAGTTCT 3')	ASCOFF6_R (5' TCTTGCTTCACCGACGCTCC 3')
Off-Target 7	ASCOFF7_F (5' CCTCCAGGGCCCCACGCTCT 3')	ASCOFF7_R (5' CAGGCCACTCGCCATGGGCG 3')
Off-Target 8	ASCOFF8_F (5'ACCGGAGGGGTCGAGCCCCT 3')	ASCOFF8_R (5' ctggccTGGAGAAGACCGT 3')
Off-Target 9	ASCOFF9_F (5'AACATCGATGGCAACCCCGT 3')	ASCOFF9_R (5'GGCAGAGACAGGACTCAGAC 3')
Off-Target 10	ASCOFF10_F (5' gggcacttggggTCTCTTT 3')	ASCOFF10_R (5'GGCAGAGACAGGACTCAGAC 3')

Le Tableau VII- couvre les différentes conditions de PCRs pour les Off-targets. Les PCRs ont été performées avec l'enzyme Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher 11304011).

Tableau VII: Étapes PCR Off-Target 1

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	51,5	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Tableau VIII: Étapes PCR Off-Target 2

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	50,7	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Tableau IX: Étapes PCR Off-Target 3

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	52,5	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Tableau IX: Étapes PCR Off-Target 4-10

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	58	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Les résultats ont ensuite été analysés par séquençage SANGER.

2.6 WesternBlot ASC

Le Western Blot a été réalisé sur $2,5 \times 10^6$ THP-1 non différenciées contrôles non-éditées THP-1 ainsi que sur les clones ASC-FLAG THP-1. Le contenu cytoplasmique a été extrait avec une solution contenant du protéase inhibiteur (1x), du swelling Buffer et du dithiothreitol (DTT).

Les échantillons ont migré sur gel SDS-Polyacrylamide 12% et transféré sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec l'anticorps monoclonal ANTI-FLAG (M2, Sigma-Aldrich) (dilution 1:500), avec l'anticorps monoclonal murin anti humain ASC (ASC B-3 : sc-514414, SantaCruz biotechnology) (Dilution 1 :1000) et l'anticorps monoclonal murin anti-123 humain GAPDH (Clone#0411, SantaCruz biotechnology) (dilution 1:2000). La détection des protéines immunoréactives ont été révélées grâce à un anticorps secondaire utilisé par le système chemilumescence (ECL) *clarity system* (1705060, Bio-rad).

La lecture a été effectuée par détecteur de luminescence.

Tableau X : Composition du Swelling Buffer

Produits	Hepès-K (1M)	MgCl ₂ (0,5M)	KCl (1,5M)	Triton x-100	H ₂ O
Volume (mL)	5	0,3	0,668	0,1	93,9

2.7 Microscopie à fluorescence des cellules THP-1 ASC-FLAG

1,5 x 10⁵ THP-1 sont différenciées en macrophages avec 10 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) sur lamelles de x mm dans des plaques 24 puits pour 5 jours. Les cellules sont fixées avec une solution de PBS 1x PFA 4%. Il y a équilibration avec la solution de PBS 1X 0,1M glycine et perméabilisation des cellules avec une solution de PBS 1X 0,5% Triton. Les cellules sont marquées avec l'anticorps primaire monoclonal ANTI-FLAG (M2, Sigma-Aldrich) (dilution 1:50), avec l'anticorps monoclonal murin anti humain ASC (ASC B-3 : sc-514414, SantaCruz biotechnology) (Dilution 1 :50) et l'anticorps secondaire murin (m-IgGκ BP-CFL 488 : sc-516176, SantaCruz biotechnology). Les cellules sont ensuite lavées avec une solution PBS 1X 1% BSA. Une solution de montage avec DAPI est mise sur la lame afin de colorer les noyaux. Le montage de la lame est effectué avec VectorShield.

Le microscope utilisé est le Leica dmi8 epifluorescent à objectif 40x.

2.8 Mesurer l'activation de la caspase des clones ASC-FLAG dans les cellules THP-1 par *Fluochrome-Labeled Inhibitors of Caspases* (FLICA)

L'activation de la caspase a été mesurée dans les cellules éditées et non éditées par la technique de FLICA. Les cellules THP-1 sont différenciées en macrophages par stimulation avec 10ng/mL de PMA pendant 48H. Elles sont décollées par incubation dans du PBS 1X EDTA 2nM. Les cellules sont incubées avec LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher # L34955) excitation à 405 nm (Dilution 1 :1000) et avec FAM-FLICA (ImmunoChemistry Technologies) (Dilution 1 :50). La mesure de la fluorescence, témoin de l'activation de la Caspase 1, a été réalisée par cytométrie de flux.

2.9 Insertion génomique de la mutation en position Histidine 392 NLRC4 exon 4 du clone ASC-FLAG par édition génique CRISPR-Cas9 dans les cellules THP-1

Conditions identiques à ci-haut section 2.2

Le clone ASC-FLAG 32 a été sélectionné dû à ses caractéristiques génomiques et protéiques comparables au profil sauvage des cellules THP-1 sauvage.

l'ARN guide : NLRC4_H392del2 (5' CCAGAGCTAGGTCTCCACAG 3') permettant une coupure double brin de l'histidine 392.

ssODN : NLRC4_delH392 (5' CCCAGTTGTCAGCAGG ACATCCTCATT 3')

2.10 Détection des clones édités Histidine 392 ASC-FLAG

Afin de vérifier l'efficacité de coupure des clones Histidine 392 édités, une PCR spécifique de la région éditée a été effectuée avec les amorces couvrant la région d'intérêt sur les clones ainsi que sur les cellules ASC-FLAG THP-1 non édités. Les amorces utilisées sont NLRC4_T7His_F (5' TATGACA GAAGACAGCGCCC 3') ainsi que la seconde amorce NLRC4_T7His_R (5'CCTTGGTCA CCTCCTCTGG 3').

Tableau XI : Étapes PCR amorces NLRC4_T7His_F et NLRC4_T7His_R

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation Initiale	94	2 min	1
Dénaturation	94	15 secondes	1
Hybridation	62	30 secondes	1
Élongation	68	30 secondes	1
Conservation	4	∞	1

} 38

Par la suite, un T7 modifié est effectué afin de vérifier l'édition génique (Benyoucef et al., 2020). Cette technique nous permet de détecter les clones ayant eu une édition génique en ajoutant au produit d'amplification PCR des clones, des amplicons de la même région amplifiée dans les THP-1 sauvages. Ceci permet de s'assurer de détecter les clones non seulement hétérozygotes, mais également homozygotes. Le produit est migré sur gel d'agarose 1,5%.

Les résultats positifs sont ensuite analysés par séquençage SANGER.

3. Résultats

3.1 Insertion génomique du ASC-FLAG par édition génétique CRISPR-Cas9 dans les cellules THP-1

La première étape du projet consiste en l'insertion génomique d'une séquence codant pour un peptide FLAG3x en 5' du premier exon du gène *PYCARD* codant pour la protéine ASC à l'aide de la technologie d'édition génétique CRISPR-Cas9 (Figure 8 A-B). Une fois le processus d'édition génétique réalisé, j'ai vérifié l'efficacité de l'insertion par la réalisation d'une PCR sur l'ADN génomique de l'ensemble des cellules modifiées, en utilisant deux couples d'amorces : 1) un couple comportant deux amorces encadrant la région d'édition génétique (contrôle d'amplification), et 2) un couple comportant une amorce localisée en amont de la région génomique ciblée et une seconde amorce spécifique de la séquence codant pour le FLAG3x (Figure 8 B-C).

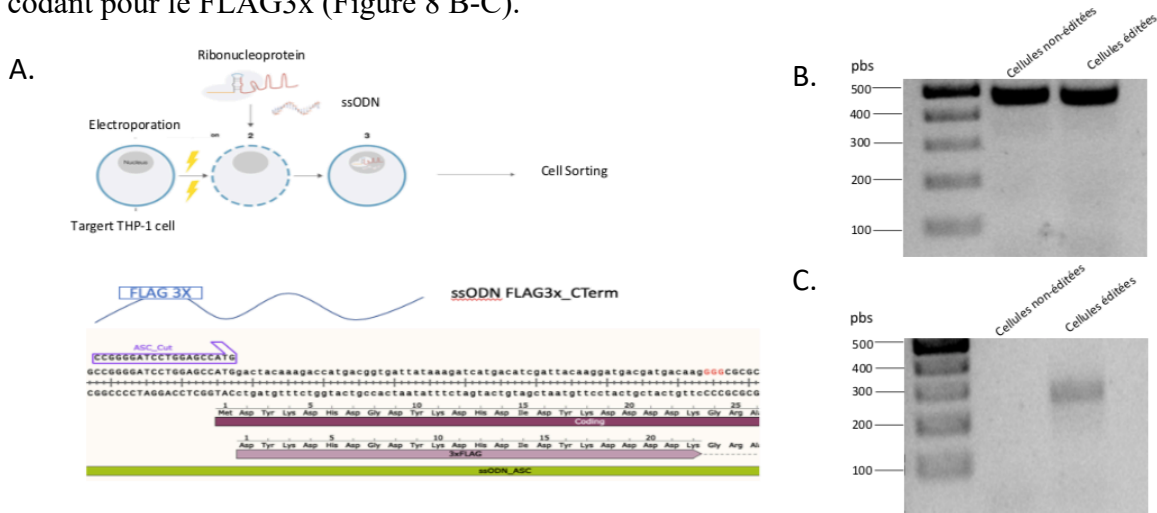


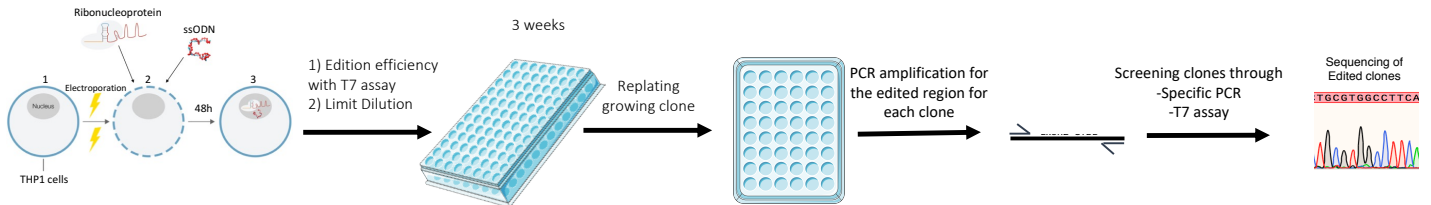
Figure 8 : Efficacité d'édition génomique sur le 1er exon du gène ASC

A. Schéma du principe expérimental : électroporation des cellules THP-1 avec la forme nucléoprotéique de la nucléase CRISPR-Cas9 complexée avec l'ARN guide ciblant ASC et générant une coupure double brin sur le 1er exon du gène ASC. Le ssODN permet d'intégrer le FLAG3x dans les cellules. **B.** Schéma représentant l'introduction du FLAG3x de 66 pbs à l'aide d'un brin d'oligonucléotides dans le cadre de lecture du 1^{er} exon de la protéine ASC. **C.** PCR couvrant la région éditée. Amorces ASC_E3_F et ASC_E3_R. De gauche à droite : Cellules totales non éditées, cellules totales éditées avec guide ASC_Cut. **D.** PCR spécifique avec amorce ASC_E3_F et FLAG3x_R. De gauche à droite : Cellules totales non éditées, cellules totales éditées avec guide ASC_Cut.

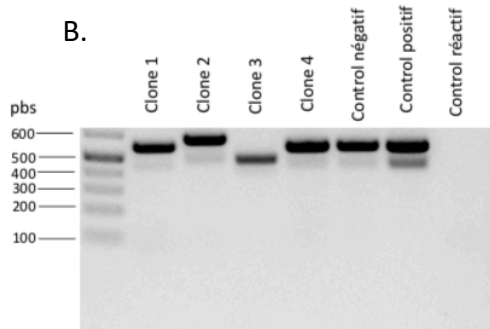
La présence d'un amplicon de 250 pbs dans la PCR réalisée avec une amorce spécifique de la séquence FLAG3x sur les cellules THP-1 éditées, contrairement aux cellules THP-1 contrôles (THP-1 ctrl) non-éditées permet de conclure à l'intégration du FLAG3X dans une fraction de la population cellulaire ayant subi le processus d'édition génique (Figure 8 D).

Une fois l'édition génique confirmée, j'ai cloné les cellules THP-1 génétiquement modifiées par dilution limite en plaques de 96 puits afin d'isoler les clones arborant le phénotype désiré (Figure 9A). J'ai par la suite criblé les différents clones par les mêmes techniques de PCR que précédemment, (Figure 9B-C). Pour les clones positifs pour la PCR de détection, j'ai réalisé un séquençage Sanger de la région d'édition afin de vérifier la bonne insertion de la séquence codante du FLAG3x au sein du cadre de lecture du gène ASC (Figure 9D).

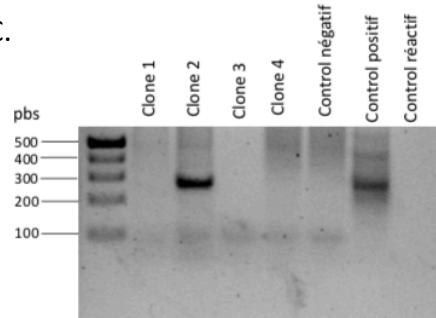
A.



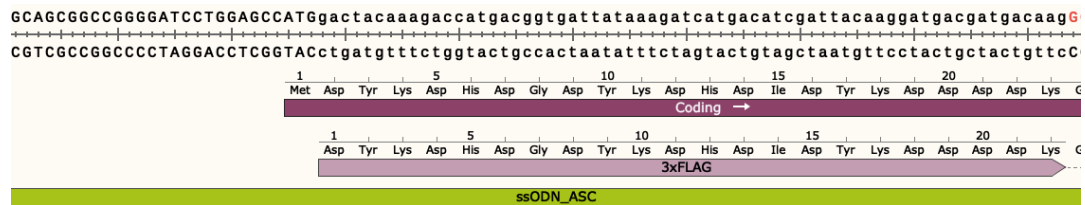
B.



C.



D.



Clone 2 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACANNNNNNACGATGACAAGG
 Clone 27 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGG
 Clone 32 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGG
 Clone 55 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATANN
 Clone 67 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGG
 Clone 127 GCAGCGGCCGGGGATCCTGGAGCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

E.	Nombres clones en dilution limite	960
	Nombre de clones analysés	140
	Nombre de clone ayant une coupure	6
	Nombre de clones ayant intégré le TAG-FLAG3x	2

Figure 9 : Détection des clones THP-1 ASC-FLAG3x

A. Schéma de génération des clones THP-1 ASC-FLAG3x. **B.** PCR couvrant la région éditée des clones 1 à 4 et les contrôles. Amorces ASC_E3_F et ASC_E3_R. De gauche à droite : Clone 1, clone 2, clone 3, clone 4, contrôle négatif : cellules non-éditées, contrôle positif : ensemble de cellules éditées, contrôle d'eau. **C.** PCR spécifique avec amorce ASC_E3_F et FLAG3x_R. De gauche à droite : Clone 1, clone 2, clone 3, clone 4, contrôle négatif cellules : non-éditées, contrôle positif : ensemble de cellules éditées, contrôle d'eau. **D.** Séquençage des clones positifs, alignement de séquence. **E.** Tableau récapitulatif des clones analysés

J'ai commencé avec 960 clones au départ, parmi ceux-ci 140 ont proliféré et leur ADN a été extrait, résultant en un taux ~ 15% d'expansion clonale. 6 clones (clone #2, #27, #32, #55, #67 et #127) parmi les 140 analysés ont démontré un résultat positif par la technique de détection. Le ratio de coupure et de réparation sur le guide de recombinaison est donc ~ 4%.

Le clone #2 présente une séquence différente de 6 pbs sur la séquence codant le FLAG3x. Lors de l'analyse du séquençage Sanger, le chromatogramme montre une conservation de la séquence similaire au substrat de recombinaison. Il s'avère que le séquençage de l'amplicon est incomplet dû aux amorces utilisées qui sont les mêmes que celles de la PCR et donc intégré dans la séquence du FLAG3x. En ces conditions, les chromatogrammes de fin de séquence en sont parfois perturbés. Il en va de même pour le clone #55, contenant une différence de 2 pbs et Le clone #127 qui quant à lui contient une différence de 18 pbs. Par soucis de conservation de séquence avec la séquence de la plateforme de recombinaison, ces clones ne seront pas sélectionnés.

Le clone #27 présente une délétion de 28 pbs en aval de la séquence codant pour le FLAG3x (Figure Supplémentaire 2). Ce clone ne sera pas sélectionné par soucis de conservation d'intégrité de la séquence au phénotype sauvage. De ce fait, le clone #32 et le clone #67 sont les deux clones présentant un résultat de séquençage avec une séquence

ayant intégré le FLAG3x en conservant le cadre de lecture et ne présentant aucune mutation ou différence de nucléotides en amont ou en aval d'ASC. Le matériel génomique analysé au séquençage provenant de la PCR de détection avec l'amorce FLAG3x_R, il m'est impossible de déterminer si l'insertion est bi-allélique ou mono-allélique puisque l'amplicon n'intéresse qu'ayant intégré la séquence codant pour le FLAG3x. Ceci n'entrave cependant pas la finalité puisque je recherche un clone conservant les conditions de stœchiométrie.

Le clone #32 a été sélectionné afin de poursuivre les expériences dans le but de vérifier l'expression et la fonctionnalité du clone FLAG3x-ASC THP-1. Il est à noter que le clone # 67 a également subi les mêmes tests par souci de résultats clones dépendants (résultats non montrés).

3.2 Screening des Off-targets du clone 32 THP-1 ASC-FLAG3x

La technologie CRISPR-Cas9 est connue pour générer des coupures hors-cible (« off-target ») sur des régions génomiques présentant de fortes homologies avec la séquence cible. Afin de vérifier que le modèle généré ne contient aucune mutation non spécifique, j'ai déterminé les 10 sites off-targets les plus probables à l'aide de l'algorithme du site CRISPOR (Figure 10 A). Ces 10 régions off-targets ont été amplifiées par PCR et les amplicons ont été analysés par séquençage Sanger.

Guide: CCGGGGATCCTGGAGCCATG PAM GGG

Off Target	ARN guide séquence	PAM	Chr. : position: +/-	Gene
Off-Target 1	CCG A AGATCCT A G A CCATG	TGG	chr7:143140557-143140579: -	TAS2R60
Off-Target 2	CCTGGG A CC A TGGAG A CATG	CGG	chr7:99580900-99580922:+	AZGP1P1
Off-Target 3	CTGGGG A ACCTGGAG C CTT G	AGG	chr15:76631973-76631995:+	RP11-685G9.2
Off-Target 4	T CAGGG C CCCTGGAGCCATG	GGG	chr2:130911802-130911824:-	SMPD4
Off-Target 5	T CAGGG C CCCTGGAGCCATG	GGG	chr2:132276307-132276329:+	AC093838.4
Off-Target 6	CTGGGG A CCCTGGAGCCATG	GAG	chr17:56405231-56405253:-	BZRAP1/BZRAP1-AS1
Off-Target 7	CAGGGG A GACTGGAGCCAT C	AGG	chr22:21322067-21322089:-	AIFM3
Off-Target 8	CAGGGG A CC C AGGAGCCATG	GAG	chr16:69356527-69356549:+	COG8/VPS4A/RP11-343C2.11
Off-Target 9	CTGGGGAT G CTGGAGCC A GG	AGG	chr9:132382101-132382123:+	C9orf50
Off-Target 10	CCGGGG G GCCTGGAGCC A AA	GGG	chr17:38612770-38612792:+	IGFBP4

Figure 10 : Les 10 off-targets les plus probables selon l’algorithme CRISPOR du guide ASC_Cut utilisé pour générer le modèle cellulaire THP-1 ASC-FLAG3x. Les off-targets les plus probables générés par l’algorithme CRISPOR de l’insertion du FLAG3x avec le guide 5’ CCGGGGATCCTGGAGCCATG 3’. La Figure contient la séquence de l’Off-Target. En noir la séquence homologue au guide, en rouge, les différences de séquence. Il contient le PAM ainsi que sa position chromosomique qui touche quel gène.

L’analyse des amplicons ne montre aucun effet Off-Target sur les 10 sites de coupures les plus fréquents à la Figure 5. Aucune différence de séquence entre les cellules contrôle et le clone 32 n’a été observée. Cette étape permet de valider l’insertion génomique de manière spécifique de la séquence FLAG3x en aval de la séquence codante pour la protéine ASC.

3.3 Validation d’expression protéique de la protéine ASC-FLAG3x

La fusion du FLAG3x à la protéine ASC étant confirmée au niveau génomique, j’ai validé l’expression protéique de la protéine chimérique FLAG3x – ASC par western blot sur les cellules monocytaires en utilisant des anticorps dirigés contre le peptide FLAG3x (Figure 11 A) et contre la protéine ASC (Figure 11 B) dans le clone #32 et dans des cellules THP-1 contrôles. L’immunoblotting anti-FLAG ne met en évidence qu’une seule protéine à 22 kDa dans le clone #32 confirmant l’intégration *in frame* du FLAG3x et l’expression de la protéine chimérique (Figure 11 A). Cette expression est confirmée par un immunoblot anti-ASC qui met en évidence deux protéines dans le clone #32, à 23 kDa et à 22 kDa. Ceci permet de conclure quant à une probable insertion mono-allélique du FLAG3x (Figure 11 B). Ceci pourra être vérifié par biologie moléculaire. La protéine à 18 kDa représente soit un produit de dégradation ou encore un transcrite alternatif présent dans les cellules THP-1.

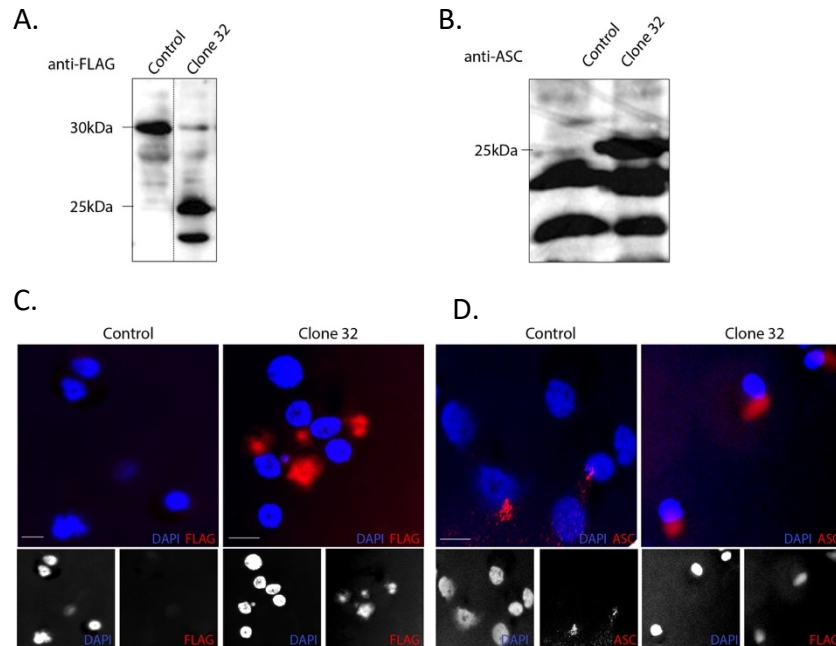


Figure 11 : Validation d'expression protéique du FLAG3x et de ASC.

A. Expression du FLAG3x à 22 kDa (anticorps anti-FLAG) démontré par Western Bot ainsi que son contrôle de charge, par liaison non spécifique de l'anticorps à 30 kDa sur des cellules contrôles : cellules THP-1 non-éditées ainsi que sur les cellules du clone 32 FLAG3x-ASC THP-1 monocytaires. **B.** Expression de la protéine ASC à 22 kDa (anticorps anti-ASC) démontré par Western Bot ainsi que son contrôle de charge, par expression basale sur des cellules contrôles : cellules THP-1 non-éditées ainsi que sur les cellules du clone 32 FLAG3x-ASC THP-1 monocytaires. **C.** Détection du FLAG3x (anticorps anti-FLAG) en TexasRed par microscopie à fluorescence sur des cellules contrôles : cellules THP-1 non-éditées ainsi que sur les cellules du clone 32 FLAG3x-ASC THP-1 macrophagiques **D.** Détection de la protéine ASC (anticorps anti-ASC) en TexasRed par microscopie à fluorescence sur des cellules contrôles non-éditées ainsi que sur les cellules du clone 32 FLAG3x-ASC THP-1 macrophagiques

3.4 Validation de préservation de la fonction protéique ASC-FLAG3x

J'ai vérifié la préservation de la fonction de la protéine chimérique FLAG3x-ASC en m'assurant que la protéine avait conservé sa capacité à 1) s'oligomériser après activation et 2) activer la Caspase 1.

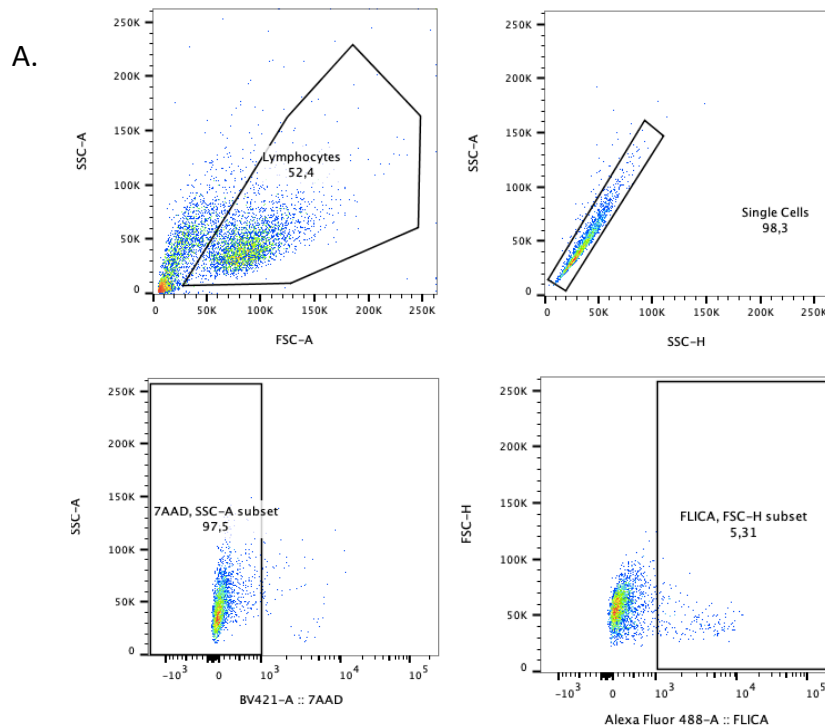
L'assemblage des protéines ASC entre-elles permet la formation d'une plateforme, appelée Speck, pouvant atteindre une taille de 1 μm et permettant le recrutement des pro-caspase (Stutz, Horvath, Monks, & Latz, 2013). Ces specks peuvent être visualisés en microscopie à fluorescence dans les THP-1 différenciées en macrophages par traitement avec de la PMA. En effet, celle-ci permet non seulement la différenciation des THP-1 en macrophage, mais aussi l'activation de l'inflammasome au sein de ces cellules (Netea et al., 2009).

En réalisant un marquage anti-ASC et anti-FLAG en immunofluorescence sur les cellules du clone #32 et des cellules THP-1 ctrl différenciées en macrophages avec de la PMA, j'ai pu m'assurer de la formation efficace de Speck dans les macrophages du clone #32 de manière identique au contrôle (Figure 11 C-D).

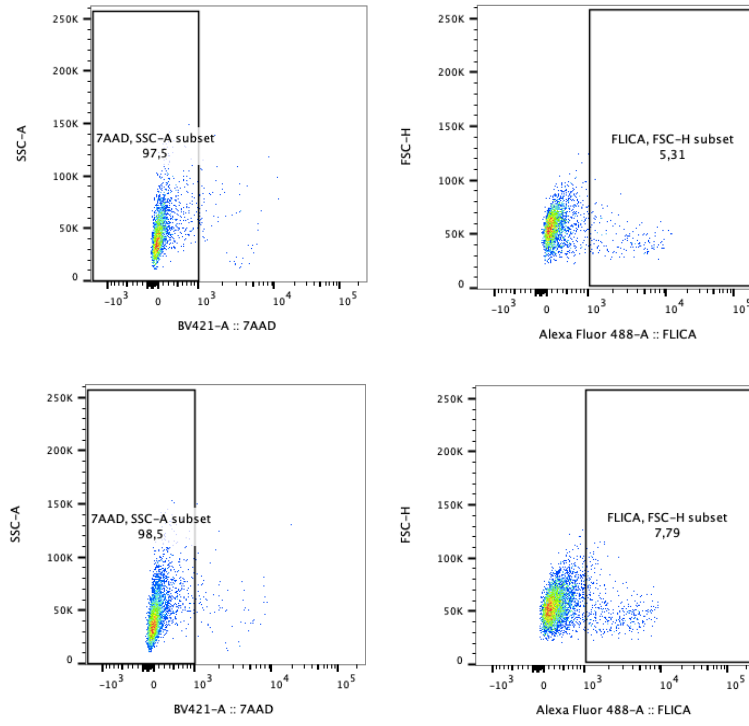
J'ai par la suite mesuré l'activité de la Caspase1 par la technique FLICA dans les cellules du clone #32 différenciées en macrophages par de la PMA et ceci comparativement aux cellules THP-1 contrôles. La technique FLICA permet la détection du site catalytique actif de la Caspase 1 à l'aide du peptide Z-YVAD-FMK couplée à un fluorophore (FAM) par cytométrie en flux.

Par cette technique, j'ai pu mettre en évidence l'absence de différence significative dans l'activation de l'inflammasome dans les cellules du clone #32 en comparaison des cellules THP-1 ctrl ceci sans différence significative de la viabilité cellulaire

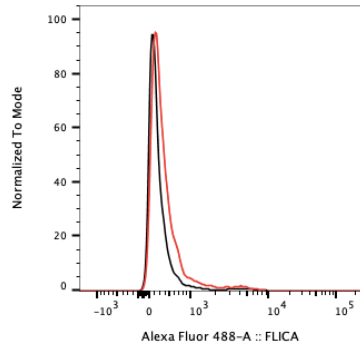
L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que la fonctionnalité de la protéine ASC reste adéquate malgré l'insertion du FLAG3x en N-terminal dans le clone #32.



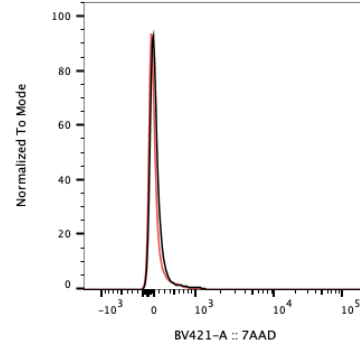
B.



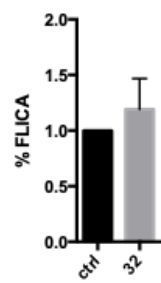
C.



D.



E. ns N=3



F. ns N=3

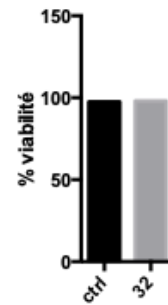


Figure 12 : Détermination de la viabilité et de l'activation de la Caspase 1 par la méthode FLICA dans le clone 32 ASC-FLAG3x-THP-1 et dans les cellules contrôles. **A.** Stratégie de gating sur les cellules du clone #32 FLAG3x-ASC ainsi que sur les cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées. **B.** Gating pertinent à l'analyse des données de viabilité et d'activation de la caspase dans les cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées. **C.** Gating pertinent à l'analyse des données de viabilité et d'activation de la caspase dans le clone #32 FLAG3x-ASC. **D.** Histogramme de la viabilité des clones #32 FLAG3x-ASC comparativement aux cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées. **E.** Histogramme normalisé de l'activation de la caspase 1 du clone #32 FLAG3x-ASC comparativement aux cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées. **F.** Histogramme normalisé N=3 de la viabilité du clone #32 FLAG3x-ASC comparativement aux cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées. **G.** Histogramme normalisé N=3 de l'activation de la caspase 1 du clone #32 FLAG3x-ASC comparativement aux cellules contrôles : cellules THP-1 non éditées.

3.5 Insertion génomique du variant génétique p.His392del NLRC4 par édition génique CRISPR-Cas9 dans le modèle clone 32 FLAG3x-ASC THP-1

La seconde étape de mon projet consistait à insérer dans le modèle FLAG3x-ASC une variation génétique génique (p.His392del) observée chez un patient présentant une maladie auto-inflammatoire

Pour ce faire, j'ai modifié génétiquement les cellules FLAG3x-ASC THP-1 avec la technologie CRISPR-Cas9 (Figure 13 A-B) afin de générer une coupure dans le gène NLRC4 et d'induire une réparation HDR avec le guide NLRC4_H392 permettant d'introduire le variant génétique p.His392del. J'ai confirmé l'efficacité de l'insertion par la réalisation d'une PCR sur l'ADN génomique de l'ensemble des cellules modifiées, et en réalisant un T7 assay sur le produit d'amplification de la PCR (Figure 13 C). Le T7 a confirmé l'efficacité de la coupure par la Cas9 au site désiré comme l'atteste la présence d'une bande de digestion à 250 pbs dans la condition FLAG3x-ASC THP-1 éditées (Figure 13 C) au contraire du contrôle (clone #32 FLAG3x-ASC THP-1 non éditées).

Figure 13 : Efficacité d'édition génomique sur le 4e exon du gène NLRC4

A. Schéma du principe expérimental : l'électroporation des cellules FLAG3x-ASC THP-1 avec la forme nucléoprotéique de la nucléase CRISPR-Cas9 complexé à l'ARN guide ciblant NLRC4 (NLRC4_H392del2) générant une coupure double brin sur le 4e exon du gène NLRC4. Le ssODN sert de plateforme de recombinaison et permet d'insérer le variant au site de coupure. **B.** Schéma représentant l'introduction du variant delCACinsTGT à

l'aide d'un brin d'oligonucléotides ssODN NLRC4_delH392 dans le cadre de lecture du 4e exon de la protéine NLRC4. C. T7 assay afin de vérifier l'efficacité de coupure sur l'ensemble des cellules éditées et l'ensemble des cellules non éditées. De gauche à droite : Cellules contrôles : cellules FLAG3x-ASC THP-1 non éditées, cellules éditées avec l'ARN guide NLRC4_H392del2 monocytaires.

J'ai par la suite cloné les cellules éditées par dilution limite en plaques de 96 puits afin d'isoler les clones arborant le phénotype désiré (Principe illustré Figure 8A). La technique de détection de l'insertion de la du variant delCACinsTGT dans le gène *NLRC4* est un T7 assay modifié réalisé (cf. méthodes) sur chaque clone (Figure 14 A-B). Les clones positifs ont été ensuite analysés par séquençage Sanger (Figure 14 D).

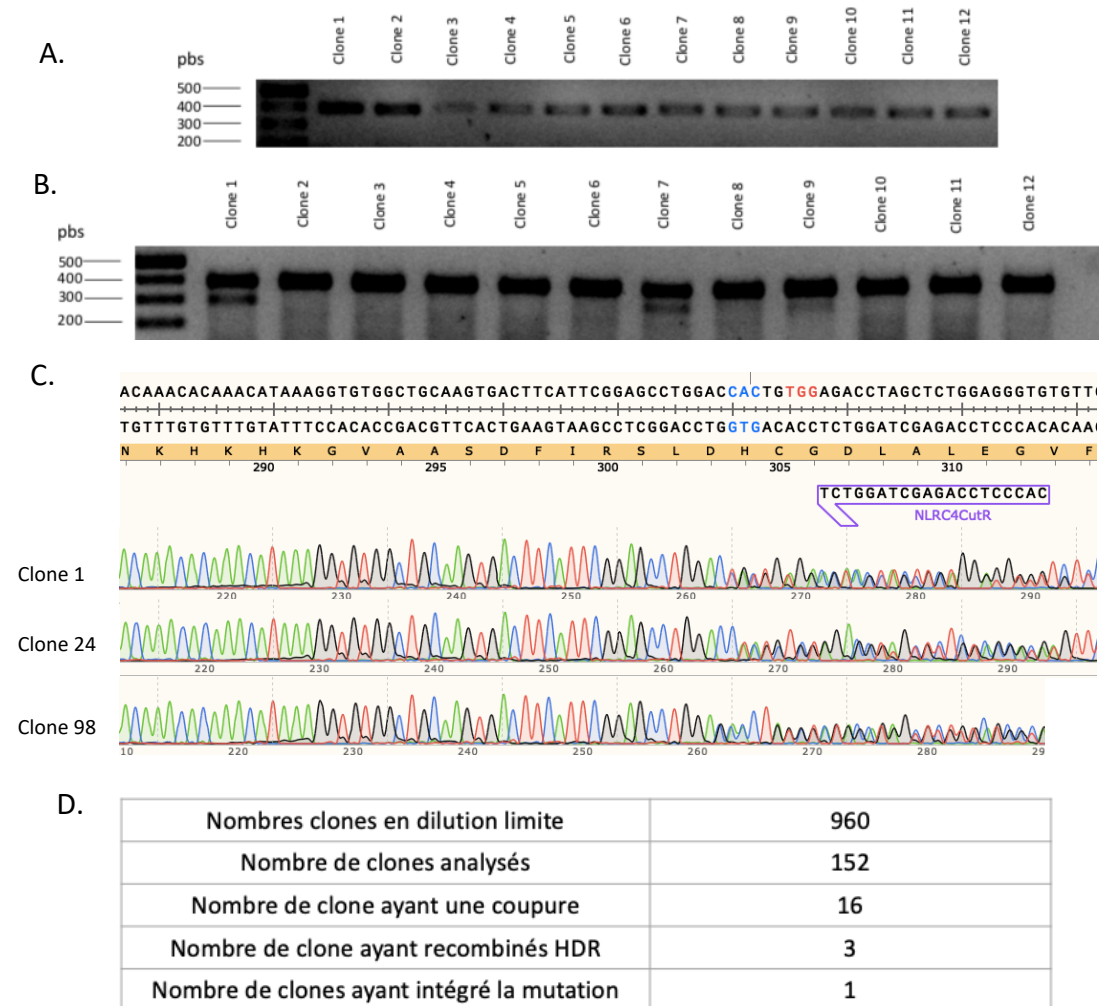


Figure 14 : Détection des clones NLRC4-delH392-FLAG3x-ASC THP-1

A. PCR couvrant la région éditée des clones 1 à 12. Amorces NLRC4_T7His_F et NLRC4_T7His_R. De gauche à droite : Clones #1, clone #2, clone #3, clone #4, clone #6, clone #6, clone #7, clone #8, clone #9, clone #10, clone #11, clone #12. Les clones

présentent une amplification de 400 pbs **B.** T7 assay couvrant la région éditée des clones #1 à 12. De gauche à droite : Clone #1, clone #2, clone #3, clone #4, clone #6, clone #6, clone #7, clone #8, clone #9, clone #10, clone #11, clone 12. Quelques clones présentent deux amplicons, signifiant une coupure. **C.** Séquençage des clones positifs, alignement de séquence. **D.** Tableau récapitulatif des clones analysés

Les résultats de l'insertion génomique du variant delCACinsTGT sont évalués par l'efficacité de coupure, technique du T7 assay. En effet, au total, nous avons débuté avec 960 cellules misent en culture par dilution limite. Sur ces 960, 152 ont proliféré et leur ADN ont été extrait, résultant en un taux ~ 16% d'expansion clonale.

Par la suite, 16 clones parmi les 152 analysés ont démontré un résultat positif par la technique de détection, mais seulement 3 ont pu intégrer la séquence d'intérêt. Seulement 1 parmi les 3 ont pu intégrer le variant génomique dans le cadre de lecture du gène. Le ratio de coupure est donc ~ 10% le taux de réparation par recombinaison homologue est ~ 2% et le ratio d'intégration dans le cadre de lecture de ~ 1%.

J'ai décidé de retenir trois clones pour les études de cinétique d'activation de l'inflammasome dans le modèle pathologique hyper-inflammatoire. Le clone #1 présente une délétion mono-allélique du codon CAC, tout comme le patient, sans aucune autre délétion ni mutation au cours de l'édition génique. Le clone #24 contient une délétion hétérozygote de 12 pbs, gardant le cadre de lecture et ainsi ne causant pas de terminaison précoce de la protéine. Le clone #98 quant à lui contient une délétion de 10 pbs menant à un changement du cadre de lecture et une terminaison précoce de la transcription par un codon stop.

4. Discussion :

À ce jour, il n'existe aucun modèle cellulaire humain permettant d'approfondir nos connaissances des mécanismes physiopathologiques associées aux dysfonctions de l'inflammasome. Mon projet a pour but de générer un modèle cellulaire dans la lignée monocyttaire THP-1 permettant de remédier à cette situation. J'ai intégré un marqueur FLAG3x à l'extrémité N-terminale de la protéine ASC, une protéine adaptatrice commune à tous les inflammasomes. Cette modification permettra d'étudier par des méthodes biochimiques poussées la dynamique d'association des protéines du complexe de l'inflammasome tout en gardant un contexte de stœchiométrie physiologique (à la différence d'une approche par transduction lentivirale). Par la suite des mutations responsables de maladies auto-inflammatoires seront générées par édition génique dans ce modèle (double *knock-in*) afin de reproduire la maladie à étudier.

J'ai pu mettre en place une plateforme de modification génétique efficace permettant d'intégrer au sein du génome humain une séquence de marquage FLAG3x par le biais d'un ssODN. L'efficacité de 15% à 16% d'expansion clonale par rapport à l'ensemencement de clone initial (pour l'insertion du FLAG3x ou pour la reproduction de la mutation p.His392del respectivement) est en accord avec le rendement que le laboratoire avait publié dans les études précédentes (Benyoucef et al., 2020). L'efficacité de recombinaison homologue est de 2 à 4%, en accord avec ce que nous avons décrit préalablement. Le taux de recombinaison par HDR dans les cellules THP-1 peut être expliqué par les propriétés immunologiques de la lignée, pouvant reconnaître des acides nucléiques (ssODN) et les éliminer, les rendant plus résistantes aux modifications génétiques que les cellules embryonnaires par exemple (Roers, Hiller, & Hornung, 2016; Serrano et al., 2011). De plus, ces expériences consistent à induire un *knock-in* plutôt qu'un *knock-out* dans les cellules THP-1. De ce fait, il est certain que le ratio de succès du *knock-out* (K.O.) est plus élevé que le *knock-in* puisque le *knock-out* peut faire intervenir le NHEJ et générer un K.O. de la protéine tandis que le *knock-in* nécessite absolument le HDR afin d'intégrer la séquence d'intérêt. Comme mentionné, la réparation par NHEJ survient à une plus haute fréquence que la réparation par HDR. Par ailleurs, la réparation sur guide de recombinaison n'exclut par ailleurs pas la survenue de modifications additionnelles de la séquence

génétiq ue. Ainsi la détection d'une intégration de la séquence de recombinaison dans le génome par PCR doit systématiquement s'accompagner d'un séquençage de la région éditée génétiquement. Ainsi, le séquençage Sanger des clones ayant intégré le FLAG3x montre différents profils d'insertion du FLAG3x au site d'intégration. Le séquençage Sanger des clones #2, #55 et #127 permet de valider la technique de détection utilisée. En effet, les clones positifs ont tous une séquence FLAG3x intégrée à leur génome. Toutefois, cette technique comporte des limitations puisqu'elle ne permet pas de conclure sur l'intégration monoallélique ou biallélique de la séquence. De plus, l'intégrité de la séquence FLAG3x en aval (3') n'a pu être vérifiée. Cette validation est d'autant plus importante puisque des délétions en amont (5') du site de coupure sont présentes sur le clone #27. Afin de contrer ses limitations, des techniques de biologie moléculaires et des analyses de séquence de part et d'autre de l'édition génique seraient judicieuses. Néanmoins, les résultats permettent une réponse indirecte quant à l'intégration monoallélique ou biallélique de la séquence FLAG3x au génome. Le chromatogramme indique une séquence homozygote, toutefois, si le WesternBlot montre une seule bande protéique lors de la révélation avec l'anticorps anti, l'immunoblot avec l'anticorps anti ASC révèle deux protéines de tailles différentes confirmant l'existence de deux allèles différents : une ayant intégré la séquence codant pour le FLAG3x et un allèle sauvage d'ASC. Pour confirmer le caractère mono-allélique de l'intégration au niveau moléculaire, il serait toujours possible de séquencer le site d'intégration en utilisant des amorces de part et d'autre de la séquence codant pour le peptide FLAG3x.

Le clone #27 présente un profil inhabituel. Il présente une longue délétion en aval du site de coupure, mais une réparation par HDR puisqu'il intègre le FLAG3x à son génome. Cette délétion ne semble pas attribuable au NHEJ, mais pourrait résulter soit d'une réparation partielle en lien aux micro-homologies de séquence (S. I. Kim et al., 2018). Ce profil peu commun démontre que le processus de réparation cellulaire lors de l'édition génique n'est pas prévisible et totalement élucidé. Cette mutation peut mener à des effets indésirables sur la structure tri-dimensionnelle de la protéine lors de son repliement. En effet, il peut résulter en de mauvaises interactions au niveau des domaines ainsi que des liaisons chimiques pouvant causer un encombrement stérique ou une répulsion de charges.

Ces résultats montrent la nécessité absolue de réaliser une vérification par séquençage Sanger de la région de coupure afin de s'assurer de la bonne intégration *in frame* de la séquence à intégrer et de l'absence de délétion ou aberration de séquence associée.

L'édition génique par CRISPR-Cas9 pouvant être associée à la survenue de coupures off-targets, j'ai évalué la probabilité de survenue de ces événements indésirables grâce au logiciel CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018). L'algorithme a pu détecter 24 off-targets potentiels pouvant toucher des exons au travers le génome. Je n'ai détecté aucune mutation au sein des 10 off-targets plus probables par séquençage Sanger. Cette analyse est limitée, mais reste la plus adaptée pour la génération d'un modèle cellulaire au sein d'un laboratoire conventionnel. En effet, les alternatives sont longues et/ou coûteuses que ce soit: (i) le séquençage de tous les off-targets prédits par Sanger, (ii) le séquençage de tous les off-targets prédits par séquençage haut débit ou (iii) enfin le séquençage du génome entier (C. C. Bell, Magor, Gillinder, & Perkins, 2014; Dong, Li, et al., 2019).

J'ai pu vérifier que l'insertion d'un FLAG3X en N-terminal d'ASC endogène n'entravait pas la fonctionnalité lors de l'activation de l'inflammasome. Ceci était peu probable, sachant que de précédents travaux avaient utilisé des formes endogènes d'ASC avec la même modification pour la réalisation d'études fonctionnelles. J'ai pu donc montrer que la protéine FLAG3X-ASC était exprimée au sein du clone #32 à un niveau comparable à l'ASC endogène (par Western Blot et microscopie à fluorescence) et qu'elle était bien fonctionnelle, car (i) capable de se polymériser pour former des Specks en réponse à l'activation cellulaire et (ii) capable de recruter et d'activer la caspase1 (FLICA assay par cytométrie de flux). Afin de valider le modèle de manière rigoureuse, j'envisage de compléter l'étude de la sécrétion de l'IL-1 β par le clone #32 dans le surnageant après différenciation en macrophage. Par ailleurs, je planifie également des expériences permettant de reproduire une activation en deux étapes de l'inflammasome avec : 1) stimulation du TLR4 avec du LPS (signal 1) et 2) activation directe de l'inflammasome par de l'ATP, Mono Sodium Urate cristal (MSU), dommages cellulaires etc. (signal 2) (Kayagaki et al., 2013; S. K. Kim, Choe, & Park, 2019; Tsutsui, Imamura, Fujimoto, & Nakanishi, 2010; Y. Wang et al., 2019; Zha et al., 2016).

Enfin, j'ai pu reproduire un variant de signification indéterminée (p.His392del) retrouvé chez un patient atteint d'une pathologie auto-inflammatoire dans le modèle FLAG3x-ASC THP-1. L'étude *in vitro* des monocytes du patient a déjà montré une hyper activation de l'inflammasome en réponse à divers stimuli (ATP, MSU, Flageline, Nigericine) (Barsalou et al., 2018). Ce nouveau modèle permettra de confirmer la pathogénicité du variant p.His392del et de réaliser des études biochimiques permettant de comprendre les conséquences du variant sur l'activation de l'inflammasome NLRC4. Si ASC n'est pas indispensable à l'activation de l'inflammasome NLRC4, cette protéine a un rôle prépondérant dans l'amplification de son activation. De cette manière, nous pensons que ces caractéristiques ne poseront pas de problème lors des analyses puisque l'inflammasome ASC-dépendant mène majoritairement à la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire caractéristique de la pathologie. La génération de ce modèle servira à des études subséquentes afin d'étudier la cinétique d'activation de l'inflammasome dans un modèle sain en comparaison avec divers modèles pathologiques. L'étude des complexes sera facilitée par le FLAG3x inséré sur la protéine ASC. De ce fait, lors de l'étude du modèle, la situation où l'inflammasome ASC est en jeu sera d'abord étudiée.

Les résultats du séquençage Sanger ont révélé que le clone 1 comporte la mutation du patient (H392delCACinsTGT) hétérozygote. Plusieurs expériences devront être effectuées afin de vérifier que ce clone représente bien la pathologie hyper-inflammatoire. Tout d'abord, il faudra s'assurer qu'il n'y a pas d'off-targets générés par le guide NLRC4_H392del2. Par la suite, des Western Blot devront être effectués afin de vérifier que l'expression de la protéine NLRC4 n'a pas été perturbée par la délétion de l'histidine 392. Il est attendu que l'expression doit être constante puisque la protéine avec cette même mutation existe chez un patient. Finalement, la détection du taux de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-1 β et l'IL-18 permettra de vérifier que le modèle présente des caractéristiques hyper-inflammatoires. Si le clone 1 représente bien le phénotype hyper-inflammatoire, il est attendu que la sécrétion de cytokines soit beaucoup plus importante que dans les cellules contrôles FLAG3x-ASC THP-1 ainsi que dans les cellules THP-1 et ce, sans stimulation par un stress cellulaire. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

pourra aussi être comparée avec des cellules de patients. Il sera également pertinent de faire ces tests multiples suite à la différenciation avec de la PMA afin de s'assurer que le phénotype reste constant lors du stade macrophagique.

5. Conclusion :

Le projet a permis de générer un modèle cellulaire contenant un FLAG3x en N-terminal de la protéine ASC, commune aux inflammasomes d'intérêts, ainsi qu'une mutation touchante l'inflammasome NLRC4 causant des symptômes hyper-inflammatoires chez un patient. Le modèle FLAG3x-ASC THP-1 forme d'abord une plateforme à la génération de d'autres modèles humains pouvant reproduire les pathologies causées par un dysfonctionnement de l'inflammasome et à leur étude subséquente.

Le modèle humain pathologique hyper-inflammatoire dans les cellules FLAG3x-ASC THP-1 permettra de subséquemment regarder la dynamique d'activation de l'inflammasome à différents temps avec différents stimuli avec la spectrométrie de masse en comparaison aux cellules contrôles. Ces expériences pourront grandement nous avancer sur la compréhension des interactions protéiques dans le modèle pathologique comparativement au modèle sain et ainsi trouver des alternatives thérapeutiques moins agressives ou encore des alternatives pour les patients réfractaires aux traitements usuels.

Bibliographie

- Arts, R. J. W., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2018). The Potential Role of Trained Immunity in Autoimmune and Autoinflammatory Disorders. *Front Immunol*, *9*, 298. doi:10.3389/fimmu.2018.00298
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
- Barsalou, J., Blincoe, A., Fernandez, I., Dal-Soglio, D., Marchitto, L., Selleri, S., . . . Touzot, F. (2018). Rapamycin as an Adjunctive Therapy for NLR4 Associated Macrophage Activation Syndrome. *Front Immunol*, *9*, 2162. doi:10.3389/fimmu.2018.02162
- Bashardoust, B. (2015). Familial Mediterranean fever; diagnosis, treatment, and complications. *J Nephroarmacol*, *4*(1), 5-8.
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., & Roitt, I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, *21 Suppl 2*, S12-23. doi:10.1016/s0264-410x(03)00195-6
- Bell, C. C., Magor, G. W., Gillinder, K. R., & Perkins, A. C. (2014). A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC Genomics*, *15*, 1002. doi:10.1186/1471-2164-15-1002
- Bell, J., & McFadden, G. (2014). Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe*, *15*(3), 260-265. doi:10.1016/j.chom.2014.01.002
- Benyoucef, A., Marchitto, L., & Touzot, F. (2020). CRISPR gene-engineered CYBB(ko) THP-1 cell lines highlight the crucial role of NADPH-induced reactive oxygen species for regulating inflammasome activation. *J Allergy Clin Immunol*. doi:10.1016/j.jaci.2019.12.913
- Berg, J. M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(1), 99-102. doi:10.1073/pnas.85.1.99
- Boaru, S. G., Borkham-Kamphorst, E., Tihaa, L., Haas, U., & Weiskirchen, R. (2012). Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm (Lond)*, *9*(1), 49. doi:10.1186/1476-9255-9-49
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, *48*, 419-436. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(Pt 8), 2551-2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
- Bonar, S. L., Brydges, S. D., Mueller, J. L., McGeough, M. D., Pena, C., Chen, D., . . . Mbalaviele, G. (2012). Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes

- inflammation and abnormal skeletal development in mice. *PLoS One*, 7(4), e35979. doi:10.1371/journal.pone.0035979
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., . . . Schroder, K. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*, 215(3), 827-840. doi:10.1084/jem.20172222
- Boyden, E. D., & Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*, 38(2), 240-244. doi:10.1038/ng1724
- Bracaglia, C., Prencipe, G., & De Benedetti, F. (2017). Macrophage Activation Syndrome: different mechanisms leading to a one clinical syndrome. *Pediatr Rheumatol Online J*, 15(1), 5. doi:10.1186/s12969-016-0130-4
- Braga, T. T., Forni, M. F., Correa-Costa, M., Ramos, R. N., Barbuto, J. A., Branco, P., . . . Camara, N. O. (2017). Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep*, 7, 39884. doi:10.1038/srep39884
- Bronner, D. N., Abuaita, B. H., Chen, X., Fitzgerald, K. A., Nunez, G., He, Y., . . . O'Riordan, M. X. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity*, 43(3), 451-462. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.008
- Budman, J., & Chu, G. (2005). Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J*, 24(4), 849-860. doi:10.1038/sj.emboj.7600563
- Canna, S. W., de Jesus, A. A., Gouni, S., Brooks, S. R., Marrero, B., Liu, Y., . . . Goldbach-Mansky, R. (2014). An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet*, 46(10), 1140-1146. doi:10.1038/ng.3089
- Carroll, D. (2014). Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem*, 83, 409-439. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035418
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chen, G. Y., & Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10(12), 826-837. doi:10.1038/nri2873
- Chen, H., Choi, J., & Bailey, S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *J Biol Chem*, 289(19), 13284-13294. doi:10.1074/jbc.M113.539726
- Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther*, 8(6), 419-429. doi:10.2174/156652308786848021
- Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, 20(4), 535-549. doi:10.1128/CMR.00013-07
- Cohen, F. S. (2016). How Viruses Invade Cells. *Biophys J*, 110(5), 1028-1032. doi:10.1016/j.bpj.2016.02.006
- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W242-W245. doi:10.1093/nar/gky354

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143
- Damiano, J. S., Oliveira, V., Welsh, K., & Reed, J. C. (2004). Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J*, *381*(Pt 1), 213-219. doi:10.1042/BJ20031506
- Das, L. M., Rosenjack, J., Au, L., Galle, P. S., Hansen, M. B., Cathcart, M. K., . . . Lu, K. Q. (2015). Hyper-inflammation and skin destruction mediated by rosiglitazone activation of macrophages in IL-6 deficiency. *J Invest Dermatol*, *135*(2), 389-399. doi:10.1038/jid.2014.375
- Davis, B. K., Wen, H., & Ting, J. P. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*, *29*, 707-735. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405
- de Jesus, A. A., Canna, S. W., Liu, Y., & Goldbach-Mansky, R. (2015). Molecular mechanisms in genetically defined autoinflammatory diseases: disorders of amplified danger signaling. *Annu Rev Immunol*, *33*, 823-874. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112227
- den Boon, J. A., Diaz, A., & Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe*, *8*(1), 77-85. doi:10.1016/j.chom.2010.06.010
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J. K., . . . Yan, N. (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, *335*(6069), 720-723. doi:10.1126/science.1215670
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., . . . Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, *190*(4), 1390-1400. doi:10.1128/JB.01412-07
- Diez-Villasenor, C., Almendros, C., Garcia-Martinez, J., & Mojica, F. J. (2010). Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *156*(5), 1351-1361. doi:10.1099/mic.0.036046-0
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, *281*(1), 8-27. doi:10.1111/imr.12621
- Dong, Y., Li, H., Zhao, L., Koopman, P., Zhang, F., & Huang, J. X. (2019). Genome-Wide Off-Target Analysis in CRISPR-Cas9 Modified Mice and Their Offspring. *G3 (Bethesda)*, *9*(11), 3645-3651. doi:10.1534/g3.119.400503
- Dong, Y., Peng, T., Wu, W., Tan, D., Liu, X., & Xie, D. (2019). Efficient introduction of an isogenic homozygous mutation to induced pluripotent stem cells from a hereditary hearing loss family using CRISPR/Cas9 and single-stranded donor oligonucleotides. *J Int Med Res*, *47*(4), 1717-1730. doi:10.1177/0300060519829990
- Duncan, J. A., & Canna, S. W. (2018). The NLRC4 Inflammasome. *Immunol Rev*, *281*(1), 115-123. doi:10.1111/imr.12607
- Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., & Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*, *10*(11), 1116-1121. doi:10.1038/nmeth.2681

- Ewald, S. E., Chavarria-Smith, J., & Boothroyd, J. C. (2014). NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, *82*(1), 460-468. doi:10.1128/IAI.01170-13
- Favier, L. A., & Schulert, G. S. (2016). Mevalonate kinase deficiency: current perspectives. *Appl Clin Genet*, *9*, 101-110. doi:10.2147/TACG.S93933
- Fay, N., & Pante, N. (2015). Nuclear entry of DNA viruses. *Front Microbiol*, *6*, 467. doi:10.3389/fmicb.2015.00467
- Figueras-Nart, I., Mascaro, J. M., Jr., Solanich, X., & Hernandez-Rodriguez, J. (2019). Dermatologic and Dermatopathologic Features of Monogenic Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*, *10*, 2448. doi:10.3389/fimmu.2019.02448
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, *8*(11), 1812-1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
- Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K. S., Lecrivain, A. L., Bzdrenga, J., . . . Charpentier, E. (2014). Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, *42*(4), 2577-2590. doi:10.1093/nar/gkt1074
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., . . . Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, *386*(6625), 619-623. doi:10.1038/386619a0
- Gul, A. (2018). Dynamics of Inflammatory Response in Autoinflammatory Disorders: Autonomous and Hyperinflammatory States. *Front Immunol*, *9*, 2422. doi:10.3389/fimmu.2018.02422
- Gutierrez, O., Pipaon, C., & Fernandez-Luna, J. L. (2004). Ipaf is upregulated by tumor necrosis factor-alpha in human leukemia cells. *FEBS Lett*, *568*(1-3), 79-82. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.095
- Ha, F., & Khalil, H. (2015). Crohn's disease: a clinical update. *Therap Adv Gastroenterol*, *8*(6), 352-359. doi:10.1177/1756283X15592585
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., . . . Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, *139*(5), 945-956. doi:10.1016/j.cell.2009.07.040
- Hallmann, A. L., Arauzo-Bravo, M. J., Mavrommatis, L., Ehrlich, M., Ropke, A., Brockhaus, J., . . . Hargus, G. (2017). Astrocyte pathology in a human neural stem cell model of frontotemporal dementia caused by mutant TAU protein. *Sci Rep*, *7*, 42991. doi:10.1038/srep42991
- Hari, A., Zhang, Y., Tu, Z., Detampel, P., Stenner, M., Ganguly, A., & Shi, Y. (2014). Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep*, *4*, 7281. doi:10.1038/srep07281
- Harrison, O. J., Srinivasan, N., Pott, J., Schiering, C., Krausgruber, T., Iltott, N. E., & Maloy, K. J. (2015). Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3(+) Treg cell function in the intestine. *Mucosal Immunol*, *8*(6), 1226-1236. doi:10.1038/mi.2015.13

- He, Y., Hara, H., & Nunez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, *41*(12), 1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
- He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B., & Nunez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, *530*(7590), 354-357. doi:10.1038/nature16959
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Thaiss, C. A., & Flavell, R. A. (2013). The intestinal microbiota in chronic liver disease. *Adv Immunol*, *117*, 73-97. doi:10.1016/B978-0-12-410524-9.00003-7
- Hindmarsh, P., & Leis, J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev*, *63*(4), 836-843, table of contents.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalos, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., . . . et al. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol*, *13*(10), 6231-6240. doi:10.1128/mcb.13.10.6231
- Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N. E., Howden, S. E., Chu, L. F., Sontheimer, E. J., & Thomson, J. A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(39), 15644-15649. doi:10.1073/pnas.1313587110
- Howard, A. D., Kostura, M. J., Thornberry, N., Ding, G. J., Limjuco, G., Weidner, J., . . . et al. (1991). IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol*, *147*(9), 2964-2969.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., . . . Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, *31*(9), 827-832. doi:10.1038/nbt.2647
- Hu, Z., Yan, C., Liu, P., Huang, Z., Ma, R., Zhang, C., . . . Chai, J. (2013). Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science*, *341*(6142), 172-175. doi:10.1126/science.1236381
- Hull, K. M., Drewe, E., Aksentijevich, I., Singh, H. K., Wong, K., McDermott, E. M., . . . Kastner, D. L. (2002). The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)*, *81*(5), 349-368. doi:10.1097/00005792-200209000-00002
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, *169*(12), 5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., . . . Brouns, S. J. (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(5), 529-536. doi:10.1038/nsmb.2019

- Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B. A., & Miao, E. A. (2016). Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J Exp Med*, *213*(10), 2113-2128. doi:10.1084/jem.20151613
- Kader, M., Alaoui-El-Azher, M., Vorhauer, J., Kode, B. B., Wells, J. Z., Stolz, D., . . . Ismail, N. (2017). MyD88-dependent inflammasome activation and autophagy inhibition contributes to Ehrlichia-induced liver injury and toxic shock. *PLoS Pathog*, *13*(10), e1006644. doi:10.1371/journal.ppat.1006644
- Karki, R., Lee, E., Place, D., Samir, P., Mavuluri, J., Sharma, B. R., . . . Kanneganti, T. D. (2018). IRF8 Regulates Transcription of Naips for NLRC4 Inflammasome Activation. *Cell*, *173*(4), 920-933 e913. doi:10.1016/j.cell.2018.02.055
- Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, *21*(4), 317-337. doi:10.1093/intimm/dxp017
- Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashi-Takamura, S., . . . Dixit, V. M. (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, *341*(6151), 1246-1249. doi:10.1126/science.1240248
- Kerrigan, A. M., & Brown, G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, *214*(7), 562-575. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003
- Kesavardhana, S., & Kanneganti, T. D. (2017). Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol*, *29*(5), 201-210. doi:10.1093/intimm/dxx018
- Kim, K. P., & Mirkin, E. V. (2018). So similar yet so different: The two ends of a double strand break. *Mutat Res*, *809*, 70-80. doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.06.007
- Kim, S. I., Matsumoto, T., Kagawa, H., Nakamura, M., Hirohata, R., Ueno, A., . . . Woltjen, K. (2018). Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat Commun*, *9*(1), 939. doi:10.1038/s41467-018-03044-y
- Kim, S. K., Choe, J. Y., & Park, K. Y. (2019). Anti-inflammatory effect of artemisinin on uric acid-induced NLRP3 inflammasome activation through blocking interaction between NLRP3 and NEK7. *Biochem Biophys Res Commun*, *517*(2), 338-345. doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.087
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., . . . Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, *523*(7561), 481-485. doi:10.1038/nature14592
- Lans, H., Marteijn, J. A., & Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin*, *5*, 4. doi:10.1186/1756-8935-5-4
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, *13*(6), 397-411. doi:10.1038/nri3452
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*, *5*, 1. doi:10.1038/s41392-019-0089-y

- Li, L., Wu, L. P., & Chandrasegaran, S. (1992). Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(10), 4275-4279. doi:10.1073/pnas.89.10.4275
- Liu, H., Kang, H., Liu, R., Chen, X., & Zhao, K. (2002). Maximal induction of a subset of interferon target genes requires the chromatin-remodeling activity of the BAF complex. *Mol Cell Biol*, *22*(18), 6471-6479. doi:10.1128/mcb.22.18.6471-6479.2002
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D., & Ma, W. (2018). Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet*, *9*, 691. doi:10.3389/fgene.2018.00691
- Liu, W., Liu, X., Li, Y., Zhao, J., Liu, Z., Hu, Z., . . . Kang, Z. (2017). LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during Salmonella Typhimurium infection. *J Exp Med*, *214*(10), 3051-3066. doi:10.1084/jem.20170014
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, *535*(7610), 153-158. doi:10.1038/nature18629
- Lundstrom, K. (2018). Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases*, *6*(2). doi:10.3390/diseases6020042
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., . . . Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell*, *16*(5), 701-713. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.017
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., . . . Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, *440*(7081), 228-232. doi:10.1038/nature04515
- Marsh, R. A., & Haddad, E. (2018). How i treat primary haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*, *182*(2), 185-199. doi:10.1111/bjh.15274
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, *10*(2), 417-426. doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3
- Martinon, F., & Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*, *26*(8), 447-454. doi:10.1016/j.it.2005.06.004
- Matusiak, M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Sirard, J. C., Kanneganti, T. D., & Lamkanfi, M. (2015). Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(5), 1541-1546. doi:10.1073/pnas.1417945112
- McCormack, M. P., & Rabbitts, T. H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, *350*(9), 913-922. doi:10.1056/NEJMra032207
- McGonagle, D., & McDermott, M. F. (2006). A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med*, *3*(8), e297. doi:10.1371/journal.pmed.0030297
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, *140*(6), 771-776. doi:10.1016/j.cell.2010.03.006

- Meylan, E., Tschopp, J., & Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, *442*(7098), 39-44. doi:10.1038/nature04946
- Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, *4*(6), 1609-1614.
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*, *9*(3), 613-621. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Nunez, G. (2013). K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, *38*(6), 1142-1153. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.016
- Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Joosten, L. A., Opitz, B., van der Meer, J. H., . . . Dinarello, C. A. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*, *113*(10), 2324-2335. doi:10.1182/blood-2008-03-146720
- Okamoto, S., Amaishi, Y., Maki, I., Enoki, T., & Mineno, J. (2019). Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. *Sci Rep*, *9*(1), 4811. doi:10.1038/s41598-019-41121-4
- Oth, T., Habets, T., Germeraad, W. T. V., Zonneveld, M. I., Bos, G. M. J., & Vanderlocht, J. (2018). Pathogen recognition by NK cells amplifies the pro-inflammatory cytokine production of monocyte-derived DC via IFN-gamma. *BMC Immunol*, *19*(1), 8. doi:10.1186/s12865-018-0247-y
- Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., . . . Liddington, R. C. (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, *414*(6860), 229-233. doi:10.1038/n35101998
- Patel, M. N., Carroll, R. G., Galvan-Pena, S., Mills, E. L., Olden, R., Triantafilou, M., . . . Masters, S. L. (2017). Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med*, *23*(2), 165-180. doi:10.1016/j.molmed.2016.12.007
- Pontillo, A., & Crovella, S. (2017). NOD-Like Receptors: A Tail from Plants to Mammals Through Invertebrates. *Curr Protein Pept Sci*, *18*(4), 311-322. doi:10.2174/1389203717666160317142306
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (2001). Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem*, *276*(30), 28309-28313. doi:10.1074/jbc.C100250200
- Qu, Y., Misaghi, S., Izrael-Tomasevic, A., Newton, K., Gilmour, L. L., Lamkanfi, M., . . . Dixit, V. M. (2012). Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature*, *490*(7421), 539-542. doi:10.1038/nature11429
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., . . . Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, *80*(1-2), 148-158. doi:10.1016/j.ymgme.2003.08.016
- Roers, A., Hiller, B., & Hornung, V. (2016). Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*, *44*(4), 739-754. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.002

- Rosengren, S., Mueller, J. L., Anderson, J. P., Niehaus, B. L., Misaghi, A., Anderson, S., . . . Hoffman, H. M. (2007). Monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients are activated by mild hypothermia. *J Allergy Clin Immunol*, *119*(4), 991-996. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.649
- Rowczenio, D. M., Trojer, H., Russell, T., Baginska, A., Lane, T., Stewart, N. M., . . . Lachmann, H. J. (2013). Clinical characteristics in subjects with NLRP3 V198M diagnosed at a single UK center and a review of the literature. *Arthritis Res Ther*, *15*(1), R30. doi:10.1186/ar4171
- Sadasivam, S., Gupta, S., Radha, V., Batta, K., Kundu, T. K., & Swarup, G. (2005). Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. *Oncogene*, *24*(4), 627-636. doi:10.1038/sj.onc.1208201
- Sage, P. T., & Carman, C. V. (2009). Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *14*, 5066-5083. doi:10.2741/3587
- Schneider, K. S., Gross, C. J., Dreier, R. F., Saller, B. S., Mishra, R., Gorka, O., . . . Gross, O. (2017). The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity. *Cell Rep*, *21*(13), 3846-3859. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.018
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, *6*(12), 1191-1197. doi:10.1038/ni1276
- Serrano, L., Liang, L., Chang, Y., Deng, L., Maulion, C., Nguyen, S., & Tischfield, J. A. (2011). Homologous recombination conserves DNA sequence integrity throughout the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, *20*(2), 363-374. doi:10.1089/scd.2010.0159
- Sha, W., Mitoma, H., Hanabuchi, S., Bao, M., Weng, L., Sugimoto, N., . . . Liu, Y. J. (2014). Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(45), 16059-16064. doi:10.1073/pnas.1412487111
- Sharma, D., & Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, *213*(6), 617-629. doi:10.1083/jcb.201602089
- Smale, S. T. (2012). Transcriptional regulation in the innate immune system. *Curr Opin Immunol*, *24*(1), 51-57. doi:10.1016/j.coi.2011.12.008
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, *28*(17), 3361-3369. doi:10.1093/nar/28.17.3361
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(5). doi:10.1101/cshperspect.a016303
- Srinivasula, S. M., Poyet, J. L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., & Alnemri, E. S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*, *277*(24), 21119-21122. doi:10.1074/jbc.C200179200
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, *481*(7381), 278-286. doi:10.1038/nature10759

- Struyf, S., Gouwy, M., Dillen, C., Proost, P., Opdenakker, G., & Van Damme, J. (2005). Chemokines synergize in the recruitment of circulating neutrophils into inflamed tissue. *Eur J Immunol*, *35*(5), 1583-1591. doi:10.1002/eji.200425753
- Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G., & Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*, *1040*, 91-101. doi:10.1007/978-1-62703-523-1_8
- Suresh, R., & Mosser, D. M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ*, *37*(4), 284-291. doi:10.1152/advan.00058.2013
- Szekanecz, Z., & Koch, A. E. (2004). Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin North Am*, *30*(1), 97-114. doi:10.1016/S0889-857X(03)00116-9
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, *249*(1), 158-175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
- Tsutsui, H., Imamura, M., Fujimoto, J., & Nakanishi, K. (2010). The TLR4/TRIF-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasome Underlies Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice. *Gastroenterol Res Pract*, *2010*, 641865. doi:10.1155/2010/641865
- van der Ploeg, J. R. (2009). Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology*, *155*(Pt 6), 1966-1976. doi:10.1099/mic.0.027508-0
- Vance, R. E. (2015). The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Curr Opin Immunol*, *32*, 84-89. doi:10.1016/j.coi.2015.01.010
- von Moltke, J., Trinidad, N. J., Moayeri, M., Kintzer, A. F., Wang, S. B., van Rooijen, N., . . . Vance, R. E. (2012). Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*, *490*(7418), 107-111. doi:10.1038/nature11351
- Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med*, *13*(9), 373-380. doi:10.1016/j.molmed.2007.07.004
- Wang, Y., Shi, P., Chen, Q., Huang, Z., Zou, D., Zhang, J., . . . Lin, Z. (2019). Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *J Mol Cell Biol*, *11*(12), 1069-1082. doi:10.1093/jmcb/mjz020
- Weaver, L. K., & Behrens, E. M. (2014). Hyperinflammation, rather than hemophagocytosis, is the common link between macrophage activation syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Curr Opin Rheumatol*, *26*(5), 562-569. doi:10.1097/BOR.0000000000000093
- Weiss, E. S., Girard-Guyonvarc'h, C., Holzinger, D., de Jesus, A. A., Tariq, Z., Picarsic, J., . . . Canna, S. W. (2018). Interleukin-18 diagnostically distinguishes and pathogenically promotes human and murine macrophage activation syndrome. *Blood*, *131*(13), 1442-1455. doi:10.1182/blood-2017-12-820852

- Wouters, C. H., Maes, A., Foley, K. P., Bertin, J., & Rose, C. D. (2014). Blau syndrome, the prototypic auto-inflammatory granulomatous disease. *Pediatr Rheumatol Online J*, 12, 33. doi:10.1186/1546-0096-12-33
- Yamauchi, Y., & Helenius, A. (2013). Virus entry at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 6), 1289-1295. doi:10.1242/jcs.119685
- Yang, X., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*, 1(2), 319-325. doi:10.1016/s1097-2765(00)80032-5
- Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., & Shi, F. (2019). Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis*, 10(2), 128. doi:10.1038/s41419-019-1413-8
- Yu, J. R., & Leslie, K. S. (2011). Cryopyrin-associated periodic syndrome: an update on diagnosis and treatment response. *Curr Allergy Asthma Rep*, 11(1), 12-20. doi:10.1007/s11882-010-0160-9
- Zha, Q. B., Wei, H. X., Li, C. G., Liang, Y. D., Xu, L. H., Bai, W. J., . . . Ouyang, D. Y. (2016). ATP-Induced Inflammasome Activation and Pyroptosis Is Regulated by AMP-Activated Protein Kinase in Macrophages. *Front Immunol*, 7, 597. doi:10.3389/fimmu.2016.00597
- Zhao, C., & Zhao, W. (2020). NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol*, 11, 211. doi:10.3389/fimmu.2020.00211
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y. N., Lu, Q., Xu, H., . . . Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, 477(7366), 596-600. doi:10.1038/nature10510
- Zheng, C., Baum, B. J., Iadarola, M. J., & O'Connell, B. C. (2000). Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat Biotechnol*, 18(2), 176-180. doi:10.1038/72628

Figures supplémentaires :

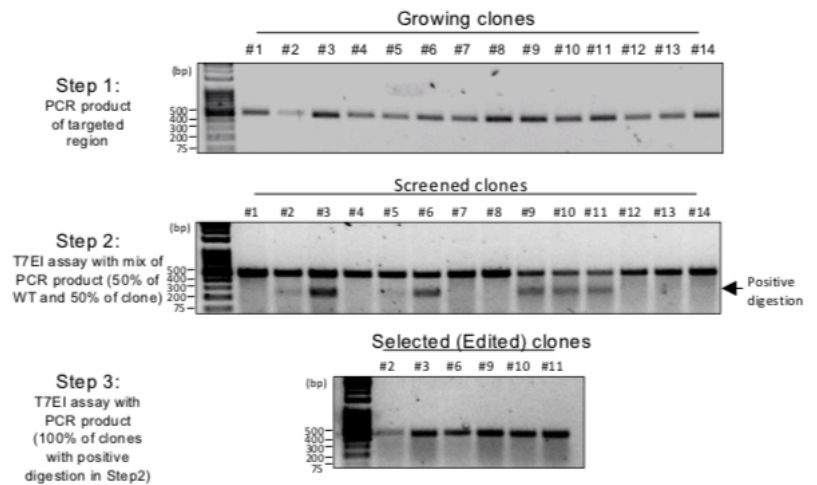
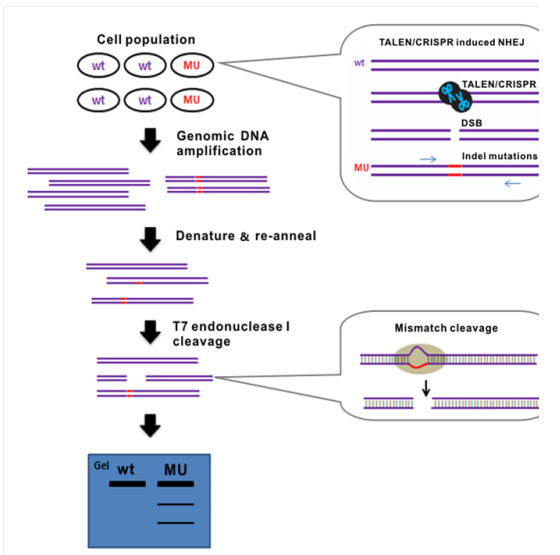


Figure supplémentaire 1 : Principe T7 assay.

A. Le T7 assay consiste en l'amplification de la région éditée par PCR. L'ADN consiste en une fraction des cellules sauvages non éditées et une fraction de cellules éditées. Cette amplification est suivie par un programme de dénaturation des brins d'ADN et d'une ré-hybridation de manière aléatoire. De ce fait, il y a appariement entre des brins édités et non édités, formant un hétérozygote. Cette hybridation engendre un mésappariement qui sera reconnu par une endonucléase T7. L'endonucléase clivera au site de mésappariement et générera ainsi deux bandes lors de la migration sur gel. **B.** Le principe du T7 assay peut être modifié afin de détecter les clones positifs. En effet, les clones provenant d'une seule cellule auront le même génome que la cellule mère. Si la mutation a été insérée en homozygote, le clone ne générera pas deux bandes lors de la migration sur gel étant donné son caractère identique au second brin d'ADN étant aussi édité. Afin de contourner ce problème, 50% du produit PCR de cellules sauvages est mélangé à 50% du produit PCR des clones afin de forcer l'hétérozygotie et ainsi détecter l'édition génique.

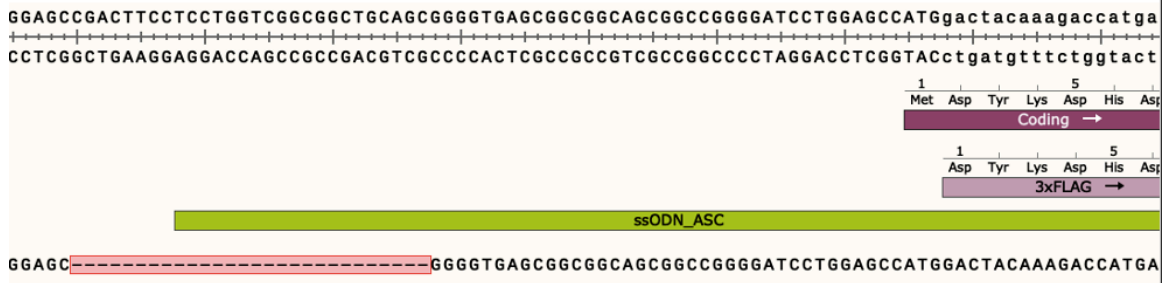


Figure 2 : Séquençage Sanger du clone 27 FLAG3x-ASC THP-1
 Alignement de séquence du clone 27 FLAG3x-ASC THP-1. Le clone montre une délétion de 28 pbs en aval du site de coupure.

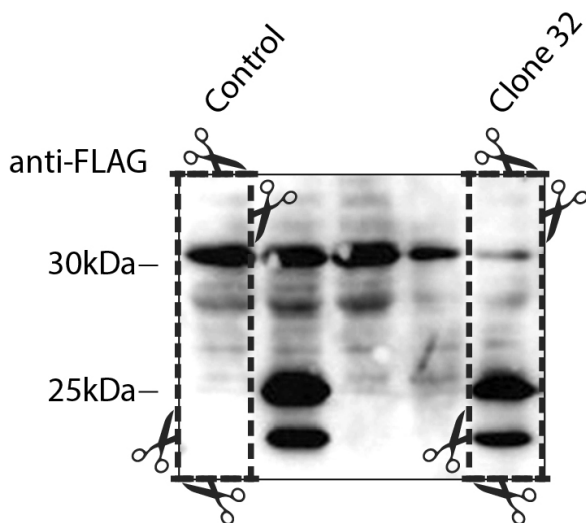


Figure Supplémentaire 3 : Résultat brut de WesternBlot anti-FLAG3x.