

Université de Montréal

**Corrélation génotype – phénotype chez les patients pédiatriques
porteurs de mutations de NLRP12**

Par

Camille Beaufile

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise en
microbiologie et immunologie

09/08/2023

© Camille Beaufile, 2023

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie,

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Corrélation génotype – phénotype chez les patients pédiatriques
porteurs de mutations de NLRP12**

Présenté par

Camille Beaufile

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Dr Elie Haddad

Directeur de recherche

Dr Fabien Touzot

Codirecteur de recherche

Dre Nathalie Labrecque

Membre du jury

Résumé

Le syndrome périodique lié à NLRP12 (NLRP12-AD) est une maladie rare appartenant au groupe des maladies auto-inflammatoires systémiques héréditaires. Ces maladies sont causées par des anomalies du système immunitaire inné. Les cryopyrinopathies (CAPS) sont une famille de maladie auto-inflammatoire liées à des mutations gain de fonction du gène *NLRP3*. *NLRP3* fait partie d'un composant central de l'inflammation, l'inflammasome. En 2007, *Jéru et al.* ont décrit un premier patient présentant des symptômes évocateurs d'un CAPS qui n'était pas porteur de mutation de *NLRP3* mais présentait une mutation de *NLRP12*. Depuis, 33 patients pédiatriques atteints de NLRP12-AD ont été décrits dans la littérature. Les signes cliniques de la maladie sont variables et ne permettent pas d'établir de critères cliniques diagnostics fiables. La pathogénicité des mutations observées chez les patients est difficile à établir. Les patients atteints de NLRP12-AD représentent également un défi thérapeutique, un certain nombre d'entre eux ne répondant pas aux anti-IL1, un traitement pourtant efficace dans la plupart des inflammasomopathies. De nombreuses études se sont intéressées au rôle de *NLRP12*, qui posséderait à la fois des propriétés pro et anti-inflammatoires par sa capacité à inhiber les voies canoniques et non canoniques de NF κ B mais aussi à former un inflammasome. Le rôle exact de *NLRP12* reste controversé, avec des résultats différents selon les cellules ou les stimuli utilisés lors des expériences.

L'objectif de notre étude est de créer un modèle *in vitro* fiable et reproductible afin de mieux comprendre la physiopathologie de NLRP12. Il permettra ensuite d'étudier les mutations de *NLRP12* retrouvées chez des patients présentant des symptômes de maladie auto-inflammatoire pour améliorer les performances et la fiabilité du diagnostic et proposer des traitements personnalisés aux patients concernés.

Nous avons créé un modèle de cellules THP1 *NLRP12* KO en utilisant la technologie de CRISPR/Cas9 qui a permis d'induire une délétion homozygote à la jonction entre le 2^{ème} intron et le 3^{ème} exon de *NLRP12*, qui code pour le domaine fonctionnel de la protéine. Nos cellules KO semblent sécréter moins de cytokine pro-inflammatoire (IL-1 β et TNF α) que les cellules WT, suggérant un rôle pro-inflammatoire de *NLRP12* dans notre modèle. Nous avons par ailleurs décrit une cohorte nord-américaine de 17 patients porteurs de mutations de *NLRP12* afin d'étudier leurs mutations et produit des vecteurs lentiviraux contenant ces mutations.

Nous prévoyons d'explorer le rôle de *NLRP12* sur l'activation de la voie NF κ B et la formation d'un inflammasome puis de transduire nos cellules KO avec les différentes mutations de nos patients et d'analyser leurs conséquences sur ces mêmes voies et sur la sécrétion cytokinique.

Mots-clés : NLRP12, maladie auto-inflammatoire, inflammasome, NF κ B, CRISPR

Abstract

NLRP12-AD is part of a new group of rheumatics' diseases: the systemic autoinflammatory diseases. Those diseases are caused by defect or dysfunction in the innate immune system. Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) is a family of systemic autoinflammatory disease initially linked to *NLRP3* gain-of-function heterozygous mutations. *NLRP3* is part of a key component of inflammation, the inflammasome. In 2007, *Jeru et al.* described the first patient with CAPS phenotype, but without *NLRP3* mutations. This patient had *NLRP12* mutations. Since then, 33 pediatric patients with NLRP12-AD have been published. There is no specific clinical presentation that allow homogenous diagnosis. Determination of the causality of the mutations remains tricky. Lastly, some patients have shown resistance to anti-IL1 treatment, a medication that is highly effective in other inflammasomopathies such as CAPS, a puzzling observation as to the role of *NLRP12*. *NLRP12* has been described with both anti- and pro- inflammatory roles, by its ability to inhibit the canonical and non-canonical NFkB pathways, but also through its hypothetic capacity to form an inflammasome. Hence, the exact role of *NLRP12* remains controversial and its role might be stimuli- or cell-dependant.

Our objective is to create a reliable and reproducible *in vitro* model to better understand the role of NLRP12. This model will then allow us to study *NLRP12* mutations found in patients with auto-inflammatory symptoms. This will improve our diagnostic performance and help to offer to patients the most suitable therapy.

We created *NLRP12* knockout THP-1 cells by using the CRPISP-Cas 9 gene editing technology. We were able to induce a homozygous deletion at the intron 2/exon 3 junction that encodes the protein functional domain. Our KO cells seems to secrete less pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α) than WT cells. This suggests a pro-inflammatory role of *NLRP12*. We described a North American cohort of 17 pediatric patients with *NLRP12* mutations to study their mutations in our model and produced lentiviral vectors containing those mutations.

We planned to study the effects of *NLRP12* on NFkB activation and on inflammasome formation. Then, we will transduce our KO cells with the patient's mutations and compare their consequences on inflammation pathways and cytokine secretion.

Keywords : NLRP12, auto-inflammatory disease, inflammasome, NFkB, CRISPR

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des annexes.....	11
Liste des abréviations.....	12
Remerciements	15
1. Introduction.....	16
1.1. Maladies auto-inflammatoires : définition, concept et historique.....	16
1.1.1. Maladies auto-inflammatoires.....	16
1.1.2. Les Inflammasomes au sein de l'immunité innée	19
1.2. NLRP12 – Aspects physiopathologiques	23
1.2.1. Principales caractéristiques.....	23
1.2.2. Rôle de NLRP12 sur les voies canoniques et non canoniques de NFkB et sur la voie MAPK	23
1.2.3. NLRP12 et inflammasome	25
1.2.4. Dualité de NLRP12.....	26
1.3. Syndrome périodique lié à NLRP12 (NAPS12 ou NLRP12-AD ou FCAS2).....	29
1.3.1. Caractéristiques cliniques et épidémiologiques des patients.....	29
1.3.2. Évolution et traitements	31
1.3.3. Génétique.....	32
1.3.4. Autres pathologies reliées à NLRP12 dans la littérature.....	33
1.4. Modification génétique de cellules par CRISPR Cas9.....	34
1.5. Hypothèses et objectifs du projet de recherche	35
1.6. Données préliminaires et modification du modèle d'étude.....	36
2. Matériels et méthodes	38
2.1. Recrutement des patients.....	38
2.2. Réactifs, milieux et amorces	38
2.3. Culture des cellules THP-1	40
2.4. Modification génétique des THP-1 par CRISPR Cas9	40
2.4.1. Protocole d'édition génétique de <i>NLRP12</i> par CRISPR/Cas9	40
2.4.2. Culture et entretien.....	41

2.5.	Validation du KO	41
2.5.1.	Amplification par PCR de l'exon 3 de <i>NLRP12</i>	41
2.5.2.	Confirmation de l'édition génique : séquençage et test de clivage enzymatique des mésappariements.....	42
2.5.3.	Extraction d'ARN et RT-PCR.....	43
2.6.	Production des plasmides contenant les mutations de <i>NLRP12</i>	43
2.6.1.	Clonage du plasmide pENTR4_ <i>NLRP12</i> WT_P2A_ <i>NLRP12</i> WT	46
2.6.2.	Clonage du plasmide pENTR4_ <i>NLRP12</i> WT_P2A dans un plasmide d'expression.....	47
2.7.	Production virale.....	48
2.8.	Différenciation au PMA.....	49
2.9.	ELISA IL1-beta humain, IL-6 et TNF α	49
3.	Résultats	51
3.1.	Patients inclus dans l'étude	51
3.2.	Création des THP-1 KO pour <i>NLRP12</i>	56
3.2.1.	Obtention d'un clone hétérozygote.....	58
3.2.2.	Obtention d'un clone homozygote	60
3.2.3.	Confirmation du clone homozygote.....	65
3.2.3.1.	Essai de mésappariement.....	65
3.2.3.2.	Analyse de l'ARN messenger.....	67
3.3.	Création des différents plasmides et lentivirus pour la transduction	68
3.4.	Test de sensibilité à la blastomycine	71
3.5.	Production de cytokines	72
4.	Discussion	76
5.	Perspectives.....	78
6.	Conclusion	82
	Bibliographie.....	83
	Annexes	88

Liste des tableaux

Tableau 1. – Liste des amorces utilisées pour les expériences d’amplification par PCR et RT-PCR, pour le clonage et pour le séquençage.	39
Tableau 2. – Caractéristiques cliniques des patients pédiatriques porteurs de mutations de <i>NLRP12</i> de la cohorte de Sainte-Justine.	52
Tableau 3. – Principaux paramètres biologiques, résultats d'examens complémentaires et des recherches génétiques des patients pédiatriques porteurs de mutations de <i>NLRP12</i> de la cohorte de Sainte-Justine.....	54
Tableau 4. – Prise en charge médicamenteuse des patients pédiatriques porteurs de mutations de <i>NLRP12</i> de la cohorte de Sainte-Justine.	55
Tableau 5. – Paramètres utilisés pour l’optimisation du protocole d’électroporation des cellules THP-1.....	57
Tableau 6. – Paramètres utilisés pour l'optimisation des PCR de l'exon 3 de <i>NLRP12</i>.	62

Liste des figures

<i>Figure 1.</i> – Principaux mécanismes physiopathologiques des maladies auto-inflammatoires monogéniques.....	17
Figure 2. – « The Immunological Disease Continuum » – Continuum des maladies immunologiques.....	18
<i>Figure 3.</i> – Schématisation de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 après le second signal d'activation.....	21
Figure 4. – Manifestations cliniques des CAPS.....	22
<i>Figure 5.</i> – Régulation des voies canoniques et non canoniques de NFkB par NLRP12.....	25
Figure 6. – Formation d'un inflammasome par NLRP12.....	26
Figure 7. – Rôle de NLRP12 dans l'encéphalite auto-immune expérimentale.....	27
Figure 8. – Rôle de NLRP12 selon l'intensité de la stimulation inflammatoire.....	29
Figure 9. – Localisation et type de mutations de <i>NLRP12</i> rapportées dans la littérature.....	32
Figure 10. – Principe de l'édition génique par CRISPR/Cas9.....	35
Figure 11. – Essai rapporteur luciférase sous le contrôle de NFkB de l'activation de la voie canonique de NFkB (A) et de la voie non canonique de NFkB (B) selon des doses croissantes de NLRP12. A.....	37
Figure 12. – Carte du plasmide initial utilisé pour le clonage de NLRP12 et du plasmide final contenant les deux séquences NLRP12 A.....	45
Figure 13. – Stratégie CRISPR/Cas9 utilisée pour la modification de l'exon 3 du gène NLRP12.....	58
<i>Figure 14.</i> – Protocole expérimental de modification génique de THP-1 par CRISPR-Cas9.....	59
Figure 15. – Exemple de profil de migration de 5 clones de THP-1 sur 12 ayant subi une modification de l'exon 3 du gène NLRP12 par CRISPR/Cas9 comparé au profil de migration des THP-1 sauvages.....	60

Figure 16. – Exemple de profil de migration de 11 clones sur 76 de THP-1 hétérozygotes 21a ayant subi une deuxième modification de l'exon 3 du gène <i>NLRP12</i> par CRIPSR/Cas9, comparé au profil de migration des THP-1 sauvage.....	61
Figure 17. – Profil de migration de l'amplification de l'exon 3 de <i>NLRP12</i> de THP-1 sauvage par différentes paires d'amorces et avec différentes températures de ligation.....	62
Figure 18. – Comparaison des profils de migration de THP-1 hétérozygotes 21a ayant subi une deuxième modification de l'exon 3 du gène <i>NLRP12</i> par CRIPSR/Cas9 amplifié par PCR avec l'ancienne paire d'amorce E3F/E3R (A) et la nouvelle paire d'amorce E3F/E3R1 (B).....	63
Figure 19. – Localisation des mutations induites au sein du gène <i>NLRP12</i>	65
Figure 20. – Profil de migration après test de clivage enzymatique des mésappariements des PCR de l'exon 3 de <i>NLRP12</i> de 8 clones sur 76 obtenus après édition génique par CRISPR/Cas 9 du clone hétérozygote 21a.....	66
Figure 21. – Profil de migration du produit de RT-PCR des ADNc de l'exon 3 de <i>NLRP12</i> des THP1 sauvages (WT), du clone hétérozygote 21a et de 10 des 76 clones obtenus après édition génique par CRISPR/Cas 9 du clone hétérozygote 21a.....	67
Figure 22. – Carte du plasmide contenant la construction <i>NLRP12_P2A_NLRP12WT</i> et schématisation du fonctionnement du peptide P2A.....	70
Figure 23. – Exemple de titration des lentivirus produits au cours de l'étude et concentration (en UI virales/ μ L) obtenues avec nos différentes productions virales.....	71
Figure 24. – Sécrétion d'IL-1 (pg/mL) par les cellules THP1 WT et <i>NLRP12</i> hétérozygote 21a après 24 h ou 48 h de culture, avec et sans stimulation au PMA mesurée par ELISA.....	72
Figure 25. – Comparaison de la sécrétion d'IL-1 (pg/mL) après 72h de culture sans PMA des cellules WT, du clone hétérozygote pour <i>NLRP12</i> 21a, du clone 18 et du clone 56 KO pour <i>NLRP12</i> mesurée en ELISA.....	73
Figure 26. – Comparaison de la sécrétion des principales cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 et TNF α) mesuré en ELISA (pg/mL) par les lignées THP-1 WT, hétérozygote (21a) et KO (29 et 56) avec et sans stimulation au PMA (Ctl) après 48h de culture.....	74

Figure 27. – **Proposition de protocole expérimental d'étude de l'activation de la voie NFκB et de la sécrétion de cytokines et résultats attendus..... 80**

-

Liste des annexes

Annexe 1: Séquence cible de l'ARN guide pour l'édition génique de l'exon 3 de <i>NLRP12</i>	88
Annexe 2: Résumé des étapes de clonage pour la création finale du plasmide pHRSIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PGK.BSD_hNLRP12WT_P2A_NLRP12WT utilisé pour la production lentivirale	89
Annexe 3: Localisation des amorces E3F, E3R et E3R1 utilisées pour l'amplification par PCR de l'ADN génomique de l'exon 3 de <i>NLRP12</i>	90
Annexe 4: Séquençage de l'exon 3 de <i>NLRP12</i> de la forme sauvage (A) et du clone 21a (B) obtenu après la première modification génique.	91
Annexe 5: Séquençage de l'exon 3 de <i>NLRP12</i> des clones 29 et 56 retrouvant une délétion de 24 paires de base.....	92
Annexe 6: Séquençage de l'ADNc après RT-PCR l'exon 3 de <i>NLRP12</i> des clones 21a, 29 et 56.....	93

Liste des abréviations

ADA2 : Adénosine Deaminase 2

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIM2 : Absent in melanoma 2

ARN : Acide ribonucléique

ASC : CARD-containing adaptator

CAPS : Cryopyrin-associated periodic syndrome (Cryopyrinopathies)

CARD : Caspase recruitment domains

CINCA : Chronic Infantile Neurologic Cutaneous Articular syndrome (Syndrome chronique infantile neurologique, cutané et artulaire)

cADN : ADN complémentaire

CrARN : ARN complémentaire

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

D – PBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DEN : N-nitrosodiethylamine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DSS : Sulfate de sodium de dextrane

EAE : Encéphalite auto-immune expérimentale

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FBS : Sérum de veau fœtal

FCAS : Urticaire familiale au froid

FMF : Fièvre Méditerranéenne Familiale

HFD : High-fat diet

IFN1 : Interféron de type 1

IL-6 : Interleukine 6

IL-18 : Interleukine 18

IL-1 β : Interleukine 1 beta

IL1RN : Antagoniste du récepteur à l'IL1

IL36RN : Antagoniste du récepteur à l'IL36

IRAK1 : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucine rich repeat (Répétition riche en Leucine)

MAI : Maladies auto-inflammatoires

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MKD : Déficit en mévalonate kinase

MVK : Mévalonate Kinase

MWS : Syndrome de Muckle-Wells

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NF κ B : Nuclear factor-kappa B

NIK : NF- κ B inducing kinase

NLR : NOD-like Receptor

NLRC4 : NLR Family CARD domain containing 4

NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3

NLRP12 : NLR family pyrin domain containing 12

NLRP12-AD : Syndrome périodique lié à *NLRP12*

NOMID : Neonatal Onset Multi-systemic Inflammatory Disease (Maladie inflammatoire multi-systémique à début néonatal)

NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2

Opti-MEM : Minimal Essential Medium Opti

PAAND : Pyrin-associated auto-inflammatory syndrome with neutrophilic dermatosis (Syndrome auto-inflammatoire avec dermatose neutrophilique)

PCR : Polymerase chain reaction

PEI : Polyéthylèneimine

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PRINTO : Paediatric Rheumatology International Trials Organisation

ROS : *Reactive oxygen species* (Dérivé réactif de l'oxygène)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TLR : Toll-like récepteurs

TNF : Tumor necrosis factor

TNFRSF1A : TNF Receptor Superfamily member 1A

TracrARN : ARN transactivateur

TRAF3 : Tumor necrosis factor receptor-associated factors 3

TRAPS : Syndrome périodique associé au récepteur du TNF α

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

Remerciements

Aux membres du jury qui ont acceptés d'évaluer ce travail.

À l'ensemble du lab Haddad pour leur aide, leur patience et leur soutien. Un remerciement tout particulier à Khampoun pour son travail précieux sur ce projet.

À Fabien, Blandine, Lorie et Sandrine pour leur expertise et leur disponibilité.

À toute l'équipe clinique d'immunologie et rhumatologie pour leur accompagnement pendant mes trois ans auprès d'eux.

À ma famille et surtout à Arthur, pour m'avoir poussé à aller au bout de ce travail.

À Romy qui a été ma plus belle rencontre de cette dernière année et sans qui ce mémoire aurait vu le jour plus tôt.

À toutes mes rencontres québécoises et canadiennes.

1. Introduction

1.1. Maladies auto-inflammatoires : définition, concept et historique

1.1.1. Maladies auto-inflammatoires

Les maladies auto-inflammatoires sont un ensemble de maladie causées par des anomalies du système immunitaire inné (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles,...), par opposition aux maladies auto-immunes qui sont, elles, secondaires à des anomalies du système immunitaire adaptatif et caractérisées par la présence d'auto-anticorps circulants (1). Historiquement, les maladies auto-inflammatoires ont été décrites et classées en fonction de leurs caractéristiques cliniques (2).

En 1997, l'*International FMF consortium* rapporte pour la première fois un gène candidat, *MEFV*, pour la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), une maladie autosomique récessive fréquente chez les patients originaires du pourtour de la méditerranée et caractérisée par des épisodes fébriles récurrents associés à une inflammation des séreuses (péritoine, plèvre et péricarde) (3,4). Cette première description va être suivie de la mise en évidence de gènes à l'origine des principales maladies auto-inflammatoires décrites à la fin des années 1990 (*MVK* pour le déficit en mévalonate kinase (MKD) et *TNFRSF1A* pour le syndrome périodique associé au récepteur du TNF α (TRAPS)). En 1999, Mc Dermott et al. proposent pour la première fois l'utilisation du terme maladies auto-inflammatoires (5).

L'avènement des techniques modernes de séquençage génétique va ensuite mener à la multiplication du nombre de gènes reliés à ces maladies auto-inflammatoires. En 2008, un premier score basé sur des critères cliniques est proposé afin de guider le recours aux analyses moléculaires chez les enfants présentant une fièvre périodique (6). Il s'avère trop complexe pour être utilisé en pratique courante.

En 2017, devant la multiplication des classifications et le spectre toujours plus large des maladies dites auto-inflammatoires, le *PRINTO (Pediatric Rheumatology International Trials Organisation)* définit officiellement les maladies auto-inflammatoires comme « des maladies causées par un déficit ou une dysrégulation du système immunitaire inné et caractérisées par la présence d'une inflammation récurrente ou continue et l'absence d'un rôle pathologique initial du système immunitaire adaptatif (LT auto-réactifs ou production d'anticorps) » (7).

L'étude des maladies auto-inflammatoires a mené à une meilleure compréhension des principales voies de l'immunité innée, notamment à la découverte de l'inflammasome, du rôle de la signalisation de l'interleukine 1 (IL-1 β) ou encore du fonctionnement des voies NF κ B et de l'interféron de type 1 (IFN1) (Figure 1) (8,9).

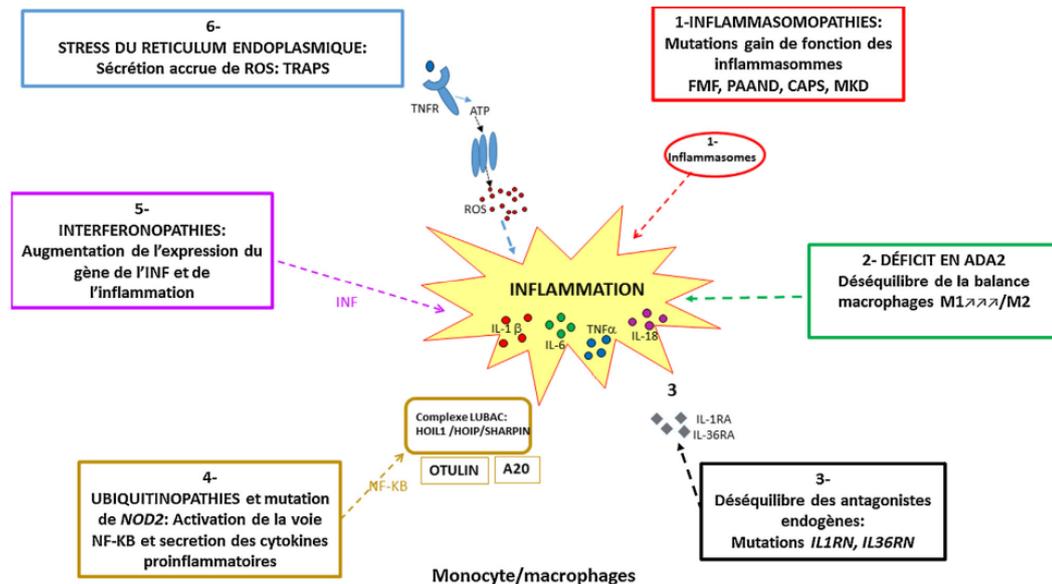


Figure 1. – **Principaux mécanismes physiopathologiques des maladies auto-inflammatoires monogéniques.** Les maladies auto-inflammatoires peuvent être secondaires à une dérégulation des principales voies de l'inflammation innée (interféron, Nf κ B, inflammasomes), menant généralement à une sur-activation de ces voies. Sont décrit par ailleurs des mécanismes touchant la régulation des ROS ainsi que des déséquilibres entre les acteurs pro et anti-inflammatoires de voie de l'immunité innée (cytokines pro et anti-inflammatoires, macrophages). Les effecteurs finaux des maladies inflammatoires sont des cytokines, le plus souvent sécrétées en excès (IL-1, IL-6, IL-18 et TNF α). FMF : Fièvre Méditerranéenne Familiale ; PAAND : Syndrome auto-inflammatoire avec dermatose neutrophilique ; CAPS : Cryopyrinopathies ; MKD : Déficit en mévalonate kinase ; IL1RN : antagoniste du récepteur à l'IL1 ; IL36RN : Antagoniste du récepteur à l'IL36 ; NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain 2 ; TRAPS : syndrome périodique associé au récepteur du TNF α ; ROS : Dérivé réactif de l'oxygène. Tiré de (9)

Cette meilleure compréhension a un effet direct sur les patients puisqu'elle a permis de mieux guider les traitements mis en place dans ces maladies en ciblant les voies concernées par des molécules spécifiques (liaison compétitive au récepteur de l'IL-1 β (anakinra), inhibition de l'IL-1 β circulant (canakinumab), régulation de la voie JAK-STAT (Tofacitinib, Baricitinib,...)) (10,11).

Toutefois, l'amélioration des connaissances autour des maladies auto-inflammatoires a également mis en évidence leur complexité. En 2020, 40 à 60 % des patients présentant un phénotype de maladie auto-inflammatoire ne réunissaient pas les critères (cliniques et/ou génétiques) permettant un diagnostic précis et étaient donc étiquetés comme porteur d'une « maladie auto-

inflammatoire indéfini » (12). Ceci a mené au développement du concept de continuité entre maladie auto-immune et auto-inflammatoire avec, de chaque côté du spectre, les maladies monogéniques et, entre les deux, des maladies polygéniques et mixtes au sein desquelles l'implication du système immunitaire inné et adaptatif est plus ou moins important (Figure 2) (13).

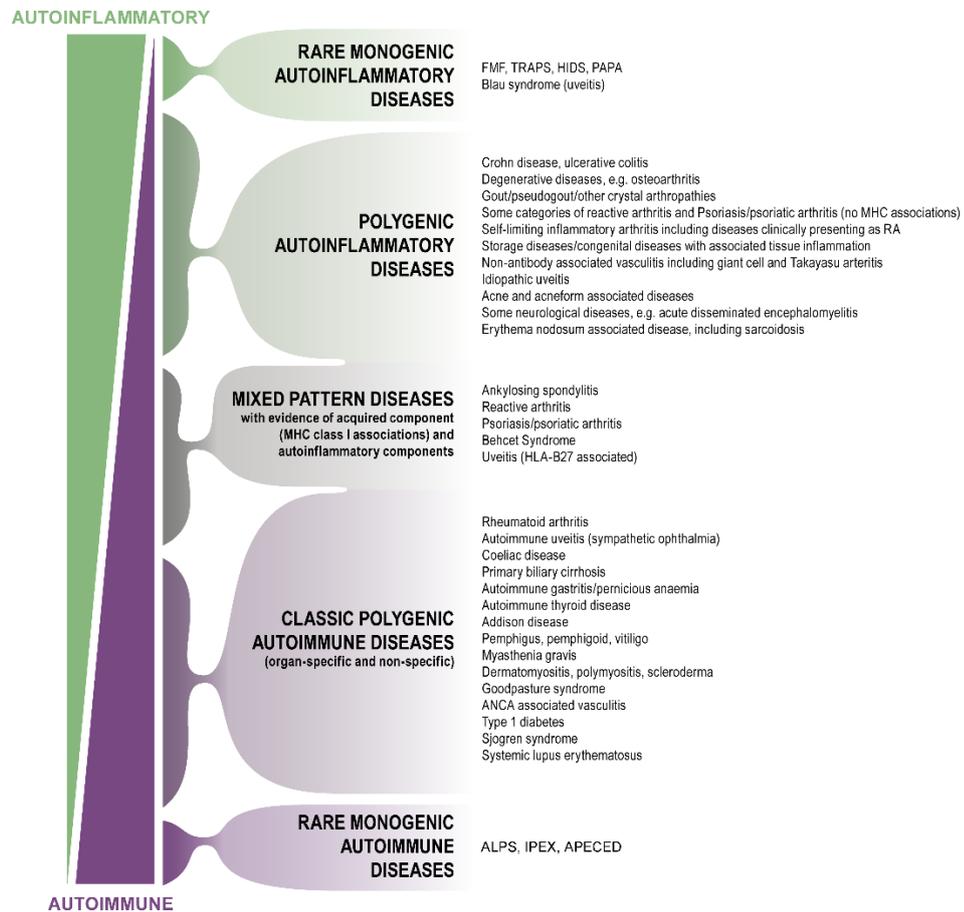


Figure 2. – « The Immunological Disease Continuum » – Continuum des maladies immunologiques. Cette figure décrit le concept de continuité des maladies immunologiques. Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires sont décrites soit comme monogéniques, c'est-à-dire liées aux mutations d'un gène spécifique soit comme polygéniques, donc liées à des atteintes de plusieurs gènes et à des facteurs modificateurs. Enfin, au centre, les maladies mixtes empruntent des caractéristiques aux deux types de maladie. Reproduit à partir de (13).

D'autre part, Sozeri et al. ont démontré, en 2021, la mauvaise corrélation phénotype-génotype chez les patients ayant reçu un diagnostic clinique de MAI (14). Sur 71 patients étudiés, seul 26 (36,6 %) ont vu leur diagnostic clinique confirmé par l'analyse génétique. Chez 9 patients, l'analyse génétique a mis en évidence des mutations pathogènes dans d'autres gènes de maladie auto-inflammatoire que celui suspecté par la clinique.

Les maladies auto-inflammatoires sont donc complexes. Leur spectre et leur nombre s'est étendu de manière importante depuis leur première description il y a 25 ans, les plus récentes revues rapportant plus d'une trentaine de maladie (9,15). Toutefois leur classification et leur compréhension restent encore incomplètes entraînant des difficultés de diagnostic pour les patients et à l'origine de défis en termes de traitement.

1.1.2. Les inflammasomes au sein de l'immunité innée

1.1.2.1. Acteurs de l'immunité innée

Le système immunitaire inné représente la première barrière de défense de l'organisme contre les agressions. Il joue un rôle dans la lutte contre les micro-organismes en les détectant et en éliminant directement certains corps étrangers. Il participe également à l'élimination des cellules mortes ou anormales de l'organisme. On l'oppose au système immunitaire adaptatif, composé des lymphocytes T et B, par sa capacité de réponse immédiate mais peu spécifique et sans mémoire cellulaire.

Les premiers représentants du système immunitaire inné sont les barrières anatomiques de l'organisme dont l'épithélium est l'exemple le plus connu. Il s'agit de barrières mécaniques qui empêchent la pénétration des agents infectieux dans l'organisme.

Les cellules composant le système immunitaire inné vont être capables de reconnaître des signaux moléculaires de danger ou DAMP (*damage-associated molecular patterns*). Lorsque ces DAMP émanent d'agents pathogènes, on parle de motifs microbiens conservés ou PAMP. Mais les DAMP peuvent également être sécrétés par des cellules du soi. Les DAMP (qui peuvent être des protéines intracellulaires, des parties de milieu extra cellulaire tel que l'acide hyaluronique ou encore des constituants non protéiques tels que l'ADN, l'acide urique ou encore de l'ATP) sont reconnus par des récepteurs spécifiques, les PRR (*pattern recognition receptor*) qui vont activer des voies de signalisation spécifiques selon leur localisation et les DAMP reconnus. Les PRR peuvent être intra ou extra cellulaire. On retrouve, au sein des PRR, les NLR (*nucleotide-binding domain and leucin-rich repeats containing receptors*) qui sont les principaux composants des inflammasomes.

Une fois activés, les PRR déclenchent des cascades de signalisation, dont la voie de NFκB et l'inflammasome. Ces cascades vont pouvoir mener à la sécrétion de protéines (cytokines, interféron) et à l'activation des cellules du système immunitaire inné représentées par les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes NK et les cellules dendritiques. Les protéines telles que le TNFα, certaines interleukines ainsi que l'interféron ont un rôle de signalisation et vont notamment permettre la régulation de la réponse immunitaire innée. Les globules blancs vont participer à la destruction

directe des pathogènes. Les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes NK sont également des interfaces avec le système immunitaire adaptatif et vont jouer un rôle dans l'activation de la réponse adaptative.

Le système du complément représente enfin un acteur à part entière du système immunitaire inné qui ne sera pas détaillé ici.

1.1.2.2. Inflammasomes et NLR

L'inflammasome est une plateforme moléculaire décrite pour la première fois par Martinon et al. en 2002 (16). Le rôle de cette structure est de permettre le recrutement et l'activation des caspases inflammatoires dont l'activité protéolytique permet le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β et sa libération. L'inflammasome est également impliqué dans la sécrétion d'autres cytokines, notamment l'IL-18, et constitue donc un élément central de la réponse inflammatoire innée.

Un des constituants principaux de l'inflammasome sont les NLR, ou NOD-like récepteurs. Les NLR sont des protéines composées pour la plupart de 3 domaines distincts :

- Un domaine C-terminal composé de répétitions riches en leucine (LRR). Il s'agit du domaine responsable de l'activation des NLR en réponse à leurs signaux activateurs ou régulateurs.
- Un domaine central NACHT (ou NOD) qui permet la dimérisation ou l'oligomérisation des NLR
- Un domaine effecteur N-terminal qui varie selon les NLR. La plupart des NLR possèdent un domaine pyrine en N-terminal (17).

Sous l'effet de signaux activateurs, les NLR vont s'assembler et, via le recrutement d'autres protéines que sont l'ASC (protéine adaptatrice) et les caspases (le plus souvent la caspase 1, parfois la caspase 5) vont former un complexe formé de plusieurs protéines : l'inflammasome

Les inflammasomes les plus étudiés sont les inflammasomes NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2. Mais d'autres inflammasomes ont été décrits: IFI16, NLRP6, NLRP7, NLRP12 et NLRC5.

Depuis sa description initiale, l'inflammasome a été impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-inflammatoires et métaboliques humaines mais également dans certains cancers et dans les mécanismes de défense contre les infections bactériennes et fongiques (18–22).

1.1.2.3. Inflammasome NLRP3 et cryopyrinopathies

L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié et représente donc souvent le modèle utilisé pour décrire les inflammasomes, leur fonctionnement et leur régulation.

Les mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3 sont complexes. Son fonctionnement requiert d'abord un premier signal d'amorçage (*priming*) représenté généralement par un PAMP comme le LPS ou par certaines cytokines (TNF α , IL-1). Ce premier signal va, via la voie NF κ B, va permettre la transcription de NLRP3 et de pro-IL-1 β qui sont présents en faible quantité à l'état basal dans les cellules. Il va également être à l'origine de modification post transcriptionnelle de NLRP3 (dubiquitination) (23).

Le second signal est un signal pouvant être déclenché par une grande variété de PAMP ou DAMP (ATP extra cellulaire, ARN virale ou encore toxines). Ces signaux sont à l'origine d'une cascade d'événements intra cellulaires mêlant flux ioniques (notamment un efflux de potassium et une mobilisation du calcium intra cellulaire), dysfonction mitochondriale entraînant une augmentation des ROS et dommages lysosomaux (24). Ce signal d'activation va mener à l'assemblage de l'inflammasome. Pour cela, NLRP3 recrute, via son domaine pyrine N-terminal une molécule adaptatrice, ASC (*CARD-containing adaptor*), permettant ensuite le recrutement de la pro-caspase-1 (25). Ce complexe trimérique va ensuite s'oligomériser. La pro-caspase-1 est alors clivée en caspase-1, sa forme active, qui est alors capable de cliver la pro-IL-1 et la pro-IL-18 en IL-1 et IL-18 qui vont être relargués dans le milieu extra cellulaire. L'assemblage de l'inflammasome est représenté dans la figure 3.

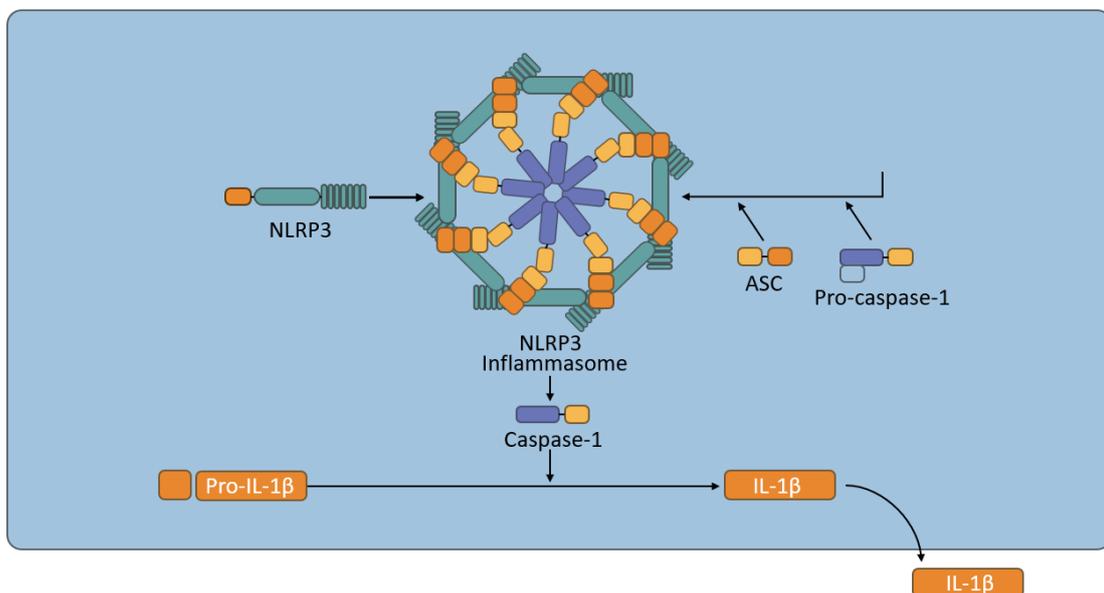


Figure 3. – **Schématisme de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 après le second signal d'activation.** La pro-IL-1 et NLRP3 sont présents en faible quantité à l'état basal dans les cellules. Le premier signal permet de déclencher leur transcription et d'augmenter leur quantité en intracellulaire. Le second signal permet le recrutement de plusieurs NLRP3 qui s'oligomérisent via leurs domaines NOD et de l'ASC qui agit comme une molécule adaptatrice en recrutant, par son domaine pyrine, NLRP3 et, par son domaine CARD, la pro-caspase-1. Une fois l'inflammasome formé, la pro-caspase-1 recrutée va être clivée en caspase-1, sa forme active, et va ensuite pouvoir cliver la pro-IL-1 en IL-1 active.

Les mutations de *NLRP3* entraînent généralement une activation constitutionnelle de sa capacité à former un inflammasome menant à un excès de sécrétion d'IL-1 β à l'origine des manifestations cliniques et biologiques observées dans les CAPS (26).

Les cryopyrinopathies ou CAPS font partie des maladies auto-inflammatoires. Les CAPS ont la particularité de présenter un spectre de manifestations cliniques plus ou moins sévères. Il s'agit de l'urticaire familiale au froid (FCAS, la forme la plus simple), du syndrome de Muckle-Wells (MWS, la forme intermédiaire) et du syndrome CINCA, aussi décrit sous le nom de NOMID (pour syndrome neurologique et cutané-articulaire chronique infantile chronique ou maladie inflammatoire multi systémique à début néonatal, qui représente la forme la plus sévère de CAPS). Les caractéristiques cliniques de ces maladies sont décrites dans la figure 4 (27). Les patients porteurs de CAPS présentent, entre autres, une hyper-sécrétion d'IL-1 et sont donc très sensibles au traitement par anti-IL-1 (Anakinra et Canakinumab). Ces traitements ciblés ont transformé le pronostic de ces maladies et ont considérablement amélioré la qualité de vie des patients.

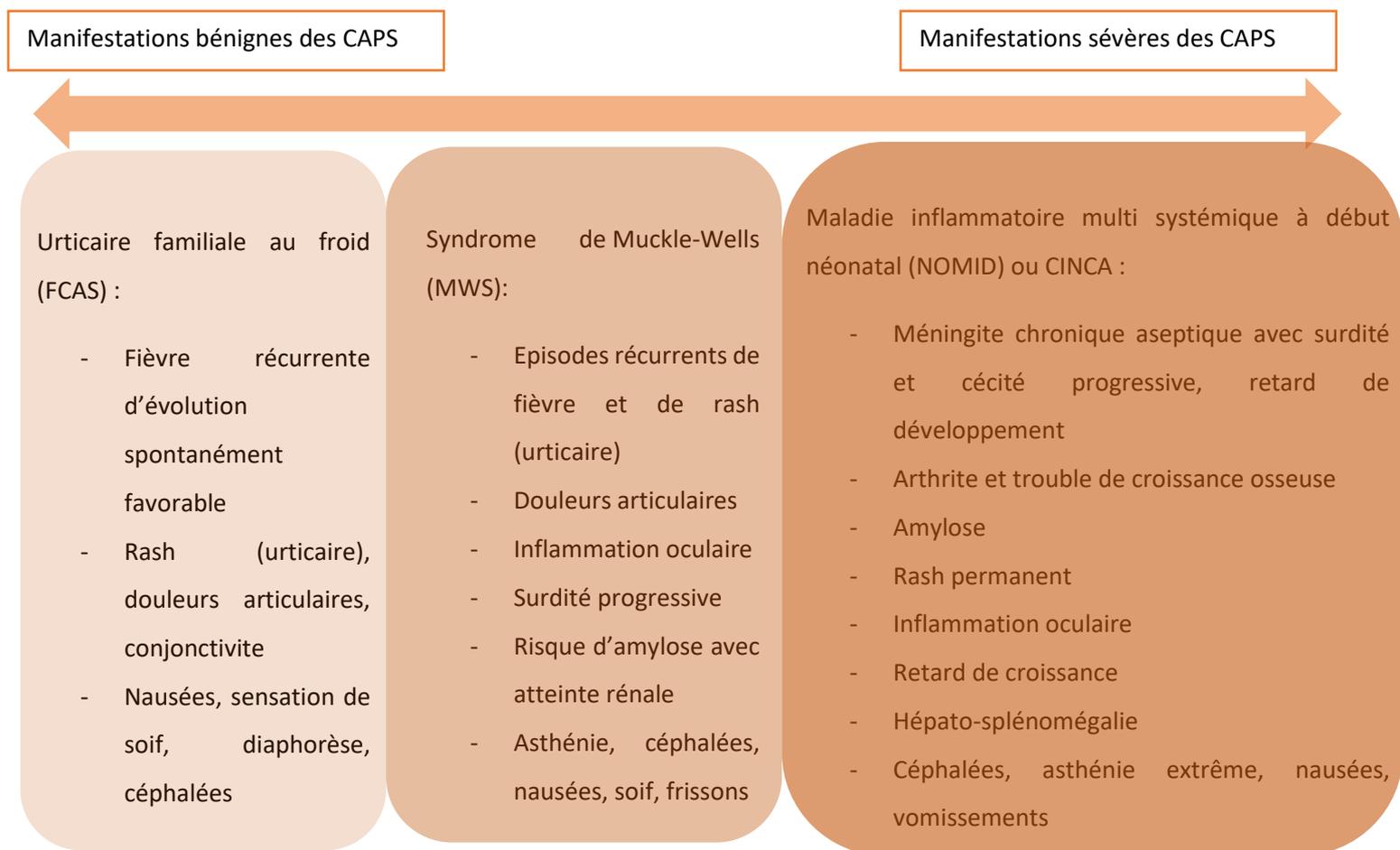


Figure 4. – **Manifestations cliniques des CAPS.** *L'urticaire familial au froid* représente la forme bénigne du spectre des CAPS et ne requiert généralement pas de traitement. A l'opposé, les patients pr sentsnt un CINCA ont un pronostic fonctionnel, et notamment neurologique, sévère et n ecessitent un traitement au long cours par anti-IL-1. Adapté de <https://www.autoinflammatorydiseases.com/cryopyrin-associated-periodic-syndromes>

1.2. NLRP12 – Aspects physiopathologiques

1.2.1. Principales caractéristiques

NLRP12 (ou Monarch-1 ou PYPAF7) appartient à la grande famille des NLR décrite ci-dessus. Il a été identifié pour la première fois par l'équipe de Wang et al. en 2002 (28). Le gène codant pour *NLRP12* est localisé en 19q13.42. Son transcrit à une taille de 3 kb lui-même traduit en une protéine formée de 1061 acides aminés (29).

NLRP12 possède la structure classique des protéines de sa famille, à savoir un domaine C-terminal composé de 12 répétitions riches en leucine, un domaine central fonctionnel NACHT et un domaine pyrine N-terminal.

A l'état basal, NLRP12 est principalement exprimée dans les cellules du système immunitaire inné et notamment dans les monocytes/macrophages, éosinophiles et polynucléaires neutrophiles. Tout comme NLRP3, il est probable que l'expression basale de NLRP12 dans les cellules soit faible et que cette expression augmente secondairement à certains stimulus immunitaires.

1.2.2. Rôle de NLRP12 sur les voies canoniques et non canoniques de NFκB et sur la voie MAPK

Lors de sa description initiale par Wang et al., NLRP12 a été décrit comme un activateur de la voie NFκB lors de sa co-expression avec ASC, et ce de manière dose-dépendante (28). Par la suite, plusieurs études ont mené à des conclusions contraires et il est actuellement communément admis que NLRP12 est en fait un inhibiteur de la voie canonique et non-canonique de NFκB (30–46).

Les modèles *in vitro* ayant abouti à ces conclusions utilisent majoritairement des cellules de la lignée myéloïdes (macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires neutrophiles) dans lesquelles le gène *NLRP12* a été inactivé. Ces cellules *NLRP12* KO ont été soit prélevées directement à partir de souris *NLRP12* KO soit obtenues par méthode d'ARN interférant (shARN ou siARN) directement sur des cellules de lignée myéloïde humaine. *In vivo*, les souris sont exposées à divers agents infectieux (Salmonelle, VSV, Francisella tularensis, staphylocoque aureus, Pseudomonas aeruginosa, Influenza A) ou traitées afin de reproduire certaines maladies auto-immunes (colites induites au DSS mimant des maladies inflammatoires de l'intestin, obésité induite par HFD, carcinome hépatique induit par DEN,

modèle expérimental d'encéphalite auto-immune). Pour la stimulation des cellules *in vitro*, si celles-ci ne sont pas déjà activées par le protocole *in vivo*, certains auteurs ont utilisé des activateurs des cellules monocytaires en ciblant soit la voie du TNF soit les TLR (activation par Pam3Cys4, LPS ou Poly (I :C)).

Ces études ont permis de démontrer que NLRP12 empêche, dans la voie canonique de NFkB, l'hyperphosphorylation d'IRAK1 et son accumulation après la stimulation des TLR menant à une inhibition de cette voie. Dans la voie non canonique de NFkB, NLRP12 aurait un double effet inhibiteur puisqu'il est capable de s'associer avec NIK, entraînant sa dégradation immédiate par le protéasome et joue également un rôle sur TRAF3 qui est aussi impliqué dans la dégradation de NIK (47).

NLRP12 semble par ailleurs inhiber la voie MAPK en diminuant l'activation d'ERK et pourrait jouer un rôle dans le recrutement et la migration des polynucléaires neutrophiles aux sites d'infections bactériennes, virales et parasitaires.

Chez les souris *NLRP12* KO on observe, *in fine*, une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, et le TNF et une plus grande susceptibilité à certaines maladies inflammatoires (colites, obésité), à certains cancers (carcinome hépato-cellulaire) et à certaines infections.

Les effets de NLRP12 sur les voies canoniques et non canoniques de NFkB ainsi que sur la voie MAPK ont été résumés par Tuladhar et Kanneganti en 2020 (Figure 5) (47).

Si les modèles *in vivo* permettent de s'approcher au plus près de la réalité, leur utilisation est coûteuse et longue. A l'inverse, les modèles *in vitro* sont plus faciles à mettre en place mais restreignent les paramètres pouvant être étudiés. Par ailleurs, les modes d'activation et de régulation de NLRP12 étant encore mal connus à l'heure actuelle, la validité des modèles utilisés *in vitro* doit toujours être interprétée avec précaution. La difficulté de l'étude de NLRP12 est notamment mise en avant par le fait que toutes les recherches existantes se basent sur des modèles différents ce qui rend difficile leur comparaison et leur reproductibilité.

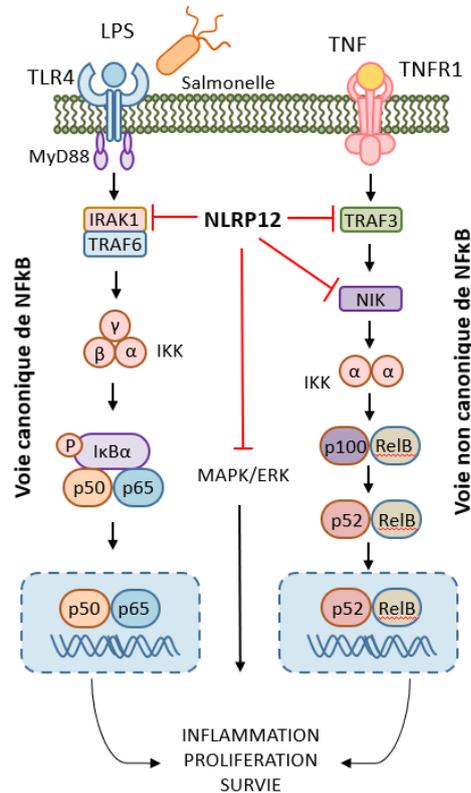


Figure 5. – **Régulation des voies canoniques et non canoniques de NFκB par NLRP12.** Sur la voie canonique de NFκB, NLRP12 inhibe IRAK1 en empêchant son hyperphosphorylation et son accumulation après stimulation des TLR. Au niveau de la voie non-canonique de NFκB, NLRP12 interagit d'une part avec NIK, entraînant sa dégradation au niveau du protéasome et d'autre part avec TRAF3 qui a un rôle dans la dégradation de NIK. Enfin, NLRP12 entraîne une régulation de la signalisation MAPK/ERK en inhibant la phosphorylation de p50, JNK et p38. Adapté de Tuladhar et Kammeganti (46).

1.2.3. NLRP12 et inflammasome

Dans leur article initial décrivant NLRP12, Wang al. avaient mis en évidence que la co-expression de NLRP12 et ASC entraînait leur colocalisation au niveau nucléaire, menait à une activation de la voie NFκB et à une sécrétion d'IL-1β. Cette sécrétion requérait la présence de caspase-1 qui interagissait avec ASC via leurs domaines CARD (28).

En 2012, Vladimer et al. ont montré que NLRP12 était capable de former un inflammasome en réponse à une infection par *Yersinia* et qu'en l'absence de NLRP12, la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 était diminuée mais non abolie, suggérant une certaine redondance entre les différents inflammasomes (48). Ataïde et al. ont également montré une activation de la caspase-1 dépendante de l'ASC et de l'expression concomitante de NLRP3 et NLRP12 dans l'infection à *Plasmodium chabaudi* (49).

A l'image de NLRP3, NLRC4 et AIM2, NLRP12 serait donc également capable, dans certaines situations et en réponse à un ou des ligand(s) encore inconnu(s), de former un inflammasome permettant la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 et le contrôle de certaines infections (22) (Figure 6).

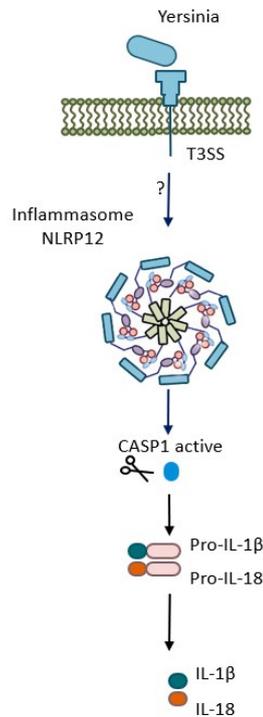


Figure 6. – **Formation d'un inflammasome par NLRP12.** NLRP12 recrute ASC par une interaction de leurs domaines pyrine. ASC permet ensuite le recrutement de la procaspase-1 par une interaction de leurs domaines CARD. L'oligomérisation de ce complexe trimérique permet le clivage de la procaspase-1 en caspase-1, qui clive ensuite la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en leur forme active (IL-1 β et IL-18). Adapté de Tuladhar et Kammeganti (46).

La fonction de NLRP12 reste donc encore mal connue. Une meilleure compréhension de son fonctionnement permettrait notamment de proposer aux patients atteint d'une maladie liée à NLRP12 des traitements plus ciblés.

1.2.4. Dualité de NLRP12

La diversité des modèles utilisés et les nombreux paramètres à prendre en compte lors de l'étude de NLRP12 rendent bien compte de la complexité de son étude. Le rôle de NLRP12 reste encore aujourd'hui controversé, opposant son rôle anti-inflammatoire par inhibition des voies canoniques et non canoniques de NF κ B à son rôle pro-inflammatoire par sa capacité supposée à former un inflammasome (47,50). Son ligand étant à ce jour encore inconnu, un rôle différentiel selon le type de stimulation auquel il est soumis a été évoqué (50).

En 2018, Gharagozloo et al. ont réussi à modéliser cette dualité dans un modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) (51). Dans cette étude, des souris Wild-type (WT) ou *NLRP12* KO étaient traitées par injection de MOG (qui sont des protéines de myéline) et de *mycobacterium* ce qui déclenchait expérimentalement une encéphalite auto-immune (Figure 7). Tel qu'attendu dans le cas d'un rôle anti-inflammatoire de NLRP12, les souris *NLRP12* KO ont développé des encéphalites auto-immunes plus sévères et plus précoces que les souris WT. Les auteurs ont toutefois noté que les souris *NLRP12* KO présentaient des encéphalites auto-immunes typiques contrairement à une autre étude similaire dans laquelle les encéphalites auto-immunes décrites étaient atypiques (46).

L'équipe a ensuite croisé les souris *NLRP12* KO ou WT avec des souris 2D2 qui sont des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique des MOG et donc capable d'induire, après croisement, le développement spontané d'encéphalites auto-immunes sans stimulation immunitaire externe. Dans ce modèle les souris *NLRP12* KO semblaient être protégées contre le développement d'encéphalite auto-immune, en contradiction avec les résultats du premier modèle (Figure 7).

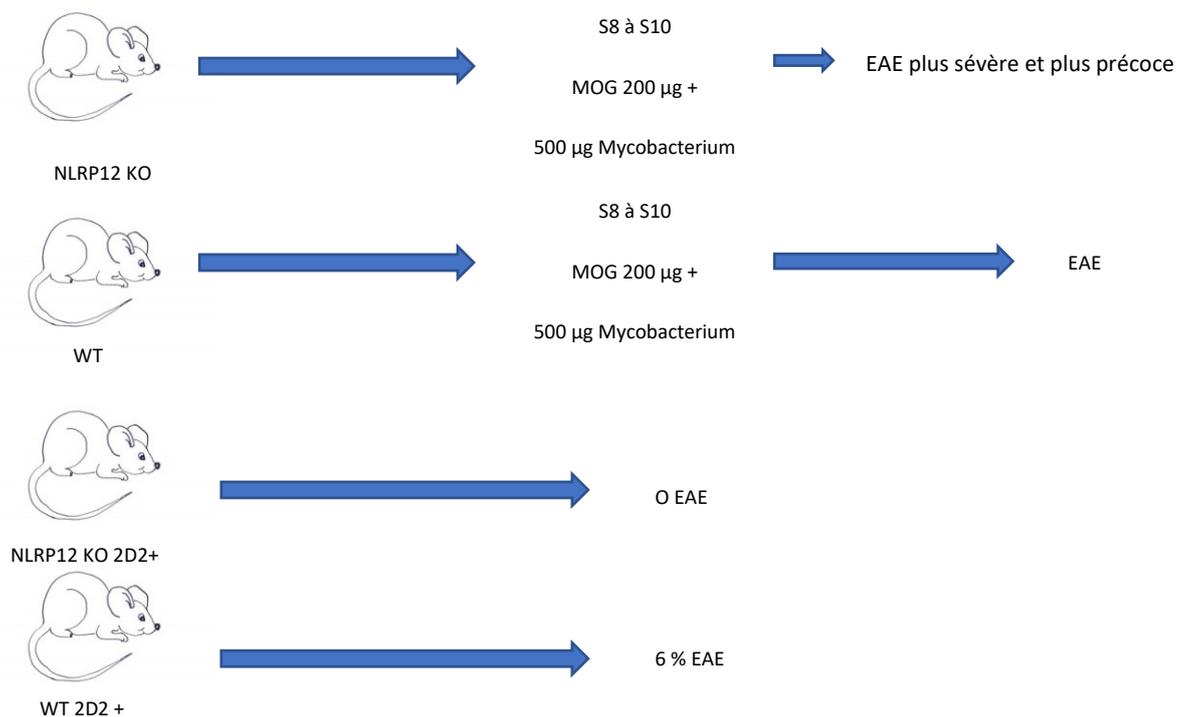


Figure 7. – **Rôle de NLRP12 dans l'encéphalite auto-immune expérimentale.** Dans le modèle de déclenchement de l'encéphalite auto-immune par injection de MOG et de Mycobacterium, les souris déficitaires en NLRP12 présentent une atteinte plus sévère et plus précoce. A l'inverse, les souris 2D2, qui développent spontanément des encéphalites auto-immunes, semblent protéger de la maladie en l'absence de NLRP12. Résumé du protocole expérimental de Gharagozloo et al. (50).

Dans ce modèle, les auteurs se sont intéressés au rôle de NLRP12 dans la réponse T-spécifique qui semble être un régulateur négatif de cette réponse. Ce rôle a été montré *in vivo* dans les souris *NLRP12* KO qui présentent une réponse T hyper-inflammatoire à l'immunisation antigénique en parallèle d'une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires traditionnelles (IL-6, TNF α). Cette hypothèse a été confirmée par le transfert adoptif de lymphocytes T naifs *NLRP12* KO dans des souris immunodéficientes qui sont alors capables d'induire des manifestations cliniques liées à des dérégulations de la réponse T (colites, dermatite atopique). Ces mécanismes sont sous-tendus par un excès d'activation de la voie NF κ B dans les lymphocytes T et par un excès de production d'IL-4 (46). Dans leur étude, Gharagozloo et al. expliquent ces résultats par la capacité de NLRP12 à inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Suite à ces résultats contradictoires, les auteurs ont proposé une nouvelle hypothèse, résumée dans la figure 8 : le comportement de NLRP12 serait dépendant de l'intensité de la stimulation immunitaire. En cas de stimulation immunitaire importante (comme dans le cas de l'encéphalite auto-immune déclenchée par l'injection de MOG et de *mycobacterium*), NLRP12 jouerait un rôle anti-inflammatoire. Son absence mènerait donc à des signes cliniques exacerbés. A l'inverse, en cas de stimulation immunitaire peu importante (comme dans le cas des souris croisées avec les souris 2D2 qui développent spontanément des encéphalites auto-immunes), NLRP12 serait pro-inflammatoire et son absence serait alors protectrice contre les manifestations inflammatoires. Enfin, en zones intermédiaires, cette dualité pourrait mener à des manifestations inflammatoires atypiques. Cette dernière suggestion est tirée de la comparaison des résultats de l'étude de Gharagozloo et al. avec celle de Lukens et al. qui utilisait des doses plus faibles de MOG (100 μ g) pour induire les EAE et avait montré une plus grande susceptibilité aux symptômes neuro-inflammatoires chez les souris *NLRP12* KO mais avec des tableaux atypiques (troubles de l'équilibre et ataxie) (46,51).

Stimulation immunologique	Faible	Moyenne	Forte
Type de stimulation	Absence d'immunisation (EAE spontanée)	Immunisation (Faible dose)	Immunisation (Forte dose)
Signes cliniques d'EAE chez les souris <i>NLRP12</i> ^{-/-}	Aucuns	Atypiques	Sévères
Activité immunorégulatrice de <i>NLRP12</i>	Inflammatoire	Inflammatoire/Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire

Figure 8. – **Rôle de NLRP12 selon l'intensité de la stimulation inflammatoire.** *En contexte de stimulation immunologique faible, comme dans le modèle de croisement des souris du protocole avec les souris 2D2, NLRP12 semble pro-inflammatoire puisqu'en son absence, les souris ne développent pas d'encéphalite auto-immune. A l'inverse, lors d'une stimulation immunologique forte, représentée dans le protocole par l'injection de MOG et de mycobaterium, les souris NLRP12 KO déclarent des symptômes plus sévères, soutenant alors un rôle anti-inflammatoire de NLRP12 dans ces conditions. Enfin des stimulations d'intensité moyenne entraîneraient des tableaux intermédiaires, mêlant alors les deux facettes de NLRP12. Adapté de Gharagozloo et al. (50)*

Les études *in vivo* et *in vitro* sur le rôle de NLRP12 ont jusqu'à présent utilisé de nombreux modèles différents et la quasi-totalité d'entre elles n'ont pas été reproduites par d'autres équipes. Par conséquent, les résultats de ces études doivent tous être interprétés avec précaution et ce d'autant plus que le mode d'activation de NLRP12, son fonctionnement et sa régulation sont encore mal connus.

1.3. Syndrome périodique lié à NLRP12 (NAPS12 ou NLRP12-AD ou FCAS2)

1.3.1. Caractéristiques cliniques et épidémiologiques des patients

En 2008, l'équipe de Jérusalem et al. décrit 3 patients présentant un tableau clinique évocateur de CAPS (fièvre périodique déclenchée par l'exposition au froid, surdité de perception chez deux des patients et divers symptômes systémiques) mais sans mutation de *NLRP3* (52). En utilisant une approche de gène candidat, ils mettent pour la première fois en évidence deux mutations de *NLRP12* associées à une fièvre périodique héréditaire. En référence à l'urticaire familial au froid lié aux mutations de *NLRP3* (FCAS), on parle alors de FCAS2.

En 2011, en utilisant un modèle de surexpression des mutations de *NLRP12* identifiées chez 5 patients dans des HEK293T, la même équipe démontre que l'effet des mutations de *NLRP12* dans les fièvres périodiques peut mener soit à une inhibition de la voie NFκB soit à une activation de la caspase-1. Ils proposent alors la dénomination de maladie liée à *NLRP12* (*NLRP12-AD*) (53).

Depuis leur première description, plusieurs cas cliniques de *NLRP12-AD* ont été rapportés dans la littérature. Une première revue de littérature de Del Porto et al. en 2020 recensait 61 patients décrits dans la littérature (54). Une seconde revue de la littérature en 2022 par Wang et al. rapportait environ 80 cas dont 33 cas pédiatriques (55).

Si l'on se concentre sur les patients pédiatriques, l'âge de début des symptômes de la maladie est variable, entre 2 mois et 17 ans. On retrouve une histoire familiale dans moins de 20 % des cas. Contrairement à l'adulte, on retrouve chez l'enfant une prédominance féminine avec un ratio de 1:2 environ. Tous les patients présentent de la fièvre dont la durée (de quelques heures à 14 jours) et la fréquence (de toutes les semaines à tous les 3 mois) est variable. Le froid est décrit comme un facteur déclenchant des symptômes chez environ 1/3 des patients. On retrouve, associé à la fièvre, divers symptômes systémiques notamment, par ordre de fréquence, des atteintes articulaires (polyarthralgies/arthrites), des atteintes digestives (douleurs abdominales/diarrhées), une éruption cutanée (majoritairement de l'urticaire), des adénopathies ou une splénomégalie, des céphalées, une surdité ou encore une aphtose buccale.

De manière intéressante, seul 55 % des patients présentaient un syndrome inflammatoire biologique (VS ou CRP augmentée) lors des poussées de la maladie. Aucun marqueur biologique spécifique de la maladie n'a été identifié. Par ailleurs, certains patients présentaient des comorbidités compatibles avec un dérèglement du fonctionnement de l'immunité innée (maladie de Crohn, glomérulonéphrite à dépôt de C3, arthrite juvénile idiopathique, anémie hémolytique auto-immune, sensibilité aux infections).

Ces caractéristiques sont superposables à celles observées dans les cas rapportés chez l'adulte en dehors de la répartition entre les sexes, avec une prédominance féminine chez l'enfant. Les tableaux cliniques des patients sont donc peu spécifiques et il n'existe pas de critères diagnostiques validés pour cette maladie. Cela a pour conséquences de mener à une errance diagnostic et à des diagnostics tardifs, la plupart des patients diagnostiquées à l'âge adulte présentant des symptômes depuis l'enfance.

1.3.2. Évolution et traitements

Le caractère rare du syndrome périodique lié à NLRP12 (estimé à une fréquence de moins de 1/1 000 000) et sa description récente ne permet d'avoir qu'un aperçu limité de l'évolution de la maladie au long terme. La description de patients adultes symptomatiques et porteurs de mutations de *NLRP12* permet toutefois de penser que la maladie reste relativement bénigne avec peu de complications au long cours. Les symptômes semblent s'atténuer progressivement au cours de l'évolution de la maladie. Aucune complication spécifique n'a été décrite au long cours et il n'existe notamment aucun cas dans la littérature d'amylose AA, de syndrome d'activation macrophagique ou encore d'atteinte d'organe (56).

La physiopathologie de la maladie étant également mal comprise, il n'existe pas de consensus quant au traitement de la maladie. A cela s'ajoute une grande variabilité des symptômes et notamment des poussées de fréquence, de durée et de sévérité variable. Chez les patients peu sévères, l'utilisation d'anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) et d'antipyrétiques classiques au moment des poussées peut être suffisante (57). Les corticostéroïdes ont également montré une efficacité, souvent en cure courte (52,57–61). L'utilisation de colchicine n'a pas permis de mettre en rémission les patients (52,61).

Concernant l'usage des biothérapies chez les patients les plus sévères, l'hypothèse physiopathologique d'une augmentation de la production d'IL-1 liée aux mutations de *NLRP12* a mené à l'utilisation d'inhibiteur du récepteur à l'IL-1 β (Anakinra – 4 patients) et d'un inhibiteur de l'IL-1 β (Canakinumab – 2 patients), largement utilisés et validés dans le traitement des CAPS. Cinq patients sont entrés en rémission complète (57,62,63). Deux patients ont présenté une rechute à un peu plus d'un an du traitement (63). Le dernier patient a présenté une rémission partielle sous traitement (58). L'utilisation des anti-TNF n'est rapportée qu'une fois dans la littérature avec un effet partiel sur les symptômes (58).

Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de marqueur pronostique de l'évolution ou de la réponse au traitement pour ces patients. La mise en place de traitements immunosuppresseurs entraîne non seulement un risque d'effets secondaires mais a également un impact économique et psychologique sur les patients et leurs familles. Une meilleure compréhension de la maladie permettrait de proposer un traitement personnalisé à chaque patient en fonction de sa probabilité de réponse à certaines molécules.

1.3.3. Génétique

Le syndrome périodique lié à *NLRP12* est une maladie autosomique dominante à pénétrance incomplète et à expression variable.

La base de données Infever dénombre environ 80 mutations de *NLRP12* (associées à *NLRP12*-AD mais également à d'autres pathologies) décrites dans la littérature, dont une large majorité est située dans l'exon 3 qui code pour le domaine fonctionnel NACHT de la protéine (Figure 9). Il s'agit essentiellement de substitution. Quelques délétions et duplications ont été rapportées.

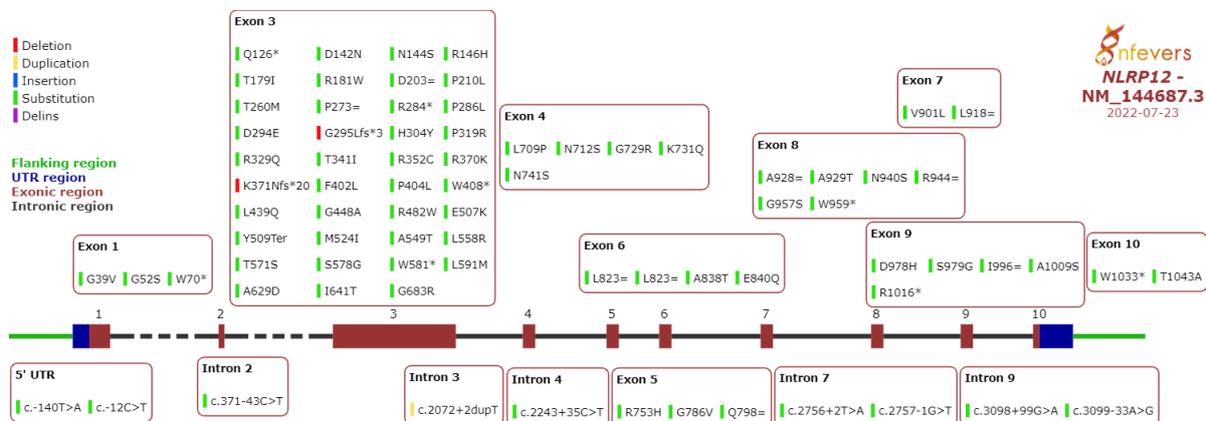


Figure 9. – Localisation et type de mutations de *NLRP12* rapportées dans la littérature. Environ 80 mutations ont été décrites dans la littérature. La majorité sont localisées dans l'exon 3 qui code pour le domaine fonctionnel de la protéine. Réalisé à partir de la base de données Infever en date du 23/07/2022

L'imputabilité de la maladie aux mutations de *NLRP12* reste aujourd'hui un des plus grands défis de cette maladie pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle *in vitro* fiable et validé permettant de tester la pathogénicité des mutations et leurs conséquences au niveau cellulaire.
- Lors des études familiales, un certain nombre d'apparenté étaient porteurs d'une mutation de *NLRP12* retrouvée chez le cas de princeps alors qu'ils étaient asymptomatiques ou présentaient des symptômes mineurs et peu spécifiques (54). Ceci pose alors la question de la pathogénicité de la mutation, d'une pénétrance incomplète ou de la présence d'autres facteurs modificateurs (génétiques ou environnementaux).

- A l'inverse, en l'absence de critères de diagnostics cliniques bien établis, il est probable qu'un certain nombre de patients ne bénéficient pas d'une recherche génétique susceptible d'identifier une mutation de *NLRP12*.
- Il n'existe aucune étude de corrélation entre le génotype des patients et leur phénotype, empêchant de définir des groupes de patients homogènes en fonction des conséquences physiopathologiques de leurs mutations.

1.3.4. Autres pathologies liées à NLRP12 dans la littérature

Depuis sa première description en 2002, NLRP12 a non seulement été impliqué dans la physiopathologie des maladies auto-inflammatoires mais son rôle a également été démontré dans la prévention des maladies inflammatoires de l'intestin, où il joue un rôle anti-inflammatoire, de maintien de l'homéostasie digestive et de régulation du microbiote, dans la prévention de l'obésité via un effet sur la résistance à l'insuline et sur l'inflammation du tissu adipeux et dans la prévention de certains cancers, notamment des carcinomes hépato-cellulaires par inhibition de la voie JNK et de l'expression de molécule pro-proliférative (35–37).

NLRP12 participe également à la défense de l'hôte contre différentes infections bactériennes et virales :

- via son effet sur la voie NFκB et sur le recrutement et la migration des polynucléaires neutrophiles à l'origine d'une survie des pathogènes et de leur persistance (33,39–45).
- Par sa capacité à former un inflammasome permettant alors une réponse inflammatoire augmentée à certains pathogènes. Il existe dans ce cas une probable redondance avec d'autres inflammasomes, notamment NLRP3 (48,49).

Enfin, NLRP12 joue un rôle dans les maladies médiées par les lymphocytes T comme l'encéphalite auto-immune en agissant comme un régulateur négatif de l'activation et de la prolifération de la réponse T spécifique (46,51).

Même si ses ligands sont encore inconnus, NLRP12 semble jouer un rôle central dans la régulation de l'immunité innée. Ses effets pro ou anti-inflammatoires pourraient dépendre du type de stimulation immunologique mais également de son intensité. Certaines études proposent également un rôle de NLRP12 dans certains aspects de la réponse immunitaire adaptative.

En conclusion, NLRP12 a un rôle anti-inflammatoire établi et participe à la prévention de certains cancers et de certaines maladies inflammatoires notamment les colites. Il joue par ailleurs un rôle dans la défense contre les micro-organismes et semble être capable de former un inflammasome

en réponse à certains stimulus ou à certaines intensités de stimulus. Il n'existe aujourd'hui aucun modèle validé et reproductible d'étude de NLRP12 dans la littérature.

1.4. Modification génique de cellules par CRISPR Cas9

La technique de CRISPR Cas 9 est une technique d'édition génique qui repose sur une technologie associant une enzyme (la Cas 9), qui est une endonucléase capable de réaliser une coupure double brin de l'ADN d'une cellule et un ARN guide (crARN ou sgARN) qui est une séquence complémentaire à l'ADN visé par la modification et qui va donc permettre de cibler précisément l'endroit de la coupure.

Le guide ARN est central dans la technique CRISPR. Sa séquence doit être soigneusement choisie afin de permettre un ciblage fiable et précis de la portion d'ADN à modifier pour éviter les effets hors-cible, c'est-à-dire la modification de l'ADN à un autre endroit que celui visé initialement. La séquence du guide ARN sélectionnée doit être relativement courtes (une vingtaine de nucléotides). Un programme tel que <http://crispor.tefor.net/> permet ensuite de s'assurer que la séquence sélectionnée n'apparaît qu'une fois dans le génome. La Cas 9, elle, reconnaît les motifs PAM au sein de l'ADN. Elle va alors ouvrir l'ADN. Si la séquence de l'ARN guide est complémentaire de l'ADN rendue accessible, la Cas 9 change alors de conformation pour pouvoir ensuite jouer son rôle d'endonucléase et entraîner une coupure double brin.

Après la coupure double brin, l'ADN va être réparé. En cas de recombinaison non-homologue, l'apparition de délétions ou d'insertions au sein du gène visé va créer des mutations aléatoires pouvant entraîner une interruption de la fonction de la protéine codée par le gène ciblé. Le CRISPR/Cas 9 permet donc de créer des cellules KO pour un gène donné. Ce KO est ensuite transmis lors de la prolifération des cellules. Aucune étude *in vitro* de NLRP12 n'a pour le moment utilisé cette technique.

Le principe de la modification génique par CRISPR/Cas 9 est résumé dans la figure 10.

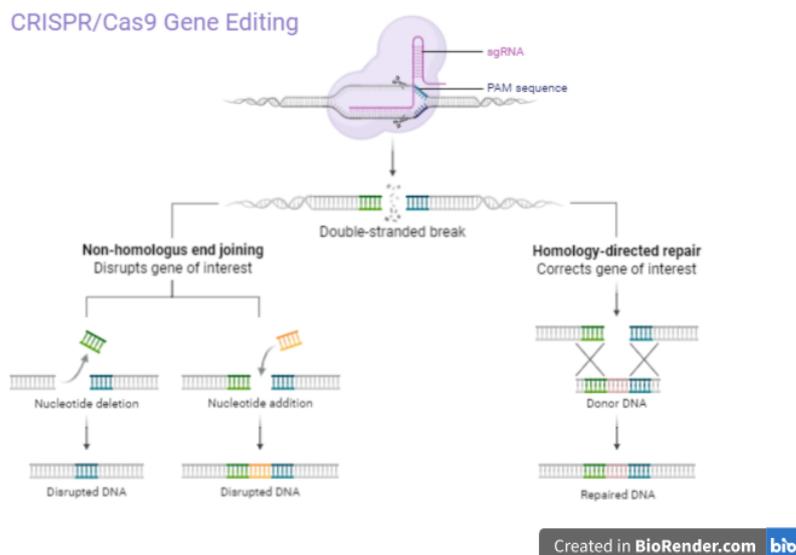


Figure 10. – **Principe de l'édition génique par CRISPR/Cas9.** L'ARN guide (ou sgARN) permet la reconnaissance de la séquence cible visée lors de l'édition génique. Il est couplé à la Cas 9 qui va venir créer une cassure double brin une fois la séquence cible reconnue par l'ARN guide. Les mécanismes cellulaires intrinsèques de réparation de l'ADN vont ensuite être mis en jeu. En cas de recombinaison non-homologue (NHEJ pour Non-homologous end joining), les deux extrémités de la coupure sont rattachées. Il s'agit d'un mécanisme rapide mais entraînant souvent des erreurs et donc des mutations (délétion et insertion) dans l'ADN cible pouvant mener à une perte de la fonction du gène visé. En cas de réparation par « homology-directed repair » (HDR), le second allèle est utilisé pour créer une réparation qui est alors plus fiable.

1.5. Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Le syndrome périodique lié à NLRP12 (NLRP12-AD) est donc une maladie auto-inflammatoire rare autosomique dominante à expression variable. Les patients atteints de cette pathologie présentent des fièvres récurrentes accompagnées de divers symptômes systémiques. Le tableau clinique de la maladie est peu spécifique et il n'existe pas de critères diagnostiques. Compte tenu de ces différents paramètres, l'imputabilité des mutations de *NLRP12* dans la maladie est parfois difficile à établir. Par ailleurs, il n'existe aucun consensus quant aux traitements à mettre en place chez ces patients.

La physiopathologie sous-tendant la maladie est encore mal comprise et débattue. La majorité des études *in vitro* et *in vivo* concluent à un effet anti-inflammatoire de NLRP12 via son rôle de régulation négatives des voies canoniques et non canoniques de NFκB. Toutefois certaines études ont, à l'inverse, démontré une capacité de NLRP12 à former un inflammasome et donc à avoir un effet pro-inflammatoire.

Notre hypothèse était que la création d'un modèle *in vitro* validé pour étudier les mutations de *NLRP12* permettrait :

- D'améliorer les performances et la fiabilité du diagnostic des patients présentant un phénotype de maladie auto-inflammatoire et porteurs de ces mutations
- De leur proposer des traitements adaptés et personnalisés
- De mieux comprendre le rôle de NLRP12.

Les objectifs de ce travail étaient :

- De créer un modèle *in vitro* permettant de mieux comprendre le rôle de NLRP12 sur :
 - La voie NFκB et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires
 - La formation d'un inflammasome NLRP12
- De décrire une cohorte nord-américaine de patients pédiatriques porteurs de mutations de *NLRP12*
- D'étudier les mutations des patients dans notre modèle et leur effet sur :
 - L'activation de NFκB et la sécrétion de cytokines inflammatoires
 - La formation d'un inflammasome NLRP12
- De déterminer s'il existe une corrélation génotype/phénotype/pathophysiologique

1.6. Données préliminaires et modification du modèle d'étude

Nous avons effectué en 2019 un travail préliminaire en utilisant un modèle de surexpression de NLRP12 dans des cellules HEK293T.

Brièvement, des cellules naïves HEK293T étaient transfectées avec trois vecteurs :

- Un vecteur d'expression contenant *NLRP12* précédé d'un promoteur fort et ubiquitaire
- Un vecteur d'expression contenant les protéines nécessaires à l'activation de la voie canonique (MyD88) ou non canonique (NIK) de NFκB, également précédé d'un promoteur fort et ubiquitaire
- Un vecteur rapporteur contenant NFκB marqué à la luciférase (NFκB-Luc)

La transfection de MyD88 ou de NIK permettait l'activation endogène de NFκB à l'origine de l'expression de la luciférase par notre vecteur rapporteur.

Lors de la mise au point de notre protocole nous avons réalisé des expériences dose-réponse afin de déterminer les quantités d'ADN plasmidique à utiliser afin d'obtenir un signal luciférase satisfaisant. Lors de la réalisation de cette optimisation nous avons mis en évidence un effet dose-réponse en trois temps avec une diminution du signal luciférase pour des faibles doses de NLRP12 sur les voies canoniques et non-canoniques de NFκB puis une augmentation du signal pour des doses

moyennes et à nouveau une diminution du signal (pouvant peut-être correspondre à une toxicité de l'activation de la voie NFκB sur les cellules bien que la survie cellulaire apparaissait similaire dans nos différentes expériences) (Figure 11).

Dans ce contexte, le choix d'une quantité de NLRP12 à transférer aurait été arbitraire et peu fiable, d'autant plus que la quantité physiologique de NLRP12 au sein des cellules n'est pas connu. Nous avons donc décidé d'abandonner ce modèle.

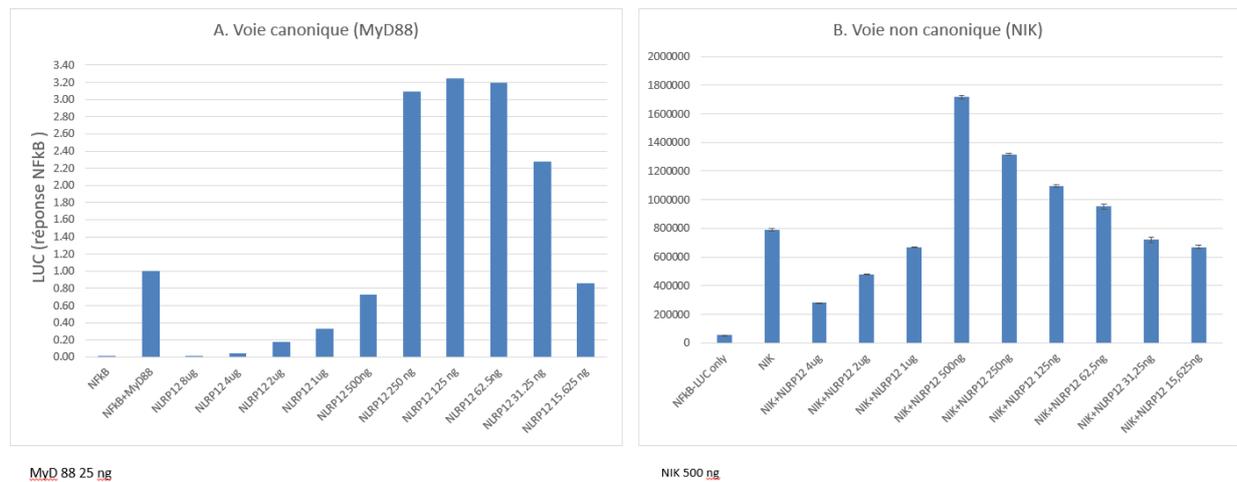


Figure 11. – **Essai rapporteur luciférase sous le contrôle de NFκB de l'activation de la voie canonique de NFκB (A) et de la voie non canonique de NFκB (B) selon des doses décroissantes de NLRP12.** **A.** Activation par des doses décroissantes d'ADN plasmidique de NLRP12 (8 μg à 15,625 ng, obtenues par dilutions successives) de la voie canonique de NFκB via MyD88 (25 ng d'ADN plasmidique) et analysée par l'intensité du signal luciférase. On note une diminution du signal aux extrêmes de la courbe (15,625 ng puis plus de 500 ng). Entre ces doses, NLRP12 augmente l'activité de la voie NFκB. **B.** Activation par des doses décroissantes d'ADN plasmidique de NLRP12 (4 μg à 15,625 ng) de la voie non-canonique de NFκB via NIK (500 ng d'ADN plasmidique). NLRP12 active cette voie entre 62,5 ng et 500 ng et la diminue en dehors de ces chiffres.

Ce résultat revêt tout de même son importance puisque ces modèles de surexpression sont les plus utilisés dans la littérature lors des expériences *in vitro* et les quantités de NLRP12 utilisées dans la littérature sont pour la plupart compris entre 1 et 2 μg soit à l'extrême de la courbe.

2. Matériels et méthodes

2.1. Recrutement des patients

Les critères d'inclusion des patients dans l'étude étaient les suivants :

- Patients âgés de moins de 18 ans au moment du recrutement
- Présentant des symptômes compatibles avec le diagnostic de NLRP12-AD, à savoir : fièvre et/ou rash cutané et/ou arthralgies et/ou myalgies et/ou symptômes digestifs (douleurs abdominales, diarrhées) et/ou symptômes neurologiques.
- Avec présence d'au moins une mutation, décrite ou non, dans *NLRP12*.

Les patients étaient exclus s'ils présentaient un diagnostic alternatif, notamment si les recherches génétiques mettaient en évidence la présence de mutation dans un gène de maladie auto-inflammatoire pouvant expliquer les symptômes.

La présence d'un syndrome inflammatoire biologique lors des poussées, de même que l'aspect périodique des symptômes n'ont pas été retenus comme critère d'inclusion du fait de la grande variabilité des tableaux rapportés dans la littérature.

L'étude a été validée par le comité d'éthique du CHU Sainte Justine (CER#3195).

Dans le cadre d'un partenariat de recherche, les patients correspondants à ces critères d'inclusions ont également été recrutés au sein du Texas Children's Hospital dans le service de Pédiatrie, par la Dr Tiphonie Phillips Vogel. Les mutations de ces patients ont donc été inclus dans le projet de recherche.

2.2. Réactifs, milieux et amorces

Le « Roswell Park Memorial Institute medium » (RPMI) – 1640, le « Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline » (D – PBS), le « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM), le « Minimal Essential Medium Opti » (Opti-MEM), le 2-mercaptoethanol, la blasticidine et le bleu de trypan ont été achetés chez Gibco. Le sérum de veau fœtal (FBS), la trypsine 0,05 % et la pénicilline / Streptomycine viennent de chez Multicell. La polyéthylèneimine (PEI) linéaire de masse moléculaire 25000 a été fourni par Polysciences Inc. Le « Phorbol 12-myristate 13-acetate » (PMA) a été acheté chez Sigma-Aldrich.

Les amorces ADN, la nucléase Cas9, l'ARN guide (crARN) et l'ARN transactivateur (TracrARN) ont été obtenus auprès d'IDT technologies.

Les amorces utilisées au cours des différentes expériences sont listées dans le tableau 1.

Tableau 1. – Liste des amorces utilisées pour les expériences d’amplification par PCR et RT-PCR, pour le clonage et pour le séquençage.

Nom	Séquence	Utilisation
NLRP12_Cut1	5' - /AltR1/rUrArG rUrCrC rCrUrG rUrArG rGrUrU -3'	CRISPR
NLRP12_E3F	5' – GCT GGA ACT ACA GGC ACA CA – 3'	PCR, séquençage
NLRP12_E3R	5' – CCA GCA TGG ACT TGC CTA TC – 3'	PCR, séquençage
NLRP12_E3R1	5' – AAG CTG TTA AGA AGC AGC TCC – 3'	PCR, séquençage
NLRP12_Fw1	5' – TAC TGA GTC GAC ATG CTA CGA ACC GCA GGC AGG – 3'	Clonage (amplification)
NLRP12_Fw2	5' – TCT TTA GCG GCC GCC ATG CTA CGA ACC GCA GGC AGG – 3'	Clonage (amplification)
NLRP12_Rv1	5'- GTC TAT GGT ACC GCA GCC AAT GTC CAA ATA AGG - 3'	Clonage (amplification)
NLRP12_Rv1a	5'- GTC TAT GGT ACC TCA GCA GCC AAT GTC CAA ATA AGG – 3'	Clonage
NLRP12_Rv2	5' – GAA TAG TCT AGA TCA GCA GCC AAT GTC CAA ATA AGG – 3'	Clonage (amplification)
PA2_Rv1.NLRP12	5' – CTT TGT GCG GCC GCG GAT CCA GGA CCG GGG TTT TC – 3'	Clonage (amplification)
PA2_Fw1.NLRP12	5' – AAC TCT GGT ACC GGC TCC GGC GCC ACG AAC – 3'	Clonage (amplification)
NLRP12_Fw1_RT_PCR	5' – AGA GGA CCT GGT GAG GGA TAC – 3'	RT-PCR, séquençage
pENTRseqFw	5' – GTT AGT TAC TTA AGC TCG GG – 3'	Séquençage
pENTRseqRv	5' – CCA GAG CTG CAG CTG GAT GG – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw1	5' – TCC TCA CTT GGG AAC CAG TC – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw2	5' – GGA TAG GCA AGT CCA TGC TG – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw3	5' – TCT TTG CTC ATC ACC ACA CG - 3'	Séquençage
NLRP12seqFw4	5' – CCC CCA CCC AAC CAG AGA – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw5	5' – AGG AGA CCA GGA GCC ACC – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw6	5' – TGT TGG TGC AGC TAC CAG AG – 3'	Séquençage
NLRP12seqFw7	5' – TGC AGA TGA TTC AGT TGA GGA -3'	Séquençage
NLRP12seqFw9	5' – TTG GGA TGG ACC TGA ATA AAA – 3'	Séquençage
NLRP12seqRv5	5' – CTT TGG ATC CAC TGC AAC AG -3'	Séquençage
NLRP12seqRv8	5' – AAC TCA AGT CCA GCT CCC G – 3'	Séquençage

2.3. Culture des cellules THP-1

La lignée cellulaire humaine monocytique dérivée de leucémie THP -1 provient de chez ATCC. Après décongélation, les cellules ont été mises en culture à une concentration de 2×10^5 cellules/mL dans du RPMI-1640 complété avec 10 % de FBS, 50 U/mL de pénicilline, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine et 0,05 mM de 2-mercapto-ethanol. Une fois en expansion, les cellules ont été maintenues dans des flasques T75 avec 20 mL de milieu à 37 °C avec 5 % de CO₂. Le milieu a été changé deux fois par semaine.

2.4. Modification génique des THP-1 par CRISPR Cas9

Pour réaliser nos cellules KO, nous avons choisi de cibler l'exon 3 de *NLRP12* car il s'agit de l'exon qui code pour le domaine fonctionnel de la protéine, le domaine NACHT. Par ailleurs, la majorité des patients décrits dans la littérature ont une mutation dans l'exon 3 de *NLRP12*.

Nous avons utilisé une approche de recombinaison non-homologue (*non-homologous end joining* dans la figure 10) afin de créer une modification suffisamment importante de la séquence de l'exon 3 de *NLRP12* pour rendre toute la protéine non fonctionnelle.

2.4.1. Protocole d'édition génique de *NLRP12* par CRISPR/Cas9

La séquence du crARN (Tableau 1 ; *NLRP12_Cut1*) a été créée grâce aux logiciels E-CRIPSR Design et CRISPOR. Le site cible de clivage de la Cas9 est représenté dans l'annexe 1. Le jour de l'édition génique, crARN et tracrARN ont été reconstitués à 200 μM selon les instructions du fournisseur (IDT). Un volume de 1,25 μL de chacun a été utilisé pour former un complexe de crARN/tracrARN en incubant à 95 °C pendant 5 min. Après refroidissement, le complexe Cr/tracrARN a été mélangé à 100 pmol (1,6 μL) de Cas9 dans un volume total de 5 μL (volume ajusté avec du PBS) et incubé pendant 20 min à température ambiante.

Les THP-1 sauvages utilisées pour l'édition génique ont été passées la veille de l'électroporation afin de s'assurer qu'elles soient en expansion. Le jour de l'expansion, 5×10^5 cellules ont été centrifugées, lavées deux fois au PBS puis une fois à l'Optimem et ont été ensuite resuspendues dans 95 μL d'Optimem.

Les cellules ont été mélangées avec le complexe ARN/Cas9. Pour permettre la pénétration du complexe dans le noyau des cellules, celles-ci ont été électroporées à l'aide du Gene Pulser Xcell Total System de Bio-Rad avec les paramètres suivants : 1200 V pendant 0,2 ms.

2.4.2. Culture et entretien

Immédiatement après l'électroporation, les cellules ont été transférées dans des plaques de 6 puits avec 3 mL du milieu de culture décrit en 2.3. Après 24 h, les cellules ont été comptées puis nous avons réalisé un clonage par dilution : 100 cellules ont été diluées dans 10 mL de milieu de culture. Nous avons ensuite choisi de disposer 100 μ L (soit l'équivalent de 1 cellule) par puit dans une plaque de 96 puits. Il n'y a pas eu de triage préalable par cytométrie de flux.

Les cellules ont été ensuite laissées en croissance dans un incubateur pendant 3 semaines. Par la suite, 100 μ L de milieu ont été ajoutés pour un total de 200 μ L. 100 μ L de milieu ont ensuite été changés toutes les semaines.

Lorsque la croissance des cellules était suffisante, elles ont été transférées dans des plaques de 24 puits puis de 6 puits.

2.5. Validation du KO

2.5.1. Amplification par PCR de l'exon 3 de *NLRP12*

Afin de déterminer si la coupure avait bien eu lieu dans nos clones, nous avons amplifié l'exon 3 de *NLRP12* des différents clones obtenus après édition génique ainsi que celui des THP-1 sauvages. Les amorces utilisées pour l'amplification étaient NLRP12_E3F et NLRP12_E3R (Tableau 1) (fragment attendu de 480 bp). Nous avons ensuite changé ces amorces pour la paire suivante : NLRP12_E3F et NLRP12_E3R1 (Tableau 1) (fragment attendu de 723 bp). Ce changement d'amorce a été motivé par l'existence d'une bande secondaire gênant l'interprétation des données. Les autres combinaisons d'amorces ne permettaient pas d'obtenir un produit d'amplification suffisamment clair.

L'ADN génomique des cellules a été extrait à partir d'un à 2 millions de cellules, à l'aide de la trousse d'extraction d'ADN de Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit.

50 à 100 ng d'ADN et 12,5 μ L de Q5 Master Mix 2x (NEB) dans un volume total de réaction de 25 μ L ont été utilisés. Les cycles de PCR programmés dans le thermocycleur ProFlex PCR System de ThermoFisher Scientific étaient les suivants : 98 °C pendant 30 secondes suivi de 35 cycles d'amplification à 98 °C pendant 10 secondes, 62 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 20 secondes puis une extension d'amplification à 72 °C pendant 2 minutes.

Le produit de PCR obtenu a été vérifié sur gel d'agarose 1 % (90 à 100 V pendant 35 à 45 min) et purifié avec la trousse de purification d'ADN (Monarch PCR & DNA Cleanup Kit; NEB). La pureté et la concentration ont été déterminées à l'aide d'un appareil ND-1000 (Nanodrop). Les produits de PCR ont été directement séquencés avec les amorces d'amplification mentionnées ci-dessus.

2.5.2. Confirmation de l'édition génique : séquençage et test de clivage enzymatique des mésappariements

Afin de confirmer l'édition génique, nous avons réalisé deux tests complémentaires : tout d'abord le produit de PCR a été séquencé par Génome Québec en utilisant les paires d'amorces NLRP12_E3F et NLRP12_E3R (Tableau 1). Par ailleurs nous avons réalisé un test de clivage enzymatique de mésappariement à l'aide de l'endonucléase T7.

Le test de clivage enzymatique des mésappariements permet de reconnaître puis de cliver des ADN double brins présentant des bases mal appariées. L'ADN des PCR à analyser est dénaturé par chauffage à 95 °C puis refroidit lentement pour favoriser la formation d'hétéroduplex. L'adjonction d'une endonucléase au mélange va cliver les brins présentant un mésappariement. Le résultat est ensuite analysé par électrophorèse et la présence d'un mésappariement sera mis en évidence par l'existence de 3 bandes de taille différentes correspondant à l'ADN non mutée en homoduplex et aux deux fragments plus petits correspondants aux hétéroduplex clivés par l'endonucléase.

Pour réaliser ce test, 100 à 150 ng du produit de PCR de l'exon 3 de *NLRP12* de l'ADN sauvage et d'un clone ont été mélangés avec un tampon pour leur hybridation (kit commercial - NEB). La dénaturation puis l'hybridation a été faite dans un thermocycleur programmé pour les cycles suivants : 95 °C pendant 10 minutes puis 85 °C pendant 2 secondes puis 85 °C pendant 1 minutes puis 75 °C pendant 1 seconde puis 75 °C pendant 1 minute puis 65 °C pendant 1 seconde puis 65 °C pendant 1 minute et ainsi de suite jusqu'à 25 °C pendant 1 minute. Après l'hybridation, 1 UI de T7 endonucléase été ajoutée à la solution et l'ensemble été incubé à 37 °C pendant 30 à 60 minutes. On ajoutait ensuite 2 µL d'EDTA (0,25 mmol/L) pour arrêter la digestion et on analysait le résultat par migration du produit sur un gel d'agarose 1,5 % à 90 V pendant 30 à 45 min.

2.5.3. Extraction d'ARN et RT-PCR

Nous avons analysé l'ARN messager des clones d'intérêts sélectionnés après séquençage et test de clivage enzymatique des mésappariements. Pour ces clones, nous avons extrait l'ARN à partir de 2×10^6 cellules avec une trousse d'extraction d'ARN (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Le produit obtenu a ensuite été traité avec 1 μ L de DNase (DNase Free Kit DNase treatment & Removal, Invitrogen).

L'ARN extrait a été ensuite converti en ADN complémentaire (cADN) en utilisant la trousse de rétrotranscription (High Capacity cDNA RT Kit, Applied Biosystems) et en suivant les procédures du fabricant. Le mélange a été incubé dans un thermocycleur avec le programme suivant : 25 °C pendant 10 minutes puis 37 °C pendant 120 minutes puis 85 °C pendant 5 minutes.

Nous avons ensuite amplifié les exons 2 et 3 de l'ADN complémentaire obtenu en utilisant la paire d'amorce suivante : NLRP12_Fw1_RT_PCR et NLRP12_E3R (Tableau 1) avec le même protocole que celui décrit en 2.5.1. mais avec une température d'hybridation de 69 °C pendant 20 secondes. Le produit de RT-PCR ainsi obtenu a ensuite pu être migré sur gel d'agarose 1 % puis envoyé en séquençage à Génome Québec avec ces deux mêmes amorces. Afin d'éviter d'amplifier l'ADN génomique, les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN complémentaire permettaient d'amplifier les exons 2 et 3 et non seulement l'exon 3. En cas d'amplification d'ADN génomique, le produit obtenu avait une taille bien plus importante qu'attendu car il contenait le 2^e intron du gène, ce qui n'est pas le cas si il s'agit d'ADN complémentaire. Ce résultat était confirmé ensuite par séquençage.

L'analyse des résultats du séquençage s'est faite à l'aide du logiciel Snapgene.

2.6. Production des plasmides contenant les mutations de *NLRP12*

Nous avons commencé par produire des plasmides contenant des ADNc codant pour des protéines recombinantes en utilisant le système Gateway. Ces plasmides permettront par la suite la production de lentivirus avec un promoteur fort contenant nos mutations et l'intégration des mutations dans nos cellules cibles. Le plasmide de destination que nous avons utilisé pour ces expériences est le plasmide pHRSIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PCK.BSD (Figure 12A). Il s'agit d'un plasmide contenant de séquences d'intérêt notamment la séquence d'auto-inactivation (SIN) empêchant la création de virus se répliquant, une séquence d'ouverture de la chromatine (UCOE0.7), un promoteur

ubiquitaire SFFV, une séquence permettant l'entrée et l'expression du plasmide dans les bactéries *Escherichia Coli* (DEST) et qui contient les sites attR1 et attR2 qui permettront, par réaction de clonage LR, l'insertion de nos séquences d'intérêt au sein de ce plasmide, une séquence d'expression eucaryote (pCK) et un gène de résistance à la blastidicine (BSD). Les étapes du clonage sont représentées dans l'annexe 2.

Nous avons réalisé plusieurs étapes de digestion d'ADN, de ligation puis de transformation dans l'objectif d'obtenir comme produit final : pHRSIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PGK.BSD_hNLRP12WT_P2A_NLRP12WT (Figure 12B). Nous avons incorporé des ADN codants pour NLRP12 sauvage et pour le peptide P2A, flanqué des séquences attL1 et attL2. Le peptide P2A est un peptide auto clivant qui va permettre, au moment de la traduction, la séparation entre les deux protéines NLRP12 clonée (64). La plupart des patients présentant des mutations hétérozygotes, le projet initial était également de produire des plasmides contenant NLRP12 muté (en fonction des mutations des patients) séparé du NLRP12 sauvage par la séquence codant pour P2A. Cette étape n'a pas été faite par manque de temps sur le projet.

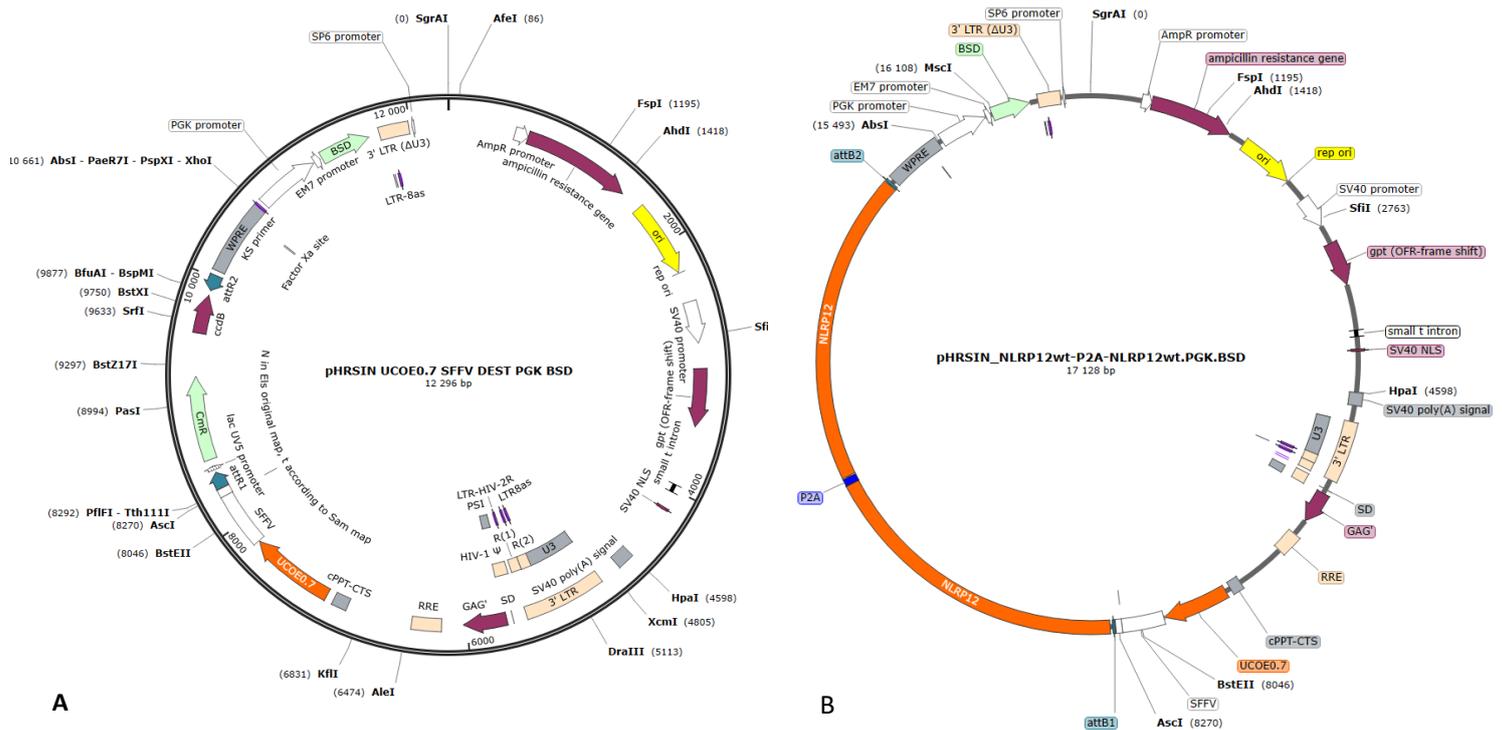


Figure 12. – Carte du plasmide initial utilisé pour le clonage de NLRP12 et du plasmide final contenant les deux séquences NLRP12 **A**. Carte du plasmide pHR SIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PCK.BSD utilisé pour le clonage de NLRP12 et contenant les sites attR1 et attR2. Ce plasmide contient notamment un gène de résistance à la blasticidine, utilisé par la suite pour la sélection des bactéries l’ayant incorporé, un promoteur fort (SFFV) et une séquence d’ouverture de la chromatine (UCOE0.7) **B**. Carte du plasmide final obtenu après les différentes étapes de clonage contenant deux séquences NLRP12 et la séquence codant pour le peptide P2A. Les sites attB1 et attB2 correspondent aux sites de ligation de la séquence d’intérêt, via ses sites attL1 et attL2, au sein du vecteur de destination aux sites attR1 et attR2. Dans ce plasmide, les deux séquences sont des séquences sauvages. Par la suite il sera possible de remplacer l’une des deux séquences par une séquence mutée et obtenir ainsi une construction hétérozygote s’approchant au plus près des conditions réelles retrouvées chez les patients.

L’intérêt de cette construction est, qu’une fois transduite dans les cellules, les deux gènes NLRP12 dépendront du même promoteur fort et devraient donc être transcrits puis traduits dans les mêmes proportions ce qui évitera d’avoir une surexpression de l’une des protéines par rapport à l’autre. Cela a essentiellement un intérêt pour les constructions hétérozygotes contenant un NLRP12 sauvage et un NLRP12 muté puisque la transduction de deux plasmides différents contenant chacun l’une des deux formes pourrait mener à l’insertion de la séquence en amont de promoteur plus ou moins fort et entraîner une différence de transcription des deux gènes. Cela mènerait à des biais dans

les observations faites par la suite. Cette construction nous permet donc d'être au plus proche des conditions réelles d'expression de NLRP12. Par ailleurs, elle permet de réaliser des constructions rapides des mutations des patients avec des contraintes limitées.

2.6.1. Clonage du plasmide pENTR4_NLRP12WT_P2A_NLRP12WT

Pour la production d'un plasmide d'amplification contenant deux NLRP12 séparés par une séquence codant pour le peptide P2A, nous avons tout d'abord amplifié par PCR :

- Le fragment d'ADN codant pour *NLRP12* WT en utilisant le plasmide codant pour la version sauvage de NLRP12 (pDEST-NLRP12WT (cloné précédemment au laboratoire)) comme matrice d'amplification en utilisant les amorces NLRP12_Fw1 et NLRP12_Rv1 (Tableau 1).
- Le fragment d'ADN contenant la séquence codant pour le peptide P2A à partir du plasmide pHUS_SH1dn_PCK_BSD (obtenu précédemment dans le laboratoire) en utilisant les amorces P2A_Fw1 NLRP12 et P2A_Rv1.NLRP12 (Tableau 1).
- A nouveau le fragment d'ADN codant pour *NLRP12* WT en utilisant le plasmide pDEST-NLRP12WT (cloné précédemment au laboratoire) en utilisant cette fois les amorces NLRP12_Fw2 et NLRP12_Rv2 (Tableau 1).

Le produit de PCR a été purifié et digéré par les enzymes de restriction suivantes :

- Sall et KpnI et sous-cloné dans le vecteur d'amplification pENTR4 par ligation pour donner naissance à la formation du plasmide pENTR4_NLRP12WT.
- KpnI et NotI et sous-cloné dans le plasmide pENTR4-NLRP12WT pour générer la construction pENTR4_NLRP12WT_P2A.
- NotI et XbaI et sous-cloné dans le plasmide pENTR4-NLRP12WT_P2A pour générer la construction pENTR4_NLRP12WT_P2A_NLRP12WT

Le résumé des différentes étapes de clonage est présenté dans l'annexe 2.

La réaction de ligation a consisté en un mélange de l'ADN d'intérêt digéré et du plasmide pENTR4 préalablement digéré par des enzymes Sall et KpnI (puis KpnI et NotI puis NotI et XbaI) en présence de 1 µL de T4 DNA ligase (NEB) (600 U/µL) et de 10 µL de tampon de ligation rapide (NEB) dans un volume final de 20 µL. Après incubation à 4 °C pendant la nuit, un volume de 2 µL du produit de ligation a été utilisé dans la transformation de bactérie STBL3 compétentes. Brièvement, 30 à 50 µL de bactéries congelées à -80 °C ont été mélangées à 50 ng de plasmide purifié, incubées sur glace pendant 30 minutes puis chauffées à 42 °C pendant 45 secondes avant d'être remises sur glace

pendant 2 minutes. Le mélange a ensuite été incubé pendant 1 h à 37 °C avec du milieu SOC puis 50 à 100 µL de ce mélange a été disposé sur des plaques d'agar avant d'être laissé à 37 °C pour la nuit.

L'extraction de l'ADN des colonies de bactéries sélectionnées sous l'action de la kanamycine a été faite avec la trousse d'extraction d'ADN (MiniPrep DNAKit; Qiagen). L'ADN obtenu a été digéré avec les enzymes de restriction Sall et KpnI (pour vérifier la présence du fragment d'ADN de *NLRP12*), KpnI et NotI (pour vérifier la présence du peptide P2A) et NotI et XbaI (pour vérifier la présence du deuxième fragment de *NLRP12*) et vérifié sur gel d'électrophorèse.

Par la suite, l'ADN a été séquencé pour confirmer la séquence native de cet ADN avec les amorces pENTRseqFw, pENTRseqRv, NLRP12seqFw1, NLRP12seqFw2, NLRP12seqFw3, NLRP12seqFw4, NLRP12seqFw5, NLRP12seqFw6, NLRP12seqFw7, NLRP12seqFw9 NLRP12seqRv5 et NLRP12seqRv8 (Tableau 1).

2.6.2. Clonage du plasmide pENTR4_NLRP12WT_P2A dans un plasmide d'expression.

Les NLRP12 en tandem obtenus dans le plasmide pENTR4 ont été par la suite transférés dans un vecteur d'expression permettant la production de particules lentivirales : le plasmide pHRSIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PKG.BSD (Figure 12A). Ceci a été fait par recombinaison à l'aide d'une trousse « Gateway LR clonase Enzyme Mix » (Thermo Fisher Scientific).

La réaction de recombinaison a été effectuée à partir de 2 µL LR clonase Enzyme Mix, 1 µL (50 ng) de pENTR4_NLRP12WT_P2A_NLRP12WT, 1 µL (150 ng) du plasmide d'expression (pHRSIN.CUE0.7.SFFV.DEST.PKG.BSD) et 6 µL du tampon TE. Après 1 h d'incubation à 25 °C, 1 µL de protéinase K a été ajoutée au mélange, et la réaction s'est poursuivie à 37 °C pendant 10 minutes.

Après cette incubation, un volume de 2 µL a été utilisé dans la transformation des bactérie STBL3. Les colonies de bactéries sélectionnées par ampicilline ont été utilisées pour la production de l'ADN de pHUS.DEST_NLRP12WT_P2A_NLRP12WT. Le résumé des différentes étapes de clonage est présenté dans l'annexe 2.

L'ADN obtenu a été digéré avec les enzymes de restriction, Sall et KpnI pour la présence du premier NLRP12WT, KpnI et NotI pour la séquence codant pour le peptide P2A et NotI et XbaI pour le deuxième fragment de NLRP12 dans la construction finale.

L'ADN a été ensuite séquencé. Une fois séquencé, un clone présentant la séquence attendue a été sélectionné pour réaliser des Maxi-Prep (Invitrogen) et le plasmide a été utilisé pour la suite des expériences. Les plasmides obtenus ont été conservés à -20 °C.

2.7. Production virale

Quarante-huit heures avant le début de la production (J0), 5×10^6 cellules 293T ont été mises en culture sur des plaques de 150 mm de diamètre dans du DMEM supplémenté avec 10 % de FBS et de la pénicilline/streptomycine.

Au bout de 48 h (J1), les cellules ont été comptées et remises en culture dans du milieu DMEM10 à une densité de $2,4 \times 10^6$ cellules dans 7 mL sur des plaques de 100 mm. Pour chaque production virale, 10 plaques ont été utilisées.

La transfection était faite après 24 h d'expansion (J2). Le but est de faire pénétrer, dans des cellules HEK 293T, l'ADN d'intérêt contenu dans les plasmides de transfert produits précédemment. Cette transfection est possible grâce à l'adjonction d'un vecteur de transfection, le PEI, qui va permettre l'entrée de l'ADN dans les cellules. L'ADN va être intégré dans le génome de la cellule hôte. Il va ensuite être transcrit puis traduit par la machinerie de la cellule et être relargué au sein d'un virus dans le milieu extra-cellulaire. L'ADN nécessaire à la production du virus est amené également par transfection par des plasmides d'enveloppe et d'encapsulation.

Après vérification visuelle de la viabilité et de la confluence des cellules (70-80 %), nous avons réparti sur les HEK 293T en culture un mélange de deux solutions. Les deux mélanges ont été faits dans l'OptiMem et ont ensuite été combinés et incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Le premier contenait le plasmide d'intérêt, l'enveloppe du virus (lentivirus) (pMD2_VSV-G; Addgene) et le plasmide d'encapsulation Pax2 (PsPAX2; Addgene) préalablement produits par MaxiPrep. Le second contenait la polyéthylèneimine (PEI). Après 24 h d'incubation (J3), le milieu de culture a été changé pour de l'OptiMem mélangé avec de la pénicilline/streptomycine.

Les cellules ont été incubées pendant 48 h puis le surnageant contenant le lentivirus a été recollecté (soit 72 h après transfection) et purifié. Celui-ci a été réparti dans des tubes de 50 mL et centrifugé une première fois à 500 RCF pendant 8 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu a ensuite été transféré dans des tubes d'ultracentrifugation et centrifugé à 22 000 RCF pendant 1h30 à 4 °C. Le virus ainsi obtenu a été suspendu dans un volume d'OptiMEM permettant d'obtenir une concentration finale de 100 X par rapport au volume initial de virus. Le virus a ensuite été laissé à 4 °C pendant 12 h puis aliquoté et stocké à -80 °C.

Avant utilisation, les virus ont été titrés par dilution limite en utilisant de la solution de cristal violet et de la blasticidine (10 µg/mL). Pour ce faire, nous avons préparé une plaque de 6 puits qui a été tapissée de gélatine. Nous avons ensuite disposé 4×10^4 HEK 293T dans 2 mL de DMEM avec 10 % de FBS dans chaque puit et laissé incuber une nuit. Le lendemain, nous avons préparé des dilutions croissantes de nos virus (de 10^{-2} à 10^{-6}) que nous avons ensuite disposé dans chaque puit. Le dernier puit représentait le contrôle. Les cellules ont été incubées avec les virus pendant 6 h puis nous ont lavé les puits avec du DMEM contenant de la blasticidine. Les cellules infectées par le virus étant devenues résistantes à la blasticidine du fait de la présence de ce gène dans notre plasmide d'expression, nous avons suivi l'évolution de la mortalité cellulaire dans chaque puit pendant 6 jours. A la fin des 6 jours, le milieu de culture a été retiré et les cellules restantes ont été fixées au paraformaldehyde puis marquées avec une solution de cristal violet à 0,1 % qui vient colorer le noyau cellulaire et faciliter ensuite le comptage des cellules vivantes. Les cellules restantes ont ensuite été comptées au microscope au grossissement 40 x. La titration des virus était ensuite déterminée en utilisant la formule suivante : Titre du virus (unité/mL) = (nombre de colonie dans le puit/ volume initial de virus (mL)) x facteur de dilution

2.8. Différenciation au PMA

Pour différencier les cellules THP1 en macrophages, nous avons utilisé le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Le PMA est un activateur de la voie NFκB via son action sur PKC et permet la différenciation des monocytes en macrophages. Des THP1 en expansion ont été mises en culture dans des pétris de 100 mm à une densité de 2×10^5 cellules/mL dans 10 mL de milieu de culture pour THP1 (RPMI avec 20 % de FBS, 1 X de pénicilline/streptomycine et 0,05 mM de 2-mercaptoethanol) et en présence de 10 ng/mL de PMA.

Après 48 h d'incubation, le surnageant a été collecté pour les analyses ELISA tandis que les cellules adhérentes (macrophages) ont été récoltées pour en extraire les protéines.

2.9. ELISA IL1-beta humain, IL-6 et TNFα

La mesure de l'IL-1, IL-6 et du TNFα sécrétés par les cellules s'est faite à l'aide de la trousse ELISA de Thermo Fisher Scientific en suivant le protocole du fabricant.

Brièvement, 24 h avant le début de l'expérience, une plaque de 96 puits de marque Coat Corning™ Costar™ 9018 ELISA a été recouverte d'un anticorps de capture et incubé pendant la nuit. Le lendemain, après lavage, chaque puit a été bloqué pendant 1 h pour éviter la liaison non spécifique

puis les échantillons de surnageant récoltés précédemment ont été répartis dans les différents puits. Une courbe standard a été réalisée en parallèle de chaque expérience.

Les plaques ont été laissées en incubation pendant une nuit puis le lendemain, un anticorps de détection a été déposé dans chaque puit. Celui-ci va être capable de venir se fixer sur les antigènes fixés sur la plaque (IL-1, IL-6 ou TNF α selon nos tests). L'anticorps de détection est conjugué à la biotine. Une fois fixé, l'adjonction d'avidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP) permet de détecter les anticorps biotinylés. Des lavages ont été effectués entre chaque étape.

Après avoir stoppé la réaction, les plaques ont été lues par lecteur d'absorbance de microplaque Sunrise™ à une longueur d'onde de 450 nm.

Les résultats ont été analysés via Excel.

3. Résultats

3.1. Patients inclus dans l'étude

Nous avons recruté, au sein de l'hôpital Sainte Justine, 8 patients présentant un tableau de maladie auto-inflammatoire avec des mutations de *NLRP12*. Les patients inclus ont tous été diagnostiqués à l'âge pédiatrique. Les caractéristiques épidémiologiques de ces patients sont listées dans le tableau 2.

Notre population est comparable aux patients rapportés par dans la revue de littérature de Wang et al. :

- La moyenne d'âge au diagnostic de nos patients est de 5,3 ans avec une médiane de 3 ans [2;14].
- On observe un ratio F/M de 3:1: 6/8 de nos patients sont de sexe féminin
- La majorité des patients (6/8 ; 75 %) sont d'origine caucasienne
- Tous les patients présentent de la fièvre dont la durée varie de 1 à 7 jours avec 3/8 patients qui présentent de la fièvre en continu. La fréquence des poussées est variable, de 7 à 30 jours
- Le déclenchement des symptômes par l'exposition au froid n'est retrouvé que chez un de nos patients soit presque trois fois moins souvent que dans la littérature
- Les symptômes systémiques associés sont, par ordre de fréquence : la fatigue (7/8 ; 87,5 %), les douleurs abdominales (6/8 ; 75 %), les céphalées (5/8 ; 62,5 %), les éruptions cutanées et les myalgies (4/8 ; 50 %), les arthralgies (3/8 ; 37,5 %), les arthrites (2/8 ; 25 %) puis l'atteinte ophtalmologique (conjonctivite) et les adénopathies.

Si l'on compare à la littérature, nos patients présentent donc moins d'atteinte articulaire et plus d'atteinte neurologique à type de céphalées. Étonnamment, aucun de nos patients ne présente d'atteinte auditive. Les éruptions cutanées rapportées par nos patients sont essentiellement des urticaires.

Tableau 2. – Caractéristiques cliniques des patients pédiatriques porteurs de mutations de *NLRP12* de la cohorte de Sainte-Justine.

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
Age (an)	10,8	16,1	4,9	11	17	15	5,7	18
Sexe	F	F	M	M	F	F	F	F
Ethnie	Caucasien	Caucasien	Caucasien et afro-américain	Caucasien	Arabe	Moyen-Orient	Caucasien	Caucasien
Age au diagnostic (an)	4,9	2	2,1	2,5	14	11	2	3,5
Caractéristiques de la fièvre								
Durée (jours)	2	Déclenché par le froid	1 à 7 jours	2 à 5 jours	Continu	Continu	4	Continu
Fréquence (jours)	30	Déclenché par le froid	Variable	7 à 15 jours	Aucune	Aucune	21	Aucune
Symptômes associés								
Asthénie	O	N	O	O	O	O	O	O
Éruption cutanée	O	O	O	N	O	N	N	N
Type d'éruption	Urticaire		Eczéma sévère, urticaire		Urticaire			
Céphalées	O	O	N	O	O	O	N	N
Douleurs abdominales	O	O	N	O	O	O	O	N
Lymphadénopathies	N	N	O	N	N	N	N	N
Arthrites	N	O	N	N	N	N	N	O
Arthralgies	O	N	N	N	N	N	O	O
Myalgies	O	O	N	O	N	N	N	O
Ophtalmologie	N	N	N	O	N	N	N	N

F : Sexe féminin ; M : Sexe masculin ; O : oui ; N : Non.

Les paramètres biologiques et les principaux résultats des examens complémentaires, notamment génétiques, des patients sont listés dans le tableau 3.

Seul 1/3 des patients présentent une augmentation des paramètres inflammatoires biologiques (VS ou CRP) au moment des poussées. Tous les patients normalisent ces chiffres en dehors des épisodes de fièvre. Ces trois mêmes patients présentent une anémie. Le dosage des immunoglobulines est sans particularité.

Chez deux patients, les résultats des dosages des cytokines sont disponibles et retrouvent une augmentation de l'IL-18 et de l'IL-4.

Les mutations retrouvées chez nos patients sont rapportées dans le tableau 3. Aucune des mutations retrouvées n'est décrite dans la littérature. 75 % (6/8) se situent dans l'exon 3 (Patients 1, 2, 5, 6, 7, 8), les deux autres correspondant à une délétion de grande taille emportant une partie de l'exon 5 et une duplication de l'exon 8. La plupart des mutations sont classées VUS donc variant de signification inconnue. La duplication de l'exon 8 est classée comme probablement pathogénique.

Chez deux patients (1 et 2), les mutations de *NLRP12* sont présentes chez la mère qui est asymptomatique.

Tableau 3. – Principaux paramètres biologiques, résultats d'examens complémentaires et des recherches génétiques des patients pédiatriques porteurs de mutations de *NLRP12* de la cohorte de Sainte-Justine

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
VS augmentée	N	N	N	N	O	O	O	N
CRP augmentée	N	N	N	N	O	N	O	N
Anémie	N	N	N	N	O	O	O	N
Taux minimal d'Hb (g/L)					68	100	104	
Ferritine maximale (mg/L)	24	39	64	45	345	51	98	25
Mesures de cytokines	O	N	IL-5 et IL-18 augmentés, IL-4 et IL-13 modérément augmentés	N	N	N	IL-4, IL12 et IL18 modérément augmentés	N
IgG (mg/dL)	916	784	631	969	951	1395	1150	1195
IgM (mg/dL)	92	68	71	53	158	636	52	105
IgA (mg/dL)	118	65	108	176	224	217	156	113
IgE (kU/L)	4	29	3051	16	-	12	-	93
Anomalies à l'imagerie	Aucunes	Synovite poignet droit	Aucunes	Aucunes	Pleurésie et péricardite	Aucunes	Aucunes	Synovite des genoux
Mutation de <i>NLRP12</i>	c.1951 T>C (P. Ser651Pro.) VUS Hétérozygote	c.446C>T. (p. Arg156Trp.) VUS Hétérozygote	c. (2243+1_2244-1)_ (2414+1_2415-1) délétion homozygote emportant l'exon 5	c.2757_2927dup; Duplication de l'exon 8 VUS Hétérozygote	. c.959C>T. (p.Thr330Met.) VUS hétérozygote	c.1035G>A. p.Thr345Thr synonyme	c.838C>T. (p. Gln280*) Probablement pathogénique hétérozygote	NLRP12 c.1763del (p.Lys588Argfs*43) VUS Hétérozygote
Hérédité	Hérité de la mère (asymptomatique)	Hérité de la mère (asymptomatique)						

O : Oui ; N : Non

Les différents traitements utilisés chez les patients sont résumés dans le tableau 4. Six des 8 patients (75 %) présentent une réponse au moins partielle à la corticothérapie orale ou intraveineuse. Seul deux patients ont été traités par anti-IL-1 (un par Anakinra et un par Canakinumab) avec une réponse partielle à l'Anakinra et complète au Canakinumab. La réponse à la colchicine et au Tocilizumab est variable selon les patients.

Tableau 4. – Prise en charge médicamenteuse des patients pédiatriques porteurs de mutations de *NLRP12* de la cohorte de Sainte-Justine.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Corticoïdes IV					RC			
Corticoïdes PO	RC	RC		NR	RP	RP	RP	RC
AINS	RC	NR					NR	RP
Colchicine	RP		RC	RP			NR	
Anakinra								RP
Canakinumab		RC						
Tocilizumab		NR			RC			RP
Anti-TNF		NR						
Autres traitements								
Nom(s)		Méthotrexate, Arava, Sirolimus	Dupilumab			Azathioprine		Méthotrexate, Arava, Abatacept, Tofacitinib, plaquenil
Réponse		NR	RC			RP		

PO : Per Os ; IV : Intra-veineux ; AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdiens ; RC : Réponse complète ; RP : Réponse partielle ; NR : Non-répondeur

En parallèle, les équipes du Dr Tiphonie Vogel du service de pédiatrie au Texas Children's Hospital ont recrutés 9 patients. Les données cliniques de ces patients ne sont pas en notre possession. Toutefois, les mutations de ces patients avaient déjà été transmises à notre laboratoire afin de tester leur pathogénicité une fois notre modèle mis en place. Quatre de ces mutations (c.910 C>T, c.1109 G>A, c.1343 G>C et c.2072+2dupT) ont déjà été rapportées dans la littérature. L'analyse des résultats

obtenus avec ces mutations dans notre modèle sera particulièrement intéressante car elle pourra être comparée aux données de la littérature, tant sur le plan clinique que biologique.

Nous avons décidé de tester la mise en place de notre modèle avec les mutations des 9 patients du Texas et du patient 2 pour des raisons de temps car les constructions des mutations étaient déjà disponibles au laboratoire. L'analyse et la comparaison phénotypique des patients du Texas sera faite dans un second temps en association avec l'équipe du Dr Tiphonie Vogel.

3.2. Création des THP-1 KO pour *NLRP12*

La première étape de notre projet nécessitait l'obtention de cellules de la lignée myéloïde KO pour *NLRP12* afin d'obtenir un témoin négatif correspondant aux cellules THP1 KO complet pour *NLRP12* (THP1 *NLRP12* KO) pouvant être comparé au témoin positif correspondant aux cellules THP1 non modifiées (THP1 WT)

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons utilisé la méthode d'édition génique CRISPR-Cas9 en électroporant des cellules THP-1. Les cellules THP-1 sont des cellules monocytaires humaines pouvant être différenciées en macrophages. Elles nous sont donc apparues comme idéales pour étudier une maladie auto-inflammatoire, dépendante des cellules de l'immunité innée, d'autant plus que *NLRP12* a été retrouvé in vivo dans ces cellules.

L'électroporation étant un processus qui peut induire une mortalité cellulaire importante, nous avons tout d'abord mis au point le protocole d'électroporation en utilisant un gène rapporteur GFP. Nous avons comparé plusieurs conditions en parallèle en modifiant le voltage, la densité cellulaire et le milieu dans lequel les cellules étaient électroporées. Nous avons ensuite comparé l'efficacité de l'électroporation de la GFP dans nos cellules THP1 et leur survie en fonction du milieu utilisé (OptiMEM ou tampon personnalisé), du voltage (750, 1000 et 1200 V) et du temps d'électroporation (0,2 ou 0,4 ms). Les mesures ont été réalisées par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5. – Paramètres utilisés pour l’optimisation du protocole d’électroporation des cellules THP-1

Nombres de cellules	Conditions (voltage (V) / temps (ms))	OptiMEM		Tampon	
		Survie	Efficacité	Survie	Efficacité
Contrôle	1000 V/ 0,2 ms	2 %	/	10 %	/
	1200 V/ 0,2 ms	1,7 %	/	5 %	/
1,5x10 ⁶ cellules	1000 V/ 0,2 ms	2 %	13 %	2 %	29 %
	1200 V/ 0,2 ms	2 %	9 %	1,3 %	27 %
0,5x10 ⁶ cellules	1000 V/ 0,2 ms	2 %	4 %	0,5 %	33 %
	1200 V/ 0,2ms	4 %	16 %	1 %	40 %
	1000 V/ 0,4 ms	1 %	14 %	1 %	34 %
	1200 V/ 0,4 ms	/	/	/	/

Test de différentes concentrations cellulaires, différents voltages, différents temps et différents milieux d’électroporation en utilisant la GFP. Le contrôle correspond à des cellules THP1 soumises aux conditions d’électroporation sans présence du gène rapporteur GFP. La survie cellulaire et l’efficacité d’électroporation sont ensuite mesurées par cytométrie en flux.

Notre contrôle souligne la mortalité cellulaire importante induite par le stress de l’électroporation puisque l’on observe une survie cellulaire de l’ordre de 2 % quelques soient les paramètres utilisés. L’augmentation de la concentration cellulaire initiale de 0,5 à 1,5 x10⁶ cellules/mL ne permet pas d’augmenter la survie cellulaire. Paradoxalement, l’efficacité de l’électroporation semble plus importante en utilisant une concentration plus faible de cellules.

En utilisant 500 000 cellules/mL, l’augmentation du voltage de 1000 à 1200 V permet une meilleure efficacité de l’électroporation (33 à 40 % de cellules marquées à la GFP) sans conséquences majeures sur la survie cellulaire. En revanche, l’augmentation du temps d’électroporation de 0,2 à 0,4 ms ne permet pas une meilleure efficacité mais entraîne un risque théorique de mortalité plus importante. Notre tampon permettait d’améliorer l’efficacité du protocole avec une survie similaire.

Basé sur ces résultats nous avons sélectionné les conditions suivantes : une concentration cellulaire de 500 000 cellules/mL et une électroporation à 1200 V pendant 0,2 ms.

3.2.1. Obtention d'un clone hétérozygote

Tel qu'expliqué dans le matériel et méthode, notre édition génique par CRISPR/Cas9 ciblait l'exon 3 de *NLRP12* qui code pour le domaine fonctionnel NOD de la protéine NLRP12. C'est par ailleurs dans cet exon que sont retrouvé la majorité des mutations décrites dans la littérature.

La stratégie CRISPR/Cas9 utilisée est décrite dans la figure 13. La séquence PAM reconnue par la Cas 9 est la séquence AGG de l'exon 3. L'ARN guide que nous avons utilisé contient la suite de la séquence, à savoir 3' – GTCCTTTGGATGTCCTGAT – 5'. Le site de clivage de la Cas 9 est généralement situé 3 bases après la séquence NGG reconnue.



Figure 13. – Stratégie CRISPR/Cas9 utilisée pour la modification de l'exon 3 du gène NLRP12. L'exon 3 du gène NLRP12 a une taille de 422 bp. Le site de clivage visé par notre ARN guide est représenté par la flèche rouge sur le schéma. La séquence PAM (AGG ici) est reconnue par la Cas9. La séquence de l'ARN guide est représentée dans l'encart violet.

Nous avons utilisé les paramètres obtenus grâce à l'optimisation de notre protocole d'électroporation. 500 000 cellules THP-1/mL ont été électroporées avec le complexe Cas9/ARN guide dans notre tampon à 1200 V pendant 0,2 ms.

L'expérience réalisée est résumée dans la figure 14. Une fois électroporées, les cellules ont été mises en culture pendant 24 h. Après 24 h, nous avons réalisé un clonage par dilution et disposé une cellule par puit. Nous avons réalisé une électroporation avec un enhancer, qui est une petite molécule favorisant l'entrée de l'ADN dans les cellules électroporée et augmentant théoriquement l'efficacité de l'électroporation.

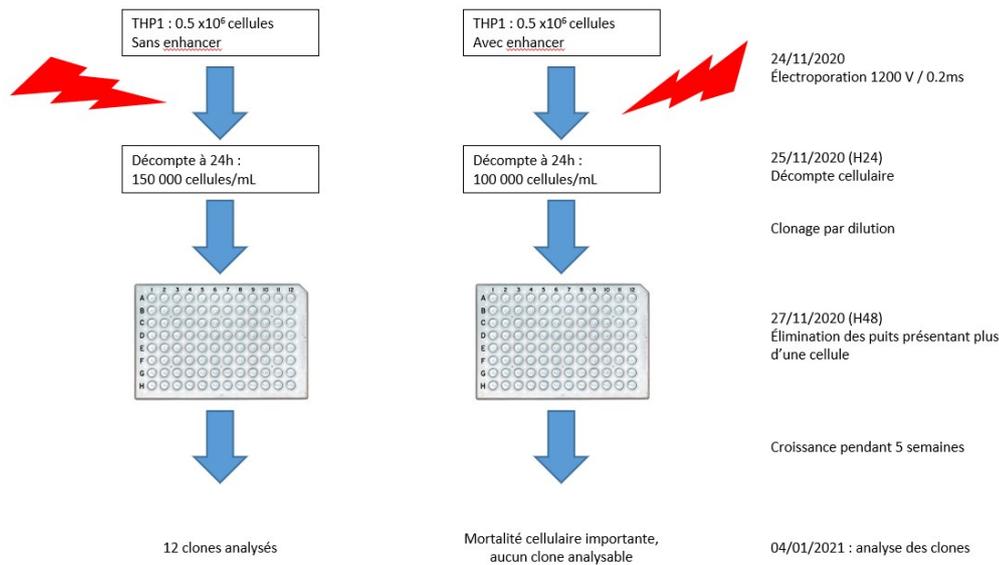


Figure 14. – Protocole expérimental de modification génétique de THP-1 par CRISPR-Cas9. *Electroporation de 500 000 THP-1 à 1200 V pendant 0,2 ms dans un tampon maison sans (à gauche) et avec (à droite) enhancer. Après clonage par dilution, nous avons mis en culture 1 plaque de 96 puits pour chacune des conditions. Les cellules ont été laissées en culture pendant plusieurs semaines. Une surveillance visuelle de la viabilité de chaque puit était effectuée deux fois par semaine. Le milieu était changé au même moment. Au bout de 5 semaines, aucune croissance n'a été observée dans les plaques où les cellules électroporées avec l'enhancer avait été disposées laissant supposer une mortalité cellulaire trop importante pour cette condition.*

Après 5 semaines, nous avons obtenus 12 clones sur 192 puits. Aucune cellule électroporée avec l'enhancer n'a survécu ce qui peut s'expliquer par la cytotoxicité de cette molécule. Les douze clones ont été analysés par amplification PCR de l'exon 3 de *NLRP12*, la séquence cible du CRISPR étant situé à ce niveau. Tous les clones sauf le clone 21a présentaient une bande attendue à 480 bp correspondant à la taille de l'exon 3 sauvage amplifié par nos amorces (Annexe 3 – localisation des amorces utilisées pour l'amplification) et étaient donc non modifiés. Le clone 21a présentait une deux produits d'amplification avec une bande de taille attendue et une bande autour de 700 bp, faisant suspecter la présence soit d'un clone hétérozygote avec une insertion d'environ 220 bp dans une seule copie de *NLRP12* menant à la présence de deux amplifications différentes selon le brin d'ADN amplifié, soit d'une double population avec une partie des cellules du puits modifiée et l'autre non (Figure 15).

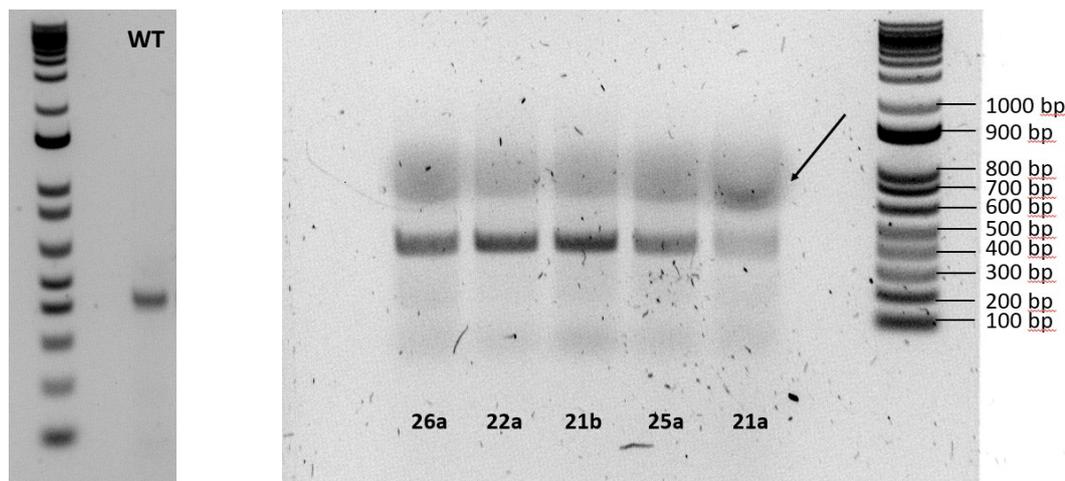


Figure 15. – **Exemple de profil de migration de 5 clones de THP-1 sur 12 ayant subi une modification de l'exon 3 du gène NLRP12 par CRISPR/Cas9 comparé au profil de migration des THP-1 sauvages.** Les clones 26a, 22a, 21b et 25a montrent tous le même profil avec une seule bande à 480 bp correspondant à l'amplification attendue de l'exon 3 de la forme sauvage de NLRP12 et superposable au profil observé pour l'ADN des THP-1 sauvage présenté sur l'électrophorèse de gauche. Le clone 21a présente une bande à 480 bp plus claire et une bande de plus grande taille à environ 700 bp (flèche noire).

Afin de confirmer la modification génique, le produit de PCR du clone 21a a ensuite été séquencé. Le séquençage retrouvait finalement la présence d'une délétion hétérozygote de l'exon 3 de *NLRP12*, en contradiction avec les résultats obtenus en PCR. Les résultats du séquençage sont présentés en annexe 4. La réaction de séquençage à partir de l'amorce sens n'est pas capable d'être complétée au-delà de la séquence PAM. Le séquençage à partir de l'amorce anti-sens révèle une délétion de 36 bp localisée dans l'intron 2. Le caractère hétérozygote était donné par génome Québec qui, dans le rendu de résultats, confirmait la possibilité de séquencer complètement l'un des allèles (résultats non transmis) et rendait le résultat obtenu dans l'annexe 4 pour le second allèle. Nous avons donc décidé de nous baser sur les résultats obtenus au séquençage pour poursuivre nos expériences.

3.2.2. Obtention d'un clone homozygote

Afin d'obtenir un clone homozygote, nous avons choisi de modifier à nouveau nos cellules THP1 hétérozygotes 21a. 500 000 cellules/mL ont été électroporées à 1200 V pendant 0,2 ms. Après 5 semaines de cultures, nous avons obtenu une croissance dans 76 puits sur 384. L'ensemble des clones ont été amplifiés par PCR puis séquencés.

L'analyse de nos amplifications a mis en évidence la présence de 24 clones d'intérêt. Toutefois la présence systématique d'une bande fantôme, comme indiqué dans la figure 16 lors de la migration des produits de PCR amplifiés par nos amorces E3F et E3R, a nécessité une modification de nos amorces et de notre protocole de PCR.

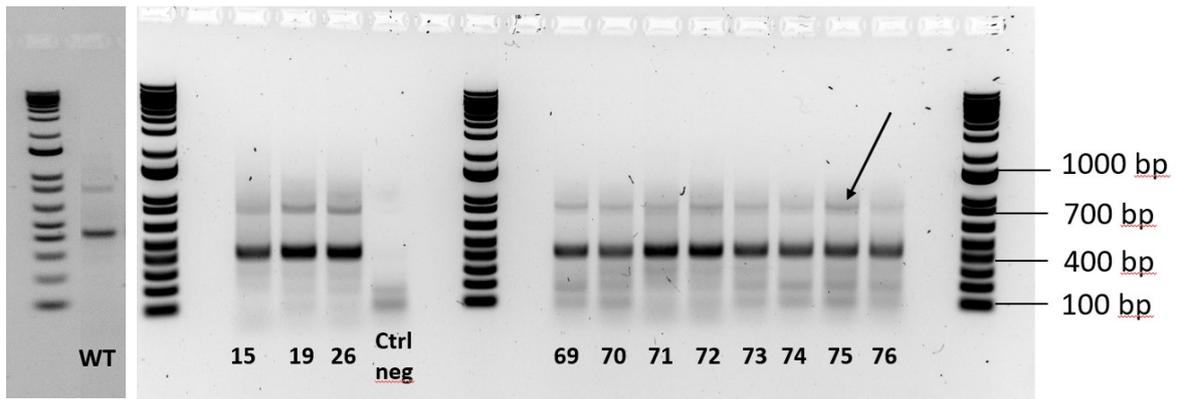


Figure 16. – **Exemple de profil de migration de 11 clones sur 76 de THP-1 hétérozygotes 21a ayant subi une deuxième modification de l'exon 3 du gène NLRP12 par CRIPSR/Cas9, comparé au profil de migration des THP-1 sauvage.** Les 11 clones présentent une bande correspondant à la taille attendue de 480 bp de l'exon 3 après amplification par les amorces E3F et E3R. On retrouve par ailleurs une bande à 700 bp (flèche noire) plus claire correspondant au profil initial du clone hétérozygote 21a. Le contrôle négatif a été réalisé avec de l'eau stérile. Le profil de migration obtenu avec les THP-1 sauvage est présenté à gauche. La bande fantôme y apparaît également.

La flèche noire dans la figure 16 indique la bande à 700 bp retrouvée initialement dans le profil de notre clone hétérozygote 21a mais pouvant également faire suspecter un problème de spécificité de nos amorces d'amplification.

Afin de nous assurer que le profil observé est bien celui de notre clone hétérozygote et non un problème de spécificité de nos amorces, nous avons donc décidé de tester de nouvelles paires d'amorces et de modifier la température d'hybridation utilisée pour nos amplification PCR afin d'obtenir un produit plus propre et donc plus facilement analysable. Les nouveaux paramètres de PCR testés sont résumés dans le tableau 6.

Nous avons amplifié l'exon 3 de *NLRP12* de THP-1 sauvage avec ces différentes paires d'amorce et utilisé deux températures d'hybridation différente. Les profils de migrations des différents fragments amplifiés apparaissent dans la figure 17.

Tableau 6. – Paramètres utilisés pour l'optimisation des PCR de l'exon 3 de NLRP12.

	Température de ligation	Paires d'amorces	Fragment attendu (bp)
1	62°C	Témoin + : E3F + E3R	480 bp
2		E3F1 + E3R1	789 bp
3		E3F1 + E3R	488 bp
4		E3F + E3R1	723 bp
5		E3F1 + E3R3	837 bp
6		Contrôle négatif	-
7	65°C	Témoin + : E3F + E3R	480 bp
8		E3F1 + E3R1	789 bp
9		E3F1 + E3R	488 bp
10		E3F + E3R1	723 bp
11		E3F1 + E3R3	837 bp

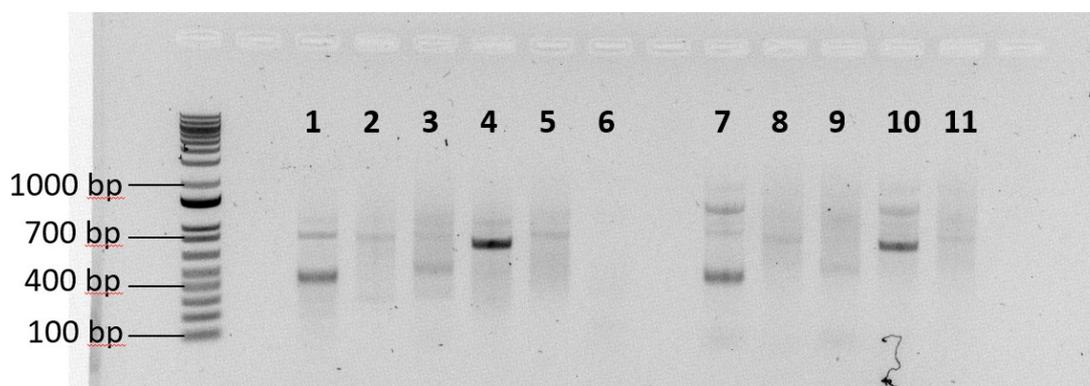


Figure 17. – Profil de migration de l'amplification de l'exon 3 de *NLRP12* de THP-1 sauvage par différentes paires d'amorces et avec différentes températures d'hybridation. Les numéros figurants sur la figure se rapportent aux différentes combinaisons présentées dans le tableau 6. Le profil 1 correspond à la combinaison d'amorce et à la température de ligation utilisés dans les premières expériences rapportées dans les chapitres plus haut. La modification de la température de ligation de cette combinaison (profil 7) ne permet pas d'obtenir un résultat plus propre. La combinaison 4 (amorces E3F et E3R1 à une température de ligation de 62 °C) permet d'obtenir une bande nette à 723 bp.

L'analyse de nos résultats a permis de sélectionner la combinaison des paires d'amorces E3F et E3R1. La combinaison d'amorce E3F et E3R utilisé précédemment (profil 1 et 7 de la figure 17) présentent toujours un bande fantôme aux alentours de 700 bp. Ce résultat rend donc difficile

l'interprétation des résultats obtenus avec le clone hétérozygote 21a et présentés dans la section précédente. La localisation des amorces est présentée dans l'annexe 3.

Nous avons alors réamplifié et reséquéncé les 76 clones obtenus après l'électroporation du clone hétérozygote 21a. Devant des problèmes de qualité de d'ADN extrait ne permettant pas une analyse fine des séquences amplifiées par séquençage, ainsi qu'une probable contamination de nos réactifs de PCR, l'ADN et l'ARN des clones d'intérêt a été extrait à nouveau afin de réaliser une nouvelle amplification de l'exon 3 avec notre nouvelle paire d'amorce. Une partie des résultats de cette amplification sont présentés sur le gel de la figure 18.

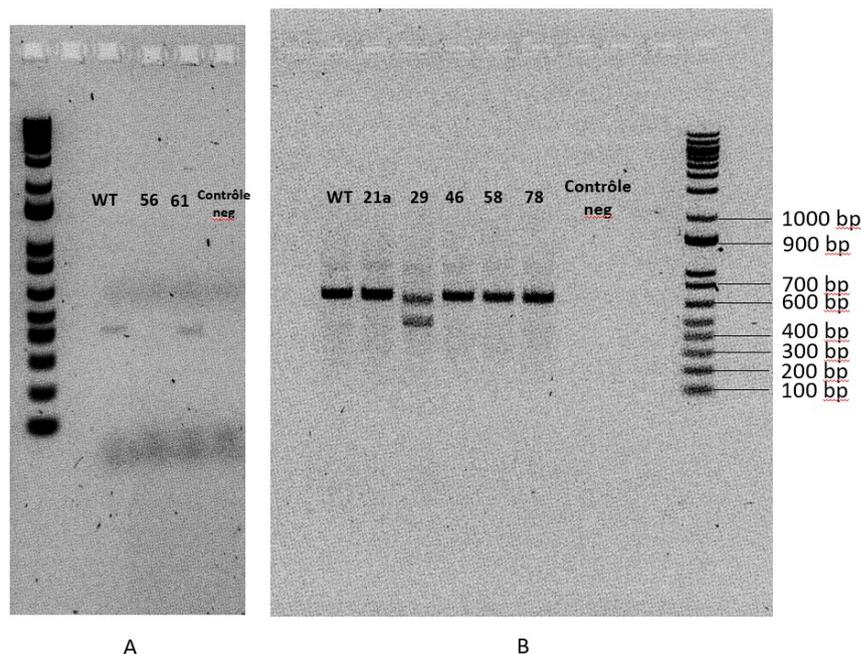


Figure 18. – Comparaison des profils de migration de THP-1 hétérozygotes 21a ayant subi une deuxième modification de l'exon 3 du gène NLRP12 par CRIPSR/Cas9 amplifié par PCR avec l'ancienne paire d'amorce E3F/E3R (A) et la nouvelle paire d'amorce E3F/E3R1 (B). La nouvelle paire d'amorce (B) permet d'obtenir un résultat d'amplification plus net et lisible que l'ancienne (A). A. Le clone 61 présente une bande attendue à 480 bp, superposable au profil de migration de l'amplification du témoin positif WT. Aucune amplification n'a été retrouvée pour le clone 56. B. Les clones 46, 58 et 78 ont un profil superposable au témoin positif (WT) et au clone hétérozygote 21a avec une bande attendue autour de 700 bp. Cela peut s'expliquer par la présence d'une délétion trop petite pour être mise en évidence sur la migration sur gel. Le clone 29 présente une double amplification avec une bande d'environ 500 bp et une bande d'environ 700 bp, plus claires.

L'amplification du clone 29 a mis en évidence la présence d'une double bande faisant suspecter la présence d'une délétion importante. La présence de deux bandes et le fait que les bandes amplifiées soient plus claires fait suspecter la présence d'une délétion différente sur les deux allèles, celle aux alentours de 700 bp correspondant à la bande observée pour le clone 21a et celle à 500 bp pouvant correspondre à l'autre allèle. En cas de délétion homozygotes, on aurait attendu une seule bande

d'intensité superposable aux autres mais d'une plus petite taille. Le clone 56 n'étant pas du tout amplifié, on peut suspecter l'existence d'une délétion homozygote importante empêchant au moins l'une des amorces de se fixer à l'ADN pour débiter l'amplification.

Il faut également souligner que cette amplification avec de nouvelles amorces donne un résultat de PCR où l'on retrouve, pour le clone 21a, une seule bande de même taille que le WT ce qui souligne d'une part une possible contamination des échantillons utilisés lors de nos premières amplifications, et d'autre part, le fait que l'amplification PCR permet uniquement de suspecter la présence d'une modification secondaire au CRISPR à condition que celle-ci soit de taille suffisante. Il est dans tout les cas indispensables de séquencer l'ensemble des clones pour confirmer les modifications et détecter des délétions ou des insertions de petite taille qui ne seraient pas visible sur les profils de migrations à cause d'une définition insuffisante.

L'ensemble des produits PCR des clones obtenus avec la nouvelle paire d'amorce E3F/E3R1 ont ensuite été séquencés. Pour le clone 29, nous n'avons pas séquencé séparément les deux bandes présentées dans la figure 18 mais l'ensemble du produit de PCR. Deux clones d'intérêts ont été retenus : les clones 56 et 29 qui présentent tous les deux une délétion homozygote d'un totale de 24 paires de base à la jonction 2^{ème} intron/3^{ème} exon, emportant les 8 premières paires de base de l'exon 3 (Annexe 5). L'homozygotie a été confirmée par génome Québec puisque le résultat du séquençage des deux allèles était le même.

En comparant les résultats du séquençage initial du clone 21a et le résultat du séquençage des clones 29 et 56, on constate que le délétion mise en évidence est proche mais différente puisque dans le clone 21a, la jonction intron/exon était intacte. Notre hypothèse est que la seconde modification génique sur l'allèle non mutée 21a a mené à une délétion homozygote car une fois clivé, l'ADN n'a pu être réapparié en miroir de l'autre allèle puisque celui-ci était déjà muté. On obtient donc une délétion finale avec une partie de la délétion 21a précédente et emportant en plus 8 paires de bases de l'exon 3. Cette délétion apparaît significative puisqu'en emportant une part importante de la jonction intron/exon, elle emporte des zones indispensables pour l'initiation de la transcription de l'ADN en ARN messager et pour l'épissage. La localisation des mutations induites est résumée dans la figure 19.

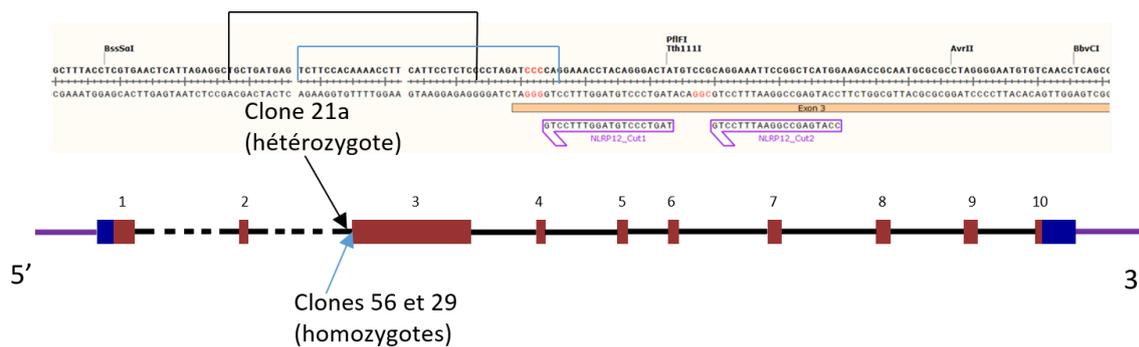


Figure 19. – Localisation des mutations induites au sein du gène NLRP12. Séquence de la fin du 2^e intron et du début du 3^e exon (qui code pour la région fonctionnelle NACHT de la protéine) de NLRP12 (en haut) et représentation schématique de l'ensemble du gène NLRP12. Les traits violets représentent les régions non codantes de l'ADN. Les introns sont représentés par les traits noirs, les exons par les boîtes rouges. Les boîtes bleu foncé représentent les régions non traduites (UTR). La première délétion induite (clone 21a) est située dans le 2^{ème} intron (flèche et cadre noir). Les mutations finales des clones 56 et 29 sont situées à cheval entre le 2^{ème} intron et le 3^{ème} exon et emporte la jonction avec elles (flèche et cadre bleu clair).

L'ensemble des 74 autres clones présentaient une séquence superposable à celle du clone 21a.

3.2.3. Confirmation du clone homozygote

3.2.3.1. Essai de mésappariement

Le mélange de l'ADN des clones mutés avec de l'ADN sauvage au sein d'un essai de mésappariement devait permettre de mettre en évidence des bandes de taille différentes en présence de mutation. Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN de NEB (New England BioLabs) car sans cela l'ADN polymérase Q5 utilisée pour les réactions de PCR inhibe l'endonucléase utilisée dans le protocole.

Les étapes de chauffage permettent de dénaturer l'ADN et donc de séparer les deux brins. La baisse progressive de la température permet ensuite aux brins de se réappairier. Si le clone n'est pas muté on obtient donc une seule bande de même taille que la forme sauvage. En cas de mésappariement, les brins d'ADN vont former des hétéroduplex qui seront ensuite clivés par l'endonucléase. La présence d'un mésappariement sera mise en évidence par l'existence 3 bandes de taille différentes correspondant à l'ADN non muté en homoduplex et aux deux fragments plus petits correspondant aux hétéroduplex clivés par l'endonucléase.

La taille des bandes attendues pour notre expérience était de 723 bp (exon 3 sauvage), 603 bp et 120 bp. Une première expérience mettait en évidence la présence de deux bandes faisant suspecter

la présence des fragments de 723 et 603 bp ce qui aurait pu signifier la présence de mutations dans tous les clones testés si l'on considère que la troisième bande à 120 bp était trop petite pour être détectée sur notre gel (figure 20). Toutefois la proximité de deux des bandes et la petite taille de la troisième rendait difficile l'interprétation de ces données et ne permettait pas de conclure à une modification de nos clones. En l'absence de mutation induite par CRISPR, on ne devrait retrouver qu'une seule bande à 723 bp puisqu'il n'y aurait alors que des homoduplex d'ADN non muté.

Par ailleurs, sur ce premier essai, nous n'avions pas réalisé de témoin positif en utilisant uniquement l'ADN de THP1 WT non mélangé à un autre clone empêchant donc de comparer les profils obtenus.

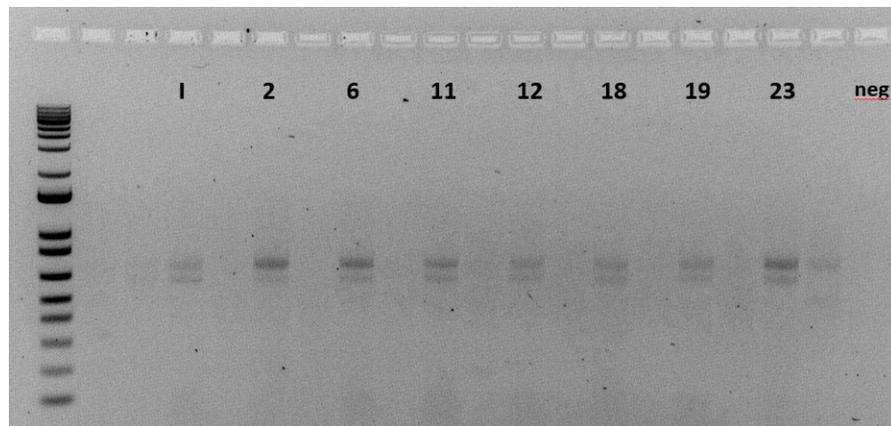


Figure 20. – **Profil de migration après test de clivage enzymatique des mésappariements des PCR de l'exon 3 de *NLRP12* de 8 clones sur 76 obtenus après édition génique par CRISPR/Cas 9 du clone hétérozygote 21a.** Les clones 1, 2, 6, 11, 12, 18, 19 et 23 sont des clones issus de la deuxième électroporation de notre clone hétérozygote 21a. On note la présence d'une double bande porche de 700 bp pouvant correspondre à la bande 723 bp attendues pour l'homoduplex non muté et à celle de 603 bp correspondant à l'un des morceaux clivés au sein des hétéroduplex. La dernière bande, de petite taille n'est pas visualisable dans notre expérience.

L'ADN sauvage utilisé pour le test de clivage des mésappariements ayant été en culture depuis un nombre important de cycle cellulaire (> 20) et que ce temps augmente le risque de survenu de mutations spontanées, nous avons décidé de le reséquencer. Nous avons alors mis en évidence la présence d'une mutation au sein de l'exon 3 de *NLRP12* des THP1 sauvage utilisés spécifiquement pour cette réaction pouvant être à l'origine d'une fausse positivité de la réaction. Cette mutation n'était pas retrouvée dans la lignée utilisée pour les expériences initiales de CRISP/Cas9 et était différente de celle observée dans les clones 21a, 29 et 56.

Une nouvelle réaction de mésappariement en utilisant de nouvelles cellules WT congelées, avec un faible nombre de cycle cellulaire et ayant été séquencé en amont de la réaction afin de s'assurer de la présence d'une séquence sauvage ne retrouvait qu'une seule bande de 723 bp. Il est donc nécessaire de réaliser une nouvelle optimisation de notre protocole. Cette technique a finalement été temporairement abandonnée et nous avons poursuivi nos expériences en nous basant sur les résultats du séquençage des clones.

3.2.3.2. Analyse de l'ARN messager

Afin de confirmer l'absence de NLRP12 fonctionnel, nous avons décidé de rechercher la présence d'ARN messager pouvant traduire la persistance d'une transcription du produit du gène muté malgré la présence de mutation au niveau moléculaire.

La concentration d'ADNc était dosée au nanodrop. Les résultats de la migration du produit de RT-PCR sont présentés dans la figure 21 et celle du séquençage de ce même produit en Annexe 6.

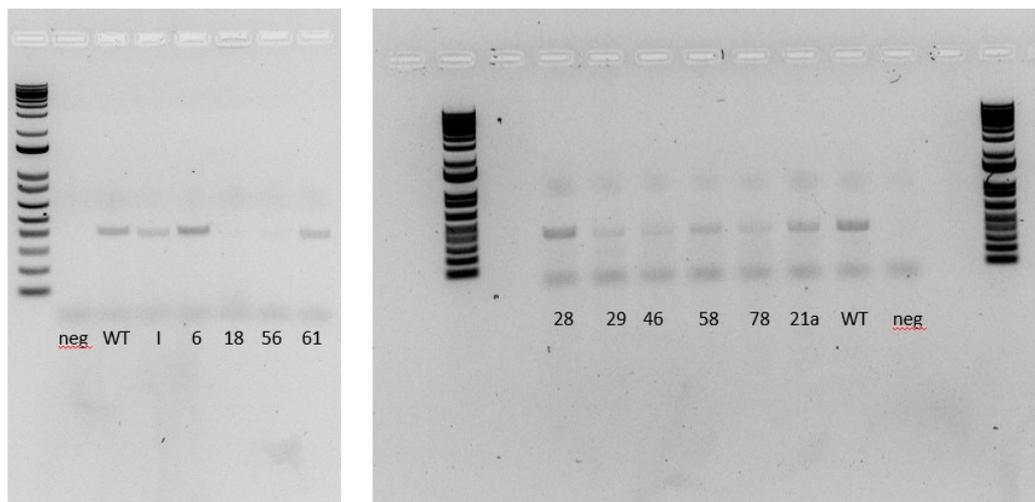


Figure 21. – Profil de migration du produit de RT-PCR des ADNc de l'exon 3 de *NLRP12* des THP1 sauvages (WT), du clone hétérozygote 21a et de 10 des 76 clones obtenus après édition génique par CRISPR/Cas 9 du clone hétérozygote 21a. Les clones l, 6, 18, 56, 61, 28, 29, 46, 58 et 78 font parties des clones obtenus après double édition génique. On retrouve une quantité négligeable d'ADNc pour les clones 18 et 56. Pour le clone 29, on retrouve une petite quantité d'ADNc, inférieure à celle mise en évidence dans la forme sauvage et dans le clone hétérozygote. Nous n'avons pas réalisé de contrôle interne pour cette expérience.

Les clones 18 et 56 présentent une quantité négligeable d'ADN complémentaire de l'exon 3 de *NLRP12*. Le clone 29 semble présenter une transcription d'ARN messager de l'exon 3 de *NLRP12* mais diminuée par rapport au WT et au clone 21a hétérozygote.

Les mutations mises en évidence suite au séquençage de l'ADN de nos clones ont montré une délétion emportant la jonction intron-exon. Comme discuté plus haut, cette région est importante et joue notamment un rôle dans l'épissage de l'ARN messager. L'absence de mise en évidence d'ARN messager dans notre expérience est en faveur d'une conséquence de la délétion créée par CRISPR/Cas9 sur l'épissage de l'exon 3 de *NLRP12* menant à une absence d'ARN messager et donc à l'absence de production d'une protéine fonctionnelle. Nous avons tout de même été capable de séquencer l'ADN complémentaire du clone 56 ce qui est en faveur d'une transcription résiduelle de l'exon 3, possiblement grâce à des mécanismes d'épissage alternatif. Les mutations en lien avec l'épissage de l'ARN, telles que celle que nous avons provoquées, peuvent être associées à des transcrits aberrants ou présents en quantité moindre.

Cette expérience devra être répétée en intégrant un contrôle interne afin de s'assurer de l'absence de problème technique, notamment de dégradation de l'ARN qui est un produit fragile.

3.3. Création des différents plasmides et lentivirus pour la transduction

Nos cellules THP-1 avec une délétion homozygote de *NLRP12* représentent donc nos cellules KO pour *NLRP12*. Nous souhaitons ensuite pouvoir utiliser ce modèle pour mettre en évidence les conséquences des mutations de *NLRP12* décrites chez les patients présentés dans la section 3.1. et listées dans le tableau 3. Pour ce faire, nous avons pour objectif de recréer *in vitro* les mutations des patients dans des plasmides permettant ensuite de produire des lentivirus. Ces lentivirus seraient ensuite transduits dans les cellules KO et nous serions alors en mesure de comparer le comportement des cellules sauvages, KO et celles ayant été transduites avec nos différentes mutations. Nous avons choisi cette technique plutôt que le CRISPR, d'une part car la plupart des patients présentent des mutations hétérozygotes ce qui est difficile à reproduire en CRISPR, et d'autre part, car une partie des constructions existaient déjà au laboratoire.

Pour être au plus proche des conditions physiologiques, nous avons réalisé des constructions contenant deux *NLRP12* séparés par un peptide P2A. Cela permet de représenter les deux allèles de *NLRP12* qui seront, après transduction, intégrées au même endroit du génome et seront donc régulées par le même promoteur. On évite ainsi, contrairement à un modèle où nous aurions choisi de

transduire les deux allèles indépendamment, d'obtenir une différence de transcription en fonction de l'endroit où s'est intégré le gène et donc un risque de sur-expression de l'une des allèles. Compte tenu du caractère autosomique dominant de la maladie, pouvoir contrôler cet aspect paraît fondamentale car une allèle sur-exprimée pourrait avoir un effet plus important que dans la réalité.

La transduction de *NLRP12* WT permettrait de confirmer que notre modèle KO est fiable si, une fois qu'il récupère *NLRP12*, il se comporte comme une cellule WT non modifiée. Par la suite, le protocole expérimental se déclinait en deux étapes :

- La transduction de nos différentes mutations isolément dans des cellules WT afin de rechercher un effet dominant négatif en présence de la mutation
- La transduction dans les modèles *NLRP12* KO de la construction *NLRP12_P2A_NLRP12mut* pour comparer les résultats à ceux-ci-dessus et s'approcher le plus possible de la réalité.

Pour commencer, nous avons créé des plasmides d'expression pour l'ensemble des mutants décrits, en priorisant ceux déjà rapportés dans la littérature car cela nous permettrait ensuite de comparer les tableaux cliniques à ceux déjà décrits.

Nous avons obtenu par clonage les différents produits nécessaires à la ligation à savoir *NLRP12* WT, P2A et les mutants suivants : Mut1109, Mut 910, Mut 466, Mut 1343, Mut 2072, Mut121, Mut 3109, Mut2331_2332, Mut773 et Mut1991.

Nous avons réalisé par étape de digestion et ligation successive la construction *pENTR4_hNLRP12_P2A_NLRP12WT*. Le plasmide final obtenu ainsi que la représentation schématique du gène exprimé par le lentivirus sont décrits dans la figure 22.

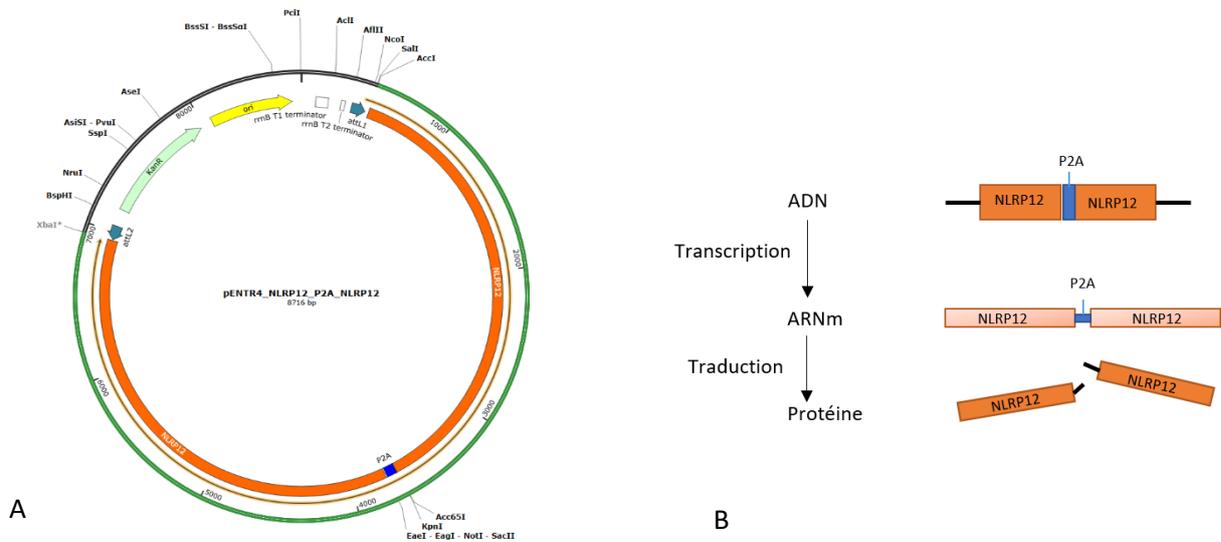


Figure 22. – Carte du plasmide contenant la construction NLRP12_P2A_NLRP12WT et schématisation du fonctionnement du peptide P2A. A. La carte du plasmide montre le résultat final obtenu après 3 réactions de digestion/ligation ayant permis d'intégrer successivement les deux gènes NLRP12 et la séquence codante du peptide P2A. Le plasmide pENTR4 contient un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des *E. Coli*. Ce plasmide sera ensuite cloné dans le vecteur d'expression utilisé pour la production de lentivirus (annexe 2). **B.** La construction NLRP12_P2A_NLRP12 est intégré dans le génome et va être transcrite en ARNm. Lors de la traduction en protéine, le peptide P2A va empêcher la formation d'une liaison peptidique par le ribosome et donc entraîner l'apparition de deux protéines séparées.

La construction pENTR4_hNLRP12_P2A_NLRP12WT a ensuite été clonée dans le vecteur d'expression pHR SIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PCK.BSD décrit dans la figure 12. L'ensemble des étapes de ligation et de clonage sont résumées dans l'annexe 2. Les mutants ont eux, dans un premier temps, été intégrés dans un plasmide d'expression (pDEST) contenant un gène de résistance à la blasticidine afin de permettre leur sélection.

Nous n'avons pas eu le temps de réaliser les constructions hétérozygotes avec les différents mutants qu'il faut intégrer à la construction pENTR4_hNLRP12_P2A. Il restera donc une dernière étape de digestion et ligation à faire avec chacun des ADN mutant obtenus.

Les plasmides créés ont été amplifiés par MaxiPrep. Les produits obtenus ont été transfectés dans des cellules HEK293T selon le protocole décrit en 2.7 afin d'obtenir des lentivirus contenant soit NLRP12WT, soit NLRP12 muté, soit la construction NLRP12WT_P2A_NLRP12WT. Les virus obtenus ont ensuite été titrés et conservés à -80°C (Figure 23).

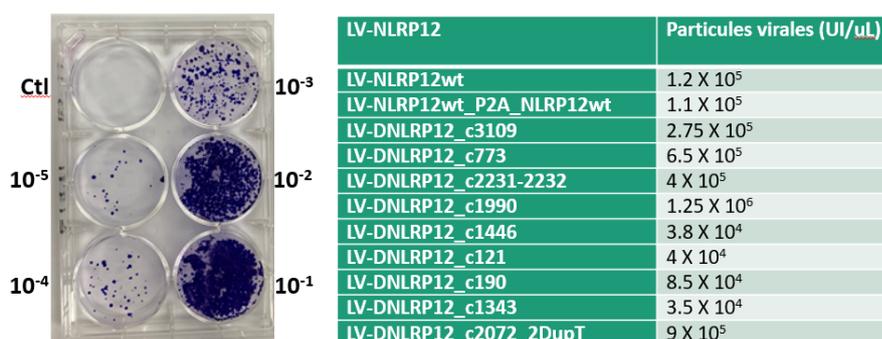


Figure 23. – **Exemple de titration des lentivirus produits au cours de l'étude et concentration (en UI virales/μL) obtenues avec nos différentes productions virales.** Des lentivirus contenant neuf mutations ont été produits. Nous avons également produit des lentivirus contenant NLRP 12 sauvage et des lentivirus contenant notre construction homozygote NLRP12_P2A_NLRP12. Ceux-ci pourront ensuite être utilisés pour infecter des cellules sauvages ou KO.

Ces lentivirus pourront être utilisés pour transduire nos cellules KO. La construction contenant NLRP12_P2A_NLRP12 est un équivalent de NLRP12 sauvage homozygote. Une fois transduites dans nos cellules KO, celles-ci devraient récupérer le même phénotype que les cellules THP 1 WT. Cette étape est indispensable pour confirmer le bon fonctionnement de notre modèle.

3.4. Test de sensibilité à la blastomycine

Les lentivirus produits contiennent un gène de résistance à la blastomycine. Une fois transduit dans les cellules, celles ayant intégré le lentivirus deviennent résistantes à la blastomycine et on peut alors réaliser une sélection par antibiotique.

Nous avons réalisé un test de sensibilité à la blastomycine : des cellules THP1 ont été mises en culture en présence d'une quantité croissante de blastomycine (1, 2, 5, 10 et 20 μL/mL). Après 2 semaines, il n'y avait plus aucune cellule vivante dans les puits contenant 10 et 20 μL/mL de blastomycine. A 5 μL/mL, certaines cellules avaient survécus. Nous avons donc choisi d'utiliser 10 μL/mL de blastomycine pendant 2 semaines pour la sélection après transduction.

3.5. Production de cytokines

Nous avons comparé la sécrétion d'IL-1 des cellules THP1 WT et du mutant hétérozygote 21a avec et sans stimulation au PMA. Les résultats sont rapportés dans la figure 24. Après 24 et 48 h de culture sans stimulation, la sécrétion d'IL-1 par les cellules THP1 sauvage et 21a est faible et comparable. Ceci est probablement dû au fait qu'à l'état basal, il existe une expression faible de pro-IL-1 et peut être de NLRP12 dans les THP-1, de manière comparable à ce que l'on observe pour NLRP3. Après stimulation par le PMA, qui pourrait être l'équivalent du 1^{er} signal d'activation comme dans l'inflammasome NLRP3, on met en évidence une sécrétion importante d'IL-1 par les cellules WT alors qu'il n'y pas de différence significative pour les cellules 21a ce qui plaiderait en faveur d'un rôle pro-inflammatoire de NLRP12 et d'un effet dominant négatif des mutations de NLRP12.

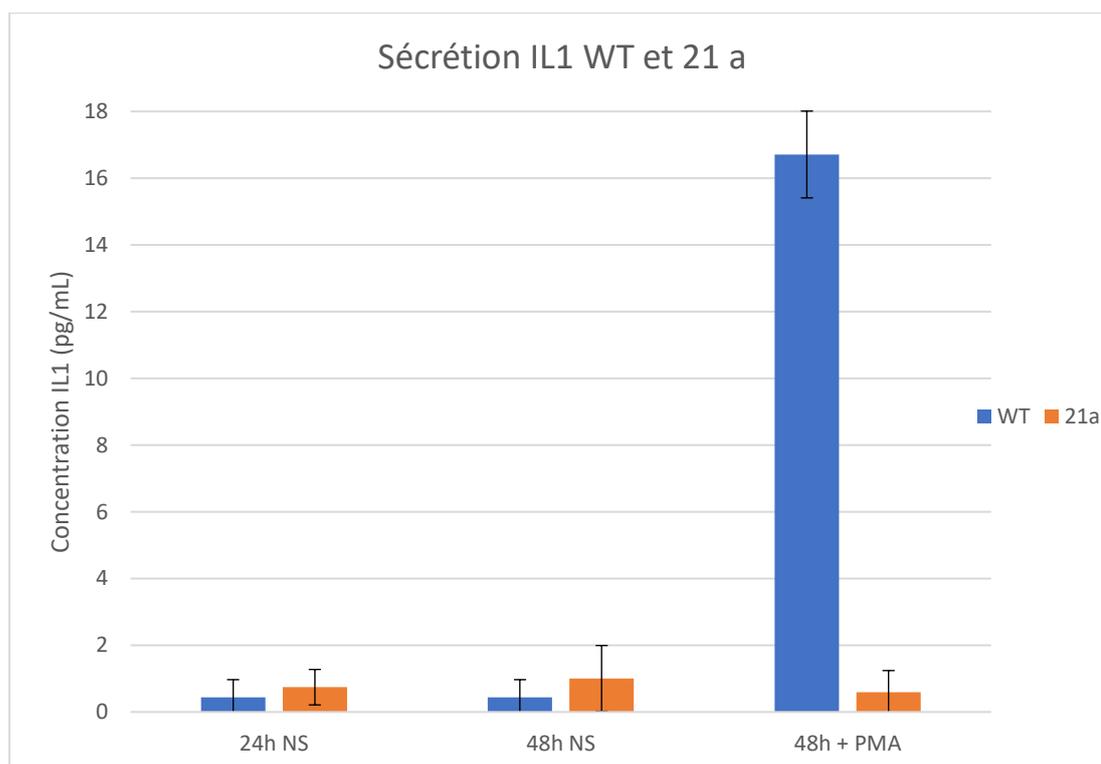


Figure 24. – **Sécrétion d'IL-1 (pg/mL) par les cellules THP1 WT et NLRP12 hétérozygote 21a après 24 h ou 48 h de culture, avec et sans stimulation au PMA mesurée par ELISA.** Sans stimulation au PMA (NS), on observe une sécrétion d'IL-1 peu significative dans toutes nos cellules THP-1. Après 48 h de stimulation au PMA, la sécrétion d'IL-1 augmente significativement dans les cellules WT mais reste basse dans les cellules hétérozygotes. La limite de sensibilité de l'ELISA IL-1 est de 2 pg/mL.

Nous avons ensuite comparé la sécrétion d'IL-1 sans stimulation des THP1 sauvage, du clone hétérozygote 21a et de deux des clones ne retrouvant aucune expression d'ADNc obtenus après la deuxième édition par CRISPR, les clones 18 et 56 (Figure 25). En l'absence de PMA, aucune sécrétion basale d'IL-1 n'est observée et il n'existe donc pas de différence significative entre les différents clones et les THP1 WT. L'absence de NLRP12 dans le clone 56 n'entraîne pas d'augmentation spontanée de la sécrétion d'IL-1 à 72 h, ce qui va plutôt à l'encontre d'un effet anti-inflammatoire de NLRP12. En effet, on s'attendrait dans ce cas à observer une hypersécrétion d'IL-1 même sans stimulation.

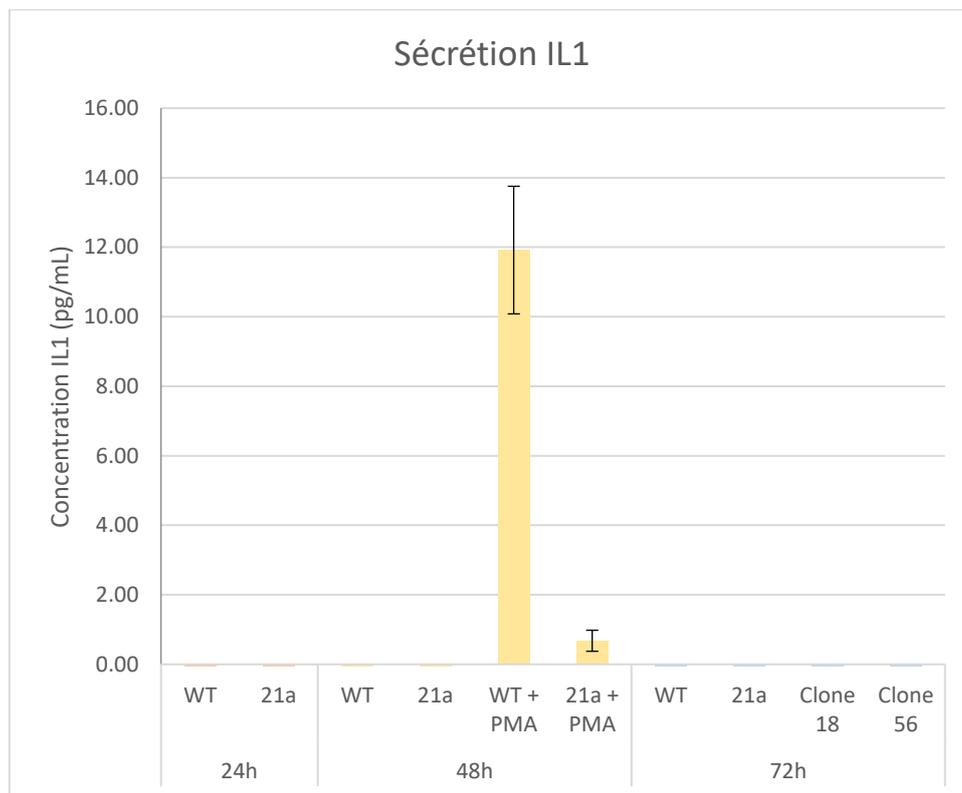


Figure 25. – **Comparaison de la sécrétion d'IL-1 (pg/mL) après 72h de culture sans PMA des cellules WT, du clone hétérozygote pour NLRP12 21a, du clone 18 et du clone 56 KO pour NLRP12 mesurée en ELISA.** En l'absence de PMA, on ne détecte aucune sécrétion basale d'IL-1. L'absence complète de NLRP12 (clone 18 et 56) n'entraîne pas d'augmentation de la sécrétion d'IL-1. La limite de sensibilité de l'ELISA est de 2 pg/mL.

Ces premières expériences nous ont permis de mettre en place notre protocole. L'expérience avec mesure en ELISA à 48 h après stimulation au PMA du clone 56 et 18 n'a pas encore été réalisée. De même, le clone 29 n'a pas pu être étudié lors de cette expérience car il n'était pas en culture. Ces premières expériences doivent être répétées en comparant nos deux clones d'intérêt (29 et 56) et en comparant les résultats obtenus avec et sans stimulation au PMA.

Pour finir, nous avons comparé la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 et de TNF α par les cellules WT, le clone hétérozygote 21a et nos deux clones d'intérêt présentant une délétion homozygote confirmé par séquençage (clones 29 et 56) avec et sans stimulation par PMA pendant 48h (Figure 26).

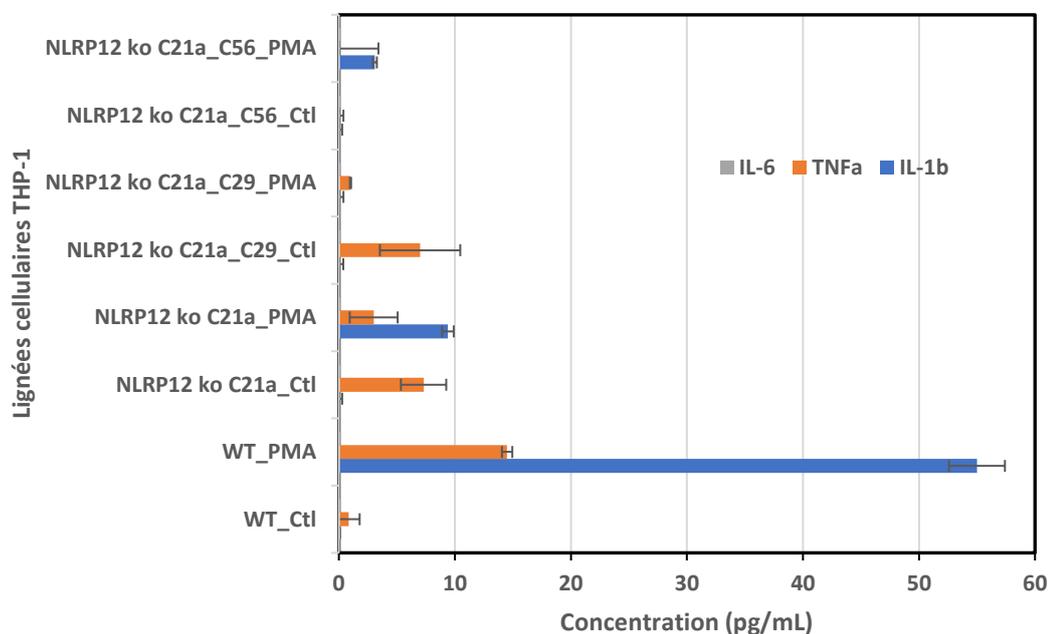


Figure 26. – Comparaison de la sécrétion des principales cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 et TNF α) mesuré en ELISA (pg/mL) par les lignées THP-1 WT, hétérozygote (21a) et KO (29 et 56) avec et sans stimulation au PMA (Ctl) après 48h de culture. La sécrétion d'IL-1 est retrouvée uniquement après stimulation au PMA et de manière plus importante dans les cellules sauvages. Le TNF α lui est retrouvé à l'état basal dans les cellules mutées (hétérozygotes ou homozygotes) mais diminue après stimulation au PMA alors qu'il augmente dans les cellules WT. Les limites de sensibilité des ELISA sont de 2 pg/mL pour l'IL-1 et l'IL-6 et de 4 pg/mL pour le TNF α .

A l'état basal, aucune sécrétion d'IL-1 n'est observée dans aucune des lignées. Après stimulation, cette sécrétion augmente, de manière plus importante dans les THP-1 WT que dans les autres lignées comme observé précédemment, à l'exception de la lignée 29 où aucune sécrétion d'IL-1 significative n'est décelée ce qui suggère à nouveau pour un rôle pro-inflammatoire de NLRP12 puisque son absence entraîne une diminution de la sécrétion d'IL-1 qui est une cytokine inflammatoire.

Le TNF α est sécrété de manière légèrement plus importante à l'état basal dans les lignées 21a et 29 que dans les cellules WT. Après stimulation, cette sécrétion diminue dans les deux premières lignées tandis qu'elle augmente dans la lignée WT suggérant là aussi pour un effet plutôt pro-inflammatoire de NLRP12.

Enfin aucune sécrétion d'IL6 n'a été observée dans nos modèles. Elle semble donc être moins intéressante à suivre que l'IL-1 et le TNF α .

Nos premiers résultats suggèrent donc un rôle pro-inflammatoire de NLRP12 après stimulation qui devra être confirmé par la répétition de nos expériences.

4. Discussion

Notre projet de recherche est transversal et vise une meilleure compréhension d'une maladie rare dont la physiopathologie est mal comprise. Mettre en place un modèle cellulaire fiable et reproductible permettrait d'une part de confirmer la pathogénicité des mutations retrouvées chez les patients mais également de leur proposer un traitement personnalisé en fonction des résultats obtenus. Ceci est d'autant plus important dans le *NLRP12*-AD compte tenu de sa transmission autosomique dominante. En effet, il n'est pas encore établi si les mutations de *NLRP12* présentent un effet dominant négatif ou s'il s'agit d'haploinsuffisance, ce qui entraînera forcément des conséquences sur le modèle utilisé.

La nécessité de changer de modèle après la mise en évidence de résultats non interprétables dans notre étude de surexpression souligne la difficulté d'interprétation des études initiales concernant *NLRP12*. La diversité des modèles utilisés dans cette maladie explique aussi probablement les résultats parfois discordants obtenus.

La régulation des voies de l'inflammation est complexe et il existe probablement des redondances entre certains acteurs de ces voies, notamment au sein des inflammasomes. Les paramètres à prendre en compte dans les modèles sont donc nombreux, complexes et souvent interconnectés.

L'utilisation de technique précise tel que l'édition génique par CRISPR-Cas9 est nécessaire pour améliorer la qualité de nos modèles. Cette technique complexe et longue a nécessité de nombreuses mises au point au cours de notre projet. Une fois les premières mutations obtenues, un processus minutieux de vérification de la spécificité et de la pathogénicité de ces mutations est nécessaire. La limite de ce modèle est le risque d'un effet hors cible (off target) avec l'apparition de mutations à un autre endroit du génome. Nous avons toutefois pris en compte cet aspect en choisissant soigneusement la séquence de l'ARN guide utilisé lors de notre CRISPR/Cas9 pour qu'elle soit extrêmement spécifique de la séquence visée au sein de l'exon 3.

Nous avons en parallèle mis en place tous les outils nécessaires à la réalisation des expériences dans nos cellules *NLRP12* KO. Il nous est apparu indispensable de confirmer précisément les conséquences des mutations de *NLRP12* à tous les niveaux (géniques, moléculaires et protéiques) afin de confirmer l'absence de protéine fonctionnelle avant d'envisager toute transduction et mesure de cytokines dans le modèle afin que nos résultats soient interprétables. Par ailleurs, l'analyse même du comportement des cellules *NLRP12* KO est probablement nécessaire afin de pouvoir les comparer

d'une part aux cellules sauvages mais également pour mieux interpréter les résultats de nos cellules transduites. La complexité du projet ne nous a malheureusement pas permis d'aller au bout des expériences prévues dans le temps imparti. Nous avons toutefois pu mettre en place l'ensemble des outils nécessaires à la poursuite du projet.

Les premiers résultats de nos ELISA semblent signer un rôle plutôt pro-inflammatoire de NLRP12 dans notre modèle puisque son absence est à l'origine d'une diminution de la sécrétion de l'IL-1 et du TNF α . Ceci pourrait expliquer le peu d'efficacité des principales biothérapies (Anakinra, canakinumab et anti-TNF) chez ces patients. Ces résultats doivent être confirmés d'une part en reproduisant notre expérience mais également en envisageant d'utiliser d'autres stimulants comme le LPS qui est un ligand des TLR, régulièrement utilisé comme premier signal dans les expériences sur l'inflammasome NLRP3, et ce afin de comparer d'éventuelles différences avec les profils de sécrétions de cytokines observés avec le PMA. L'étude de l'IL-18 aura aussi un intérêt majeur compte tenu de la physiopathologie de l'inflammasome. Son étude est toutefois plus coûteuse que celle des cytokines que nous avons testées ici et il n'existe pour le moment pas de molécule thérapeutique disponible en clinique ciblant l'IL-18 bien qu'un certain nombre soit en développement. Ceci explique notre choix d'optimiser d'abord notre modèle avant d'étudier l'IL-18. Compte tenu de la rareté de la maladie, l'utilisation directe du sang des patients pourrait s'avérer intéressante. Il s'agit toutefois d'enfants pour qui la répétition de prélèvements sanguins peut s'avérer difficile. Les conditions de transport, surtout depuis d'autres pays, peuvent également altérer certains paramètres sanguins.

Ce projet a permis de mettre en place une collaboration nord-américaine avec le centre du Texas Children's Hospital. Compte tenu de la rareté de la pathologie il est évidemment indispensable de travailler de manière multicentrique. Nous sommes donc en mesure de proposer aujourd'hui la description de 17 cas pédiatriques supplémentaires qui viendront s'ajouter aux 33 cas pédiatriques déjà rapportés dans la littérature. Cela permettra de continuer à mieux décrire ces patients et donc à améliorer nos capacités de diagnostic clinique, le NLRP12-AD étant une maladie polymorphe dont les manifestations cliniques sont peu spécifiques. Seuls les tableaux des 8 patients suivis dans notre centre sont rapportés dans cette étude, les 9 autres patients ayant été recrutés par l'équipe du Texas Children's Hospital.

5. Perspectives

Les étapes à venir dans notre projet de recherche sont nombreuses. Tout d'abord nous devons sélectionner le clone cellulaire à utiliser pour notre transduction. Les clones 18 et 56 sont les candidats les plus intéressants puisqu'ils présentent un profil suggérant possiblement un problème d'épissage à l'origine d'une absence d'ARNm. Le profil observé devra être confirmé par une nouvelle recherche d'ARNm en ajoutant un gène rapporteur à notre essai tel que l'actine pour s'assurer que les échantillons ne sont pas dégradés. Les mutations mises en évidence se situant à la jonction intron-exon seraient toutefois compatibles avec l'hypothèse d'une anomalie de l'épissage.

Les clones 29 et 56 présentent une délétion homozygote de 8 paires de base de l'exon 3. La dernière étape de confirmation de ces clones sera d'analyser l'expression de NLRP12 au niveau protéique par Western Blot et de s'assurer de l'absence de protéine fonctionnelle. L'intérêt d'optimiser notre T7 est discutable si l'on confirme le clone KO par séquençage, analyse de l'ARN et analyse de la protéine.

Une fois validé, l'analyse précise du comportement du clone KO par rapport au clone sauvage sera indispensable. Compte tenu de nos premiers résultats, il sera probablement nécessaire d'effectuer une différenciation de nos cellules au PMA afin d'obtenir des sécrétions de cytokine à un niveau suffisant pour l'analyse. Il sera toutefois intéressant de réaliser des mesures de chaque cytokines (IL-1, IL-6, IL-18 et TNF α) sans stimulation pour s'assurer de l'absence d'hypersécrétion spontanée dans notre modèle KO.

Les différents modèles à utiliser pour cette première étape seront les suivants :

- NLRP12 WT (Témoin positif)
- NLRP12 KO (NLRP12 -/-)
- NLRP12 KO cultivé avec un inhibiteur de la voie NF κ B (IKK α) ce qui permettra de savoir si l'effet observé passe exclusivement par la voie NF κ B. Si c'est le cas, ce modèle devrait se comporter comme NLRP12 WT.
- NLRP12 KO transduit avec la construction NLRP12_P2A_NLRP12WT qui devrait normalement récupérer le même phénotype que NLRP12 WT.

L'utilisation de notre construction NLRP12_P2A_NLRP12WT plutôt qu'un ADNc NLRP12 est plus complexe mais plus représentatif de la réalité. En effet, pour les patients présentant des mutations hétérozygotes, l'utilisation de cette construction permet de nous assurer que les deux gènes s'insèrent au même endroit dans le génome, dépendant donc du même promoteur. On obtiendra une

transcription équivalente des deux gènes sans risquer d'observer une sur-expression de l'une ou l'autre des allèles qui pourrait alors fausser l'interprétation de nos résultats.

L'objectif serait également de transduire l'ensemble de ces modèles avec notre lentivirus contenant NFkB-Luc afin de pouvoir évaluer l'activation de la voie NFkB par luciférase. Notre virus NFkB-Luc étant sélectionné par le même antibiotique que nos constructions NLRP12_P2A, la sélection devra nécessairement se faire en deux temps en cas de double transduction. Une transduction initiale avec la construction NFkB-Luc et une sélection via l'expression GFP permettant un tri par cytométrie en flux puis une transduction de la construction NLRP12_P2A et une sélection par antibiotique.

Les paramètres analysés seraient donc la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6, TNF α et IL-18), mesurés par protocole ELISA tel que décrit dans notre étude. On pourra également doser l'ARNm des différentes cytokines étudiées, en ajoutant un contrôle interne de gène rapporteur pour s'assurer que chaque échantillon n'est pas dégradé. Le niveau d'activation de la voie NFkB sera mesurée par luciférase et par Western Blot. Le protocole expérimental ainsi que les résultats attendus sont résumés dans la figure 27. Les marqueurs d'activation de la voie NFkb envisagé sont pour la voie canonique p65 et l'hyperphosphorylation d'IRAK1 et pour la voie non canonique NIK et p100.

Afin de rechercher rapidement un effet dominant négatif des mutations de *NLRP12*, il pourrait également être envisagé de transduire directement nos mutations (déjà produites sous forme de lentivirus) dans des cellules WT et d'observer si ces mutations entraînent des conséquences sur la sécrétion cytokinique observée.

Secondairement, nous souhaitons évaluer la capacité de NLRP12 à former un inflammasome et les conséquences des mutations sur cette capacité. Pour ce faire, deux méthodologies complémentaires sont prévues. Pour commencer, nous aimerions utiliser l'immunofluorescence. Brièvement, un marquage fluorescent serait ajouté au sein de nos vecteurs NLRP12 avant transduction. NLRP12 pourrait ensuite être co-transduit dans les cellules *NLRP12* KO avec NLRP3, ASC et caspase-1 marqués également avec un fluorochrome. On pourra ensuite analyser la formation d'inflammasome par microscopie confocale mais également observer d'éventuelle interaction ou redondance entre les inflammasomes. Nous pourrions également réaliser de l'immunoprécipitation.

La deuxième méthodologie consistera en la réalisation d'une construction de NLRP12 biotinylé qui permettra d'étudier les interactions spontanées de NLRP12 après activation des cellules sans présupposer des acteurs impliqués dans ces interactions.

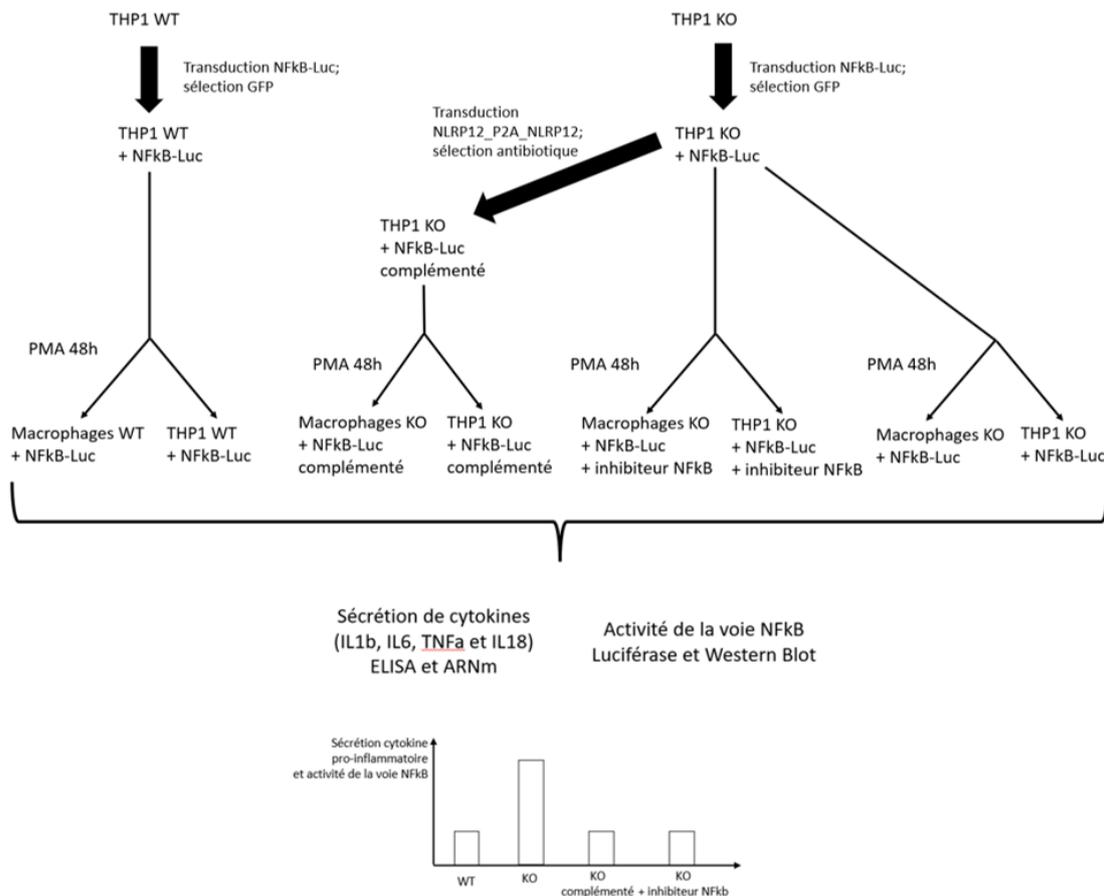


Figure 27. – Proposition de protocole expérimental d'étude de l'activation de la voie NFκB et de la sécrétion de cytokines et résultats attendus. Ce protocole permettra d'une part d'étudier le comportement des cellules NLRP12 KO mais également de s'assurer de la validité du modèle et notamment du bon fonctionnement de nos construction NLRP12_P2A_NLRP12WT. Le but est de s'assurer que nous sommes capables de rétablir de la fonction « sauvage » de nos cellules et de définir si seule la voie NFκB est impliquée dans le phénotype observé.

Une fois le modèle KO et le modèle complémenté validé il nous sera possible de transduire les différentes mutations des patients au sein de notre modèle KO et comparer l'activation de la voie NFκB, la sécrétion de cytokines et la formation d'inflammasome pour chacune des mutations par rapport aux cellules sauvages et aux cellules KO. Une comparaison avec notre mutant 21a (hétérozygote) pourrait également être intéressante dans les expériences de validation du modèle, la plupart des patients présentant des mutations hétérozygotes. Les activateurs spécifiques de NLRP12 n'étant pas connu, plusieurs pistes devront être explorées, notamment celle du LPS comme cité plus haut.

Pour finir, sur le plan clinique, nous avons pris la décision d'élargir notre recrutement et de contacter d'autres centres afin d'essayer de décrire un maximum de patients diagnostiqués à l'âge pédiatrique encore non rapportés dans la littérature. Un contact a donc été pris avec le CHUM à Montréal (qui suit des patients adultes mais dont certains ont été diagnostiqués à l'âge pédiatrique) ainsi que l'hôpital Robert Debré à Paris.

6. Conclusion

Ce travail de recherche a permis de mettre en place les différents outils nécessaires à la poursuite de notre étude.

Le syndrome périodique lié à NLRP12 (NLRP12-AD) est une maladie rare. Seul 33 cas pédiatriques sont actuellement décrits dans la littérature. Nous avons recruté 17 patients provenant de deux centres de recherche nord-américain et avons standardisé le recueil des données cliniques et paracliniques. Huit patients ont été recrutés au sein du CHU Sainte Justine. Les mutations de *NLRP12* des 9 autres patients ont été récupérées. Nous avons également décidé d'élargir le recrutement à d'autres centres afin de décrire un maximum de patients. Cela permettra de mieux définir le tableau clinique des patients et donc d'améliorer la capacité des cliniciens à les détecter et les diagnostiquer.

Le NLRP12-AD est une maladie autosomique dominante. La physiopathologie sous-jacente reste encore actuellement débattue, NLRP12 ayant été décrit comme jouant un rôle anti-inflammatoire par sa capacité d'inhibition des voies canoniques et non-canoniques de NF κ B mais également pro-inflammatoire en formant un inflammasome. Ce rôle pourrait être dépendant du type et de l'intensité de la stimulation immunologique. Cet effet paradoxalement opposé rend difficile l'interprétation de la pathogénicité des mutations retrouvées chez les patients suspects de NLRP12-AD. L'utilisation d'un modèle *in vitro* au plus proche des conditions réelles semble donc indispensable à l'amélioration de nos connaissances sur cette pathologie et à une meilleure prise en charge des patients, depuis le diagnostic jusqu'à la prise en charge thérapeutique.

Une fois notre modèle KO validé il sera possible de tester n'importe quelle mutation de patients et d'analyser ses conséquences sur :

- L'activation de la voie NF κ B
- La formation et l'activation d'inflammasome
- La sécrétion de cytokines ; avec un impact direct sur le choix des traitements à proposer aux patients

Ce projet transversal souligne bien la nécessité de l'interconnexion permanente entre nos connaissances fondamentales sur le fonctionnement du système immunitaire et le travail clinique de prise en charge et de description de patients atteints de nouvelles maladies auto-inflammatoires.

Bibliographie

1. Sibia J. Comment définir et classer les maladies inflammatoires? *Rev Rhum.* 1 sept 2007;74(8):714-25.
2. Kastner, D.L. Intermittent and periodic arthritic syndromes. *Arthritis Allied Cond 13th Ed WJ Koopman Ed Baltim Md Williams Wilkins.* 1996;1279-1306.
3. The International FMF Consortium. Ancient Missense Mutations in a New Member of the RoRet Gene Family Are Likely to Cause Familial Mediterranean Fever. *Cell.* 22 août 1997;90(4):797-807.
4. The French FMF Consortium, Bernot A, Clepet C, Dasilva C, Devaud C, Petit JL, et al. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet.* sept 1997;17(1):25-31.
5. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell.* 2 avr 1999;97(1):133-44.
6. Gattorno M, Sormani MP, D’Oswaldo A, Pelagatti MA, Caroli F, Federici S, et al. A diagnostic score for molecular analysis of hereditary autoinflammatory syndromes with periodic fever in children. *Arthritis Rheum.* juin 2008;58(6):1823-32.
7. Ben-Chetrit E, Gattorno M, Gul A, Kastner DL, Lachmann HJ, Touitou I, et al. Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(11):1558-65.
8. de Jesus AA, Canna SW, Liu Y, Goldbach-Mansky R. Molecular Mechanisms in Genetically Defined Autoinflammatory Diseases: Disorders of Amplified Danger Signaling. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:823-74.
9. Geogin-Lavialle S, Rodrigues F, Hentgen V, Fayand A, Quartier P, Bader-Meunier B, et al. [Clinical overview of auto-inflammatory diseases]. *Rev Med Interne.* avr 2018;39(4):214-32.
10. Vitale A, Rigante D, Lucherini OM, Caso F, Muscari I, Magnotti F, et al. Biological Treatments: New Weapons in the Management of Monogenic Autoinflammatory Disorders. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 [cité 23 oct 2020];2013. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3736401/>
11. Pathak S, McDermott MF, Savic S. Autoinflammatory diseases: update on classification diagnosis and management. *J Clin Pathol.* janv 2017;70(1):1-8.
12. Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun.* 1 mai 2020;109:102421.
13. McGonagle D, McDermott MF. A Proposed Classification of the Immunological Diseases. *PLOS Med.* 29 août 2006;3(8):e297.
14. Comparison of the clinical diagnostic criteria and the results of the next-generation sequence gene panel in patients with monogenic systemic autoinflammatory diseases | SpringerLink [Internet]. 2022 [cité 28 juin 2022]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-020-05492-8>

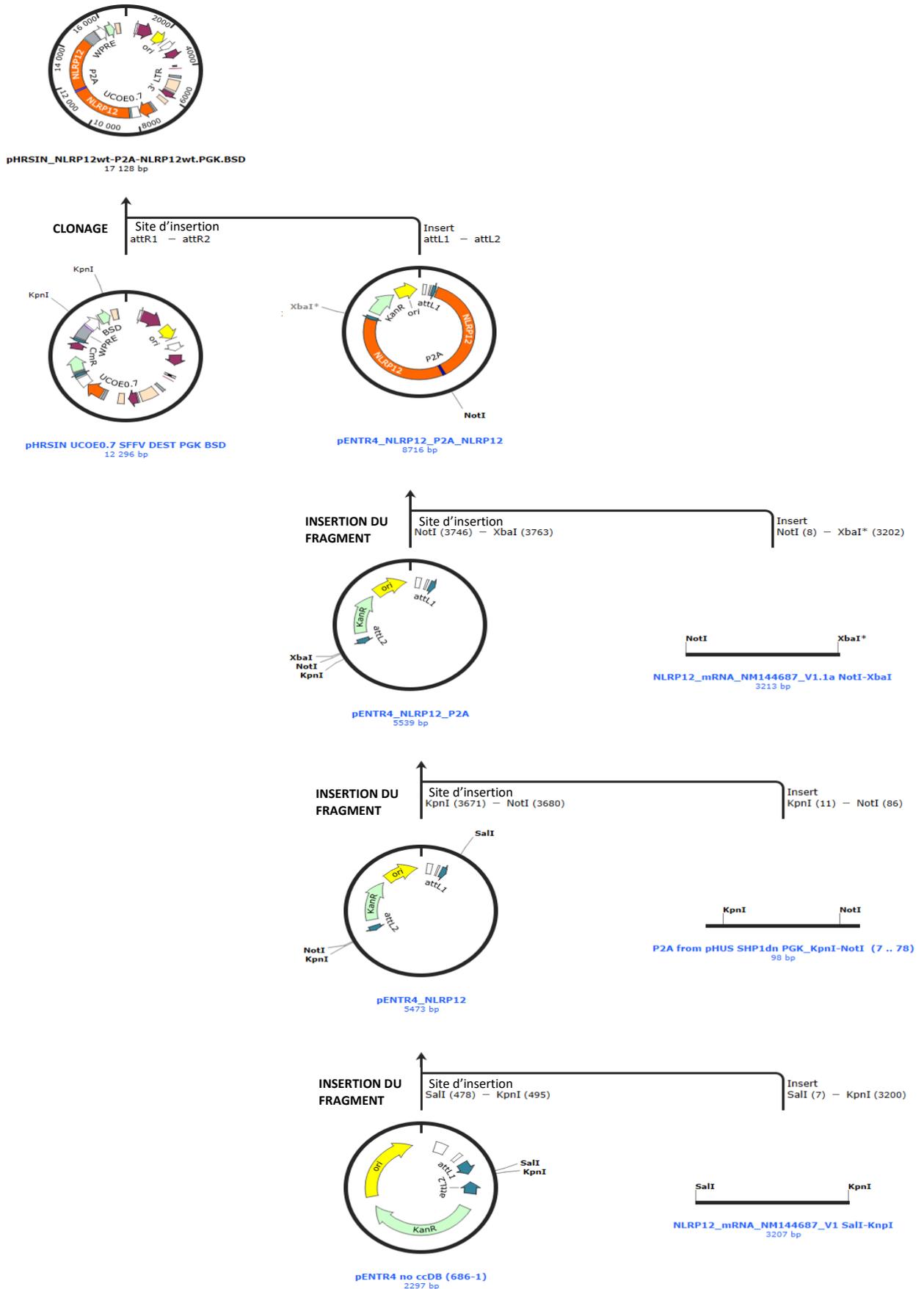
15. Jamilloux Y, Belot A, Magnotti F, Benezech S, Gerfaud-Valentin M, Bourdonnay E, et al. Geoepidemiology and Immunologic Features of Autoinflammatory Diseases: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. juin 2018;54(3):454-79.
16. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Mol Cell*. 1 août 2002;10(2):417-26.
17. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65.
18. Wilson SP, Cassel SL. Inflammasome mediated autoinflammatory disorders. *Postgrad Med*. sept 2010;122(5):125-33.
19. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 21 oct 2020];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00333/full>
20. Lupfer C, Kanneganti TD. Unsolved Mysteries in NLR Biology. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 23 oct 2020];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00285/full#B80>
21. Babamale AO, Chen ST. Nod-like Receptors: Critical Intracellular Sensors for Host Protection and Cell Death in Microbial and Parasitic Infections. *Int J Mol Sci*. janv 2021;22(1):11398.
22. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol*. févr 2013;16(1):23-31.
23. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 6 juill 2019;20(13):3328.
24. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 14 juill 2017;2(1):1-9.
25. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):821-32.
26. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 Forms an IL-1 β -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity*. 1 mars 2004;20(3):319-25.
27. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. nov 2001;29(3):301-5.
28. Wang L, Manji GA, Grenier JM, Al-Garawi A, Merriam S, Lora JM, et al. PYPAF7, a Novel PYRIN-containing Apaf1-like Protein That Regulates Activation of NF- κ B and Caspase-1-dependent Cytokine Processing. *J Biol Chem*. 16 août 2002;277(33):29874-80.
29. Pinheiro AS, Eibl C, Ekman-Vural Z, Schwarzenbacher R, Peti W. The NLRP12 Pyrin Domain – Structure, Dynamics and Functional Insights. *J Mol Biol*. 4 nov 2011;413(4):790-803.
30. Williams KL, Lich JD, Duncan JA, Reed W, Rallabhandi P, Moore C, et al. The CATERPILLER Protein Monarch-1 Is an Antagonist of Toll-like Receptor-, Tumor Necrosis Factor α -, and Mycobacterium tuberculosis-induced Pro-inflammatory Signals. *J Biol Chem*. 12 févr 2005;280(48):39914-24.

31. Ye Z, Lich JD, Moore CB, Duncan JA, Williams KL, Ting JPY. ATP Binding by Monarch-1/NLRP12 Is Critical for Its Inhibitory Function. *Mol Cell Biol.* mars 2008;28(5):1841-50.
32. Zaki MdH, Vogel P, Subbarao Malireddi RK, Body-Malapel M, Anand PK, Bertin J, et al. The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 15 nov 2011;20(5):649-60.
33. Zaki MH, Man SM, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 janv 2014;111(1):385-90.
34. Allen IC, Wilson JE, Schneider M, Lich JD, Roberts RA, Arthur JC, et al. NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Non-canonical NF- κ B Signaling and MAP Kinase Activation. *Immunity.* 25 mai 2012;36(5):742-54.
35. Chen L, Wilson JE, Koenigskecht MJ, Chou WC, Montgomery SA, Truax AD, et al. NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth. *Nat Immunol.* mai 2017;18(5):541-51.
36. Truax AD, Chen L, Tam JW, Cheng N, Guo H, Koblansky AA, et al. The Inhibitory Innate Immune Sensor NLRP12 Maintains a Threshold against Obesity by Regulating Gut Microbiota Homeostasis. *Cell Host Microbe.* 12 sept 2018;24(3):364-378.e6.
37. Udden SN, Kwak YT, Godfrey V, Khan MAW, Khan S, Loof N, et al. NLRP12 suppresses hepatocellular carcinoma via downregulation of cJun N-terminal kinase activation in the hepatocyte. *Cao X, Taniguchi T, éditeurs. eLife.* 16 avr 2019;8:e40396.
38. Lich JD, Williams KL, Moore CB, Arthur JC, Davis BK, Taxman DJ, et al. Cutting Edge: Monarch-1 Suppresses Non-Canonical NF- κ B Activation and p52-Dependent Chemokine Expression in Monocytes. *J Immunol.* 1 févr 2007;178(3):1256-60.
39. Ulland TK, Jain N, Hornick EE, Elliott EI, Clay GM, Sadler JJ, et al. Nlrp12 mutation causes C57BL/6J strain-specific defect in neutrophil recruitment. *Nat Commun.* 25 oct 2016;7(1):13180.
40. Zamoshnikova A, Groß CJ, Schuster S, Chen KW, Wilson A, Tacchini-Cottier F, et al. NLRP12 is a neutrophil-specific, negative regulator of in vitro cell migration but does not modulate LPS- or infection-induced NF- κ B or ERK signalling. *Immunobiology.* 1 févr 2016;221(2):341-6.
41. Chen ST, Chen L, Lin DSC, Chen SY, Tsao YP, Guo H, et al. NLRP12 Regulates Anti-viral RIG-I Activation via Interaction with TRIM25. *Cell Host Microbe.* 10 avr 2019;25(4):602-616.e7.
42. Allen IC, McElvania-TeKippe E, Wilson JE, Lich JD, Arthur JC, Sullivan JT, et al. Characterization of NLRP12 during the in vivo host immune response to *Klebsiella pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2013;8(4):e60842.
43. Silveira TN, Gomes MTR, Oliveira LS, Campos PC, Machado GG, Oliveira SC. NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*. *Eur J Immunol.* janv 2017;47(1):51-9.
44. Pudla M, Srisaowakarn C, Utaisincharoen P. NLRP12 negatively modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and tumor necrosis factor- α production in *Porphyromonas gingivalis* LPS-treated mouse macrophage cell line (RAW264.7). *Inflamm Res.* 1 oct 2019;68(10):841-4.

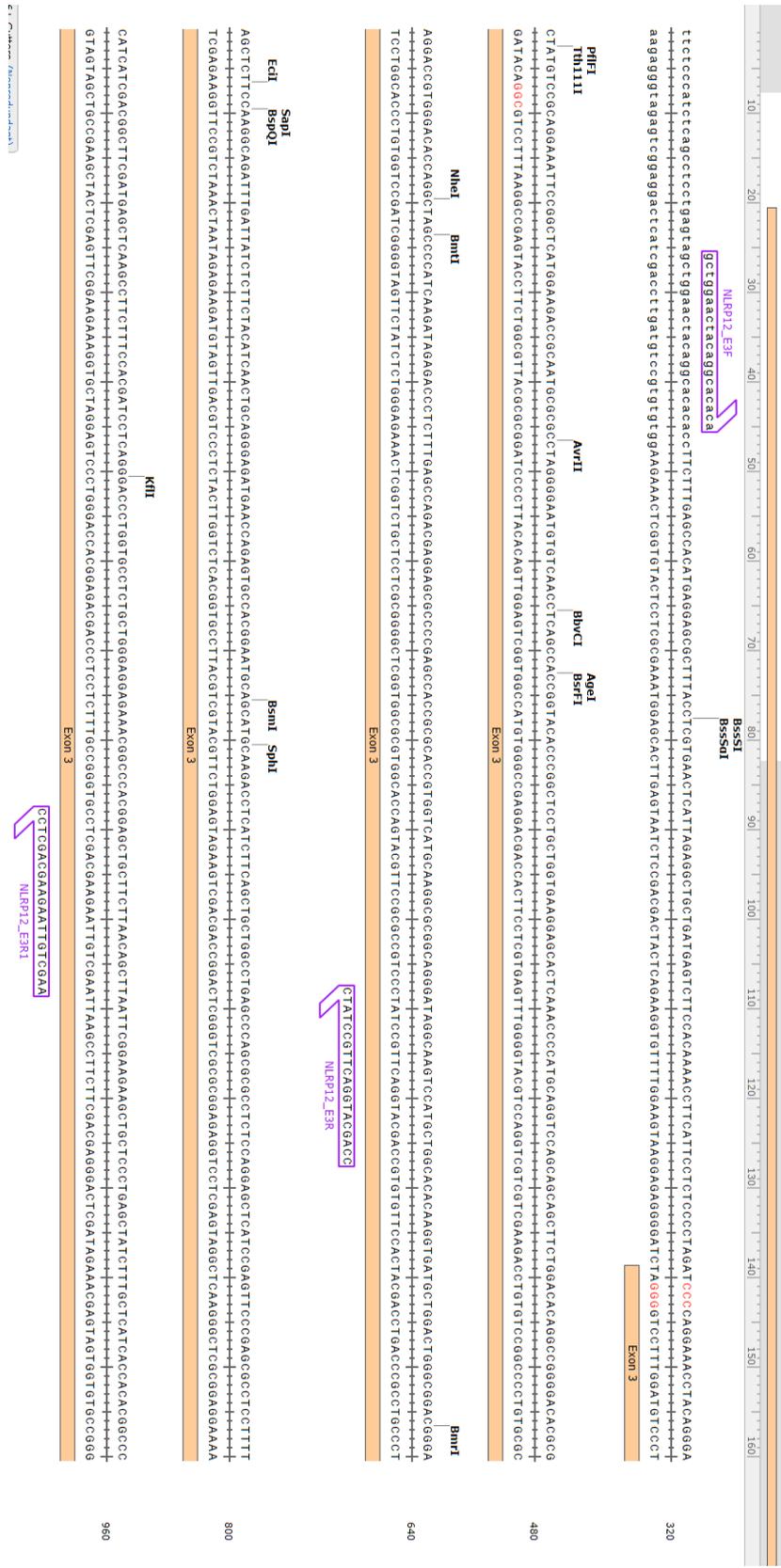
45. Hornick EE, Banoth B, Miller AM, Zacharias ZR, Jain N, Wilson ME, et al. Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection. *J Immunol.* 1 févr 2018;200(3):1188-97.
46. Lukens JR, Gurung P, Shaw PJ, Barr MJ, Zaki MdH, Brown S, et al. NLRP12 negatively regulates autoinflammatory disease by modulating interleukin-4 production in T cells. *Immunity.* 21 avr 2015;42(4):654-64.
47. Tuladhar S, Kanneganti TD. NLRP12 in innate immunity and inflammation. *Mol Aspects Med.* 22 août 2020;100887.
48. Vladimer GI, Weng D, Paquette SWM, Vanaja SK, Rathinam VAK, Aune MH, et al. The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity.* 27 juill 2012;37(1):96-107.
49. Ataide MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza M do C, Franklin BS, et al. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection. *PLoS Pathog [Internet].* 16 janv 2014 [cité 21 oct 2020];10(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894209/>
50. Tuncer S, Fiorillo MT, Sorrentino R. The multifaceted nature of NLRP12. *J Leukoc Biol.* 2014;96(6):991-1000.
51. Gharagozloo M, Mahmoud S, Simard C, Mahvelati TM, Amrani A, Gris D. The Dual Immunoregulatory function of Nlrp12 in T Cell-Mediated Immune Response: Lessons from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cells [Internet].* 27 août 2018 [cité 28 août 2020];7(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162721/>
52. Jéru I, Duquesnoy P, Fernandes-Alnemri T, Cochet E, Yu JW, Lackmy-Port-Lis M, et al. Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 févr 2008;105(5):1614-9.
53. Jéru I, Le Borgne G, Cochet E, Hayrapetyan H, Duquesnoy P, Grateau G, et al. Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndromes. *Arthritis Rheum.* 1 mai 2011;63(5):1459-64.
54. Del Porto F, Cifani N, Proietta M, Verrecchia E, Di Rosa R, Manna R, et al. NLRP12 gene mutations and auto-inflammatory diseases: ever-changing evidence. *Rheumatology [Internet].* 28 août 2020 [cité 28 août 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/keaa304/5877487>
55. Wang H fang. NLRP12-associated systemic autoinflammatory diseases in children. *Pediatr Rheumatol.* 5 févr 2022;20(1):9.
56. Syndrome périodique lié à NLRP12 (NAPS12) : Généralités [Internet]. 2019 [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.fai2r.org/les-pathologies-rares/x-nouvelles-maladies-auto-inflammatoires-genetiques/syndrome-periodique-lie-a-nlrp12-naps12/generalites/>
57. Vitale A, Rigante D, Maggio MC, Emmi G, Romano M, Silvestri E, et al. Rare NLRP12 variants associated with the NLRP12-autoinflammatory disorder phenotype: an Italian case series. *Clin Exp Rheumatol.* juin 2013;31(3 Suppl 77):155-6.
58. Kostik MM, Suspitsin EN, Guseva MN, Levina AS, Kazantseva AY, Sokolenko AP, et al. Multigene sequencing reveals heterogeneity of NLRP12-related autoinflammatory disorders. *Rheumatol Int.* 1 mai 2018;38(5):887-93.

59. Yang X, Zhao B, Liao Y. Analysis on misdiagnosis of a case of novel variant of NLRP12. *Ann Rheum Dis*. 31 août 2020;
60. Gupta L, Ahmed S, Singh B, Prakash S, Phadke S, Aggarwal A. Novel NLRP12 variant presenting with familial cold autoimmunity syndrome phenotype. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 24 août 2019 [cité 20 oct 2020]; Disponible sur: <https://ard.bmj.com/content/early/2019/08/23/annrheumdis-2019-216158>
61. Ghosh K, Mishra K, Shah A, Patel P, Shetty S. Novel Deleterious Sequence Change in the NLRP12 Gene in a Child with the Autoinflammatory Syndrome, Joint Hypermobility and Cutis Laxa from India. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 1 mars 2019 [cité 28 août 2020];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6402545/>
62. Başaran Ö, Uncu N, Çakar N, Turanlı ET, Kiremitci S, Aydın F, et al. C3 glomerulopathy in NLRP12-related autoinflammatory disorder: case-based review. *Rheumatol Int*. 1 août 2018;38(8):1571-6.
63. Jéru I, Hentgen V, Normand S, Duquesnoy P, Cochet E, Delwail A, et al. Role of interleukin-1 β in NLRP12-associated autoinflammatory disorders and resistance to anti-interleukin-1 therapy. *Arthritis Rheum*. 1 juill 2011;63(7):2142-8.
64. Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep*. 19 mai 2017;7(1):2193.

Annexe 2: Résumé des étapes de clonage pour la création finale du plasmide pHR SIN.UCOE0.7.SFFV.DEST.PGK.BSD_hNLRP12WT_P2A_NLRP12WT utilisé pour la production lentivirale

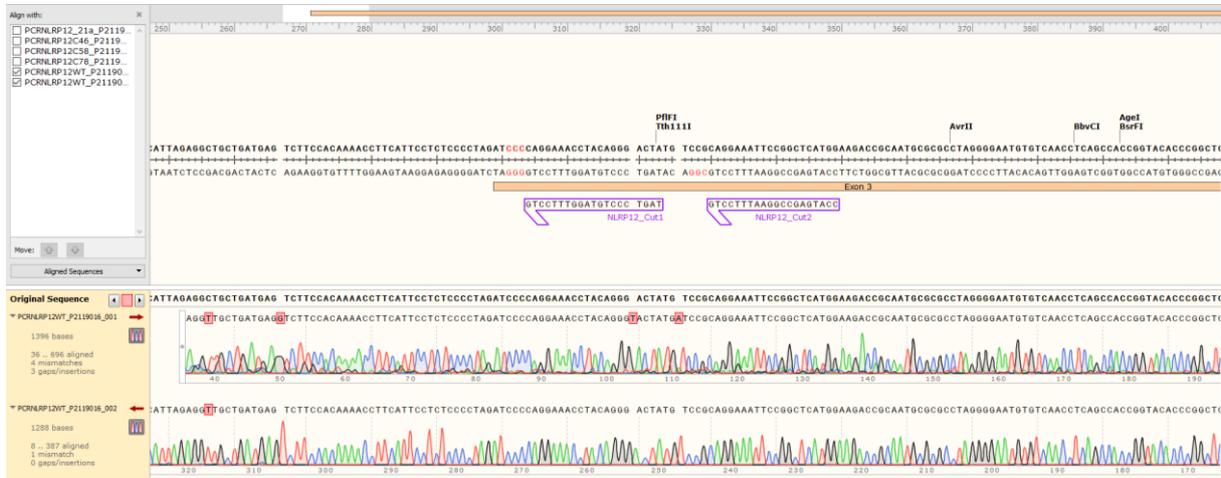


Annexe 3: Localisation des amorces E3F, E3R et E3R1 utilisées pour l'amplification par PCR de l'ADN génomique de l'exon 3 de NLRP12.

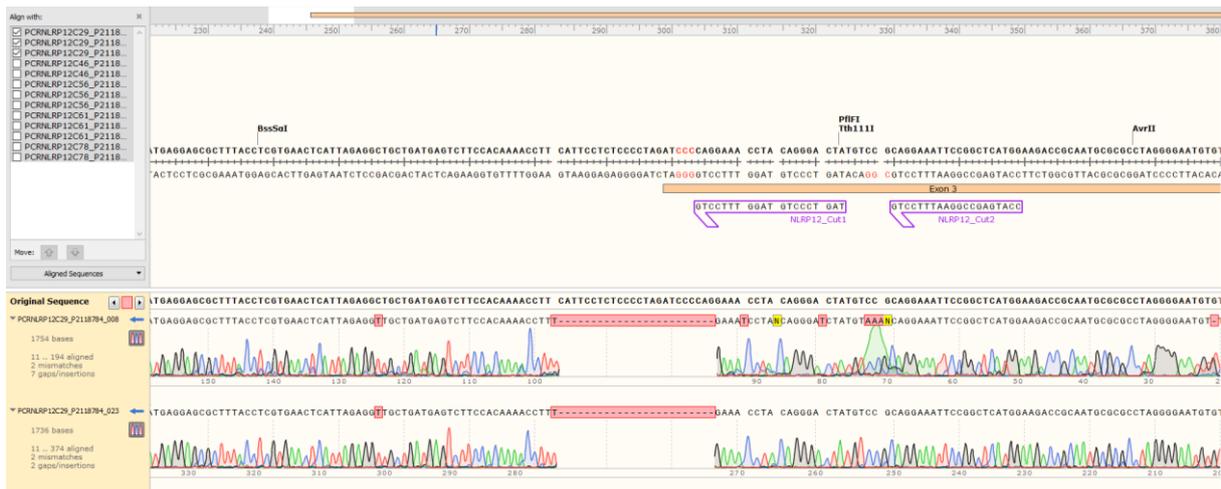


Annexe 5: Séquençage de l'exon 3 de *NLRP12* des clones 29 et 56 retrouvant une délétion de 24 paires de base.

Contrôle sauvage :



Clone 29 :

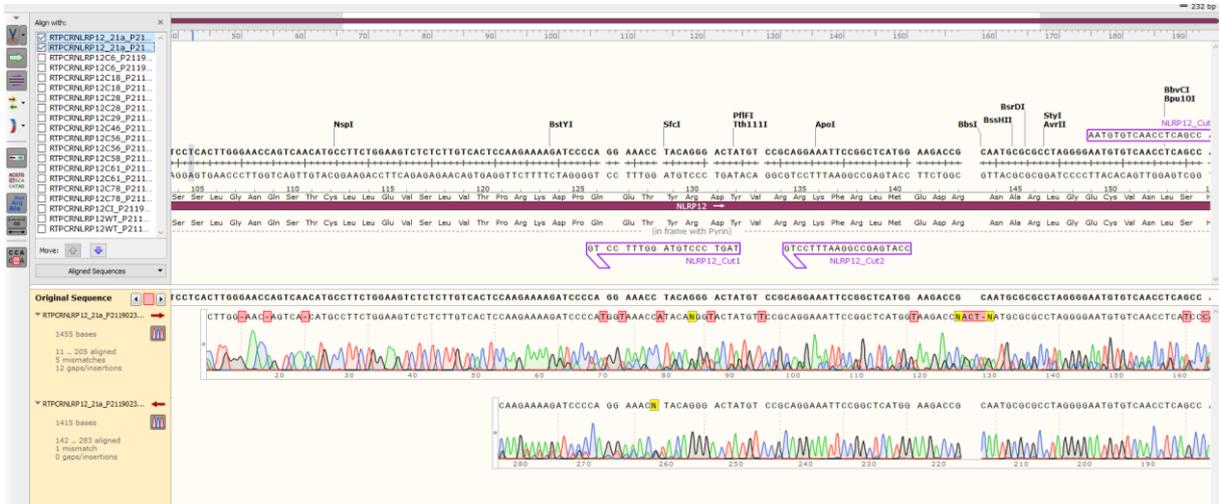


Clone 56 :

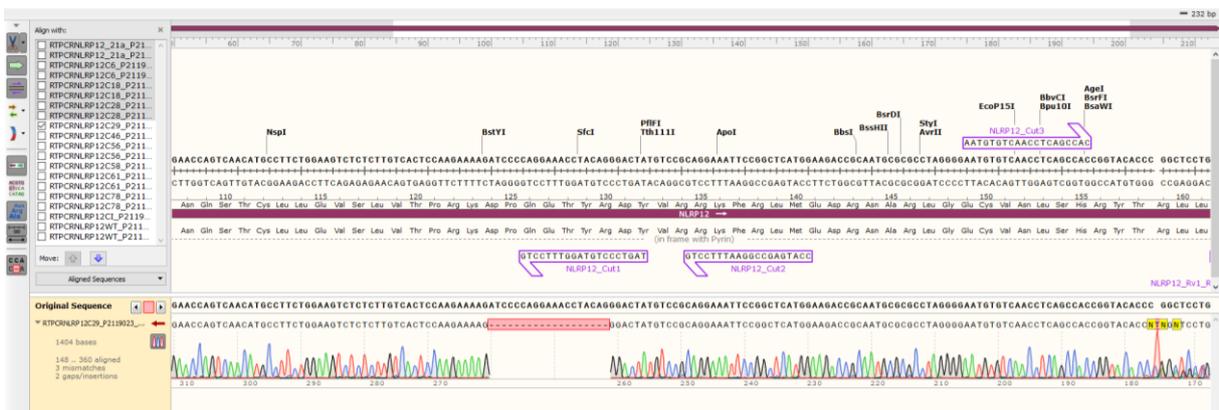


Annexe 6: Séquençage de l'ADNc après RT-PCR l'exon 3 de *NLRP12* des clones 21a, 29 et 56.

Clone 21a :



Clone 29 :



Clone 56 :

