Université de Strasbourg

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)

Unité de recherche CNRS UPR 3572

Thèse d'université

Soutenue publiquement le 1er Avril 2019 par :

Aurélien GUFFROY

Né le 14.01.1987 à Villeurbanne (69)

Discipline : **Science de la Vie et de la Santé**

Spécialité : **Immunologie**

ETUDE DES MECANISMES DE RUPTURE DE TOLERANCE LYMPHOCYTAIRE AU COURS DES DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS DE L'ADULTE AVEC MANIFESTATIONS AUTO-IMMUNES

Unité de Recherche :

I.B.M.C. (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire)
UPR3572 – I2CT UPR3572 Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique

15 Rue R. Descartes
67 084 Strasbourg Cedex
France

DIRECTEUR :
Madame le Professeur KORGANOW Anne-Sophie
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (I.B.M.C.), UPR3572; Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique ▪ CHU de Strasbourg ▪ Strasbourg ▪ France

RAPPORTEURS :
Monsieur le Professeur Patrick BLANCO
CNRS UMR 5164 - Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique. – CHU de Bordeaux – France
Monsieur le Docteur Sven KRACKER
IHU Imagine Institut des Maladies Génétiques – Laboratoire Lymphohématopoïese Humaine – Paris – France

AUTRE MEMBRE :
Madame le Professeur Hélène DOLLFUS
Inserm U1112 – Laboratoire de Génétique Médicale – Faculté de Médecine de Strasbourg – Strasbourg – France.

A ceux qui m’entourent. Pour leur soutien.

Aux malades, qui guident nos choix.

REMERCIEMENTS

- **Madame le Professeur Hélène DOLLFUS**
  Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Recevez l'expression de mes remerciements les plus sincères.
  Votre accueil ainsi que celui de Corinne Stoezel dans votre unité de recherche ont été précieux.

- **Monsieur le Professeur Patrick BLANCO**
  Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver l'expression de ma sincère reconnaissance pour le temps consacré à ce travail.

- **Monsieur le Docteur Sven KRACKER**
  Vous me faites l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail. C'est un privilège de pouvoir bénéficier de votre expertise dans l'évaluation de ce travail.

- **A mon directeur de thèse**,
  Me le Professeur Anne-Sophie KORGANOW
  Toi qui fais preuve d'une patiente détermination pour me guider en Science et en Médecine. Merci.

PUBLICATIONS

(Les publications en lien avec ma thèse de science sont surlignées en *vert*)

POSITION	ANNEE	REVUE	IMPACT FACTOR (IF)	RANG	TITRE	LISTE DES AUTEURS
Dernier auteur	2018	Rev Med Interne	IF 1.126	D	Hughes-Stovin syndrome: About one case in a young man with recurrent thrombosis and pulmonary artery aneurysm and literature review	T. El Jamma, P.-E. Gavand, M. Martin, A.-S. Korganow, A. Guffroy
Dernier auteur	2018	Arthritis Rheumatol	IF 6.918	A	Persistent acrocyanosis : a rare manifestation revealing anti-PL12 syndrome	Mertz P, Herber M, Jeannel J, Korganow AS, Guffroy A.
1er auteur	2018	Orphanet Journal of Rare Diseases (OJRD)	IF 3.607	C	Infection risk among adults with down syndrome: a two group series of 101 patients in a tertiary center	Guffroy A, Dieudonné Y, Uring-Lambertb B, Goetz J, Alembikc Y, Korganow AS
1er auteur	2018	Clin Immunol	IF 3.557	C	Adolescents and young adults (AYAs) affected by chronic immunological disease: A tool-box for success during the transition to adult care	Guffroy A, Martin T, Korganow AS
1er auteur	2017	J Clin Immunol.	IF 4.227	C	Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome	Guffroy A, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, Pouliet A, Nitschké P, Hanein S, Bienvenu B, Chanet V, Donadieu J, Gardembas M, Karmochkine M, Nove-Josserand R, Martin T, Poindron V, Soulas-Sprauel P, Rieux-Laucat F, Fieschi C, Oksenhendler E, André-Schmutz I, Korganow AS; DEFI study group.
1er auteur	2017	Rev Med Interne	IF 1.126	D	Primary immunodeficiency and autoimmunity.	**Guffroy A**, Gies V, Martin M, Korganow AS. Primary immunodeficiency and autoimmunity.
1er auteur	2016	Semin Arthritis Rheum.	IF 4.498	B	Systemic capillary leak syndrome and autoimmune diseases: A case series.	Guffroy A, Dervieux B, Gravier S, Martinez C, Deibener-Kaminsky J, Hachulla E, et al.
1er auteur	2016	Joint Bone Spine.	IF 3.329	C	Anti-pseudo-PCNA type 1 (anti-SG2NA) pattern: Track down Cancer, not SLE.	Guffroy A, Dima A, Nespola B, Poindron V, Sibilia J, Herbrecht R, et al.
1er auteur	2015	Arthritis Rheumatol	IF 6.918	A	Chloroma--an uncommon cause of arthritis.	Guffroy A, Helali M, Merle B, Imperiale A, Chatelus E.
2ème auteur	2018	J Clin Immunol.	IF 4.227	C	Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Primary Immunodeficiencies.	Hadjadj J, Guffroy A, Delavaud C, Taieb G, Meyts I, Fresard A, Streichenberger N, L'Honneur AS, Rozenberg F, D'Aveni M, Aguilar C, Rosain J, Picard C, Mahlaoui N, Lecuit M, Hermine O, Lortholary O, Suarez F.
2ème auteur	2018	J Rheumatol	IF 3,150	B	Tongue and scalp necrosis: simultaneous initial complications revealing giant cell artheritis	Fongaufier C, Guffroy A, Lutz J-C
2ème auteur	2017	Med Sci (Paris)	IF 0.417	E	Thymic B cells: not simple bystanders of T cell lymphopoiesis	Gies V, **Guffroy A**, Korganow AS
2ème auteur	2017	Rev Med Interne	IF 1.126	D	Lupus and lymphopenia	Martin M, **Guffroy A**, Argemi X, Martin T.
2ème auteur	2017	J Allergy Clin Immunol	IF 13.081	A	B cells differentiate in human thymus and express AIRE	Gies V, **Guffroy A**, Danion F, Billaud P, Keime C, Fauny J-D, et al.

Avant-dernier auteur	2018	Lupus Science & Medicine	IF 2.88	D	The 10 most important contemporary challenges in the management of Systemic Lupus Erythematosus	Felten R, Sagez F, Gavand PE, Martin T, Korganow AS, Sordet AS, Javier RM, Soulas-Sprauel P, Riviere M, Scher F, Poindron V, Guffroy A, Arnaud L
Avant-dernier auteur	2018	Med Mal Inf	IF 1.307	E	First case of Comamonas aquatica bacteremia complicated by septic shock.	Kaeuffer C, Schramm F, Meyer A, Hansmann Y, Guffroy A, Argemi X.
3ème auteur	2018	Rev Med Interne	IF 1.126	D	Sinusoidal obstruction syndrome after BeAM confitionning regiment for autologous stem cell transplantation: imputability of Bendamustine? About two cases and litterature review	Meyer A, Fornecker LM, Guffroy A, Korganow AS, Martin M
3ème auteur	2016	Médecine Thérapeutique.	ND	ND	Biomédicaments « cibles » dans les maladies auto-immunes et inflammatoires systémiques.	Sagez F, Mallick A, Guffroy A, Sordet C, Rahal N, Chatelus E, Javier R-M, Gottenberg J-E, Sibilia J.
> 3ème auteur	2017	Sci Rep	IF 5,228	B	Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes	Gies V, Wagner A, Seifert C, **Guffroy A,** Fauny JD, Knapp AM, Pasquali JL, Martin T, Dumortier H, Korganow AS, Soulas-Sprauel P.
> 3ème 18auteur	2017	Genome Biol Evol	IF 3.979	C	Whole-Genome Sequencing of Seven Strains of Staphylococcus lugdunensis Allows Identification of Mobile Genetic Elements	Argemi X, Martin V, Loux V, Dahyot S, Lebeurre J, Guffroy A, Martin M, Velay A, Keller D, Riegel P, Hansmann Y, Paul N, Prévost G
> 3ème auteur	2018	JCI Insight	NC	Open access	Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus.	Gies V, Schickel J-N, Jung S, Joublin A, Glauzy S, Knapp A-M, Soley A, Poindron P, **Guffroy A**, Choi J-Y, Anolik J-H. Gottenberg J-E, Martin T, Soulas-Sprauel P, Meffre E, Korganow A-S
> 3ème auteur	2018	RMD Open	3,47	C	Mixed connective tissue disease: state of the art on clinical practice guidelines.	Benjamin C, Carlo Alberto S, Rosaria T, Tobias A, Zahir A, Tadej A, Lorenzo B, Andrea D, Aurelien G, Vera G, Éric H, Thomas K, David L, Gemma L, Pia M, Ulf ML, Simona R, Ana R, Sander W T, van Vollenhoven R F, Ana V, Stefano B, Eurico FJ, Ilaria G, Matthias S, Vanessa S, Maurizio C, Marta M, Rebecca FB.

COMMUNICATIONS EN LIEN AVEC CE TRAVAIL

21/09/2016 – 24/09/2016	**Congrès de l'ESID 2016 (Barcelone - Espagne)**	**COMMUNICATION AFFICHEE**	**"Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) In Patients With Common Variable Immunodeficiency (CVID): Description Of Two Cases Associated With CD8+ Lymphoproliferation"**
11/10/2017	**Congrès ESID 2017** (Edinbourg – Ecosse)	COMMUNICATION AFFICHEE ET ORALE (POSTER COMMENTE)	**« Neutropenia in patients with common variable immunodeficiency : a rare event associated with severe outcome ».**

RESUME

L'association entre déficits immunitaires primitifs (DIPs) et manifestations auto-immunes peut sembler paradoxale lorsque l'on aborde les DIPs comme des défauts d'immunité opposés à l'auto-immunité vue comme excès d'immunité adaptative à l'encontre du soi. Néanmoins, loin de se résumer à un simple défaut d'une ou plusieurs composantes du système immunitaire qui prédispose aux infections par divers agents pathogènes, les DIPs sont fréquemment associés à une auto-immunité; parfois révélatrice. Ainsi, les données épidémiologiques issues de registres ou de larges séries de patients atteints de DIPs s'accordent sur une prévalence globale de 25 à 30% de complications auto-immunes (au premier rang desquelles figurent les cytopénies auto-immunes).

Différentes hypothèses sont avancées pour rendre compte de l'auto-immunité dans les DIPs. On peut citer : 1°) une perturbation profonde de l'homéostasie lymphocytaire, en particulier dans les déficits immunitaires combinés sévères (CID) avec lymphopénies T et B ; 2°) des défauts intrinsèques des lymphocytes B permettant une rupture de tolérance précoce des LB auto réactifs ; 3°) un comportement aberrant des LT (défaut de maturation, excès d'activation) ; 4°) une absence de lymphocytes T ou de B régulateurs ; 5°) une production inappropriée de certaines cytokines pro-inflammatoires comme dans les interféronopathies. Ces hypothèses concernent surtout les DIPs pédiatriques sévères.

Mon travail de thèse explore la rupture de tolérance immunitaire adaptative au cours des DIPs de l'adulte par différentes approches. Nous nous sommes en particulier attachés au plus fréquent, le DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable), déficit immunitaire humoral pas toujours bien défini sur le plan génétique et physiopathologique qui constitue un défi thérapeutique lorsqu'il est compliqué d'une auto-immunité nécessitant un traitement immunosuppresseur.

Dans un premier axe, nous avons étudié les caractéristiques immunophénotypiques et moléculaires de 17 patients atteints de DIPs avec neutropénie issus de notre service et de l'étude DEFI (collaboration Pr C Fieschi et Pr E. Oksenhendler, Hôpital St Louis, Paris).

Dans un second axe, nous avons pris le problème sur le versant de l'auto-immunité et nous avons participé à un projet en cours dans notre laboratoire pour analyser les données de séquençage haut débit de 60 patients lupiques avec syndrome d'EVANS (purpura thrombopénique auto-immun et anémie hémolytique auto-immune) (collaboration Pr R.Voll et Pr B.Grimbacher, Fribourg, Allemagne).

Dans un troisième axe, nous avons étudié une famille de déficit immunitaire combiné avec auto-immunité, de transmission autosomique dominante et mis en évidence un nouveau gène candidat impliqué dans les déficits immunitaires. La fonction du gène dans les cellules immunitaires et de la protéine codée par le gène retrouvé muté dans cette famille ont été mieux caractérisés par une approche transcriptomique et protéomique (collaborations Pr H.Dollfus, C. Stoetzel (Inserm U1112), Strasbourg, France; C.Keime (IGBMC) Illkirch, France, P.Hammann, IBMC, Strasbourg, France).

Pris ensemble, les résultats de ce travail, sous ses différents aspects, témoignent de la multiplicité des approches possibles de la problématique de la rupture de tolérance B et T dans les DIPs. L'approche classique à partir de cas familiaux de déficits immunitaires et séquençage haut débit de l'exome reste probablement, à l'heure actuelle, la plus rentable et nous a permis d'identifier l'implication d'un nouveau gène dans un déficit immunitaire combiné sévère de l'adulte avec auto-immunité. De façon intrigante, comme suggéré pour d'autres gènes de découverte récente des anomalies du signal T et/ou du cytosquelette peuvent induire un déficit T mais également un déficit B et une auto-immunité médiée par des autoanticorps. Ce type d'approche poursuivie par une analyse en RNA-*sequencing* et de lignées transgéniques peut permettre de conclure quant à l'impact d'une mutation et le rôle d'une protéine donnée sur le développement et le fonctionnement lymphocytaire B ou T. Il éclaire mal la redondance des phénotypes dans des DIPs très différents (gain de fonction de *STAT1*, haploinsuffisance de *CTLA4*, syndrome *PI3KCD*).

Les études de cohortes sont peu sensibles pour dégager des voies physiopathologiques communes. Des techniques complémentaires d'analyses sont nécessaires pour aborder les phénotypes complexes, en particulier ceux de l'adulte, qui combinent probablement plusieurs mécanismes physiopathologiques (digénisme, polygénisme, épigénisme).

Mots-clés : tolérance, auto-immunité, déficit immunitaire primitif, lymphocyte B, Lymphocyte T, génétique, WES, NGS, Cohortes, cytopénies auto-immunes, PTI, AHAI, syndrome d'EVANS, Neutropénie

ABSTRACT

The association between primary immune deficiency (PID) and autoimmunity may seem paradoxical when PID is considered only as an immune response defect against pathogens and autoimmunity only as an excess of immunity. Nevertheless, far from being simple immune defects increasing the risk of infections, DIPs are frequently associated with autoimmunity. Even more, autoimmunes manifestations can sometimes reveal a PID. Thus, epidemiological data from registers or large series of patients with PIDs agree on an overall prevalence of 25 to 30% of autoimmune complications (with auto-immune cytopenias as first causes).

Several hypotheses have been proposed with different underlying mechanisms to explain the tolerance breakdown in PIDs. We can cite : 1°) a severe disturbance of lymphocyte homeostasis, for example in severe combined immunodeficiencies ; 2°) an impaired B-cell developpement with early-stage defects of tolerance ; 3°) a dysregulation of T cells (developpement or activation impairments) ; 4°) a dysfunction of T-reg (or B-reg) ; 5°) an excess of production of proinflammatory cytokines. These hypotheses are especially true for early-onset PIDs (in infancy).

In this work (PhD), we explore the mechanisms of tolerance breakdown involved in adults PIDs. We use several approaches to describe the pathways leading to autoimmunity, focusing on the most common PID in adult : CVID (common variable immunodeficiency). This syndrome is not well defined on the genetic and physiopathological level. It is still a therapeutic challenge when complicated by autoimmunity (requiring immunosuppressive therapy).

In a first axis, we studied the immunophenotypical and molecular features of a well characterised cohort of DICV/CID patients with autoimmunity (autoimmune cytopenia, neutropenia).

In a second axis, we took the problem to the side of autoimmunity and took advantage of an on-going study in our lab to analyse the characteristics of patients with an homogeneous phenotype of systemic lupus erythematosous (SLE) and EVANS syndrome (collaboration with R.Voll and Pr B.Grimbacher, Freiburg, Germany).

In a third axis, we studied a family of CVID with autoimmunity, with a dominant trait of inheritence and we found a new candidate gene potentially involved in the phenotype. We explored in depht the role of this gene in lymphocytes by a transcriptomic and proteomic approach to better characterized the potential mechanism of tolerance breakdown.

Our results argue for a complex and heterogeneous process in the way of autoimmunity in PIDs and systemic autoimmune diseases. The classical approach from one family to one candidate gene thanks to next generation sequencing and whole genome sequencing remains the most cost-effective way to find a new gene and explore monogenetic cause of PIDs/autoimmune disease. Interestingly, as suggested by other causes of PIDs, T-cell signaling defects and cytoskeletton impairement could both lead to autoimmunity in PID, but also to a B-cell defect with humoral impairement and B-cell mediated autoimmunity. This type of approach, pursued by RNA-sequencing analysis and transgenic cell-lines investigations can lead to conclusions about the impact of a given mutation in the phenotype (T and B cell impairement for example). It is more complicated to explain the general underlying process that explains the breakdown of tolerance occuring in PIDs.

Cohort studies failed to identify common physiopathological pathways involved. High-throughtput analyses of combined datas (genomics, transcriptomics, proteomics) are needed to understand the complex processes underlying complex diseases in PIDs and systemic autoimmune diseases.

Key-words : tolerance, autoimmunity, primary immune deficiency, B lymphocytes, T lymphocyte, Whole Exome Sequencing, Next Generation Sequencing, systemic lupus erythematosous (SLE), EVANS syndrome, neutropenia, autoimmune cytopenia.

ABRÉVIATIONS

- **ACP1** : *Acid phosphatase 1*
- **AD/AR** : Autosomique dominant/Autosomique récessif
- **AHAI :** Anémie hémolytique auto-immune
- **AIRE** : Autoimmune regulator
- **ALPS** : *Autoimmune lymphoproliferative syndrome* / syndrome auto-immunité et lymphoprolifération
- **ANA** : Anticorps anti-nucléaire
- **APC** : *Antigen-presenting cell* / cellule présentratrice d'antigène
- **APECED** : Poly-endocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique
- **APS-1** : Poly-endocrinopathie auto-immune de type 1
- **BAFF** : *B-cell activating factor*
- **BCR** : *B cell receptor* / récepteur B
- **CID** : Déficit immunitaire combiné
- **CMH** : Complexe majeur d'histocomptabilité
- **cTEC** : Cellule épithéliale thymique corticale
- **CTLA4** *:* (CD152) *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*
- **CXCR5** : *C chemokine receptor type 5*
- **DEFI** :étude nationale française sur les deficits immunitaires primitifs
- **DICV** : Déficit imunitaire commun variable
- **DIP** : Déficit immunitaire primitif
- **EVANS** : association AHAI et PTI
- **FDC** : Cellule dendritique folliculaire
- **FoxP3 :** *Forkhead box P3*
- **GWAS** : *Genome-wide association study*
- **ICOS** : *Inducible T-cell costimulator*
- **IFN** : Interféron
- **IL-n°x** : Interleukine-n°x
- **IRM :** Imagerie par raisonnance magnétique
- **JAK** : Janus Kinase
- **JC (virus)** : virus responsable de la LEMP (virus de John Cunningham), opportuniste
- **LB** : Lymphocyte B
- **LBBR** : Lupus biobanque du Rhin supérieur
- **LEMP** : Leuco-encephalopathie multifocale progressive
- **LRBA** : *LPS Responsive Beige-Like Anchor Protein*
- **LT** : Lymphocyte T
- **NFKB :** *Nuclear Factor-Kappa B*
- **MAI** : Maladie auto-immune
- **mTEC** : Cellule épithéliale thymique médullaire
- **NGS** : Séquençage haut débit (Next-Generation Sequencing).
- **pDC** : *Plasmacytoid dendritic cell* / Cellule dendritique plasmacytoïde
- **PTI :** Purpura thrombopénique idiopatique
- **RAG** : *Recombinase-activating gene*
- **STAT** : *Signal transducer and activator of transcription*
- **TACI** : *Transmembrane activator, calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*
- **TCR** : *T cell receptor* / récepteur T
- **TEC** : Cellule épithéliale thymique
- **TEP-TDM** : scanner avec tomographie par emission de positrons
- **TDM** : scanner (tomodensitométrie)
- **TFh** : Lymphocyte T folliculaire
- **TNF** : *Tumor necrosis factor*
- **TRA** : *Tissue restricted antigen* / Antigène tissu spécifique
- **Trég** : Lymphocyte T régulateur
- **WES** : *Whole exome sequencing*/séquençage complet de l'exome
- **κ** : Kappa
- **λ** : lambda

TABLE DES MATIERES

RESUME…… **P8**

ABSTRACT…… **P9**

ABREVIATIONS…… **P10**

LISTE DES FIGURES…… **P13**

LISTE DES TABLES…… **P16**

INTRODUCTION…… **P17**

PREFACE…… **P19**

AXE I : LA TOLERANCE IMMUNITAIRE ET LA RUPTURE DE TOLERANCE.. **P23**

AXE II : LES DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS COMME MODELE D'ETUDE DE LA TOLERANCE…….. **P35**

- **Papier 1** (revue) : **Guffroy A**, Gies V, Martin M, Korganow AS. Primary immunodeficiency and autoimmunity. ***Rev Med Interne. 2017*** ……. *P41*
- **Papier 2** (revue) : Martin M, **Guffroy A**, Argemi X, Martin T. Systemic lupus erythematosus and lymphopenia: Clinical and pathophysiological features. ***Rev Med Interne. 2017*** …….. *P53*

AXE III : ACP1 : UNE PHOSPHATASE UBIQUITAIRE DE FONCTION INCONNUE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE…….. P81

PROJET DE THESE…….. **P97**

MATERIEL ET METHODES…… **P101**

RESULTATS…….. **P119**

PARTIE I : ANALYSE DE COHORTE DICV/CID – NEUTROPENIE…….. P121

- **Papier 3** (Article original) : **Guffroy A**, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, Pouliet A, Nitschké P, Hanein S, Bienvenu B, Chanet V, Donadieu J, Gardembas M, Karmochkine M, Nove-Josserand R, Martin T, Poindron V, Soulas-Sprauel P, Rieux-Laucat F, Fieschi C, Oksenhendler E, André-Schmutz I, Korganow AS; DEFI study group.
  Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome. ***J Clin Immunol. 2017*** *P127*

ANNEXE PARTIE I..... *P157*

PARTIE II : COHORTE DE PATIENTS LUPUS + EVANS…… P163

ANNEXE PARTIE II..... *P187*

PARTIE III : ETUDE D'UN NOUVEAU GENE RESPONSABLE DE DEFICIT IMMUNITAIRE PRIMITIF AVEC RUPTURE DE TOLERANCE : *ACP1*…… P201

ANNEXE PARTIE III..... *P249*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES…… P255

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…… P265

ANNEXES GENERALES…… P289

- **Papier 4** (Article original) **:** Gies V, **Guffroy A,** Danion F, Billaud P, Keime C, Fauny JD, Susini S, Soley A, Martin T, Pasquali JL, Gros F, André-Schmutz I, Soulas-Sprauel P, Korganow AS B cells differentiate in human thymus and express AIRE. ***J Allergy Clin Immunol.*** **2017**.....*P293*

- **Papier 5** (Article original) : Gies V, Wagner A, Seifert C, **Guffroy A,** Fauny JD, Knapp AM, Pasquali JL, Martin T, Dumortier H, Korganow AS, Soulas-Sprauel P. Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes. ***Sci Rep.*** **2017**.....*P309*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : liens connus et hypothèses qui se nouent entre modèles monogéniques et multigéniques de rupture de tolérance

Figure 2 : représentation schématique de la différenciation lymphocytaire B

Figure 3 : tolérance B centrale

Figure 4 : fréquence des LB autoréactifs aux différents stades ontogéniques

Figure 5 : mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs

Figure 6 : représentation schématique des mécanismes conduisant à la rupture de tolérance immunitaire

Figure 7 : mécanismes de rupture de tolérance chez les patients mutés pour *AICDA*

Figure 8 : représentation schématique des mécanismes de rupture de tolérance dans les DIPs

Figure 9 : mécanisme d'action de BACH2 dans les lymphocytes T (A) et les lymphocytes B (B)

Figure 10 : schéma complétant les hypothèses menant à la rupture de tolérance au cours de DIPs et des maladies auto-immunes multifactorielles

Figure 11 : fonctionnement du locus d'*ACP1* chez l'Homme

Figure 12 : structure de la protéine ACP1

Figure 13 : expression tissulaire de la protéine ACP1

Figure 14 : recrutement de ZAP70 sur les motifs ITAM de CD3 après engagement de la voie du TCR

Figure 15 : localisation des amorces utilisées pour la qPCR SybrGreen d'ACP1

Figure 16 : représentation schématique des causes génétiques connues de déficit immuntaire commun variable

Figure 17 : survie des patients DICV non neutropéniques (Groupe A) en comparaison avec la survie des patients neutropéniques (Groupe B) au sein de l'étude nationale DEFI

Figure 18 : immunophénotypage des patients de la cohorte Neutropénie avec DICV/CID

Figure 19 : immunophénotypage cTFh de la cohorte Neutropénie avec DICV/CID

Figure 20 : immunophénotypage des LT régulateurs des patients de la cohorte DICV/CID avec Neutropénie comparée aux témoins

Figure 21 : quantification intracellulaire de LRBA dans les lymphocytes T

Figure 22 : stratégie de filtre des variants dans l'analyse d'exome en cohorte (n=7 patients)

Figure 23 : stratégie d'identification des variants dans le projet EVANS-Lupus

Figure 24 : représentation schématique de la répartition des 93 variants issus de la première analyse de 37 patients LES+EVANS en fonction des voies physiopathologiques pré-déterminées sur le panel NGS

Figure 25 : répartition des variants en fonction des catégories (pathways) constituées (A) et en fonction de la proportion de gènes par catégorie (B)

Figure 26 : répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « voie des immuns complexes et clairance des auto-antigènes » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Figure 27 : répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « réponse immunitaire innée » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Figure 28 : répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « réponse immunitaire adaptative » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Figure 29 : répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « stress cellulaire et régulation du cycle cellulaire » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Figure 30 : répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « inconnue » (A) et corrélation avec les données clinriques et biologiques (B)
Figure 31 : commentaire sur les variants dans les autres pathways
Figure 32 : arbre génétique de la famille et résumé des principales caractéristiques cliniques
Figure 33 : histogramme résumant l'évolution de la numération lymphocytaire (totale, T CD4 et CD8 et B CD19) au cours du temps et en fonction des thérapeutiques reçues chez la patiente II.2
Figure 34 : examens d'imagerie chez la patiente II.2
Figure 35 : IRM cérébrale réalisée chez la patiente II.2 montrant une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP)
Figure 36 : IRM cérébrale du patient III.3
Figure 37 : immuno-phénotypage des patients II.2 et III.3
Figure 38 : expression de CD57 à la surface des lymphocytes T du patient III.3 (non stimulés)
Figure 39 : expression membranaire de CD69 et CD70 à la surface des lymphocytes T CD4+ du patient III
Figure 40 : stratégie d'identification de gène par WES (A) et séquençage Sanger des variants d'intérêt (B-E)
Figure 41 : défaut de couverture de la région mutée de KMT2B initialement sélectionné dans les variants potentiels
Figure 42 : *ACP1* est un gène qui possède 2 isoformes de 158 acides aminés issues d'un épissage alternatif de l'exon 3
Figure 43 : analyses des transcrits d'*ACP1 (A-C)* et de gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire T (C) en qPCR SybrGreen (A et C gauche) ou Taqman (C droite)
Figure 44 : Western Blot (WB) d'ACP1
Figure 45 : cytométrie de flux du marquage ACP1
Figure 46 : phosphorylation du site pY292 de ZAP70 à l'état basal et sous stimulations dans les lymphocytes T
Figure 47 : stimulation TCR dépendante révélant une hyperphosphorylation du site pY292 de ZAP70
Figure 48 : stimulation TCR-dépendante des lymphocytes T CD4 révèlant une hyperphosphorylation de ERK1/2 dans les cellules du patient III.3
Figure 49 : utilisation d'un vecteur sur-exprimant ACP1F
Figure 50 : augmentation du transcrit d'*ACP1F* dans les cellules transfectée et étude de la prolifération à H48
Figure 51 : transfections d'un vecteur ACP1F dans les cellules primaires du patient III.3
Figure 52 : sous-expression de ACP1 par siRNA dans les lymphocytes T CD4
Figure 53 : conséquences de la sous-expression d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 sur les phosphorylations de ZAP-Y292 et de ERK
Figure 54 : conséquences de la sous-expression d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 sur l'expression membranaire de CD45RA, CD69 et CD57
Figure 55 : photos en microscopie optique des cellules du patient III.3 et de témoin
Figure 56 : quantification des transcrits *Fast* et *Slow* dans le RNAseq des lymphocytes T (A)
Figure 57 : Volcano Plot des résultats de RNAseq dans les LT
Figure 58 : principales voies sur-exprimées et sous-exprimées dans les lymphocytes T du patient III.3
Figure 59 : quantification des transcrits *Fast* et *Slow* dans le RNAseq des lymphocytes B CD19+ (A)
Figure 60 : Volcano Plot des résultats de RNAseq dan les LB

Figure 61 : principales voies sur-exprimés et sous-exprimés dans les lymphocytes B du patient III.3
Figure 62 : interactome d'ACP1 dans les PBMCs
Figure 63 : interactome d'ACP1 dans les Lymphocytes T
Figure 64 : interactome d'ACP1 dans les Lymphocytes B
Figure 65 : interactions prédites (d'après STRING®) entre ACP1, TKTL2, ZAP70, SRC et indirectement ARHGAP35
Figure 66 : interactions fortes (d'après STRING®) entre DBNL, LCK, ZAP70 et LCP1 et 2
Figure 67 : représentation schématique de la contribution potentielle des variants délétères identifiés par WES et panels NGS dans notre travail de thèse (DICV/CID et Neutropénie ; LES et EVANS)
Figure 68 : Schéma récapitulatif et perspectives de l'approche génétique des mécanismes de rupture de tolérance dans les DIPs et les MAIs.

LISTES DES TABLES

Table 1 : déficits immunitaires primitifs impliquant un dysfonctionnement du cytosquelette

Table 2 : amorces utilisées pour la ségrégation en Sanger (projet ACP1)

Table 3 : amorces utilisées en qPCR (Taqman® et Sybergreen®)

Table 4 : liste des anticorps usuellement utilisés dans les panels de cytométrie.

Table 5 : principaux panels utilisés pour l'immunophénotyage des patients (DIPs) et des témoins

Table 6 : anticorps utilisés pour le marquage CTLA4/LRBA

Table 7 : principaux anticorps pour les marquages phosphos

Table 8 : principaux stimuli utilisés dans les expériences de stimulation

Table 10 : caractéristiques des patients explorés en immunophénotypage

Table 11 : caractéristiques des patients explorés en immunophénotypage

Table 12 : liste des variants retenus sur le panel NGS de 235 gènes

Table 13 : liste des variants retenus à partir de l'analyse d'exome

Table 14 : liste des variants retenus par patients testés (panel et exome)

Table 15 : formes monogéniques de lupus

Table 16 : caractéristiques démographiques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS).

Table 17 : caractéristiques cliniques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS)

Table 18 : caractéristiques biologiques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS)

Table 19: traitements reçus par les patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS)

Table 20 : sélection des variants le plus significatifs identifiés sur le panel NGS de 135 gènes et triés sur la valeur du score CADD

Table 21: résumé des caractéristiques cliniques et biologiques des patients

Table 21 : table déterminant le génotype prédictif de l'activité enzymatique d'ACP1 dans notre famille

Table 22 : table prédictive de l'activité enzymatique en fonction du génotype et fréquence de chaque génotype dans la population caucasienne (*d'après Alpet et al. 2009*)

INTRODUCTION

PREFACE

Il existe à l'heure actuelle plus de 350 causes de déficits immunitaires primitifs (DIPs) connus qui touchent l'immunité innée et/ou adaptative et qui sont individualisés sur le plan génétique (maladies monogéniques). Ces gènes, responsables de DIPs sont fréquemment identifiés au sein de familles ou chez des patients isolés avec des phénotypes communs. Ils suivent une transmission génétique classique (mendélienne ou *de novo*). Leurs mutations sont délétères pour la fonction de la protéine (perte ou gain de fonction). Vingt à 25% des patients atteints de ces DIPs présentent des maladies auto-immunes de tous types. Dans ces DIPs, les mécanismes de la rupture de tolérance du système immunitaire vis-à-vis d'antigènes du soi restent souvent mystérieux.

Sur l'autre versant, les maladies auto-immunes (MAIs) sans déficit immunitaire, en dehors de quelques cas monogéniques, sont tout aussi mystérieuses dans leurs mécanismes. En considérant la récurrence pour les autres membres de la famille d'un patient atteint de MAI et la concordance faible de la pathologie dans les paires de jumeaux monozygotes, ainsi que les données des GWAS (*Genome Wide Association Study*) ou de séquençage d'exome (y compris au sein de familles multiplex), ces maladies sont majoritairement multifactorielles et leur approche génétique reste souvent décevante. Un des écueils à l'origine des difficultés d'analyse génétique pourrait être l'hétérogénéité clinique.

Lorsque l'on regarde plus en détail l'intersection entre les gènes retrouvés dans les GWAS de maladies multigéniques et les formes monogéniques de DIPs, on constate que les gènes concernés peuvent être communs et sont fréquemment impliqués dans des voies clés de la défense anti-infectieuse : voie des interférons de type I et II, système du complément, reconnaissance et présentation antigénique (*CMH I et II*), voies JAK/STAT et récepteurs de cytokines ainsi que des facteurs de transcriptions comme *IKZF1*, *AIRE* ou *NFKB* (*Fodil N et al. Trends in Immunol 2016*).
Ainsi, de façon dichotomique, une mutation fortement délétère dans un gène (inactivation de la fonction protéique par exemple) entrainera un DIP alors qu'un polymorphisme et/ou une mutation « moins forte » sur ce même gène conférera un sur-risque pour une MAI qui se traduira de façon pathologique s'il se combine à d'autres facteurs de risques (*Morris DL Nat Genet 2016*) (**Figure 1**).

Nous verrons dans un premier temps bibliographique quels sont les principes des mécanismes de la tolérance immunitaire en condition normale chez l'Homme (**AXE I**)

Nous aborderons dans la deuxième partie de notre introduction les liens entre DIPs et maladies autoimmunes ou autoimmunité, tels qu'ils sont définis aujourd'hui avec les questions ouvertes sur ce sujet. Dans ce cadre, pour éclairer notre travail sur la cohorte de patients lupiques, nous soulignerons plus particuliérement les ponts cliniques et physiopathologiques avec le lupus érythémateux disséminé (LES) (**AXE II**).

Enfin, nous introduirons, dans un troisième temps (**AXE III**), la phosphatase LMW-PTP (*Low Molecular Weight- Protein Phosphatase*) aussi dénommée ACP1 (*Acide Phosphatase 1*) et son rôle présumé au sein du système immunitaire puisque c'est cette protéine qui apparait mutée dans la famille que nous avons analysée en trio.

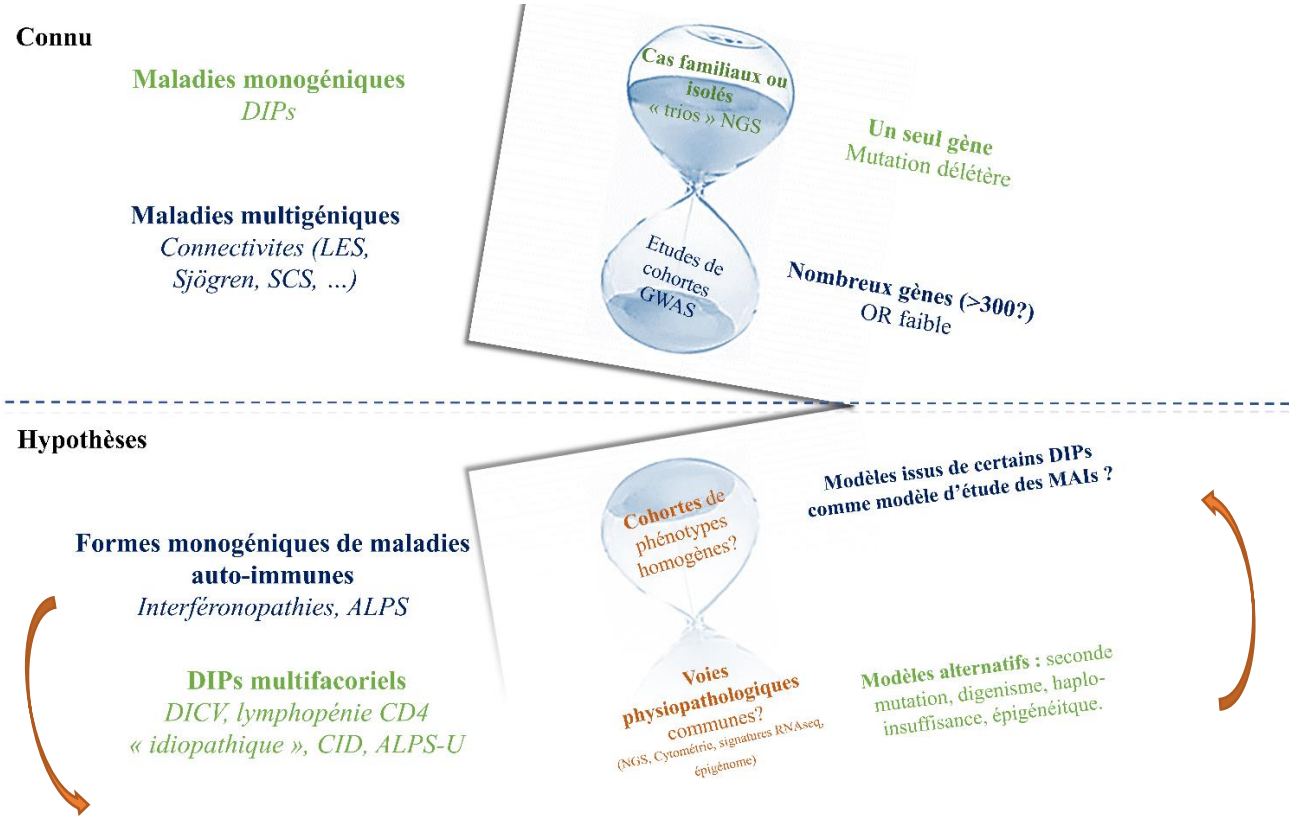


Figure 1 : Liens connus et hypothèses qui se nouent entre modèles monogéniques et multigéniques de rupture de tolérance. DIP (Déficit Immunitaire Primitif) – LES (Lupus Erythémateux Systémique) – SCS (Sclérodermie Systémique) – OR (Odds Ratio) – ALPS (*Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*) – DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable) – CID (combined Immuno-Deficiency) – ALPS-U (*Autoimmune LymphoProliferative Syndrome – Undefined) -GWAS (Genome Wide Association Study).*

INTRODUCTION

AXE I : LA TOLERANCE IMMUNITAIRE ET LA RUPTURE DE TOLERANCE

AXE I : LA TOLERANCE IMMUNITAIRE ET LA RUPTURE DE TOLERANCE

I. Introduction

Ehrlich (1899), dans sa description d'un phénomène qu'il qualifie d' « *horror autotoxicus* », suite à l'immunisation d'animaux avec des globules rouges d'individus de la même espèce, décrit pour la première fois un phénomène d'auto-immunité et préssent la notion de « tolérance » chez les individus qui ne développent pas ce type de réaction auto-immune (Ehrlich, 1899; Ehrlich and Morgenroth, 1899). Par la suite, Burnet et Fenner (Burnet and Fenner, 1951) à la fin des années 40s et 50s définissent les contours du concept de tolérance. Burnet a été le premier à proposer une théorie convaincante de la « sélection clonale » qui postulait que chaque lymphocyte exprime 1 BCR (*B Cell Receptor*) spécifique d'un antigène donné (clone), en précisant que :

- un LB exprimant un BCR spécifique d'un antigène (Ag) étranger déclenchera une réponse immunitaire après liaison du BCR à cet Ag étranger ;
- un LB auto-réactif, c'est-à-dire exprimant un BCR spécifique d'un antigène du soi sera éliminé du répertoire B.

Il propose la notion de « tolérance », à savoir qu'il existe des mécanismes permettant l'élimination des LB auto-réactifs, afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes.

Il faudra attendre l'arrivée des modèles murins transgéniques pour commencer à démanteler pas à pas le processus de tolérance, et particulièrement de tolérance B ((Storb, 1987). La découverte du phénomène d'édition du récepteur B, processus permettant d'éliminer ou d'atténuer le caractère autoréactif d'un BCR et pour permettre la survie du LB, complétera la description initiale un peu dichotomique tolérance/auto-immunité (Gay et al., 1993; Goodnow et al., 1988; Nemazee, 2017; Nemazee and Weigert, 2000; Tiegs et al., 1993).

La capacité du système immunitaire à reconnaître un nombre presque infini de déterminants antigéniques, sans rencontre préalable avec cet antigène, nous garantit une protection efficace contre les infections. L'immunité innée est cruciale dans la réponse immédiate contre les pathogènes. Le système immunitaire adaptatif assure quant à lui une protection efficace et durable contre les pathogènes grâce aux processus de maturation d'affinité et de mémoire immunitaire Cette protection est médiée principalement par des LT et les LB qui constituent des collections polyclonales hautement spécifiques et réactives contre des déterminants antigéniques prédéterminés (**répertoire immunitaire**).

On sait aujourd'hui qu'en condition physiologique, le système immunitaire produit une grande proportion de cellules auto-réactives, mais que ces cellules subissent différents mécanismes permettant de contrôler l'émergence de phénomènes auto-immuns pathologiques. Ainsi, une étude réalisée chez l'Homme a montré que la population de LB immatures médullaires (formés après réarrangement aléatoires des gènes d'immunoglobulines) est caractérisée par un répertoire riche en cellules auto réactives (50-75%), alors que plus tard, aux stades de lymphocyte B matures, ce taux de cellules « physiologiquement » auto-réactives descend à 5% (Wardemann et al., 2003).

L'auto réactivité précoce des LB (au niveau médullaire) entraîne en fait majoritairement une édition du BCR ou une délétion, alors que plus tardivement (dans les organes lymphoïdes secondaires) cette auto réactivité est régulée exclusivement négativement (délétion/apoptose ignorance ou anergie) (Lamoureux et al., 2007; Nemazee, 2006).

Dans ce manuscrit, nous entendrons par **tolérance immunitaire**, l'ensemble des mécanismes mis en œuvre par le système immunitaire permettant l'élimination physique ou fonctionnelle des Ly (B et T) auto réactifs (reconnaissant fortement des antigènes du soi). En miroir, la **rupture de tolérance** correspond à l'ensemble des facteurs qui concourent à l'émergence d'une auto-immunité pathologique médiée par le système immunitaire adaptatif (LB et LT).

II. Les mécanismes de la tolérance

a. Tolérance B centrale

A partir de la cellule souche hématopoïétique pluripotente, l'ontogenèse B (**Figure 2**) prend place dans la moelle osseuse sous l'influence de plusieurs facteurs tels que Flt3, puis de l'interleukine-7 (IL-7), produite par les cellules stromales médullaires (Dias et al., 2005). L'action de plusieurs facteurs de transcription comme IKAROS, E2A, EBF (*Early B cell Factor 1*), PAX5 (*Paired Box gene 5*) et IRF8 (*Interferon Regulatory factor 8*) est essentielle (Bonilla and Oettgen, 2010; LeBien and Tedder, 2008).

Au stade pro-B, le LB commence un réarrangement des gènes permettant, aux stades ultérieurs, l'expression d'un BCR fonctionnel. On observe à ce stade un réarrangement des gènes des régions V, D et de J sur le locus de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (Tonegawa, 1983). Ce réarrangement est un évènement clé dans l'acquisition d'un **répertoire antigénique** et est un prérequis pour passer au stade de maturation suivant. La recombinaison V(D)J nécessite l'action des enzymes RAG1 et RAG2

(*Recombinase-activating gene*), qui jouent un rôle essentiel aussi bien dans l'expression du récepteur T (TCR) par les LT que du BCR par les LB.

Une fois le réarrangement de la chaîne lourde achevé les LB passent au stade pré-B, étape ontogénique se caractérisant par la présence d'un **pré-BCR** dont l'expression autorise la survie cellulaire et la maturation vers le stade suivant. De plus, le pré-BCR permet la mise en place de mécanismes de sélection positive et/ou négative (Keenan et al., 2008; Köhler et al., 2008; Vettermann and Jäck, 2010). Par la suite, les pré-B prolifèrent et se différencient afin de procéder au réarrangement des gènes de la chaîne légère de l'immunoglobuline. La chaîne légère va par la suite s'associer à la chaîne lourde afin de former une immunoglobuline complète (de type IgM) qui sera exprimée à la surface de la cellule B (Halverson et al., 2004; Nemazee, 2017) (**Figure 2**).

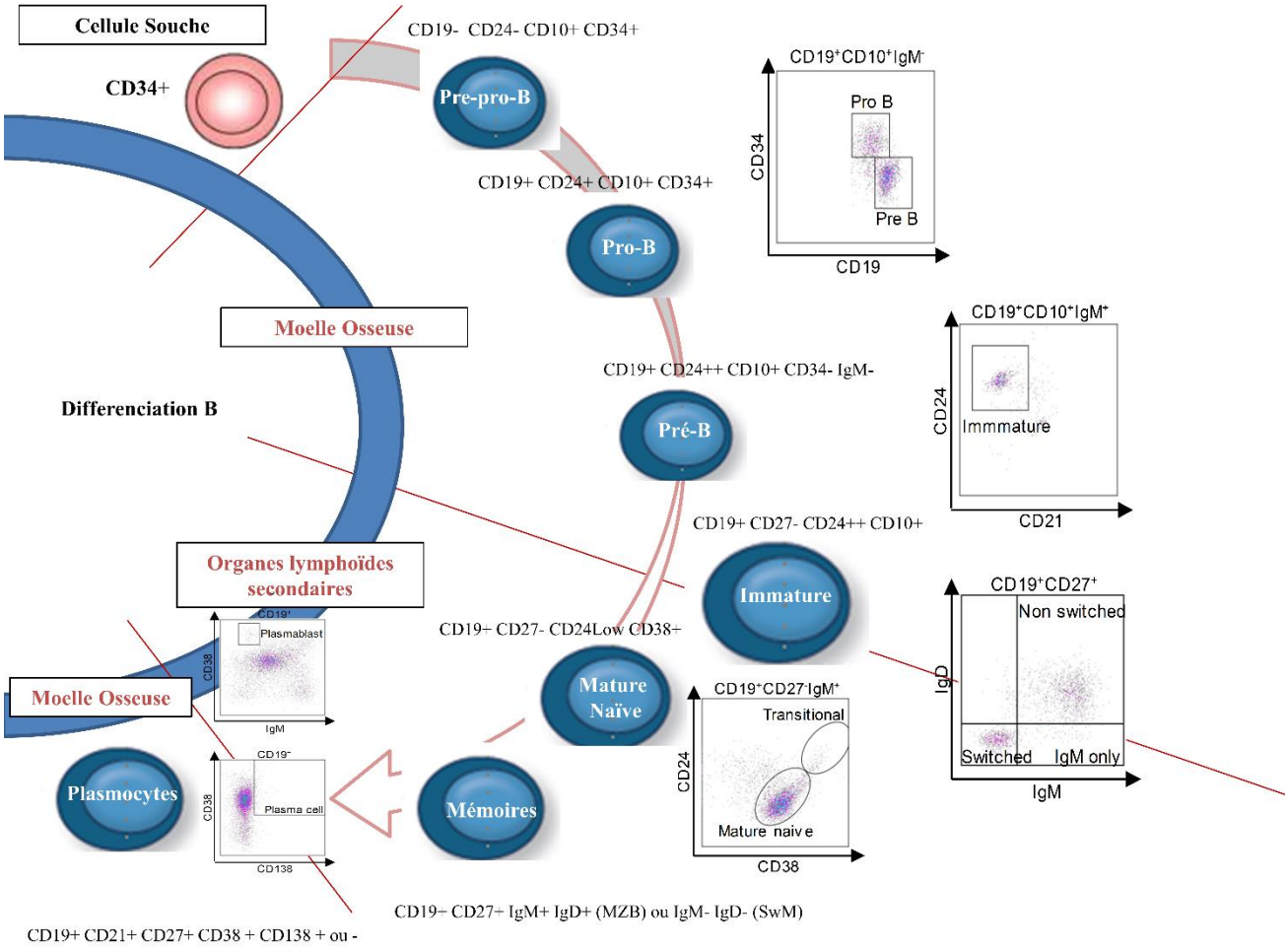


Figure 2 : Représentation schématique de la différenciation lymphocytaire B

À ce stade, on parle de LB immatures, population possédant désormais un BCR capable de lier un antigène. La recombinaison V(D)J permet une grande diversité de BCR, mais elle est intrinsèquement aléatoire et propice à des réarrangements non productifs, ou permettant l'avènement de BCR potentiellement auto-réactifs. A ce stade, une cellule B a plusieurs possibilités (**Figure 3**) :

- La cellule n'est pas auto-réactive, elle peut passer la **sélection positive** (transduction correcte du signal du BCR), ce qui implique l'arrêt de la recombinaison V(D)J, l'initiation de la maturation et de la migration vers les organes lymphoïdes secondaires.
- Si le signal de son BCR est insuffisant (appariement chaîne H-chaîne-L inefficace, réarrangement non productif), la cellule ne peut pas passer la sélection positive, retourne dans le compartiment des pré-B et va procéder à un nouveau réarrangement des gènes de chaînes légères κ, et λ si nécessaire, afin de générer un BCR avec une chaîne légère présentant une nouvelle spécificité/affinité. Si un réarrangement de la chaîne légère n'est plus possible, le LB entre en apoptose.
- Si le BCR reconnait un antigène présent dans la moelle osseuse (autoantigène), le processus de **sélection négative** intervient :
    - En cas d'interaction forte avec l'autoantigène : le LB internalise son BCR, retourne dans le compartiment des pré-B pour subir une **édition de son récepteur** (il s'agit majoritairement de nouveaux réarrangements des chaînes légères κ, et si nécessaire λ) afin de générer un BCR sans caractère autoréactif. Dans le cas contraire, le LB est éliminé par apoptose : c'est la **délétion clonale** (Nemazee, 2017). En cas d'interaction faible avec l'autoantigène : le LB va pouvoir migrer en périphérie mais ne pourra pas répondre à l'antigène : c'est **l'anergie**.
    - En cas d'autoréactivité très faible, il est également possible que le LB échappe à l'édition de récepteur, à la délétion clonale et à l'anergie, dans ce cas une régulation intrinsèque peut se mettre en place : **c'est l'ignorance** (Goodnow et al., 2005).

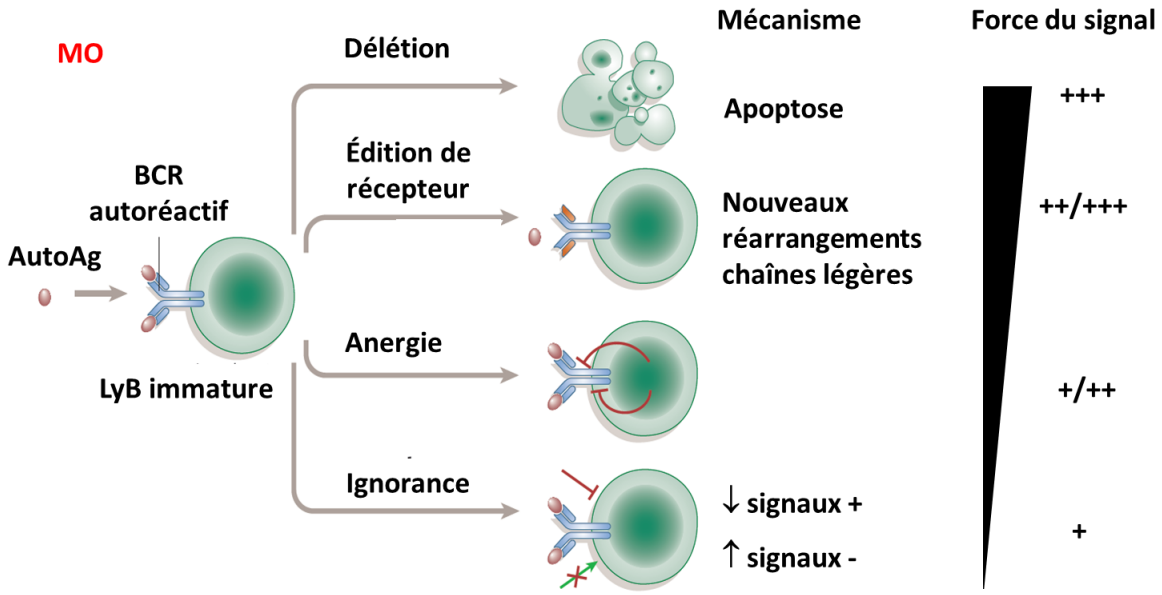


Figure 3. Tolérance B centrale. Au stade de lymphocyte B immature, dans la moelle osseuse, le lymphocyte B qui a réarrangé ses chaînes d'immunoglobulines (lourdes et légères) va subir le processus de sélection négative. La force du signal contre les auto-antigènes exprimés localement va conditionner le devenir de la cellule B et son passage en périphérie *(Goodnow, Nature 2005. Adaptée)*

Les LB ayant passé avec succès la tolérance centrale quittent la moelle osseuse et complètent leur maturation en périphérie. Cependant, malgré l'existence de ces mécanismes de tolérance, une fraction significative des cellules B autoréactives (40%) va migrer vers les tissus lymphoïdes périphériques (Goodnow et al., 1995; Nemazee, 2006, 2017).

b) Tolérance B périphérique

Malgré l'existence de cellules autoréactives issues de la moelle osseuse, la prévalence de maladies auto-immunes reste faible (3-8% de la population (Jacobson et al., 1997)), impliquant l'existence de mécanismes de tolérance périphérique. Une étape importante de sélection a lieu dans le compartiment B au niveau des LB transitionnels. Dans le sang périphérique, la sous-population des LB transitionnels représente généralement une petite proportion des LB (<5%) et possède des propriétés de cellules B immatures avec la survenue d'une sélection négative en présence de l'autoantigène (Anolik, 2013). Diverses conditions pathologiques, incluant les DIPs (Cuss et al., 2006) et l'auto-immunité, avec en particulier le LES (Sims et al., 2005), ont été associées à l'accumulation des LB transitionnels présuposant que ces cellules seraient une étape clé de la tolérance périphérique. Ainsi Yurasov et al. ont démontré que chez les patients lupiques 41-50% des anticorps obtenus à partir de LB matures naïfs

possèdent un caractère autoréactif (analyse sur cellules Hep-2), contre 20% chez les sujets sains (Yurasov et al., 2005) (**Figure 4**).

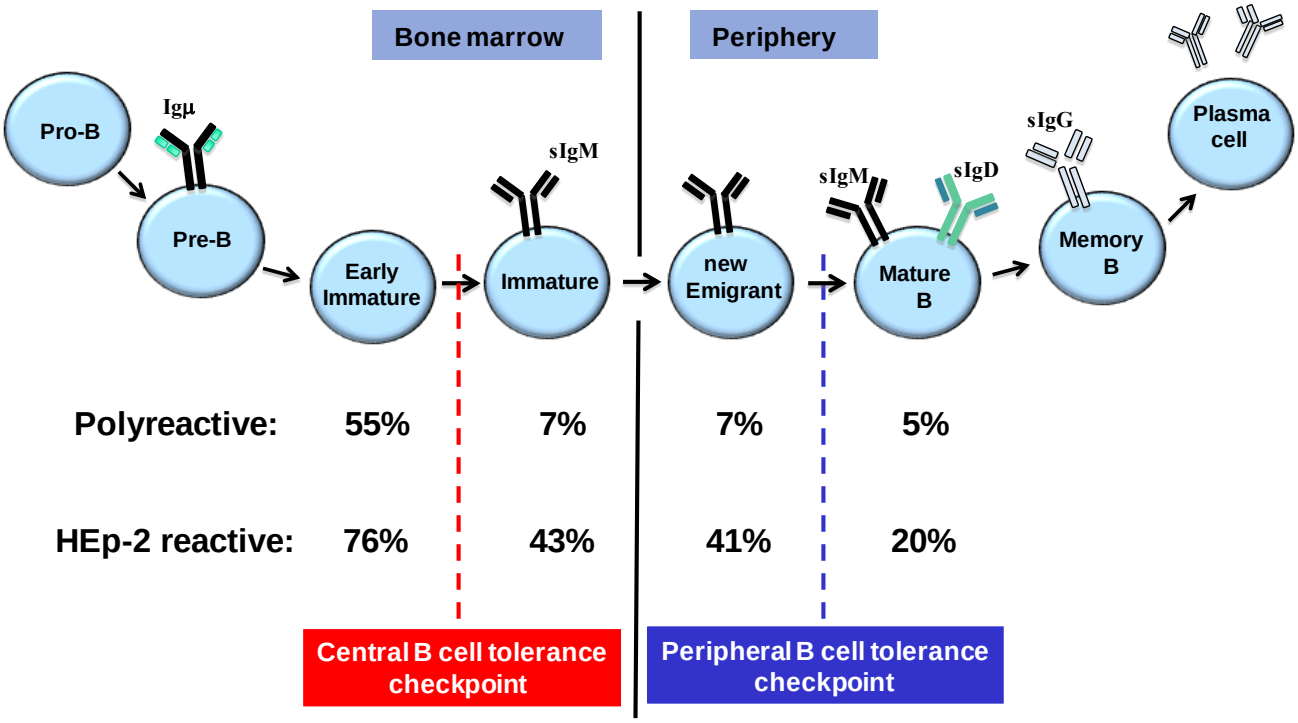


Figure 4. Fréquence des LB autoréactifs aux différents stades ontogéniques. *((*Meffre et al., 2000)., *adaptée)*

Après le stade transitionnel, Les LB humains s'orientent vers différentes voies : elles acquierent un marqueur nommé CD27+ (Klein et al., 1998). Les cellules CD27+ peuvent ainsi être subdivisées en LB non switchés (naïfs) pré centre germinatif (CD19+CD27+IgM+IgD+), switchés (CD19+CD27+IgM-IgD-) post centre germinatif, et cellules IgM^{only} (CD19+CD27+IgM+IgD-) qui sont pour la plupart des cellules de la zone marginale qui ont été soumises au processus d'hypermutation somatique (Tangye and Good, 2007; Weller et al., 2004).

A la suite de la rencontre de l'antigène avec le LB, de l'activation réciproque entre LB et LT, médiée par l'engagement de CD40 (TNFRSF5) avec le CD40L présent sur les LT, la formation de centres germinatifs va débuter. Il s'agit de structures transitoires organisées autour d'un réseau de cellules dendritiques folliculaires (FDC), apparaissant 4-7 jours après la rencontre avec l'antigène (Gatto and Brink, 2010) et indispensables pour la **commutation de classe** et **l'hypermutation somatique** (responsables respectivement de l'apparition des différents isotypes d'immunoglobulines et d'une affinité accrue pour l'antigène). Ces 2 mécanismes sont possibles par l'intermédiaire d'interactions avec

des LT folliculaires (Tfh) $CD4^+$ (identifiés par l'expression ICOS (*Inducible T-cell costimulator*), CXCR5 (*C chemokine receptor type 5*) et PD-1 (*Programmed cell death protein 1*)), et par la production d'IL-21 par ces mêmes cellules (Deng et al., 2015; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2015). Les clones B ayant une affinité augmentée pour l'antigène, à la suite de l'hypermutation somatique, sont préférentiellement maintenus dans le centre germinatif (sélection positive) (Kräutler et al., 2017), mais un des risques lié à ce processus est l'introduction de mutations entrainant l'apparition d'une auto immunité (Goodnow et al., 2010). A ce stade, le récepteur B peut à nouveau être édité avec la réactivation des enzymes RAG1 et RAG2 et le changement de chaine légère (kappa vers lambda). Un nouveau processus de sélection négative des cellules auto réactives interessant la voie FASL/FAS et Caspase 8 a lieu (Janda et al., 2016; Mesin et al., 2016).

A l'issue, le processus de maturation permet l'apparition de cellules mémoires à longue durée de vie et de plasmocytes (Zharkova et al., 2017). Les plasmocytes de longue durée de vie migreront préférentiellement dans la moelle osseuse (Hoek et al., 2010; Tobon et al., 2013).

Il ne faut pas perdre de vue que les mécanismes de tolérance B exposés ci-dessus ne mettent en lumière qu'une partie des acteurs cellulaires ou cytokiniques intervenant dans ces processus complexes qui sont le résultat d'un équilibre subtil, comme l'illustre l'étude de patients atteints de déficits immunitaires et auto-immunité (**voir AXE II de l'introduction**).

c) Tolérance T centrale

Les LT sont originaires de la moelle osseuse et migrent dans le thymus pour s'y développer et maturer. Le thymus est le principal organe lymphoïde impliqué dans le développement, l'éducation et la sélection des LT. Dans ce sens, des souris athymiques ont un déficit complet en cellules T et une immunodéficience marquée (Pantelouris, 1968). La maturation des LT est primordiale pour le développement d'un système immunitaire fonctionnel, et elle repose sur la sélection de LT possédant un récepteur T (TCR) sans caractère auto réactif. L'ontogenèse T se déroule dans le thymus selon un mécanisme parallèle à celui des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Les progéniteurs lymphoïdes entrent dans le thymus à la jonction cortico-médullaire (Lind et al., 2001). Après leur entrée, ces LT double négatifs (LT DN CD4- CD8-) subissent des étapes de réarrangements somatiques aléatoires (recombinaison V(D)J) là encore sous l'effet des enzymes RAG1/RAG2, permettant l'expression du TCR (Shinkai et al., 1992). A ce stade, les clones lymphocytaires T sont capables de reconnaitre virtuellement n'importe quel antigène exogène mais également endogène. En effet, la spécificité des LT

est d'être générés de façon aléatoire par la recombinaison V(D)J, nécessite la mise en place de processus de tolérance, appelés **tolérance centrale T**, afin d'éliminer de potentiels LT autoréactifs. Après expression du TCR, ces cellules expriment le CD4 et le CD8, et ces LT dits double positifs (LT DP CD4+CD8+) subissent une sélection positive dans le cortex, et négative dans la médulla thymique. Au cours de ce processus 95% des cellules T sont éliminées afin de façonner le répertoire des LT qui, purgés des éléments autoréactifs, pourront migrer en périphérie (Klein et al., 2014).
Dans ce processus, l'épithélium thymique joue un rôle prépondérant via les cellules spécialisées que sont les cellules épithéliales thymiques (TECs) qui ont une structure tridimensionnelle complexe au sein du parenchyme thymique correspondant à des zones de fonctionnalité différente du thymus (zone médullaire et zone corticale) (Gies et al., 2017).

Les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs) interviennent dans la sélection positive, *via* la présentation de peptides du soi par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH I ou le CMH II), et entrainent la déplétion de LT DP ayant un TCR de faible ou sans affinité. Au contraire les LT possédant un TCR avec une affinité suffisante pour une molécule du CMH survivent (Klein et al., 2009). Les LT DP sélectionnés se différencient en LT simple positifs (LT SP) qui expriment le CD8 ou le CD4, selon qu'ils ont reconnu le CMH I ou CMH II respectivement (Mathis and Benoist, 2009).

Par la suite, les LT SP migrent dans la médulla thymique. Pour empêcher les cellules autoréactives d'aller plus loin dans la maturation, il est alors nécessaire que des protéines spécifiques des tissus des différents organes de l'individu soient rendues visibles (présentées par les molécules du CMHI et II), et donc exprimées dans le thymus. Les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs), vont alors exprimer un large répertoire de gènes codant pour des antigènes tissulaires périphériques (*TRAs : Tissues Restricted Antigens*). C'est l'étape de sélection négative des LT SP auto-réactifs (Derbinski et al., 2001; Mathis and Benoist, 2009). L'expression génétique des TRAs est contrôlée en grande partie par le facteur de transcription AIRE (*Autoimmune regulator*) (Anderson et al., 2002; Venanzi et al., 2008). En effet, AIRE est un régulateur transcriptionnel, principalement exprimé par les mTECs, pouvant influencer l'expression de près de 4000 gènes (Sansom et al., 2014). Le rôle primordial de AIRE dans le processus de sélection négative est bien illustré par le syndrome APECED (APS-1) qui se manifeste par une poly-endocrinopathie (*voir* ***AXE II. Partie II.e***). Le processus de délétion des thymocytes autoréactifs fait intervenir la protéine ZAP70 (ζ-chain-Associated Protein kinase 70 kDa). En effet, les souris mutées avec une expression partielle de ZAP70 présentent

un défaut de sélection négative des thymocytes et développent de l'auto-immunité (polyarthrite) (Sakaguchi et al., 2003).

d) Tolérance T périphérique

Tous les auto-antigènes ne sont pas exprimés au niveau thymique et certaines cellules T auto-réactives peuvent se retrouver en périphérie. De plus, certains lymphocytes T auto-réactifs exprimant un TCR de faible affinité peuvent échapper aux mécanismes de tolérance centrale et passer en périphérie. L'un des effecteurs T de la tolérance pour contrôler l'auto-immunité en périphérie est le lymphocytes T régulateur (CD4+CD25+FoxP3+). Sur le plan ontogénique, cette cellule peut avoir plusieurs origines, mais l'une des voies privilégiées serait une orientation précoce (au stade thymique) de certaines cellules auto-réactives vers un phénotype T régulateur. Ces cellules exercent leur effet immunosuppresseur sur les cellules T activées par différents mécanismes *(voir **AXE II. Partie II.e)** Mécanismes périphériques de rupture de tolérance avec les exemples de l'haplo-inssuffisance de CTLA4 et les défauts le LRBA)* **(Figure 5)** :

1) Des mécanismes dépendant du contact direct entre les cellules avec un rôle prépondérant de la molécule CTLA4 (mais également LAG3) et des phénomènes comme la transandocytose des récepteurs de co-stimulation CD80/CD86 du lymphocyte B.
2) Des mécanismes paracrines liés à la sécrétion de cytokines immunosuppressives : IL10, TGFβ, IL35. La production de cytokines cytotoxiques comme la perforine et le granzyme B.
3) Une compétition avec les lymphocytes T environnant pour certaines cytokines permettant la survie du lymphocyte T (avidité plus importante des LTregs pour l'IL2).

Enfin, différents mécanismes de régulation intrinsèques aux lymphocytes T existent pour contrôler l'auto-immunité. Ces mécanismes qui se mettent en œuvre dans les lymphocytes T activés, font notamment intervenir les voies de l'apoptose et des médiateurs comme FAS, FASL, Caspase 8 et 10, Bcl2. L'implication de ces mécanismes est particulièrement bien illustrée par certaines situations pathologiques comme le syndrome ALPS (*Autoimmune Lympho-Proliferative Syndrome*) que nous détaillerons plus loin (**AXE II**).

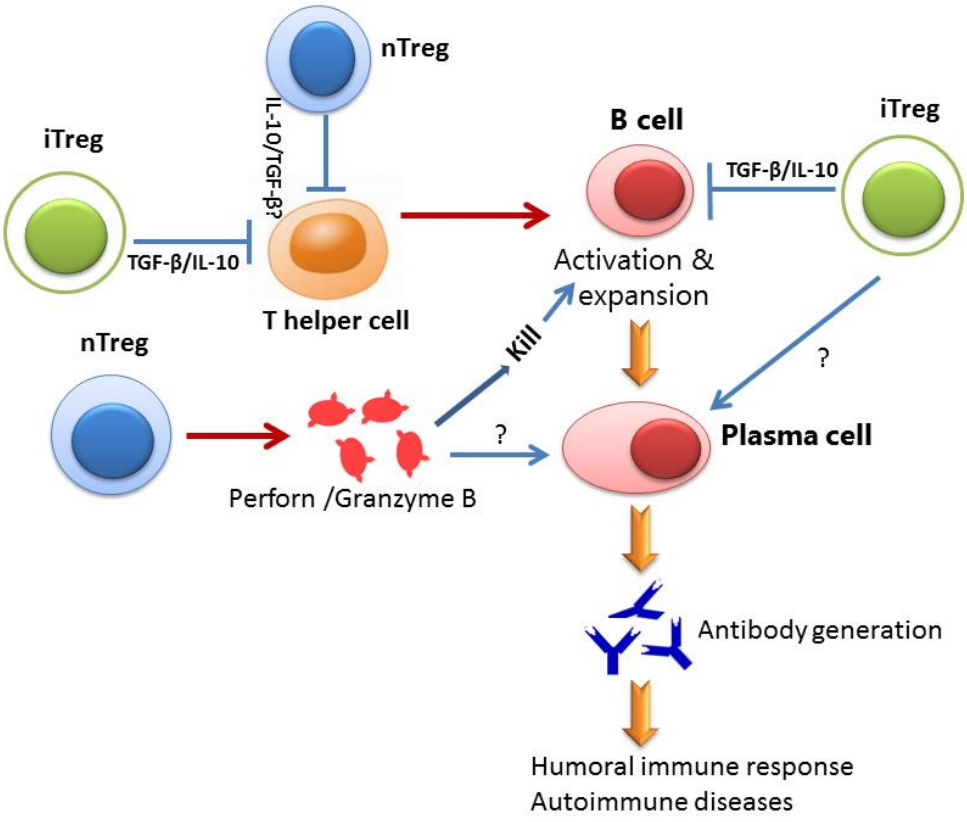


Figure 5 : mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs. nTreg (Treg naturel) – iTreg (Treg induit). *Adapté de* (Wang and Zheng, 2013)

e) En résumé :

Le maintien de la tolérance immunitaire est un processus qui se met en place tout au long de la maturation lymphocytaire T et B dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse, thymus) et secondaires. L'auto-réactivité, consubstantielle à la diversité du répertoire immunitaire, est un processus contrôlé en condition physiologique. Les mécanismes possibles de rupture de tolérance sont nombreux au cours du développement du lymphocyte (T ou B). De petites variations de ces mécanismes finement régulés peuvent favoriser un déséquilibre qui se traduira par une situation d'auto-immunité clinique à la faveur d'évènements qui activent la réponse immunitaire, tels qu'une infection.

INTRODUCTION

AXE II : LES DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS COMME MODELE D'ETUDE DE LA TOLERANCE

AXE II : LES DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS COMME MODELE D'ETUDE DE LA TOLERANCE

I. Introduction

Les déficits immunitaires primitifs (DIPs) sont un ensemble de maladies rares (prévalence de 4 à 10 pour 100.000 naissances) (Marschall et al., 2015; 2010) dont on connait à l'heure actuelle plus de 354 entités et 344 gènes responsables (Bousfiha et al., 2015; Picard et al., 2018). L'auto-immunité est un phénomène fréquent au cours des DIPs (25 à 30% des patients). *Fischer et al*. ont rapporté dans le JACI (*Journal of Allergy and Clinical Immunology*) en 2017 la prévalence des manifestations auto-immunes au cours des déficits immunitaires dans le registre national des DIPs (base du CEREDIH Centre de Référence des Déficits Immunitaires Héréditaires). Sur 2183 patients étudiés, 571 (26,2%) présentaient une ou plusieurs manifestations auto-immunes (852 manifestations rapportées) avec un risque relatif (RR) très augmenté par rapport aux personnes non atteintes de DIPs : jusqu'à 120 fois pour les cytopénies auto-immunes; en particulier pour l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) avec un RR de 830 et le purpura thrombopénique immunologique (PTI) avec un RR 60 (Fischer et al., 2017). Cette association concerne tous les types de DIPs mais plus particulièrement les déficits de l'immunité adaptative ; lymphocytaire T et B, au premier rang desquels figure le DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable). En effet, au cours du DICV (déficit immunitaire symptomatique le plus fréquent de l'adulte), jusqu'à 40% des patients vont présenter des complications non infectieuses (lymphoprolifération, entéropathie et auto-immunité (Chapel et al., 2008, 2012). Ces complications, et en particulier l'auto-immunité, sont connues pour grever le pronostic des malades avec jusqu'à 30 à 50% de mortalité dans ces sous-groupes et un risque relatif multiplié par 11 par rapport aux patients sans auto-immunité (Boileau et al., 2011; Guffroy et al., 2017; Malphettes et al., 2009; Resnick et al., 2012; Wehr et al., 2008).

La survenue de ces manifestations auto-immunes pose par ailleurs un problème thérapeutique majeur (utilisation d'immunosuppresseurs chez des patients déjà immunodéprimés). Dans ce contexte, l'émergence de cibles thérapeutiques sur la base de la compréhension moléculaire du DIP sous-jacent ouvre certes des pistes de prise en charge (CTLA4-Ig ; blocage de la voie de l'IL6 ou utilisation de JAK-inhibiteurs), mais la seule façon théorique de guérir les DIPs à l'heure actuelle reste l'allogreffe de cellules souches (grevée d'une mortalité non négligeable). La thérapie génique avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques modifiées, grâce au progrès de l'utilisation d'édition de gène

(CRISPR-Cas9) et de transfert de gène par des vecteurs, est une perspective intéressante pour certains types de DIPs en cours d'évaluation dans plusieurs DIPs à début pédiatrique (Cooper et al., 2017; Sweeney et al., 2017).

L'apport des technologies nouvelles de séquençage haut débit du génome humain ou *Next Generation Sequencing* (NGS) a certes rendu l'approche mécanistique des DIPs et des mécanismes de rupture de tolérance plus accessible mais a aussi révélé toute la complexité de l'étude de ces maladies (Seleman et al., 2017). Des modèles physiopathologiques plus complexes tels que l'haplo-insuffisance, la digénicité, ou l'épigénicité commencent à être démantelés dans les DIPs et réduisent la frontière entre DIPs avec auto-immunité et maladies auto-immunes classiques.

Dans cette partie de notre travail, nous nous attachons à décrire les principaux mécanismes de rupture de tolérance immunitaire adaptative au cours des DIPs de l'adulte en les illustrant par des exemples prototypiques de chacun des grands mécanismes exposés dans le schéma de la **Figure 6**.

Nous nous référons dans un premier temps à deux papiers de revue à destination d'un public médical que nous avons publié début 2017 et qui s'attachent à décrire les aspects cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques des déficits immunitaires avec auto-immunité (premier manuscrit) et des liens entre lymphopénie et auto-immunité en prenant l'exemple du lupus érythémateux disséminé (LES) (second manuscrit).

- Papier 1 (revue) : **Guffroy A**, Gies V, Martin M, Korganow AS. Primary immunodeficiency and autoimmunity. ***Rev Med Interne. 2017***

- Papier 2 (revue) : Martin M, **Guffroy A**, Argemi X, Martin T. Systemic lupus erythematosus and lymphopenia: Clinical and pathophysiological features. ***Rev Med Interne. 2017***

Après la présentation de ces revues généralistes, nous insisterons sur quelques mécanismes clés utiles pour introduire la suite de notre travail de thèse.

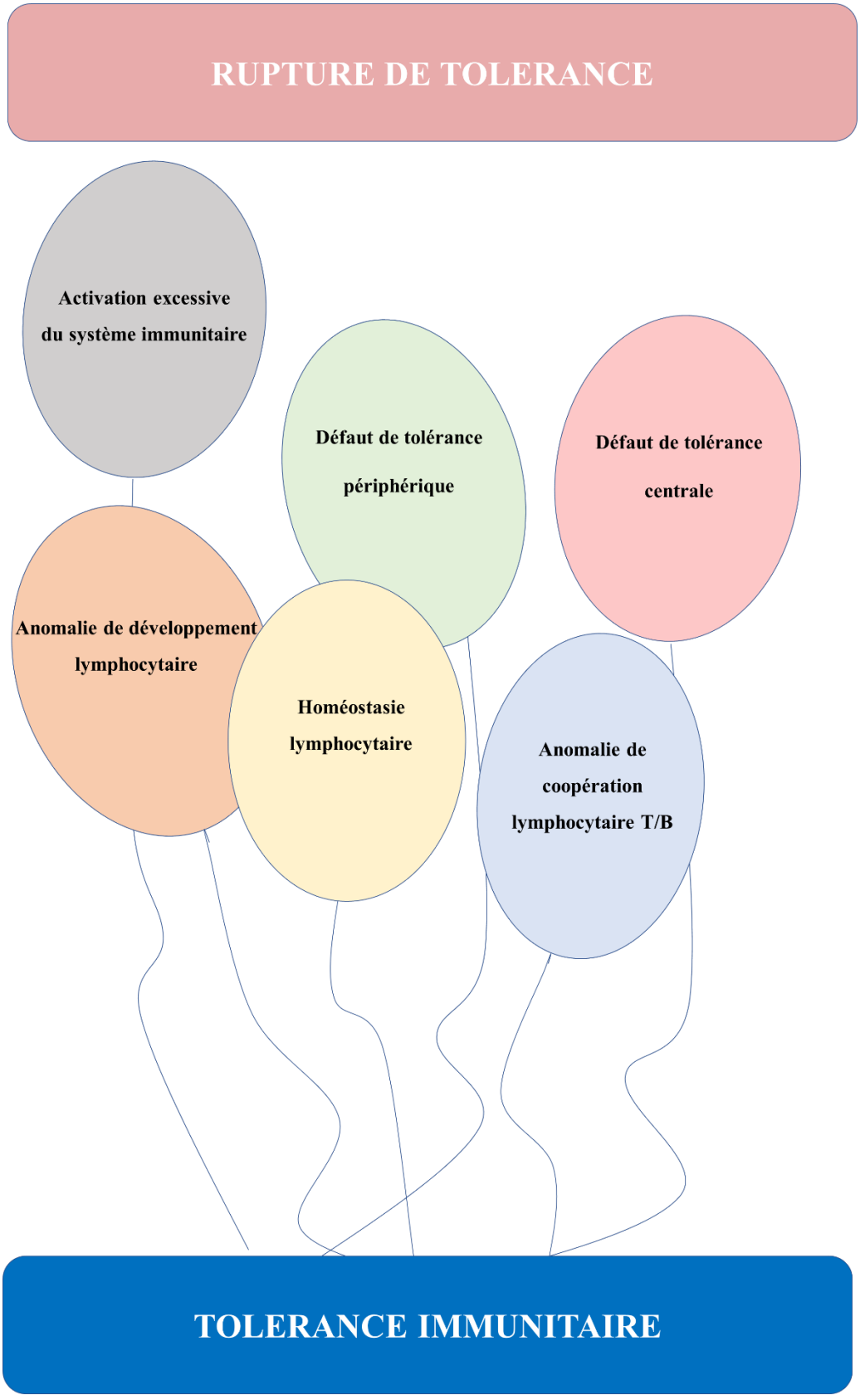


Figure 6: représentation schématique des mécanismes conduisant à la rupture de tolérance immunitaire

PAPIER 1 :

DEFICIT IMMUNITAIRE PRIMITIF DE L'ADULTE ET AUTO-IMMUNITE

PRIMARY IMMUNODEFICIENCY AND AUTOIMMUNITY

Guffroy A, Gies V, Martin M, Korganow AS.

Mise au point (article de Revue)

La Revue de Médecine Interne (2017)

La Revue de médecine interne 38 (2017) 383–392

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

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

Mise au point

Déficit immunitaire primitif de l'adulte et auto-immunité

Primary immunodeficiency and autoimmunity

A. Guffroy[a,b,*], V. Gies[a,b], M. Martin[a,b], A.-S. Korganow[a,b]

[a] *CNRS UPR 3572 « Immunopathologie et chimie thérapeutique », laboratoire d'excellence Medalis, institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC), 67000 Strasbourg, France*
[b] *Service d'immunologie clinique et de médecine interne, Centre national de référence des maladies auto-immunes rares, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 23 novembre 2016

Mots clés :
Déficit immunitaire primitif (DIP)
Déficit immunitaire commun variable (DICV)
Auto-immunité

RÉSUMÉ

Déficit immunitaire et auto-immunité sont deux manifestations d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui peuvent être associés, avec des liens physiopathologiques communs. De nombreux déficits immunitaires primitifs (DIPs) correspondent à des anomalies génétiques, de transmission mendélienne (monogénique) ou multigénique, qui impliquent le système immunitaire inné ou adaptatif. Ils peuvent se révéler dès la naissance ou seulement à l'âge adulte. Les symptômes révélateurs des DIPs sont classiquement infectieux, mais il peut aussi s'agir de manifestations auto-immunes, qui sont parfois au premier plan. Nous nous attacherons dans cette revue à présenter différents aspects des DIPs qui s'accompagnent d'auto-immunité, en détaillant les principales manifestations auto-immunes rencontrées, les aspects spécifiques de leur prise en charge et les mécanismes physiopathologiques qui les gouvernent et qui sont de mieux en mieux démantelés grâce à l'apport des nouvelles techniques de séquençage haut débit (NGS), déjà disponibles pour le praticien.

© 2016 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Primary immunodeficiency
Common variable immunodeficiency (CVID)
Autoimmunity

ABSTRACT

Many evidences highlight that immunodeficiency and autoimmunity are two sides of a same coin. Primary immune deficiencies (PIDs), which are rare mono- or multigenic defects of innate or adaptative immunity, frequently associate with autoimmunity. Analyses of single-gene defects in immune pathways of families with PIDs, by new tools of molecular biology (next genome sequencing technologies), allowed a better understanding of the ways that could both drive immune defect with immune deficiency and autoimmunity. Moreover, genes implicated in rare single-gene defects are now known to be also involved in polygenic conventional autoimmune diseases. Here, we describe the main autoimmune symptoms occurring in PIDs and the underlying mechanisms that lead to autoimmunity in immunodeficiency. We review the links between autoimmunity and immunodeficiency and purpose some principles of care for patients with PIDs and autoimmunity.

© 2016 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Abréviations

AHAI	anémie hémolytique auto-immune
AID	*activation-induced cytidine deaminase*
AIRE	*auto-immune regulator*
ALPS	*autoimmune lymphoproliferative syndrome* (syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité)
ANAs	anticorps antinucléaires
APECED	*auto-immune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*
BCR	*B cell receptor*
CAI	cytopénie auto-immune
CGD	*chronic granulomatous disease* (granulomatose septique chronique)

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : aurelien.guffroy@chru-strasbourg.fr (A. Guffroy).

http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2016.10.388
0248-8663/© 2016 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DIPs	déficits immunitaires primitifs
DICV	déficit immunitaire commun variable
GWAS	Genome-Wide Association Study
IgIV	immunoglobulines polyvalentes intraveineuses
LES	lupus érythémateux systémique
LB	lymphocyte B
LT	lymphocyte T
LTrég	lymphocyte T régulateur
LRBA	LPS-responsive Beige-like anchor
NGS	next generation sequencing
PCR	polymerase chain reaction
PTI	purpura thrombopénique immunologique
TACI	transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor

2. Introduction

Les déficits immunitaires primitifs (DIPs), actuellement classés en fonction des mécanismes physiopathologiques immunologiques sous-jacents, correspondent en règle générale à des anomalies mono- ou multigéniques, touchant des voies de l'immunité innée ou adaptative, avec plus de 300 gènes impliqués connus. Fréquem-ment de début pédiatrique, ils peuvent aussi se manifester à l'âge adulte [1].

De nombreux DIPs s'accompagnent de manifestations auto-immunes. Ainsi au cours du déficit immunitaire commun variable (DICV), première cause de déficit immunitaire symptomatique de l'adulte, les manifestations auto-immunes sont retrouvées pour 25 % des patients [2,3]. Elles peuvent précéder les manifestations infectieuses classiques qui font habituellement évoquer un DIP et il faut savoir penser et rechercher un déficit immunitaire dans certaines situations d'auto-immunité. L'association d'apparence paradoxale entre déficit immunitaire cellulaire ou humoral et auto-immunité, permet d'appréhender les mécanismes physiopathologiques immunologiques à l'œuvre dans le déficit immunitaire et nous informent sur le fonctionnement normal du système immunitaire.

La frontière physiopathologique entre déficit immunitaire et auto-immunité, tant parfois à s'effacer encore d'avantage lorsque le déficit immunitaire est lui-même de cause auto-immune (thymome et myasthénie au cours du syndrome de Good, présence d'anticorps anti-cytokines comme les anticorps anti-IL17 au cours du syndrome APECED, anti-GM-CSF et protéinose alvéolaire auto-immune) [4].

Les patients atteints de manifestations auto-immunes ou dysimmunitaires au cours d'un DIP sont plus à risque de complications à long terme, avec une morbi-mortalité augmentée [2,3,5].
L'attitude thérapeutique dans les situations d'auto-immunité et de DIP varie en fonction du déficit immunitaire sous-jacent, à la fois à la lumière de nouveaux traitements de fond disponibles pour les complications auto-immunes et de l'évaluation du risque infectieux global nécessitant une conduite anti-infectieuse prophylactique adaptée.

3. Le point de vue du clinicien : quelles manifestations auto-immunes au cours des déficits immunitaires ?

Pratiquement toutes les formes d'auto-immunité peuvent se rencontrer au cours d'un DIP (Tableau 1).

3.1. Cytopénies auto-immunes

Les cytopénies auto-immunes (CAI) sont les principales mani-festations d'auto-immunité rencontrés au cours des DIPs [2]. Au cours du DICV en particulier, un PTI survient chez près de 15 % des patients et une AHAI chez 5 % avec une moyenne d'âge de 29 ans. PTI et/ou AHAI précéderaient les manifestations infectieuses liées au déficit humoral dans près de 75 % des cas [3]. Dans ces situa-tions, se pose principalement le problème du diagnostic différentiel avec d'autres maladies auto-immunes telles que le lupus érythé-mateux systémique (LES) ou certaines maladies hématologiques : hémopathies malignes (lymphomes) lorsqu'il existe un syndrome lymphoprolifératif classique au cours de nombreux DIPs [6].

L'association d'un PTI et d'une AHAI constitue le syndrome d'Evans, dont l'incidence au cours du DICV est de 4 %. Devant un syndrome d'Evans, il faut particulièrement savoir évoquer le diagnostic de syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS) au cours duquel la prévalence du syndrome d'Evans est de 50 %. Ce syndrome partage de nombreuses caractéristiques avec le syndrome d'Evans classique (hors DIP) mais associe un syndrome lymphoprolifératif polyclonal, une augmentation des lymphocytes T (LT) doubles négatifs ($CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ TCR^+) et une élévation sérique du taux de FASL soluble (> 200 pg/mL) [7]. L'élévation de la vitamine B12 (> 1500 ng/L) ou des taux l'IL-10 et d'IL-18 font également partie des critères diagnostiques d'ALPS.
D'authentiques neutropénies périphériques auto-immunes peuvent aussi survenir chez des patients atteints de DICV ou d'autres DIPs. Le diagnostic de l'étiologie auto-immune peut être compliqué, d'une part, par le fait que les anticorps anti-granuleux sont d'interprétation et de recherche parfois difficiles en pratique courante (tests MAIGA – monoclonal antibody immobilization of gra-nulocyte antigens ou GIFT – Granulocyte Immunofluorescence Test), et d'autre part, car ces neutropénies surviennent fréquemment chez des patients atteints de formes complexes de DICV associant lym-phoprolifération et hypersplénisme, nécessitant d'envisager ces manifestations comme étiologies possibles. La neutropénie pour-rait être un marqueur indépendant de gravité au décours du DICV avec un risque de surmortalité chez ces patients (résultats non publiés sur la cohorte nationale franc¸ aise DEFI).

La présence de cytopénies au cours des DIPs peut ainsi être multi-factorielle et nécessite de prendre en compte à la fois les données physiopathologiques du DIP sous-jacent (cause centrale ou périphérique, auto-immune, myélodysplasie, lymphoproliféra-tion et envahissement médullaire, causes carentielles, infectieuses ou inflammatoires associées), les données d'anamnèse, et des exa-mens cliniques et paracliniques afin d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique. Quelques examens complémentaires sont requis : dosages de vitamine B12, bilan martial, test de Coombs et bilan d'hémolyse, ainsi qu'un immunophénotypage lymphocytaire, des hémocultures et la recherche de causes infectieuses comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), le cytomégalovirus (CMV) par PCR (risque de faux-négatif de la sérologie lié au déficit humoral) ou des causes bactériennes (Rickettsioses). La réalisation d'un myélo-gramme pourra être nécessaire dans certains cas (rarement en cas de syndrome d'Evans).
Le diagnostic de thrombopénie auto-immune peut parfois être conforté par la recherche d'anticorps anti-plaquettes (ex. anticorps anti-GpIIbIIIa) par monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA). Mais ce test, conc¸ u pour être réalisé dans les situations d'allo-immunisation anti-plaquettes, est fréquem-ment pris en défaut dans cette indication et ne doit pas remettre en cause le diagnostic.
A l'inverse, PTI et AHAI doivent systématiquement faire évoquer un DIP, qu'ils soient isolés ou associés à d'autres manifestations auto-immunes et ce d'autant plus qu'ils surviennent chez un indi-vidu jeune. La recherche d'antécédents d'infections répétées ou inhabituelles (par le site ou le germe en cause), l'existence d'une lymphoprolifération, sans étiologies retrouvées, ou un contexte familial évocateur sont des arguments appuyant l'hypothèse d'un DIP. La recherche d'une lymphopénie et d'une hypogammaglobulinémie doivent faire partie du bilan étiologique chez ces patients.

Tableau 1
Principaux déficits immunitaires primitifs (DIPs) associés à des manifestations auto-immunes.

DIP	Gènes	Transmission	Auto-immunité	Fréquence	Âge de début des symptômes
Début pédiatrique					
Omenn Syndrome, DICS	RAG1, RAG2, LIG4, DCLRE1C, PRKDC	AR	Érythrodermie, entéropathie, CAI, infiltration d'organe, granulomes, splénomégalie, alopécie	1/5 000 000 (au moins 70 cas)	< 1 an
STIM1	STIM1	AR	Cytopénies auto-immunes	3 familles et 6 patients décrits	Naissance (< 2 ans)
Syndrome du lymphocyte nu (type II)	Gènes de régulation du CMH II (CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP)	AR	Cytopénies auto-immunes	Environ 100 patients décrits	< 1 an
ITK	ITK	AR	Cytopénies auto-immunes, glomérulonéphrites,	5 familles et 8 patients décrits	Entre 3 et 14 ans
LCK	LCK	AR	Cytopénies auto-immunes, vasculites rétiniennes	NC	Nouveau-nés
BENTA syndrome	CARD11	AR	Adénomégalie, splénomégalie Neutropénie auto-immune	2 familles et 4 patients décrits	Dans l'enfance
APECED/APS1	AIRE	AR » AD	Endocrinopathie auto-immune, anticorps anti-cytokines (IL-17, IL-22, IFN), vitiligo	De 1/1 000 000 à 1/25 000 selon les groupes ethniques	Dans l'enfance
WAS	WASP	Lié à l'X	Anémie hémolytique auto-immune, inflammation de l'intestin, arthrites, eczéma, vascularites, néphropathie IgA	1 à 9/1 000 000	Dans l'enfance
IPEX	FOXP3	Lié à l'X	Cytopénies auto-immunes, Endocrinopathies auto-immunes, eczéma, allergies sévères, diarrhée et entéropathies inflammatoires	< 1/1 000 000	Nouveaux-nés
Défaut de la chaîne alpha de l'IL2R (CD25)	CD25	AR	Maladie inflammatoire de l'intestin, eczéma, cytopénies auto-immunes	< 1/1 000 000	Dans l'enfance
XLA	BTK	Lié à l'X	Arthrite juvénile, PR	1/100 000 à 1/200 000	6–12 mois
CGD	CYBB, CYBA, NCF2, NCF4	Lié à l'X (CYBB, 70 %) ou AR (autres mutations, 30 %)	Maladie inflammatoire de l'intestin, granulomatose (sarcoïdose-like), lupus chez les femmes porteuses de mutations CYBB	1/200 000 à 1/250 000	Enfance (entre 2 et 5 ans). Parfois plus tardif (formes AR)
STAT1 GOF	STAT1 (gain-de-fonction)	AD	Thyroïdite, hépatites auto-immunes, CAI - candidose	NC	De l'enfance à l'âge adulte
STAT3 GOF	STAT3 (gain-de-fonction)	AD	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, cytopénies auto-immunes, diabètes précoces, maladie cœliaque	NC	De l'enfance à l'âge adulte
PI3K delta	PIK3CD (gain-de-fonction)	AD	Cytopénies auto-immunes, eczéma, arthrites, hépatites auto-immunes, diabète de	Une centaine de cas rapportés	De l'enfance à l'âge adulte (médiane autour de 17 ans)
	PIK3R1	AR	type 1, glomérulonéphrites		
PLAID	PLCG2 (gain-de-fonction)	AD	Urticaire au froid, atopie, thyroïdite auto-immune, présence d'anticorps antinucléaires	Quelques cas rapportés (3 familles)	Enfance
NF- B2	NFKB 2	AD ou sporadique	Alopécie, vitiligo, psoriasis, thyroïdite	NC	Enfance/adolescence
Syndrome Hyper-IgM	CD40L (CD154 ou TNFSF5), CD40 (TNFRSF5), AID	X, AR (AID)	CAI, lupus, hépatites auto-immunes	1/500 000	Enfance
STIM1	STIM1	AR	Cytopénies auto-immunes	NC	Enfance
Début à l'âge adulte					
DICV	TACI, CTLA-4, LRBA, ICOS, BAFF-R, CD19, CD20, CD21, CD81	AR » AD Ou sporadique	Cytopénies auto-immunes, entéropathies inflammatoires, thyroïdite, lupus, uvéite, maladie cœliaque, vitiligo	1/20 000 à 1/50 000	Variable entre 15 et 40 ans
ALPS	TNFSF6 (FAS) TNFRSF6 (FASL) CASP8, CASP10	AD ou sporadique	CAI (syndromes d'EVANS), maladies auto-immunes d'organes (thyroïdites, colites), lupus. Auto-anticorps : ANAs, FR	NC	Enfance (âge médian : 3 ans), mais parfois à l'âge adulte (18–35 ans)

Tableau 1 (Suite)

DIP	Gènes	Transmission	Auto-immunité	Fréquence	Âge de début des symptômes
Défaut des composants du complément	C1qA, C1qB, C1qC, C2, C4A, C4B	AR	Lupus	NC	Âge adulte
Syndrome de Good	NC	Sporadique	Myasthénie, PTI (AHAI, Neutropénie), colite inflammatoire, diabète de type 1, Lichen plan oral, alopécie, uvéite	0,15/100 000	40–60 ans
Lymphopénie CD4 dite idiopathique	NC ou RAG1 hypomorphe, MAGT1, UNC119	AD, sporadique	Lupus, sarcoïdose, Sjögren, thyroïdite, vitiligo, SAPL, psoriasis, vascularite, maladie inflammatoire de l'intestin	NC	Adulte

DIP : déficit immunitaire primitif ; AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif ; CAI : cytopénies auto-immunes ; DICS : déficit immunitaire combiné sévère ; RAG : recombination activating gene ; LIG4 : DNA ligase 4 ; DCLRE1C : DNA cross-link repair 1C ; PRKDC : protein kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide ; CIITA : Class II, major histocompatibility complex, transactivator ; RFXANK : regulatory factor X associated ankyrin containing protein ; RFX5 : regulatory factor X5 ; RFXAP : regulatory factor X associated protein ; ITK : interleukin-2-inducible T-cell kinase ; LCK : lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase ; AID : activation-induced cytidine deaminase ; CARD11 : caspase recruitment domain family member 11 ; BENTA : B cell expansion with NF- B and T-cell anergy ; APECED : autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy ; AIRE : Auto-Immune REgulator ; STIM1 : Stromal interaction molecule 1 ; WAS : Wiskott-Aldrich Syndrome ; WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome protein ; IPEX : immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked ; FOXP3 : Forkhead box P3 ; XLA : X-Linked Agammaglobulinemia ; BTK : Bruton Tyrosine Kinase ; CGD : chronic granulomatous disease ; CYBB : cytochrome b-245, beta chain ; CYBA : cytochrome b-245, alpha chain ; NCF : neutrophil cytosolic factor ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; GOF : gain of function (gain-de-fonction) ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PLAID : PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation ; PLCG2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 ; NFKB 2 : nuclear factor-kappa-˜2 ; AID : activation-induced cytidine deaminase ; STIM1 : stromal interaction molecule 1 ; DICV : déficit immunitaire commun variable ; TACI : transmembrane activator and CAML interactor ; CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 ; LRBA : lipopolysaccharide-responsive and Beige-like anchor ; ICOS : inducible T-cell costimulatory ; ALPS : autoimmune lymphoproliferative syndrome ; FAS : TNF receptor superfamily member 6 ; CASP : Caspase gene ; FR : facteur rhumatoïde ; RAG1 : recombination activating gene 1 ; MAGT1 : magnesium transporter 1 ; UNC119 : Unc-119 lipid binding chaperone ; SAPL : syndrome des anti-phospholipides ; NC : non connu.

et sont d'ailleurs recommandés dans les protocole national de dia-gnostic et de soin (PNDS) de ces maladies.

3.2. Maladies auto-immunes d'organes

Plusieurs types d'auto-immunité spécifique d'organe sont clas-siquement rencontrés au cours des DIPs [2,8,9] (Tableau 1). Il peut s'agir :

- d'entéropathie et de colites inflammatoires. Elles sont quasiment constantes au cours des syndromes immune dysregulation polyen-docrinopathy enteropathy-X-linked syndrome (IPEX) et IPEX-like, et jusqu'à 10 % au cours du DICV. Elles peuvent aussi s'observer dans les déficits en LRBA ou CTLA-4 (chez 80 % des patients), les mutations gains de fonction de PI3KCD, les syndromes d'Omenn ou de Wiskott-Aldrich (WAS) ;

- de pseudo-maladie cœliaque, avec absence d'auto-anticorps, observée dans 5 à 10 % des DICV ;
- d'hépatite auto-immune ou de glomérulonéphrites s'associant au syndrome Hyper-IgM et au DICV ;
- d'endocrinopathie auto-immune (thyroïdite, diabète de type 1), particulièrement dans le syndrome auto-immune polyendocrinopathy-candidasis-ectodermal dystrophy (APECED), mais aussi au cours du syndrome IPEX et du DICV. Au cours du déficit en CTLA-4, une thyroïdite est rencontrée chez près d'un tiers des patients et un diabète de type 1 chez 15 % des patients ;
- d'atteintes d'organes plus rares telles que des uvéites ou des pathologies neurologiques centrales inflammatoires ou granulomateuses. Le diagnostic différentiel avec une lymphopro-lifération (hémopathie maligne) ou une infection opportuniste (LEMP due au virus JC par exemple), ne devra pas être méconnu [10] et la réalisation d'une ponction lombaire avec colorations spéciales ainsi que des examens infectieux généraux et ciblés (PCR) en fonction du DIP sous-jacent pourront être utiles.

3.3. Atteintes granulomateuses et pseudo-sarcoïdose

Des atteintes granulomateuses, limitées à un organe (poumon, foie, rate, ganglions) ou systémiques pseudo-sarcoïdosiques [11] peuvent se rencontrer, au cours du DICV en particulier (histo-logiquement prouvée chez 10 à 15 % des patients [3,5,8]). Une étiologie infectieuse (mycobactéries, brucellose) sera toujours évo-quée et recherchée, là encore grâce à des colorations spécifiques sur biopsies, des cultures et des PCR spécifiques (les sérologies pouvant être prises en défaut chez les patients ayant un déficit humoral ou substitués en immunoglobulines). Ces granulomatoses posent parfois un problème de diagnostic différentiel avec la sarcoï-dose. Néanmoins, la sarcoïdose présente habituellement des taux d'Ig normaux ou élevés. L'atteinte sarcoïdosique pulmonaire asso-cie classiquement plus d'adénopathies hilaires non compressives, une atteinte micronodulaire prédominant dans la partie supérieure des poumons et une fréquence plus rare de bronchiectasies asso-ciées. La présence de cytopénies auto-immunes (jusqu'à 50 % des patients DICV avec granulomatose), d'épisodes infectieux respira-toires récurrents ou une hypogammaglobulinémie doivent alerter le clinicien sur la possibilité d'un DICV associé à la granulomatose [11]. À l'inverse, la découverte d'une granulomatose systémique, en particulier si elle est pulmonaire, sévère et associée à une atteinte interstitielle lymphoprolifé-rative (groupe des GLILD pour granulo-matous – lymphocytic interstitial lung disease) doivent faire craindre une évolution péjorative du DICV (risque d'évolution vers un lym-phome de 31 % et médiane de survie globale abaissée à 13,7 ans versus 28,8 ans pour les DICV sans granulomatose) [12]. Ces granu-lomatoses associées aux DICV ne se compliquent habituellement pas d'hypercalcémie et les atteintes ophtalmologiques (uvéites) ou cardiaques sont exceptionnelles.

3.4. Connectivites et rhumatismes inflammatoires

Les manifestations articulaires inflammatoires sont un symp-tôme fréquent au cours des déficits immunitaires, en particulier au décours du DICV (15 % des patients [2]) et du syndrome Hyper-IgM. Il peut s'agir d'authentiques rhumatismes inflammatoires (arthrite juvénile idiopathique ou polyarthrite rhumatoïde), mais il convient toutefois de ne pas méconnaître une cause infec-tieuse associée au déficit immunitaire (réplication EBV ou CMV, parvovirus B19, infection à mycoplasme). Par ailleurs, certaines maladies systémiques comme le LES, le syndrome de Sjögren,

ou la sarcoïdose, peuvent se présenter avec des lymphopénies T profondes persistantes ou s'associer à d'authentiques déficits immunitaires humoraux (type DICV), suggérant une interface physiopathologique entre maladies auto-immunes et DIPs [13]. Un âge de début précoce de la symptomatologie auto-immune, la présence d'une transmission familiale mendélienne, l'association à des manifestations atypiques (infections, granulomatose, lymphoprolifération) ou sévères (neurologiques) devra faire évoquer la possibilité d'un déficit immunitaire sous-jacent (exemples du déficit génétique en fraction du complément et LES ou des interféronopathies par anomalies des composants de la voie de l'interféron pour certains lupus pédiatriques ou familiaux).
Par ailleurs, paradoxalement, des pistes thérapeutiques émergent de la connaissance des mécanismes de rupture de tolérance dans le syndrome APECED avec anticorps anti-cytokines dirigées contre l'IL-17 et l'interféron de type I. En effet, ces auto-anticorps bloquants pourraient constituer un facteur protecteur vis-à-vis de certaines maladies auto-immunes médiées par les LT et être une piste thérapeutique d'avenir dans les maladies auto-immunes en général [4].

4. Mécanismes physiopathologiques

4.1. L'apport des nouvelles techniques de biologie moléculaire dans l'étude génétique des DIPs

Les techniques de séquenc¸age haut débit du génome humain (next generation sequencing [NGS]) ont complètement changé l'étude et la compréhension des DIPs. Ces techniques sont utilisées en recherche pour l'identification de nouveaux gènes à l'origine de DIPs par l'étude de familles affectées ou de groupes très homogènes de patients avec des phénotypes proches. Les mutations génétiques mises en évidence par ce type d'analyse doivent être confirmées par un séquenc¸age classique par la méthode de Sanger [14]. Par ailleurs, le nombre croissant de gènes impliqués dans des déficits immunitaires (plus de 300) nécessite des techniques d'explorations d'un grand nombre de gènes simultanément. Ceci est rendu pos-sible grâce aux techniques de NGS (méthode en cours de validation pour une utilisation en routine à l'hôpital Necker).

4.2. Mécanismes impliqués dans la rupture de tolérance au cours des DIPs

L'auto-immunité est le résultat de la rupture de tolérance du sys-tème immunitaire vis-à-vis des antigènes du soi. Les mécanismes impliqués dans cette rupture de tolérance au cours des déficits immunitaires sont résumés sur la Fig. 1 et le Tableau 2.

4.2.1. Défauts d'activation lymphocytaire B

4.2.1.1. Défaut de maturation lymphocytaire B : le syndrome Hyper-IgM autosomique récessif avec mutation du gène codant pour activation-induced cytidine deaminase (AID). Le gène AID est exprimé dans les LB activés dans les organes lymphoïdes secon-daires et permet les processus de maturation d'affinité des anticorps par hypermutation somatique. Ainsi, les mutations de ce gène sont impliquées dans les défauts de switch à l'origine d'une forme de syndrome Hyper-IgM autosomique récessif, avec des taux bas d'IgG et IgA mais des taux normaux ou élevés d'IgM. Les

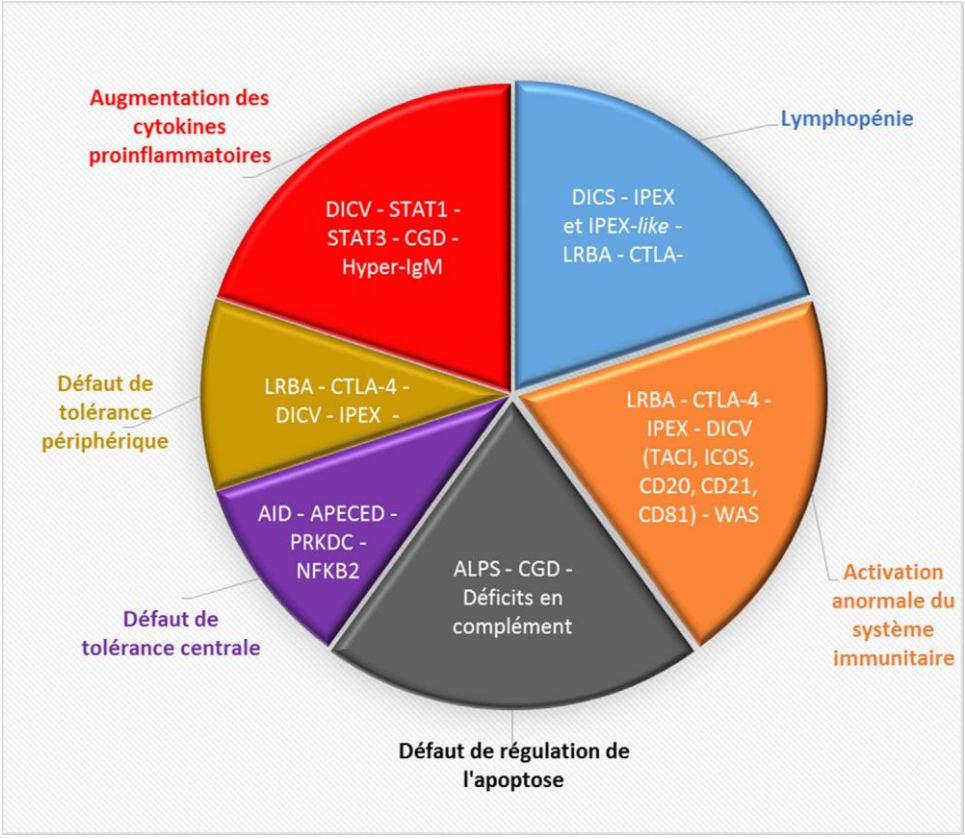


Fig. 1. Principaux mécanismes physiopathologiques à l'origine d'auto-immunité dans les déficits immunitaires primitifs. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'auto-immunité au cours du déficit immunitaire nous informent sur l'émergence de l'auto-immunité en général et permettent de comprendre l'étiologie de maladies auto-immunes multi-factorielles et multigéniques (lupus, polyarthrite, maladies inflammatoires de l'intestin). Les mécanismes de rupture de tolérance dans les déficits immunitaires primitifs peuvent être centraux ou périphériques, affectent l'immunité innée et adaptative, humorale et cellulaire, effectrice et régulatrice. Ils sont souvent combinés comme au cours du déficit immunitaire commun variable.

Tableau 2
Principaux mécanismes physiopathologiques imputés d'auto-immunité au cours des déficits immunitaires primitifs.

Mécanismes de rupture de tolérance	Pathologies
Oligoclonalité T	Syndrome d'Omenn
Défaut d'expression de la protéine AIRE	APECED, syndrome d'Omenn, mutations de NFKB 2, PRKDC
Défauts des lymphocytes T régulateurs : (défaut de nombre des LTregs et/ou défaut de fonction des LTregs)	IPEX, Omenn, CTLA-4, LRBA, IPEX-like, WAS, Ora1, STIM1
Défaut d'apoptose	ALPS, CGD, HLH, LRBA
Défaut de clairance des corps apoptotiques	ALPS, CGD, déficits en complément (C1q, C2, C3, C4)
Défaut de sélection lymphocytaire B	DICV, ALPS, AID
Défaut d'autophagie des lymphocytes B	LRBA
Défaut d'activation lymphocytaire B	STIM1, PLCG2, NFKB 2

APECED : autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy ; NFKB 2 : nuclear factor-kappa-˘2 ; PRKDC : protein kinase, DNA-activated, catalytic poly-peptide ; IPEX : immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked ; CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 ; LRBA : lipopolysaccharide-responsive and Beige-like anchor ; WAS : Wiskott-Aldrich Syndrome-Ora1 ; STIM1 : stromal interaction molecule 1 ; ALPS : autoimmune lymphoproliferative syndrome ; CGD : chronic granulomatous disease ; HLH : hemophagocytic lymphohistiocytosis ; DICV : déficit immunitaire commun variable ; AID : activation-induced cytidine deaminase ; PLCG2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 ; NFKB 2 : nuclear factor-kappa-˘2.

patients présentent des manifestations auto-immunes (CAI, auto-immunité d'organe, lupus) dans 30 % des cas qui pourraient être liées à des défauts de régulation de la sélection négative des clones auto-réactifs B au niveau central et périphérique [15,16]. Les auto-anticorps sont en général d'isotype IgM [15–17]. Une partie des patients déficients en AID présente des lymphoprolifératons avec une hyperplasie folliculaire et des centres germinatifs géants sur les biopsies ganglionnaires.

4.2.1.2. Des états d'activations anormaux du BCR peuvent également favoriser l'auto-immunité [18]. Des anomalies du signal calcique, après stimulation du BCR, ont été constatées chez les patients DICV avec auto-immunité comparativement aux autres DICV et aux sujets sains [19], mais aussi dans d'autres déficits immu-nitaires comme le syndrome de Wiskott-Aldrich [20]. La baisse du signal calcique aboutit à un défaut d'activation des LB et d'activation de la voie NF- B. Certaines formes monogéniques de DICV touchent des co-récepteurs du BCR (mutations de CD19 [21], CD20 [22], CD21 [23,24], ou CD81 [25]). Elles associent une hypogammaglobulinémie de profondeur variable et une lym-phopénie B touchant particulièrement les LB mémoires switchés ($CD19^+$ $CD27^+$ IgD^- IgM^-). Quelques patients atteints de ces muta-tions ont développé des néphrites. Le mécanisme impliqué serait lié au défaut de signal médié par le BCR dans les centres germinatifs, occasionnant une dérégulation du processus de sélection négative et entraînant une rupture de tolérance en périphérie [23,25].

4.2.2. PI3K : anomalies d'activation lymphocytaire T
PI3K est une kinase centrale du fonctionnement des cellules eucaryotes. La classe I de cette kinase est composée de 2 sous-unités (p85/régulatrice et p110 /catalytique) qui joue un rôle essentielle dans la fonction et l'activation lymphocytaire. Les mutations gain-de-fonction de la sous-unité p110 de PI3K (gène PI3KCD) sont responsables d'un phénotype de déficit immunitaire complexe associant lymphoprolifération, auto-immunité, infections pulmo-naires et ORL récurrentes liées dans un certain nombre de cas à une hypogammaglobulinémie [26]. Les complications auto-immunes sont fréquentes (15 à 30 %) et comprennent des CAI, mais aussi des manifestations de type lupiques et beaucoup plus rarement de l'auto-immunité d'organe comme des glomérulonéphrites ou des thyroïdites [27–29]. Dans les LT, PI3K agit en aval de l'activation du co-récepteur T CD28. Les mutations gain-de-fonction aug-mentent la production de phosphatidylinositol triphosphate dans les cellules T. Ceci aboutit à une phosphorylation accrue d'Akt, et une hyperactivation de la kinase mechanistic Target Of Rapamy-cin (mTOR), cible thérapeutique de la rapamycine, du sirolimus et de l'évérolimus, entraînant la différenciation et l'activation des LT effecteurs à l'origine des manifestations auto-immunes [30]. Les anomalies de signal de PI3K sont par ailleurs responsables potentiellement de l'hypogammaglobulinémie et des défauts de maturation lymphocytaire B constatés.

4.2.3. ALPS-CGD : un défaut de régulation des mécanismes d'apoptose conduit à l'auto-immunité
L'accumulation des débris apoptotiques causée soit par un excès d'apoptose, soit liée à un défaut de clairance des corps apopto-tiques comme dans les déficits en complément, est désormais bien connue pour provoquer de l'auto-immunité en activant les voies de l'inflammasome et de l'interféron [31,32]. Au cours de l'ALPS, les manifestations auto-immunes sont très fréquentes (72 % à l'âge de 30 ans). Il s'agit en particulier de CAI, et plus précisément de syn-drome d'Evans (52 %), et plus rarement de maladies auto-immunes d'organe. La maladie est causée le plus souvent par des mutations germinales, suivant un mode de transmission autosomique domi-nant, touchant les gènes FAS, FASL ou CASP10, impliqués dans les mécanismes d'apoptose [7,33]. Des mutations de ces gènes ont également été retrouvées au cours du LES [7,34,35]. Dans la granu-lomatose chronique héréditaire (CGD) liée à l'X, la mutation de CYBB impliquant un défaut de la fonction phagocytaire et des neutro-philes, est un facteur de risque de lupus pour les femmes porteuses de la mutation. Ainsi, près de 60 % de ces femmes présenteraient des signes cutanés et environ 10 % seraient atteint d'authentiques LES. Le mécanisme physiopathologique sous-jacent associerait une baisse de clairance des débris apoptotiques cellulaires, un défaut d'opsonisation et un état pro-inflammatoire chronique (défaut d'expression de la phosphatidyl sérine, de la prostaglandine D2 et diminution de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF-), prompt à provoquer l'émergence d'auto-immunité [36].

4.2.4. IPEX-APECED et CTLA4-LRBA : un défaut de fonction des mécanismes de tolérance conduit à l'auto-immunité
4.2.4.1. IPEX et APECED (ou APS-1) : défaut de contrôle de la tolérance centrale thymique. L'exemple prototypique des défauts de fonction des lymphocytes T régulateurs (Trègs) du syndrome IPEX [37,38] qui se manifeste tôt dans l'enfance et associe entéropathie auto-immune, eczéma, diabète de type 1 et CAI. Il est causé par la mutation du facteur de transcription FoxP3 (canonique des LTregs) qui aboutit à une absence de LTregs.
Certains déficits immunitaires entraînent un défaut d'expression thymique des auto-antigènes au niveau de la médulla, permettant à des clones T auto-réactifs de passer anor-malement l'étape de sélection négative. C'est le cas des déficits en auto-immune regulator gene (AIRE) dont la mutation aboutit au syn-drome APECED (ou APS-1) de transmission autosomique récessive. AIRE est un élément clé du processus de tolérance centrale dans le thymus en permettant la présentation, par les cellules épithéliales thymiques médullaires, d'un large répertoire d'auto-antigènes aux LT immatures afin permettre la sélection négative des cellules T auto-réactives. AIRE influence aussi l'acquisition du répertoire des LTregs au niveau thymique et joue un rôle dans le contrôle de la tolérance périphérique. Les candidoses cutanéomuqueuses chroniques observées dans les APECED sont d'ailleurs le reflet de l'auto-immunité qui accompagne les défauts d'AIRE, puisque liées à la production d'auto-anticorps anti-IL-17 et anti-IL-22 ciblant les lymphocytes Th17, acteurs centraux de la réponse antifongique [39].

Tableau 3
Prévalence des complications dysimmunitaires associées aux mutations de LRBA et CTLA-4.

	CTLA-4[a]	LRBA[b]
Anémie hémolytique auto-immune	28 %	61 %
PTI	35 %	72 %
Neutropénie	NC	21 %
Lymphopénie	Fréquente/NC	32 %
Entéropathie inflammatoire	78 %	62 %
Hépatite auto-immune	Rapportée/NC	14 %
Endocrinopathies auto-immunes (diabète de type 1 ou thyroïdite)	15 à 20 %	24 %
Uvéite	Rapportée/NC	10 %
Alopécie	Rapportée/NC	5 %
Granulomatose avec pneumopathie infiltrative	66 %	38 %
Baisse du nombre de lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25++ FoxP3+)	Possible	73 %
Arthrites	Rapportée/NC	Rapportée/NC
Lymphopénie B (CD19+)	Possible/NC	55 %
Hypogammaglobulinémie	76 %	60 %

NC : prévalence non connue.
a Résultats sur 19 patients porteurs de mutations sur CTLA-4 [72]. [b]
Résultats sur 22 patients porteurs de mutations LRBA [45].

4.2.4.2. CTLA4-LRBA : défaut de tolérance lymphocytaire T périphé-rique. Des défauts de fonction de CTLA-4 et de LRBA aboutissent à un défaut de fonction des LT régulateurs. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (CTLA-4) est une molécule exprimée à la surface des LTregs de fac¸on constitutionnelle. Elle exerce sa fonction immunosuppressive en entrant en compétition avec CD28 pour la liaison aux molécules de co-stimulation CD80/CD86 présentes
à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, et en dimi-nuant leur expression par transendocytose [40,41]. Des anomalies d'expression de CTLA-4 sur les LTregs ont été décrites dans plu-sieurs pathologies auto-immunes (lupus, polyarthrite rhumatoïde) [42,43]. Par ailleurs, des mutations de CTLA-4 [40] conduisent à un phénotype complexe de déficit immunitaire, à début le plus sou-vent pédiatrique et de transmission autosomique dominante avec pénétrance variable (cas décrits jusqu'à 50 ans avec une médiane de 11 ans). Les anomalies de la fonction T régulatrice, consé-quences de la mutation de CTLA-4, vont entraîner l'émergence d'auto-immunité avec lymphoprolifération via une activation lymphocytaire T dérégulée, ainsi qu'un déficit immunitaire avec une hypogammaglobulinémie, une lymphopénie, des anomalies de maturation lymphocytaire B et T, et une infiltration de certains organes (granulomatose pulmonaire, entéropathie, infiltration cérébrale) (Tableau 3). L'infiltration des organes hématopoïétiques par les LT activés serait ainsi à l'origine de la destruction de la niche hématopoïétique B qui causerait le déficit humoral de ces patients [40]. Sur un modèle physiopathologique proche, des anomalies de LRBA ont été récemment décrites. LPS-responsive Beige-like anchor (LRBA) est une grande protéine intracytoplasmique qui intervient dans la dégradation lysosomale et la recirculation de protéines intracellulaires dont CTLA-4. Dans les LTregs activés, LRBA est responsable de l'augmentation de l'expression membranaire de CTLA-4. La perte de LRBA induit une diminution des fonctions T régulatrices via l'altération du recyclage de CTLA-4 à la membrane des LTregs, expliquant les manifestations cliniques observées [44]. Les mutations de LRBA peuvent donner des phénotypes extrême-ment diversifiés, de manifestations auto-immunes isolées jusqu'au déficit immunitaire humoral sévère et à des syndromes IPEX-like, avec une pénétrance clinique variable et un début des symptômes qui peut aller de l'âge pédiatrique jusqu'à l'adolescence. Les manifestations auto-immunes rapportées sont variées (Tableau 3)
[45] : glomérulonéphrites, anémie de Biermer, arthrites, CAI (PTI, AHAI). Les patients présentent une hypogammaglobulinémie avec anomalies lymphocytaires B (défaut d'activation des cellules B naïves, défaut de maturation des LB mémoires des LB de la zone marginale, défaut d'autophagie) [44,46].
Prises ensemble, ces données expliquent comment un déficit génétique touchant les LTregs, peut à la fois conduire à un phé-notype auto-immun par rupture de tolérance périphérique et à un déficit immunitaire complexe associant lymphopénie sanguine, hypogammaglobulinémie et lymphoprolifération T d'organe.

4.2.5. Un excès d'interféron de type 1 conduit à l'auto-immunité
Le démantèlement des mécanismes physiopathologiques conduisant aux lupus de formes monogéniques (syndrome d'Aicardi Gouttière, Chilblain lupus) a permis de mieux compren-dre l'implication des interférons de type 1 dans l'émergence d'auto-immunité [31,32]. Les mutations gains de fonction de STING, un gène impliqué dans la reconnaissance intracellulaire des débris nucléiques, entraînent une hyperactivation de la réponse interféron de type I en présence de débris nucléiques (issus de cellules apoptotiques ou de pathogènes viraux) et favorise l'auto-immunité [47].

En dehors des formes monogéniques d'activation de la voie de l'interféron, une augmentation de la réponse interféron de type 1 a été constatée dans les DICV avec auto-immunité [48,49]. Une augmentation de la réponse interféron par hyperactiva-tion chronique de STAT1 [50] peut aboutir à des manifestations auto-immunes dans les mutations gain-de-fonction de STAT1. Ce syndrome se caractérise à la fois par un défaut d'immunité cellulaire (perte de la réponse antifongique Th17) et par des mani-festations auto-immunes. Des observations analogues sont faites dans les mutations gain-de-fonction de STAT3 [51]. Cependant, la lecture de cette signature interféron au cours des DIPs avec auto-immunité n'impliquent pas forcément un lien de causalité direct, mais pourrait constituer un épiphénomène associé à la présence d'auto-immunité et nécessite d'être conforté expérimentalement.

4.3. Interface physiopathologique entre DIP et maladies auto-immunes

Certains gènes impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire peuvent être touchés par des mutations rares et délétères pour la fonction protéique, aboutissant à un déficit immunitaire. Plus fréquemment, des mutations peu délétères sur plusieurs gènes impliqués dans les fonctions immunitaires, vont avoir un effet synergique, et aboutir à une susceptibilité polygé-nique accrue aux maladies auto-immunes [31,60,61]. Ceci a été confirmé par les données issues de Genome-Wide Association Study (GWAS) et de NGS dans les maladies auto-immunes et les déficits immunitaires [62]. Ainsi, parmi les 265 gènes connus à l'origine de formes monogéniques de DIPs, 80 environ (30 %) sont également des loci de susceptibilité aux maladies auto-immunes et inflammatoires identifiés par les études de GWAS et 50 % de ceux-ci se retrouvent dans plusieurs maladies inflammatoires (maladie de Crohn, lupus, polyarthrite rhumatoïde, thyroïdites).

5. Prise en charge thérapeutique des DIPs avec auto-immunité

5.1. Particularités liées à la prise en charge d'un patient immunodéprimé avec auto-immunité

La prise en charge thérapeutique d'une maladie auto-immune associée à un DIP amène immédiatement la problématique de la

prévention du risque infectieux (vaccinations, substitution, compli-cations liées aux traitements de fond comme à une éventuelle allogreffe) et de l'aggravation de ce risque infectieux en rapport avec le traitement de la maladie auto-immune.

5.1.1. Principes généraux

Dans le cas d'émergence de manifestations auto-immunes au décours d'un DIP, il faut toujours évaluer la balance bénéfice/risque des thérapeutiques envisagées et prendre des précautions parti-culières concernant la majoration du risque infectieux. Le haut conseil de santé publique a émis des recommandations aux-quelles on peut se référer concernant la prise en charge vaccinale chez les patients atteints de DIPs (http://www.hcsp.fr/). De fac¸on générale, les vaccins vivants atténués sont contre-indiqués en cas de déficit cellulaire sévère. Au préalable à l'introduction d'un traitement immunosuppresseur, il ne faut pas méconnaître une infection chronique qui peut entretenir certaines manifes-tations, comme des cytopénies ou des manifestations digestives par exemple, et qui peuvent bénéficier d'une prise en charge spécifique. En fonction du DIP sous-jacent, il faudra être parti-culièrement attentif à certains risques spécifiques surajoutés par l'utilisation de certaines biothérapies ou vaccins. Par exemple, chez les patients atteints de CGD [63] ou dans les déficits de la voie IL-12/IFN- [64], la vigilance devra être encore plus grande à l'égard du risque de réactivation tuberculeuse en cas d'utilisation d'anti-TNF- [65] et le vaccin anti-BCG est contre-indiqué du fait du risque de BCGite généralisé. La vaccination anti-grippale annuelle est recommandée après l'âge de 2 ans dans la plupart des DIPs et la vaccination anti-pneumococcique (schéma prime-boost avec le vaccin 13 valences/Prévenar13® suivi 2 mois plus tard du vaccin 23 valences/Pneumo23®) est recommandée dans les déficits de l'immunité humorale et cellulaire même en cas de substitution en immunoglobulines. De plus, le vaccin anti-Haemophilus de type b et anti-méningocoque est recommandé en cas d'anomalies de la voie du complément ou d'asplénie. Concernant l'antibioprophylaxie, le cotrimoxazole (800 mg/j) est recommandé au long court en cas de neutropénie chronique pro-fonde (< 500/mm^3), de CGD ou de lymphopénie CD4 profonde. Dans les DICV avec dilatations des bronches et infections récurrentes, une antibioprophylaxie par azythromycine 250 mg 3 fois par semaine est parfois proposée.

5.1.2. Cytopénies auto-immunes

Des doses supérieures d'IgIV (de l'ordre de 1 g/kg) peuvent être nécessaires en cas de PTI ou d'AHAI. Par ailleurs, le taux résiduel d'immunoglobuline cible, pour éviter les infections chez ces patients, est également supérieur [66]. La corticothérapie à forte dose (bolus IV relayé par des doses modérées per os) pour plu-sieurs semaines, est généralement efficace. Le rituximab (4 cures, 375 mg/m^2 hebdomadaire) a aussi été utilisé dans les formes réfractaires et/ou récurrentes avec efficacité [67]. Cependant le traitement par rituximab au cours de l'ALPS est fréquemment compliqué d'hypogammaglobulinémie profonde et persistante [7,33] et expose à des complications infectieuses graves en dehors de substitution par IgIV.

En cas de splénectomie ou en cas d'utilisation du rituximab, la protection anti-infectieuse doit être accrue par une majoration des doses d'IgIV, du fait du risque augmenté d'infection bactérienne à germes encapsulés (en plus des mesures habituelles) [68].

5.1.3. Manifestations rhumatologiques

La prise en charge thérapeutique des arthrites associées au DIPs fait appel aux antibiotiques en cas d'arguments pour une étiolo-gie infectieuse et un traitement ciblant les germes intracellulaires (doxycycline) est facilement proposé. Par ailleurs, la substitution par immunoglobulines polyvalentes apporte fréquemment une amélioration des douleurs [69]. Dans le cas contraire, le traitement recourt en première ligne aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou stéroïdiens puis aux traitements immunomodulateurs (métho-trexate, salazopyrine). Enfin, il existe d'authentiques rhumatismes inflammatoires qui nécessitent le recours aux thérapies ciblées, selon les mêmes modalités que dans la polyarthrite rhumatoïde (anti-TNF abatacept, rituximab).

5.1.4. Granulomatoses

La prise en charge des complications granulomateuses associées au DIP ne nécessite que rarement une prise en charge thérapeu-tique spécifique. Les IgIV ou SC sont habituellement inefficaces sur la granulomatose. En cas de complications (hypersplénisme, compression liée à une adénomégalie, hépatite, lymphoprolifé-ration), le traitement pourra recourir à la splénectomie, à une chirurgie de décompression ou exceptionnellement à un traitement immunosuppresseurs. Là encore, les complications infectieuses surajoutées à ces thérapies devront être prévenues et le rapport bénéfice/risque soigneusement pesé.

5.1.5. Phénotypes complexes à risque évolutif sévère

La meilleure connaissance du profil évolutif péjoratif de déficits immunitaires complexe avec auto-immunité (défaut de CTLA-4 et LRBA, activation de PI3KCD, IPEX), les succès de l'emploi de thé-rapies ciblées dans certains DIPs, mais aussi les meilleurs taux de réussite en cas de réalisation précoce de l'allogreffe dans les DIPs
à risque de complications sévères, plaident pour une identification précoce des patients sur la base de la reconnaissance syndromique et génétique de leur DIP, afin de pouvoir envisager rapidement le mode de prise en charge adapté.

5.2. Perspectives thérapeutiques des manifestations auto-immunes associées aux déficits immunitaires

La précision des anomalies génétiques dans certains DIP avec manifestations auto-immunes a permis de d'ouvrir des perspec-tives thérapeutiques avec des traitements ciblés sur le mécanisme physiopathologique sous-jacent.

5.2.1. Thérapies immunomodulatrices

L'hydroxychloroquine, en inhibant la dégradation lysosomiale, permet de restaurer la fonction de LRBA chez certains patients mutés pour LRBA et prévient la perte de CTLA-4 à la surface des LTrégs [44]. Ce traitement pourrait être envisagé chez ces patients.
La rapamycine ou le sirolimus, en inhibant mTOR, permet de res-taurer en partie le phénotype (lymphoprolifération) des patients atteints de mutations gains de fonction de PI3K [30]. Par ailleurs, le sirolimus, autre inhibiteur de mTOR, a aussi montré son effica-cité dans les cytopénies auto-immunes associées au syndrome ALPS [70]. Du fait de sa bonne tolérance, ce type de traitement pour-rait être considéré comme un traitement d'épargne cortisonique de premier choix en cas de cytopénies auto-immunes associées à l'ALPS.

L'IL-7 recombinante est une thérapeutique envisagée dans les lymphopénies CD4 idiopathiques [71]. Dans un essai de phase I/IIA, cette thérapeutique a conduit à une élévation du nombre absolu de LT CD4+ et CD8+ circulants.
Le G-CSF pourrait augmenter la sécrétion d'IL-17 et améliorer le phénotype des patients atteints de déficits immunitaires avec anti-corps anti-IL-17 (gains de fonction de STAT1, syndrome APECED) [72].

5.2.2. Thérapies ciblées

La découverte des défauts de fonction de CTLA-4 et LRBA a naturellement conduit à l'utilisation de CTLA-4-Ig (abatacept) pour restaurer le phénotype de ces patients. Cela a eu pour effet de

réduire la lymphoprolifération d'organe (en particulier pulmo-naire) [44].

Par ailleurs, l'utilisation d'anti-IL-17, en restaurant l'apoptose médiée par FAS dans les LB auto-réactifs, pourrait être un traite-ment des manifestations auto-immunes dans l'ALPS [33].

5.2.3. Allogreffe de cellule souches hématopoïétique chez l'adulte Les données publiées [73,74] retrouvent un taux de mortalité
élevé (proche de 50 %) lié au terrain de déficit immunitaire sous-jacent et aux comorbidités (traitements, infections). L'avenir de la thérapie cellulaire des déficits immunitaires de l'adulte serait, outre le recours à des protocoles de conditionnement atténués spéci-fiques aux DIPs, de mieux cibler les indications sur la base de la corrélation génotype/phénotype, et d'envisager plus précocement cette option thérapeutique sur la base de facteurs pronostics évo-lutifs (sur l'exemple des mutations de GATA2 dans le syndrome myélodysplasique) [75].

6. Conclusions

La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui conduisent à l'auto-immunité au cours des DIPs a permis de mieux comprendre le fonctionnement normal du système immunitaire. L'association fréquente de l'auto-immunité au cours des déficits immunitaires permet d'appréhender les modèles complexes qui sous-tendent les maladies auto-immunes, certaines hémopathies malignes ou bien encore certains effets des traitements par thérapies ciblées (anti-CTLA-4, anti-PDL1) en immunologie ou en cancérologie.

Des perspectives thérapeutiques nouvelles (thérapies ciblées, immunomodulateurs) s'ouvrent au clinicien en charge des patients atteints de DIPs avec manifestations auto-immunes sur la base de meilleurs connaissances physiopathologiques.

Déclaration de liens d'intérêts

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

Remerciements

A.G. a été Lauréat de la bourse SNFMI Marcel Simon en 2013 et remercie la SNFMI d'avoir soutenu son projet de recherche.

Références

[1] Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova J-L, Chatila T, et al. The 2015 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. J Clin Immunol 2015;35:727–38, http://dx.doi.org/10.1007/s10875-015-0198-5.
[2] Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. Blood 2012;119:1650–7.
[3] Boileau J, Mouillot G, Gérard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. J Autoimmun 2011;36:25–32, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.10.002.
[4] Meyer S, Woodward M, Hertel C, Vlaicu P, Haque Y, Kärner J, et al. AIRE-deficient patients harbor unique high-affinity disease-ameliorating autoantibodies. Cell 2016;166:582–95, http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.024.
[5] Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Blood 2008;111:77–85, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744.
[6] Seidel MG. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment. Blood 2014;124:2337–44, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-06-583260.
[7] Neven B, Magerus-Chatinet A, Florkin B, Gobert D, Lambotte O, Somer LD, et al. A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. Blood 2011;118:4798–807, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-04-347641.
[8] Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. Blood 2008;112:277–86, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-11-124545.
[9] Verbsky JW, Routes JM. In: Sullivan, Stiehm, editors. Management of autoimmunity and inflammation. Stiehms Immune Defic. Elsevier; 2014. p. 931–42.
[10] Zerbe CS, Marciano BE, Katial RK, Santos CB, Adamo N, Hsu AP, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in primary immune deficiencies: Stat1 gain of function and review of the literature. Clin Infect Dis 2016;62:986–94, http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ1220.
[11] Pavic M, Pasquet F, Fieschi C, Malphettes M, Sève P. Granulomatoses au cours des déficits immunitaires primitifs de l'adulte. Rev Med Interne 2013;34:154–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2012.02.005.
[12] Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2004;114:415–21, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.05.057.
[13] Khoruts A, Fraser JM. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. Immunol Lett 2005;98:23–31, http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2004.10.022.
[14] Van Schouwenburg PA, Davenport EE, Kienzler A-K, Marwah I, Wright B, Lucas M, et al. Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. Clin Immunol 2015;160:301–14, http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.05.020.
[15] Meyers G, Ng Y-S, Bannock JM, Lavoie A, Walter JE, Notarangelo LD, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B cell tolerance in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:11554–9, http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102600108.
[16] Durandy A, Cantaert T, Kracker S, Meffre E. Potential roles of activation-induced cytidine deaminase in promotion or prevention of autoimmunity in humans. Autoimmunity 2013;46:148–56, http://dx.doi.org/10.3109/08916934.2012.750299.
[17] Hase K, Takahashi D, Ebisawa M, Kawano S, Itoh K, Ohno H. Activation-induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. PloS One 2008;3:e3033, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003033.
[18] Dörner T, Lipsky PE. Signalling pathways in B cells: implications for autoimmunity. Curr Top Microbiol Immunol 2006;305:213–40.
[19] Foerster C, Voelxen N, Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Goldacker S, et al. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. J Immunol 2010;184:7305–13, http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000434.
[20] Becker-Herman S, Meyer-Bahlburg A, Schwartz MA, Jackson SW, Hudkins KL, Liu C, et al. WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. J Exp Med 2011;208:2033–42, http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110200.
[21] Van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJM, van Tol MJD, et al. An antibody deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. N Engl J Med 2006;354:1901–12, http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa051568.
[22] Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell–independent antibody responses. J Clin Invest 2010;120:214–22, http://dx.doi.org/10.1172/JCI40231.
[23] Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagena T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol 2012;129:801–10, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.027 [e6].
[24] Frank MM. CD21 deficiency, complement, and the development of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2012;129:811–3, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.982.
[25] Van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. J Clin Invest 2010;120:1265–74, http://dx.doi.org/10.1172/JCI39748.
[26] Deau M-C, Heurtier L, Frange P, Suarez F, Bole-Feysot C, Nitschke P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. J Clin Invest 2014;124:3923–8, http://dx.doi.org/10.1172/JCI75746.
[27] Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: a cohort study. J Allergy Clin Immunol 2016;138:210–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.022 [e9].
[28] Jou S-T, Chien Y-H, Yang Y-H, Wang T-C, Shyur S-D, Chou C-C, et al. Identification of variations in the human phosphoinositide 3-kinase p110delta gene in children with primary B cell immunodeficiency of unknown aetiology. Int J Immunogenet 2006;33:361–9, http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2006.00627.x.
[29] Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Screaton N, et al. Clinical spectrum and features of activated PI3-kinase delta syndrome: a large patient cohort study. J Allergy Clin Immunol 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.021.
[30] Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. Nat Immunol 2014;15:88–97, http://dx.doi.org/10.1038/ni.2771.
[31] Grimbacher B, Warnatz K, Yong PFK, Korganow A-S, Peter H-H. The crossroads of autoimmunity and immunodeficiency: lessons from polygenic traits and monogenic defects. J Allergy Clin Immunol 2016;137:3–17, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.004.

392

[32] Allenspach E, Torgerson TR. Autoimmunity and primary immunodeficiency disorders. J Clin Immunol 2016, http://dx.doi.org/10.1007/s10875-016-0294-1.
[33] Shah S, Wu E, Rao VK, Tarrant TK. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an update and review of the literature. Curr Allergy Asthma Rep 2014;14:462, http://dx.doi.org/10.1007/s11882-014-0462-4.
[34] Xiang N, Li X-M, Wang G-S, Tao J-H, Li X-P. Association of Fas gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Mol Biol Rep 2013;40:407–15, http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-2075-0.
[35] Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. J Clin Invest 1996;98:1107–13, http://dx.doi.org/10.1172/JCI118892.
[36] Cale CM, Morton L, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. Clin Exp Immunol 2007;148:79–84, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03321.x.
[37] Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. J Med Genet 2002;39:537–45.
[38] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001;27:20–1, http://dx.doi.org/10.1038/83713.
[39] Kisand K, Bøe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. J Exp Med 2010;207:299–308, http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091669.
[40] Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. Science 2014;345:1623–7, http://dx.doi.org/10.1126/science.1255904.
[41] Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. Nat Med 2014;20:1410–6, http://dx.doi.org/10.1038/nm.3746.
[42] Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:19396–401.
[43] Jury EC, Flores-Borja F, Kalsi HS, Lazarus M, Isenberg DA, Mauri C, et al. Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Eur J Immunol 2010;40:569–78, http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939781.
[44] Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. Science 2015;349:436–40, http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa1663.
[45] Gámez-Díaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M, et al. The extended phenotype of LPS-responsive Beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. J Allergy Clin Immunol 2016;137:223–30, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.025.
[46] Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad MJ, Kiani IS, Aljebreen A, et al. LPS-responsive Beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2012;130:481–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.043 [e2].
[47] Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg M-C, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. J Clin Invest 2014;124:5516–20, http://dx.doi.org/10.1172/JCI79100.
[48] Park J, Munagala I, Xu H, Blankenship D, Maffucci P, Chaussabel D, et al. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. PLoS One 2013;8:e74893, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074893.
[49] Yu JE, Zhang L, Radigan L, Sanchez-Ramon S, Cunningham-Rundles C. TLR-mediated B cell defects and IFN-α in common variable immunodeficiency. J Clin Immunol 2012;32:50–60, http://dx.doi.org/10.1007/s10875-011-9602-y.
[50] Uzel G, Sampaio EP, Lawrence MG, Hsu AP, Hackett M, Dorsey MJ, et al. Dominant gain of function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked-like syndrome. J Allergy Clin Immunol 2013;131:1611–23, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.054.
[51] Chandrasekaran P, Zimmerman O, Paulson M, Sampaio EP, Freeman AF, Sowerwine KJ, et al. Distinct mutations at the same positions of STAT3 cause either loss or gain of function. J Allergy Clin Immunol 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.007.
[60] Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, Smith JM. Evolution of genetic redundancy. Nature 1997;388:167–71, http://dx.doi.org/10.1038/40618.
[61] Siddle KJ, Quintana-Murci L. The Red Queen's long race: human adaptation to pathogen pressure. Curr Opin Genet Dev 2014;29:31–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2014.07.004.
[62] Fodil N, Langlais D, Gros P. Primary immunodeficiencies and inflammatory disease: a growing genetic intersection. Trends Immunol 2016;37:126–40, http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.12.006.
[63] Uzel G, Orange JS, Poliak N, Marciano BE, Heller T, Holland SM. Complications of tumor necrosis factor-α blockade in chronic granulomatous disease-related colitis. Clin Infect Dis 2010;51:1429–34, http://dx.doi.org/10.1086/657308.
[64] Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-γ immunity. Semin Immunol 2014;26:454–70, http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008.
[65] Salgado E, Gómez-Reino JJ. The risk of tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. Expert Rev Clin Immunol 2011;7:329–40, http://dx.doi.org/10.1586/eci.11.6.
[66] Lucas M, Lee M, Oksenhendler E, Chapel H. The ratio of mean daily IgG increment/mean daily dose in immunoglobulin replacement therapy in primary antibody deficiencies. J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3:998–1000, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2015.07.001 [e2].
[67] Sève P, Bourdillon L, Sarrot-Reynauld F, Ruivard M, Jaussaud R, Bouhour D, et al. Autoimmune hemolytic anemia and common variable immunodeficiency: a case-control study of 18 patients. Medicine (Baltimore) 2008;87:177–84, http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e31817a90ba.
[68] Wong GK, Goldacker S, Winterhalter C, Grimbacher B, Chapel H, Lucas M, et al. Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Outcomes of splenectomy in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a survey of 45 patients. Clin Exp Immunol 2013;172:63–72, http://dx.doi.org/10.1111/cei.12039.
[69] Webster AD, Loewi G, Dourmashkin RD, Golding DN, Ward DJ, Asherson GL. Polyarthritis in adults with hypogammaglobulinaemia and its rapid response to immunoglobulin treatment. Br Med J 1976;1:1314–6.
[70] Bride KL, Vincent T, Smith-Whitley K, Lambert MP, Bleesing JJ, Seif AE, et al. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial. Blood 2016;127:17–28, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-07-657981.
[71] Sheikh V, Porter BO, DerSimonian R, Kovacs SB, Thompson WL, Perez-Diez A, et al. Administration of interleukin-7 increases CD4T cells in idiopathic CD4 lymphocytopenia. Blood 2016;127:977–88, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-05-645077.
[72] Wildbaum G, Shahar E, Katz R, Karin N, Etzioni A, Pollack S. Continuous G-CSF therapy for isolated chronic mucocutaneous candidiasis: complete clinical remission with restoration of IL-17 secretion. J Allergy Clin Immunol 2013;132:761–4, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.018.
[73] Wehr C, Gennery AR, Lindemans C, Schulz A, Hoenig M, Marks R, et al. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2015;135:988–97, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.029 [e6].
[74] Slatter MA, Engelhardt KR, Burroughs LM, Arkwright PD, Nademi Z, Skoda-Smith S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for CTLA4 deficiency. J Allergy Clin Immunol 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.045.
[75] Saida S, Umeda K, Yasumi T, Matsumoto A, Kato I, Hiramatsu H, et al. Successful reduced-intensity stem cell transplantation for GATA2 deficiency before progression of advanced MDS. Pediatr Transplant 2016:20:333–6, http://dx.doi.org/10.1111/petr.12667.

PAPIER 2 :

LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE ET LYMPHOPENIE : ASPECTS CLINIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES

SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND LYMPHOPENIA : CLINICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES

M. Martin, **A. Guffroy**, X. Argemi, T. Martin

Mise au point (article de Revue)

La Revue de Médecine Interne (2017)

La Revue de médecine interne 38 (2017) 603–613

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

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

Mise au point

Lupus érythémateux systémique et lymphopénie : aspects cliniques et physiopathologiques

Systemic lupus erythematosus and lymphopenia: Clinical and pathophysiological features

M. Martin[a,*,b], A. Guffroy[a,b], X. Argemi[c,d], T. Martin[a,b]

[a] Service d'immunologie clinique et de médecine interne, centre national de référence des maladies auto-immunes rares, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France
[b] CNRS UPR 3572 « immunopathologie, chimie thérapeutique »/équipe « tolérance cellulaire B, auto-immunité », laboratoire d'excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France
[c] Service de maladies infectieuses et tropicales, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France
[d] EA 7290 « virulence bactérienne précoce », faculté de médecine, Strasbourg, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 15 février 2017

Mots clés :
Lupus érythémateux systémique
Lymphopénie

RÉSUMÉ

La lymphopénie est très fréquente au cours du lupus érythémateux systémique (LES), et profonde (< 500/mm^3) dans 10 % des cas. Elle touche principalement les lymphocytes T, notamment CD4$^+$. Les mécanismes physiopathologiques sont complexes, faisant intervenir des anticorps lymphocytotoxiques, un excès d'apoptose, une sensibilité accrue à la lyse par le complément, de même qu'une répression de la lymphopoïèse et des phénomènes de séquestration lymphocytaire. La lymphopénie dans le LES est indépendante des autres cytopénies et des immunosuppresseurs reçus. Elle est associée à l'activité de la maladie, au risque de poussée lupique et aux séquelles viscérales. Le risque infectieux est principalement bactérien, et une lymphopénie < 1 G/L est un facteur de risque indépendant de survenue d'infections sévères bactériennes. Le déficit immunitaire cellulaire T est associé à un moindre contrôle de la réplication virale, mais les infections sévères symptomatiques restent rares. Bien qu'exceptionnelle dans le LES, la pneumocystose y est plus sévère que chez les patients infectés par le VIH, et le risque de leucoencéphalopathie multifocale progressive semble augmenté comparativement aux autres rhumatismes inflammatoires. À ce jour, il n'existe pas de recommandations spécifiques de prise en charge des LES avec lymphopénie. La prophylaxie anti-infectieuse doit rester exceptionnelle et à discuter au cas par cas. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer précisément les caractéristiques cliniques et évolutives des patients lupiques avec lymphopénie chronique profonde (< 500/mm^3), qui constituent très probablement un sous-groupe de LES avec déficit immunitaire primitif associé et nécessitant une prise en charge spécifique.

© 2017 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Systemic lupus erythematosus
Lymphopenia

ABSTRACT

Lymphopenia is frequent in systemic lupus erythematosus (SLE) and profound (< 500/mm^3) in 10% of cases. T lymphocytes, especially CD4+, are more affected than B cells. The pathophysiological mechanisms are complex, involving lymphocytotoxic antibodies, excess of apoptosis, increased susceptibility of T cells to complement mediated cytolysis, as well as lymphopoiesis impairment and lymphocyte sequestration. Lymphopenia in SLE is independent from other cytopenia and immunosuppressive drug regiments, and associated with disease activity, risk of flare and damage scores. Infectious risk is mostly bacterial, and lymphopenia < 1 G/L is an independent risk factor for severe bacterial infections occurrence. The T cellular deficiency is associated with less control of viral replication, but severe and

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : mickael.martin@chru-strasbourg.fr (M. Martin).

http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2017.01.005
0248-8663/© 2017 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

Dans le lupus érythémateux systémique (LES), une lymphopé-nie périphérique, définie par un taux de lymphocytes circulants
4.1,5 G/L, est observée dans 15 à 82 % selon les études [1]. Elle fait partie des critères de classification ACR de 1997 du LES [2], et des critères SLICC de 2012, ces derniers comprenant un taux de lym-phocytes totaux < 1 G/L [3]. Une lymphopénie < 0,5 G/L, considérée comme profonde, est rapportée chez 10 % des patients au cours du LES [4]. Cette revue présentera tout d'abord les mécanismes physio-pathologiques de la lymphopénie dans le LES, qui sont complexes et imparfaitement connus à ce jour, puis elle abordera les associations cliniques et conséquences infectieuses, peu détaillées dans la littérature. Enfin, les spécificités de prise en charge de la lymphopénie profonde dans le LES seront discutées.

2. Aspects physiopathologiques de la lymphopénie au cours du LES

La lymphopénie au cours du LES contribue, de manière indé-pendante de la neutropénie, à la leucopénie globale observée chez ces patients [4]. Elle peut toucher les lymphocytes B (LyB), mais elle concerne principalement les lymphocytes T (LyT) [5] et notamment les $CD4^+$ [6].

2.1. Anticorps lymphocytotoxiques

Des auto-anticorps lymphocytotoxiques (ALC) d'isotype IgM ont été observés dès 1975 dans le LES (Fig. 1A). Leur présence était associée à une lymphopénie par cytotoxicité médiée par la voie classique du complément [7–9]. Depuis, il a été démontré que l'isotype IgG est celui le plus impliqué, conduisant à une cytotoxi-cité cellulaire dépendante des anticorps. Les antigènes reconnus à la surface des LyT sont très variés, incluant de fac¸on non exhaustive le CD4 [10], le CD45 [11], le CMH I/II [12], les glycophospholipides [13], et la protéine p ribosomale [14]. Les IgG ALC sont associés à la présence d'une lymphopénie dans le LES sont significativement plus fréquents dans le LES comparativement aux autres rhuma-tismes inflammatoires et ne sont pas observés chez les sujets sains [15].

2.2. Excès d'apoptose

Comparativement aux témoins sains et aux patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, des études in vitro ont démontré dans le LES une accélération de l'apoptose des lymphocytes LyT [16,17], inversement corrélée aux taux de LyT circulants [5], et indépen-dante des traitements immunosuppresseurs rec¸us [16] (Fig. 1B). Les mécanismes proposés pour expliquer cet excès d'apoptose lym-phocytaire sont multiples.

Sha et al. ont montré une association de excès d'apoptose des LyT avec une diminution significative des concentrations intracel-lulaires de glutathion, un puissant antioxydant naturel, suggérant ainsi une sensibilité accrue des LyT aux espèces réactives de l'oxygène [18]. Un mécanisme plus documenté est celui de l'hyper-expression constitutive de la protéine Fas [17,19], à la surface des LyT naïfs et mémoires, qui est inversement corrélée aux taux de LyT $CD4^+$ circu-lants [19]. Toutefois, cette hyper-expression n'est pas spécifique du LES, étant aussi observée dans les connectivites indifférenciées, la granulomatose avec polyangéite, l'artérite de Takayasu et la périar-térite noueuse [17]. Cette hyper-expression pourrait être à l'inverse physiologique et bénéfique, en permettant de limiter, par apoptose, la prolifération des cellules auto-réactives.

D'autre part, l'excès de Fas soluble est corrélé à l'apoptose des LyT dans le LES [20,21]. Cette molécule, issue à la fois d'un épissage alternatif et du clivage de la forme entière de Fas lors de l'apoptose, est capable de lier la partie extracellulaire de Fas et d'entraîner son hétéro-oligomérisation, indépendamment de la liaison à Fas Ligand. Ceci conduit l'activation du signal d'apoptose médiée par Fas, libérant en retour du Fas soluble et amplifiant ainsi le phéno-mène d'apoptose de manière paracrine [22].

La molécule de co-stimulation CD28 semble aussi impliquée. Il a été montré dans le LES un déficit sélectif en LyT $CD4^+$ et $CD8^+$ expri-mant le CD28, en lien avec une apoptose accélérée de ces cellules et non à un défaut de prolifération et/ou d'activation [23]. L'hypothèse avancée serait l'hyper-expression de CTLA-4 spécifiquement à la surface des LyT $CD28^+$ qui, de manière antigène dépendante et en coopération avec une activation soutenue du récepteur T (TCR) peut avoir un rôle pro-apoptotique [24], visant à empêcher l'expansion des LyT activés potentiellement auto-réactifs.

Le mécanisme de mort cellulaire passive (neglect-apoptosis) est une voie apoptotique médiée par une hyperperméabilité mito-chondriale en lien avec la perte des signaux de survie. Silva et al. ont montré un excès de mort lymphocytaire passive dans le LES, significativement plus important chez les patients avec manifes-tations neuropsychiatriques et notamment ceux avec anticorps anti-phospholipides et/ou anti-Ro/SSA [25]. Ainsi, dans le LES, les lymphocytes pourraient avoir une plus grande dépendance aux signaux de survie, et la mort cellulaire passive constituerait un mécanisme additionnel de lymphopénie induite par apoptose, en conjonction de certains auto-anticorps circulants.

Enfin, des études ont montré que la lymphopénie au cours du LES était associée à des profils distincts d'auto-anticorps, princi-palement de type anti-Ro/SSA (52 kD) ou anti-RNP (70 ou 68 kD) [26,27]. Le mécanisme supposé serait la pénétration in vivo dans les LyT/LyB de ces auto-anticorps, suivie d'un blocage du cycle cellu-laire en phase G0/G1 entraînant l'apoptose de ces cellules [28,29].

2.3. Déficit en protéines régulatrices du complément

Le système du complément est un mécanisme inné de défense anti-infectieux rapide et puissant, mais son activation trop intense ou prolongée peut entraîner des lésions tissulaires ou cellulaires dont des cytopénies (Fig. 2). Comparativement aux contrôles sains, il existe, à la surface des LyT dans le LES, une diminution de l'expression de CD55, CD59 [30–32], et CD46 [30], qui sont les principales protéines de régulation du complément [33], avec une diminution significative plus importante dans le sous-groupe lym-phopénique pour les protéines CD55 et CD59 [31]. De plus, il existe une diminution significative de l'expression de CD55 et CD59 aussi à la surface des LyB, sans présence d'anticorps anti-lymphocytes détectables [32]. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas défi-nis à ce jour. Toutefois, l'association de cette sensibilité accrue des LyT et des LyB à la lyse par le complément à l'activité du LES et à des taux bas de C3 peut laisser suggérer un phénomène acquis par consommation liée à l'hyper-activation du complément, et non un phénomène intrinsèque cellulaire [30].

M. Martin et al. / La Revue de médecine interne 38 (2017) 603–613

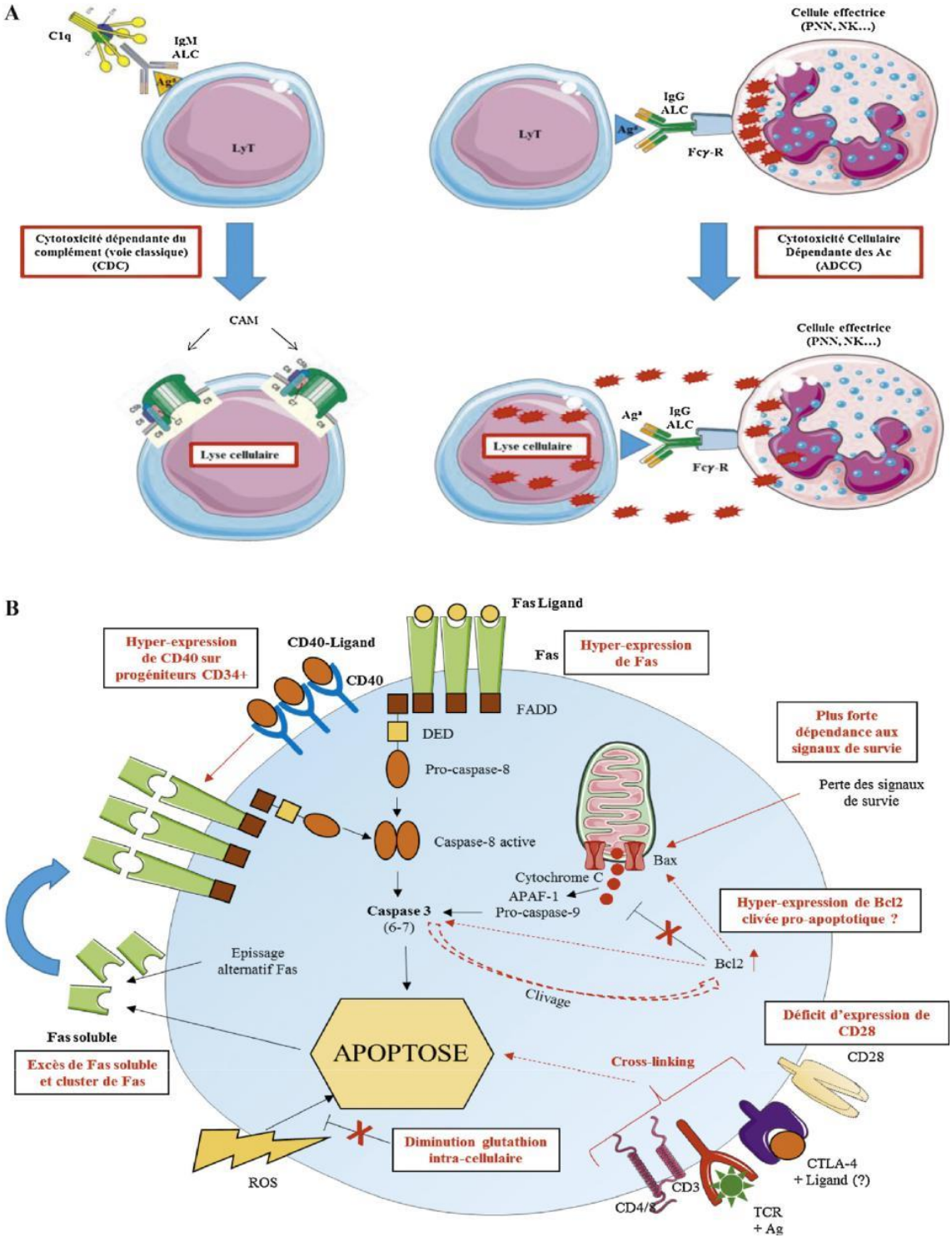


Fig. 1. Lymphocytotoxicité et excès d'apoptose participent à la lymphopénie dans le lupus érythémateux systémique. A. Anticorps anti-lymphocytotoxiques, abou-tissant à la lyse cellulaire médiée par le complément ou par cytotoxicité cellulaire dépendante. B. Mécanismes impliqués dans l'excès d'apoptose. ACL : anticorps anti-lymphocytotoxiques ; Ag : antigène ; CAM : complexe d'attaque membranaire ; LyT : lymphocytes T ; Fc-R : récepteur du fragment Fc des IgG ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; NK : lymphocytes T natural killers ; FADD : Fas-Associated protein with Death Domain ; DED : Death-Effector Domain ; APAF-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1 ; ROS : Reactive Oxygen Species ; TCR : T Cell Receptor.

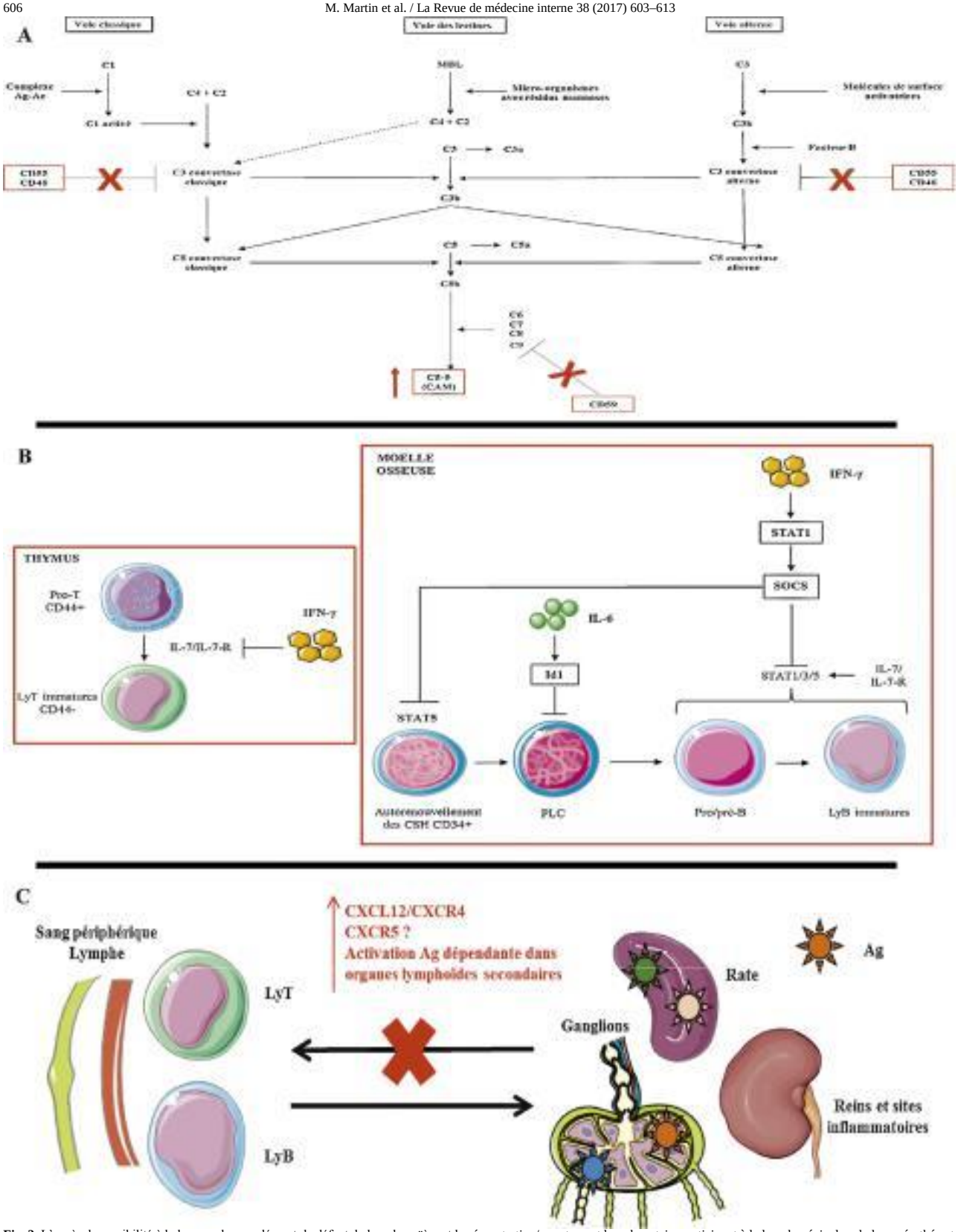


Fig. 2. L'excès de sensibilité à la lyse par le complément, le défaut de lymphopoïèse et la séquestration/recrutement lymphocytaire participent à la lymphopénie dans le lupus érythémateux systémique. A. Défauts d'expression des protéines régulatrices du complément (CD55, CD46 et CD59] à la surface des LyT aboutissant à un excès de sensibilité
• la lyse par les voies du complément. B. Représentation simplifiée de l'inhibition de la lymphopoïèse médullaire et thymique. C. Principaux mécanismes simplifiés de la séquestration/recrutement lymphocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires et les sites inflammatoires. Ag : antigène ; Ac : anticorps ; MBL : mannose-binding lectin ; CAM : complexe d'attaque membranaire ; LyT : lymphocyte T ; LyB : lymphocyte B ; Id1 : inhibitor of differentiation 1 ; IL : interleukine ; IFN- : interféron-gamma ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; SOCS : suppressor of cytokine signaling ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; PLC : progéniteur lymphoïde commun ; CXCL : C-X-C motif ligand ; CXCR : C-X-C-motif receptor.

2.4. Défaut de lymphopoïèse

Il a été observé dans le LES une diminution de la réserve médullaire en cellules progénitrices CD34^{+} [34,35], en lien avec l'hyper-expression constitutive de CD40 à la surface de ces cellules ce qui favoriserait leur apoptose médiée par Fas en présence de CD40-ligand [35] (Fig. 2B).

De plus, diverses cytokines, impliquées dans la physiopa-thologie du LES, surtout l'interféron Gamma (IFN-), semblent jouer un rôle dans la lymphopoïèse. Cette cytokine limite l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques [36], ce qui peut aggraver le déficit en cellules progénitrices CD34^{+} observé dans le LES [34,35]. Ce rôle inhibiteur passe par l'hyper-expression de protéines SOCS qui bloquent les signaux de prolifération et de survie du facteur de transcription STAT5. De plus, en inhibant de la même manière STAT1/3/5, l'IFN- bloque aussi le signal de l'interleukine (IL)-7 qui est nécessaire à l'ontogénèse B, inhibant ainsi la différenciation des LyB dès le stade pro/pré-B, mais égale-ment au stade immature [36].
Enfin, l'IFN- induit l'hyper-expression du facteur de trans-cription PU.1 qui bloque la lymphopoïèse B au profit de la différentiation myéloïde [36]. L'IFN- touche aussi la lignée LyT avec un blocage dès le stade pro-T dans le thymus [37]. Dans le LES, il a récemment été observé une réduction significative des pro/pré-B, en lien avec la production in situ d'IFN- par les cel-lules dendritiques plasmacytoïdes mais aussi par les polynucléaires neutrophiles [38].
D'autre part, des taux élevés d'IL-6 circulant sont associés à une réduction des fractions CD19^{+} médullaires et des progéniteurs lymphoïdes communs, potentiellement par l'activation préféren-tielle du facteur de transcription Id1 dans les progéniteurs très précoces, entraînant une répression de la lymphopoïèse au profit de la différentiation myéloïde [39]. Ces mécanismes illustrent l'implication probable et la complexité des mécanismes inflamma-toires dans le LES pouvant entraîner un défaut de lymphopoïèse B et T et ainsi contribuer à la lymphopénie périphérique.

2.5. Séquestration lymphocytaire

La séquestration lymphocytaire sélective est un phénomène ubiquitaire, décrit il y a plus de 30 ans, de disparition transitoire de LyT spécifiques d'antigènes de la circulation périphérique, résul-tant de leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires (Fig. 2C). À cela s'ajoute le recrutement des lymphocytes dans ces organes ainsi que dans les sites inflammatoires. L'ensemble participe ainsi à une lymphopénie périphérique relative, par séquestration et/ou recrutement lymphocytaire tissulaire, médiée par les interactions entre diverses cytokines et leurs récepteurs tels que CCL19-CCL21/CCR7, CXCL12/CXCR4, et CXCL13/CXCR5 [40]. Ainsi, dans le LES, CXCR4 est hyper exprimé à la surface des LyB et des LyT CD4^{+}, et ceci est associé à l'activité du LES et à l'atteinte rénale. De plus, une hyper expression de CXCL12 est observée dans les tubules rénaux et est corrélée à l'activité de la néphrite [41]. CXCR5 est aussi nécessaire au recrutement des LyB et des LyT pour la formation des centres germinatifs et potentiellement impliqué dans la néphrite lupique [42]. Enfin, la moelle osseuse semble aussi un site de séquestration des LyB activés dans le LES [43], potentiel-lement par l'effet de CXCL12 [44].

2.6. Lymphopénie et auto-immunité

De manière générale, une lymphopénie chronique peut favo-riser l'émergence d'auto-immunité, au travers d'un processus multi-étapes (Fig. 3). Le phénomène physiologique de prolifération

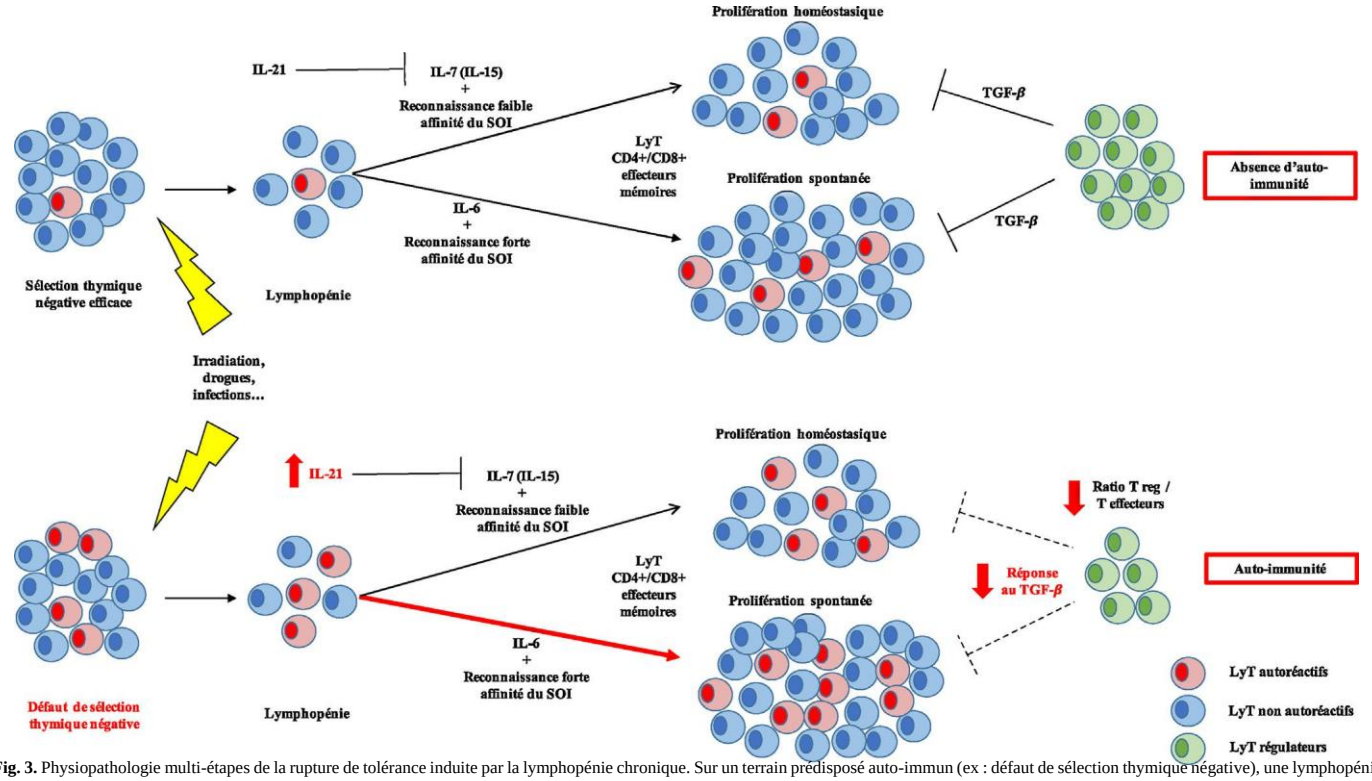


Fig. 3. Physiopathologie multi-étapes de la rupture de tolérance induite par la lymphopénie chronique. Sur un terrain prédisposé auto-immun (ex : défaut de sélection thymique négative), une lymphopénie chronique peut mener à l'émergence de manifestations auto-immunes, en association à d'autres facteurs : hyper-expression d'IL-21. D'une part elle pérennise la lymphopénie en inhibant l'IL-7, ce qui empêche la prolifération homéostatique physiologique, et d'autre part ceci facilite la voie de prolifération spontanée médiée par l'IL-6 avec comme conséquence un risque accru d'expansion des lymphocytes T (LyT] auto-réactifs ; défaut de l'activité suppressive des LyT régulateurs, par diminution de la sensibilité des LyT (notamment auto-réactifs) au TGF- et/ou par diminution de la proportion de LyT régulateurs par rapport à celle des LyT effecteurs

induite par lymphopénie (lymphopenia-induced proliferation [LIP]), vise à restaurer l'homéostasie lymphocytaire par une expansion modérée des LyT naïfs et leur différentiation en LyT mémoires. La LIP est médiée par des taux élevés d'IL-7/15 ou d'IL-6, et la reconnaissance par le TCR des complexes peptides du soi/complexe majeur d'histocompatibilité lors de la sélection positive thymique [45–47]. Ceci entraîne une réduction de la diversité du répertoire du TCR et tend à favoriser l'expansion et l'activation de LyT autoréac-tifs. Ainsi, un défaut initial de sélection négative thymique, associé à la sélection et l'expansion de LyT autoréactifs en périphérie par phé-nomène de LIP pourrait être la première étape menant à la rupture de tolérance, favorisée par une dysrégulation de la voie de l'IL-7. De plus, un excès d'IL-21 pourrait avoir un rôle additif, en inhibant la survie des LyT médiée par l'IL-7 [48,49], entretenant de fait la lym-phopénie et pérennisant la sélection de LyT autoréactifs. Enfin, un défaut de répression de ces derniers en lien avec un déficit quantita-tif [50–53] et/ou qualitatif des LyT régulateurs [53,54], notamment via une perte de sensibilité au transforming growth factor-˘ [54], constituerait une étape supplémentaire et nécessaire dans la surve-nue de manifestations auto-immunes en contexte de lymphopénie chronique.

De plus, le déficit de lymphopoïèse médié par la production médullaire d'IFN-, favoriserait la différentiation en LyB transi-tionnels [38], stade clé de la sélection négative centrale [55,56]. Ainsi, ce mécanisme additionnel pourrait favoriser le recrutement en périphérie de clones auto-réactifs transitionnels.

3. Présentations cliniques

Les données concernant les manifestations cliniques associées à une lymphopénie au cours du LES sont nombreuses, mais aussi très hétérogènes du fait des disparités entre les ethnies étudiées et l'utilisation parfois confondante des immunosuppresseurs.

3.1. Atteintes viscérales et activité du LES

Les principales données épidémiologiques sont issues du suivi des cohortes multi-ethniques Lumina et Gladel, portant res-pectivement sur 591 et 1437 patients [57,58]. Les principales caractéristiques associées à une lymphopénie étaient une atteinte rénale, la survenue de sérites, la présence d'une leucopénie, d'une thrombopénie, d'anticorps anti-ADN double brin, d'anti-SSA, de même qu'une lymphopénie au diagnostic de LES ou précédant celui-ci. L'association lymphopénie/immunosuppresseurs (gluco-corticoïdes, azathioprine, méthotrexate et mycophénolate mofétil) semble plus le reflet d'un LES sévère (atteinte rénale notamment) qu'un lien de causalité, d'autant plus qu'en analyse multiva-riée les immunosuppresseurs n'étaient pas associés aux scores d'activité de séquelles [57]. De manière intéressante, la prise d'hydroxychloroquine semble un facteur protecteur de survenue d'une lymphopénie [58].

D'autre part, la lymphopénie est associée à l'activité du LES. Une étude prospective a montré qu'un taux < 1,5 G/L était prédictif d'une poussée lupique (augmentation du systemic lupus erythematosus disease activity index [SLEDAI] ≥ 3 points), et d'une activité lupique plus intense (SLEDAI) dans les 12 mois [59]. La profondeur de la lymphopénie est de plus un facteur déterminant de l'activité de la maladie. En effet, une lymphopénie modérée (500–999/mm^3) et surtout profonde (< 500/mm^3) est corrélée aux plus hauts scores d'activité de la maladie et de séquelles induites (damage score) [57]. Ceci est corroboré par des données expérimentales, montrant que l'apoptose des LyT est significativement plus importante chez les patients avec un LES actif (SLEDAI > 4) comparativement aux LES inactifs, avec une corrélation positive entre la proportion de LyT apoptotiques et le SLEDAI [5]. La présence d'IgG ALC est aussi corrélée au SLEDAI [15]. Ainsi, ces résultats suggèrent que la lym-phopénie, et notamment sa profondeur, pourrait être considérée comme un biomarqueur indépendant d'activité du LES, et poten-tiellement prédictif de poussée lupique. De fac¸ on plus anecdotique, la lymphopénie dans le LES pour-rait aussi être associée à une athéromatose précoce. En effet, dans une étude prospective portant sur 76 LES de début juvénile, il a été observé une augmentation significative de l'épaisseur média-intima carotidienne comparativement aux sujets sains appariés par âge, la lymphopénie < 1,5 G/L étant le seul facteur de risque indépendant de progression de cet épaississement [60]. D'autre part, une lymphopénie < 1 G/L et un SLEDAI élevé dans les mois précédents semblent être des facteurs de risque indépendants de survenue d'un purpura thrombotique thrombocytopénique au cours du LES [61]. Les mécanismes physiopathologiques sous ten-dant de telles associations sont pour le moment inconnus.

3.2. Complications infectieuses

3.2.1. Généralités

Une récente méta-analyse a montré une mortalité dans le LES 3 fois supérieure à celle de la population générale [62]. Les princi-pales causes étaient l'atteinte rénale (reflétant une activité sévère de la maladie), suivie par les infections et les maladies cardiovas-culaires.

L'incidence des infections dans le LES est de 10,8/100 personne-années [63]. Elle sont nettement dominées par les infections bactériennes, représentant 85 à 96 % des cas [63,64], suivies par les infections virales (2,7 à 7,6 %) [63,64], fongiques (0,7 à 7,6 %) [63,64] et mycobactériennes (0,6 %) [63]. Les facteurs de risque rap-portés sont une atteinte rénale du LES, le sexe masculin, l'ethnie noire, la prise de glucocorticoïdes et d'immunosuppresseurs [63]. Dans la plupart des cas, seule la leucopénie a été étudiée. Il existe donc au final peu d'études évaluant spécifiquement le rôle de la lymphopénie dans les complications infectieuses au cours du LES.

3.2.2. Bactériennes

Une lymphopénie < 1 G/L est un facteur de risque de surve-nue d'infections bactériennes sévères, indépendamment de la prise d'immunosuppresseurs. Sur 82 patients avec un LES nouvellement diagnostiqué (≤ 12 mois), et suivis pendant 6 ans, 33 % ont présenté une infection majeure (mycobactérienne et/ou requérant une anti-biothérapie intraveineuse) [65]. Le seul facteur de risque observé était une lymphopénie <1 G/L au diagnostic (Hazard ratio [HR] : 4,7 ; IC95 % : 1,6–13,7). En incluant que les infections microbio-logiquement documentées, cette association restait significative. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude incluant 167 LES (Odds ratio [OR] : 5,14 ; IC95 % : 2,61–10,1), et qui objec-tivait d'autres facteurs de risque, tels qu'un taux de C3 bas et la prise de glucocorticoïdes et ce, même pour des doses < 7,5 mg/jour [66]. Les immunosuppresseurs (azathioprine, méthotrexate, myco-phénolate mofétyl et cyclophosphamide) n'étaient pas associés au risque de survenue d'infection sévère dans ces études [65,66]. Ceci renforce le fait que les glucocorticoïdes au long cours, même à faibles doses, représentent le traitement le plus délétère en risque d'infections sévères au cours du LES. L'hydroxychloroquine pourrait au contraire conférer une protection vis-à-vis du risque infec-tieux [63,66]. Ces résultats intéressants sont toutefois limités par le caractère rétrospectif des études, leurs faibles effectifs, et l'absence de détail sur les posologies et durées des traitements rec¸ us, ce qui peut expliquer en partie l'absence étonnante d'association entre immunosuppresseurs et risque infectieux sévère.

De même que dans le LES en général [63], la très grande majo-rité des infections en contexte de lymphopénie < 1 G/L au cours du LES sont de type bactériennes [63,65,66]. Les sepsis uro-génitaux semblent être les complications les plus fréquentes (25,8 %), suivies

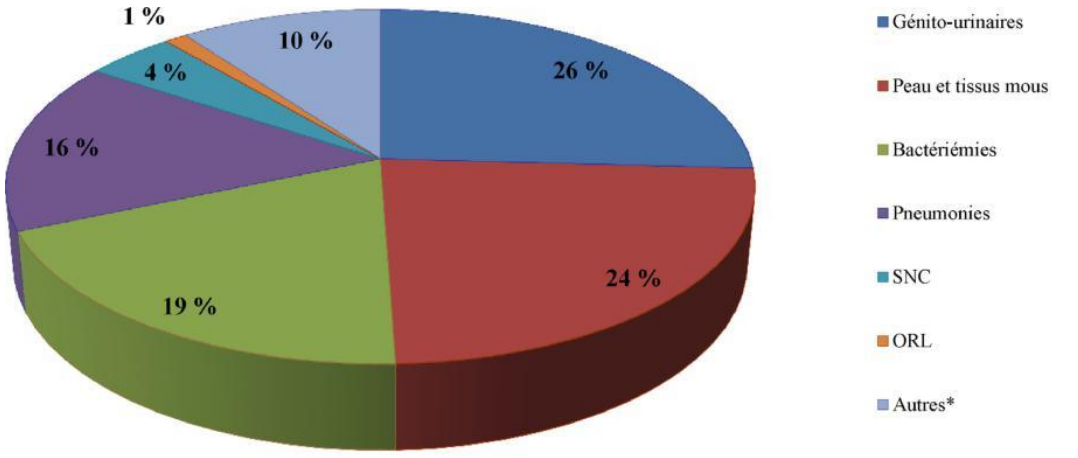
M. Martin et al. / La Revue de médecine interne 38 (2017) 603–613

par les infections de la peau et des tissus mous (23,6 %), les bacté-riémies (19,1 %) et les pneumonies (15,7 %) [66]. Une autre étude a toutefois rapporté les pneumonies comme principale complica-tion infectieuse [65]. Les sites d'infections ainsi que des principaux microorganismes impliqués sont détaillés sur la Fig. 4. Ces patients semblent prése nter des infections plus sévères, près d'un quart développant des bactériémies, des infections disséminées et/ou du système nerveux central, associées à une mortalité voisine de 20 % [6]. Il existe un pléomorphisme bactérien, mais plus de 5 % sont à haut pouvoir pathogène (notamment P. aeruginosa, S. aureus ou encore A. baumanni), pouvant expliquer la sévérité [66].

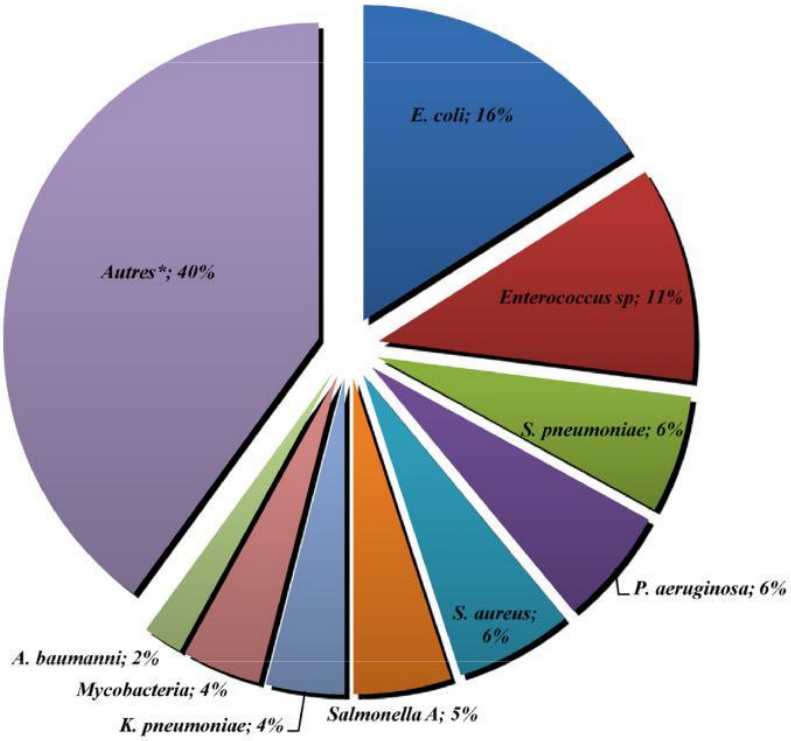
Les infections à Mycobacterium tuberculosis semblent aussi particuliè-rement fréquentes [65] à l'instar des descriptions dans le LES en général [63].

3.2.3. Virales

Les infections virales dans le LES sont bien plus rares que les infections bactériennes [63,64]. Très peu d'études ont évalué spéci-fiquement la prévalence ou l'incidence des infections virales aiguës au cours du LES ainsi que les pathogènes impliqués, et encore moins le rôle éventuel de la lymphopénie. Ramos-Casals et al., en se basant sur des données sérologiques (IgM positifs puis séroconversion),



*Arthrites septiques, ostéomyélites, miliaire tuberculeuse, infections disséminées (incluant les infections invasives à pneumocoque)



*Actnomices sp, Bacteroides fragilis, Citrobacter koseri, Enterobacter cloacae, Listeria monocytogenes, Morganella morganii, Pantoea agglomerans, Staphylococcus lugdensi, Streptococcus pyogenes, Stahylococcus hominis, Streptococus bovis

Fig. 4. Principaux sites infectieux et germes bactériens identifiés aux cours des infections sévères dans le LES avec lymphopénie < 1 G/L [66].

ont observé que le cytomégalovirus (CMV) était le principal patho-gène viral observé au cours de l'évolution du LES (près de la moitié des cas d'infections virales aiguës), suivi par l'herpes simplex virus (HSV), l'Epstein-Barr virus (EBV) et le virus zona-varicelle (VZV) [67]. Une leucopénie était observée chez 69 % de ces patients, mais sans précisions sur une éventuelle lymphopénie. Il est ainsi diffi-cile d'estimer le sur-risque infectieux viral potentiel que confère une lymphopénie dans le LES.

Bien que l'incidence des infections aiguës symptomatiques CMV au cours du LES soit inconnue, elles restent rares, et surviennent exclusivement chez des patients sous immunosup-presseurs. Les manifestations sont souvent sévères et atypiques, touchant le tractus digestif, respiratoire, le système nerveux central et la rétine, mais peuvent aussi parfois mimer une poussée lupique [67,68]. Les taux rapportés de LyT $CD4^+$ au diagnostic de ces infec-tions dans le LES varient de 119-350/mm^3 [69], et une lymphopénie < 700/mm^3 est un facteur de risque indépendant de charge virale CMV élevée, elle-même associée à une infection symptomatique à CMV, mais toutefois sans lien direct entre lymphopénie et infection symptomatique à CMV [70].

L'infection symptomatique par EBV est également rare dans le LES, mais ces patients présentent plus fréquemment une réac-tivation EBV biologique, plaidant pour un défaut de régulation de l'infection à EBV [71]. Ceci semble lié à une altération de la capacité des $CD8^+$ spécifiques d'EBV à secréter de l'IFN- , et à un défaut de cytotoxicité [72,73], potentiellement en rapport avec l'hyper-expression du récepteur inhibiteur de la co-stimulation PD-1 (programmed death-1) uniquement à la surface des LyT $CD8^+$ spécifiques d'EBV [73]. En effet, ces anomalies ne sont pas obser-vées pour les LyT $CD8^+$ spécifiques du CMV [73]. Parallèlement, il existe une augmentation des LyT $CD4^+$ spécifiques d'EBV pro-ducteurs d' IFN- , supposée compenser le défaut en LyT $CD8^+$ et contrôler la réplication EBV [72]. Ainsi, il est probable qu'une lymphopénie ne permette plus cette expansion compensatrice et contribue à la réactivation EBV, voire à des lymphoprolifé rations EBV-induites. Toutefois, cette réactivation biologique est princi-palement sans conséquences cliniques. De plus, bien qu'il existe un sur-risque de lymphomes malins dans le LES [74], les lympho-prolifé rations malignes EBV-induites restent exceptionnelles dans cette population [75]. Ceci suggère des mécanismes adaptatifs de contrôle supplémentaires peu connus à ce jour.

L'incidence du zona dans le LES est estimée à 12/1000 personne-années, soit 4 fois supérieure à la population générale [76]. Une étude rétrospective, comparant 65 cas de LES avec zona à 105 LES contrôles, a montré qu'une lymphopénie < 1,5 G/L dans les 2 ans était un facteur de risque indépendant de survenue de zona (OR : 2,9 ; IC95 % : 1,1–7,7) [77]. La prise de corticoïdes dans les 6 mois précédents le zona, le mycophénolate mofétyl et le cyclo-phosphamide ont aussi été rapportés comme facteurs de risque indépendants de zona [76,77]. Des études in vitro ont montré qu'il existait dans le LES un défaut de réponse IFN- ainsi qu'une diminu-tion de prolifé ration préférentielle des LyT $CD4^+$ après stimulation par le VZV, indépendamment des immunosuppresseurs rec¸ us ou de l'activité lupique. L'immunité humorale anti-VZV était par contre conservée [78]. Ainsi, la susceptibilité virale dans le LES, et notam-ment à la réactivation du VZV, serait liée au déficit de l'immunité cellulaire, probablement par une altération des LyT mémoires.

3.2.4. Opportunistes

La lymphopénie T $CD4^+$ dans le LES, à l'instar de celle dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine acquise (VIH), peut conférer à ces patients un sur-risque d'infections oppor-tunistes. Une large étude rétrospective de registres américaine a récemment montré que les infections fongiques opportunistes et les pneumocystoses étaient significativement surreprésentées chez les patients lupiques comparativement aux patients non lupiques [79].

La pneumocystose est la moins fréquente des causes infec-tieuses d'hospitalisation des patients lupiques (0,04 %) et son incidence semble en diminution. Toutefois, elle est plus sévère que chez les patients infectés par le VIH, avec une mortalité variant de 20 à 45 % [80,81]. Les taux de LyT $CD4^+$ observés étaient constamment < 200/mm^3. L'impact des immunosuppresseurs est contradictoire selon les études, très probablement en lien avec leurs faibles effectifs et leur caractère rétrospectif [80,82,83]. Des gluco-corticoïdes > 20 mg/jour semble toutefois représenter un facteur de risque surajouté de pneumocystose [80,83,84].

Une revue de la littérature a montré que les infections fon-giques invasives représentaient 0,6 à 3,2 % des hospitalisations toutes causes confondues des patients lupiques, avec une morta-lité de 53 %, Cryptococcus spp., Aspergillus spp. et Candida spp. étant les pathogènes les plus fréquemment mis en en évidence [85]. Une leucopénie était observée dans 40 % des cas, mais le détail des popu-lations leucocytaires n'est pas précisé. Une lymphopénie ne semble pas être un facteur de risque significatif, contrairement à la prise d'azathioprine [86], mais les effectifs de cette étude sont faibles.

Bien que très rare, la leuco-encéphalopathie multifocale pro-gressive (LEMP) est plus fréquente dans le LES comparativement aux autres connectivites et rhumatismes inflammatoires (50 cas au total dont 32 LES [64 %]) [87,88]. De plus, parmi ces patients, 33 % n'avaient jamais rec¸ u de cyclophosphamide, 33 % n'étaient que sous prednisone ≤ 15 mg/jour et hydroxychloroquine ou sans traitement de fond, et seuls 7 % avaient été traités par rituximab, suggérant que le LES conférerait un sur-risque intrinsèque de déve-lopper une LEMP. Des taux persistants de LyT CD4+ < 200/mm^3 ont été rapportés chez des patients lupiques présentant une LEMP [89]. Le contrôle de l'infection à JC virus est effectué par les LyT $CD8^+$, dont la génération dépend en partie de l'interaction avec les LyT $CD4^+$, expliquant la susceptibilité des patients VIH+ à ce virus. Ainsi, il est possible que la lymphopénie $CD4^+$ prédominante dans le LES puisse participer à l'absence de contrôle du JC virus et le dévelop-pement d'une LEMP, en conjonction à d'autres facteurs inconnus à ce jour.

4. Prise en charge

Il n'existe pas à ce jour de recommandations spécifiques concernant la prise en charge de la lymphopénie au cours du LES, contrairement aux autres cytopénies, telles que les anémies hémolytiques auto-immunes, le purpura thrombopénique immu-nologique ou encore les neutropénies.

Son association à l'activité de la maladie, au risque de poussée, et à certaines manifestations notamment neuropsychiatriques, en fait un biomarqueur simple de suivi et incite à une surveillance renforcée de ces patients, surtout en cas de taux < 0,5 G/L et d'anti-Ro/SSA [25–27,57,59]. Les IgG ALC sont spécifiques mais manquent de sensibilité [15], ce qui limite l'intérêt de leur détection en pra-tique clinique. De plus, divers mécanismes non auto-immuns sont impliqués dans la genèse d'une lymphopénie dans le LES. Ainsi, la présence d'une lymphopénie, même sévère, ne légitime pas à elle seule l'introduction d'immunosuppresseurs avec le risque d'une inefficacité et/ou la majoration du risque infectieux.

Du point de vue infectieux, indépendamment de l'activité lupique, l'hydroxychloroquine semble avoir un réel effet protecteur sur le risque infectieux global [63,66]. Par ailleurs, compte tenu de l'importante morbi-mortalité en lien avec les pneumonies et Strep-tococcus pneumonia dans le LES, notamment en cas de lymphopénie [62,65,66], il est légitime, surtout en cas d'immunosuppresseurs associés, de proposer une vaccination anti-pneumococcique chez ces patients, en utilisant un schéma vaccin conjugué puis vac-cin polysaccharidique (prime-boost), celui-ci ayant démontré une

meilleure réponse humorale anti-pneumococcique en cas de lymphopénie $CD4^+$ [90]. De même, une vaccination antigrippale annuelle devrait être proposée chez tous les patients lupiques avec lymphopénie, indépendamment de l'âge et des immunosuppres-seurs recus.

Une diminution rapide et sévère des chiffres de lympho-cytes étant observée préalablement au déclenchement des cas de pneumocystoses, certains auteurs préconisent de débuter une prophylaxie dès le seuil des 750 lymphocytes totaux/mm^3 [80]. Cette proposition est critiquable. En effet, ces prophylaxies ne sont pas dénuées de risques, notamment pour le sulfaméthoxazole-triméthoprime, qui reste le traitement de référence. Ce dernier est allergisant et peu employé dans le LES notamment en raison des nombreux effets secondaires dans cette population et du risque d'aggravation du LES [91,92]. Il existe aussi de manière générale un risque non négligeable de toxicité médullaire, pouvant participant la leucopénie chez ces patients. Bien qu'il n'existe pas de recom-mandations à ce jour, à l'instar du VIH, une prophylaxie devrait par contre être classiquement proposée dès que les $CD4^+$ sont < 200/mm^3 . Toutefois, la détermination systématique des sous-populations lymphocytaires est rarement effectuée en routine chez les patients lupiques.

Concernant le VZV, le vaccin monovalent Zostavac® est actuel-lement recommandé par la Haute Autorité de santé dans la population générale de 50 ans et plus, et étendu aux adultes de 65 ans à 79 ans avec un schéma à une dose [93]. Compte-tenu du sur-risque de zona dans le LES avec lymphopénie [77,78] et la bonne réponse humorale anti-VZV [78], ce vaccin pourrait être intéressant chez ces patients. Toutefois, étant donné le caractère vivant atté-nué du vaccin et le déficit de l'immunité cellulaire dans le LES, son administration n'est actuellement pas recommandée, et à discu-ter au cas, par cas du fait des risques de réactivation et d'infection sévère postvaccinales.

5. Conclusion

Une lymphopénie chronique peut être le point de départ d'une rupture de tolérance et le développement de manifestations auto-immunes. La lymphopénie dans le LES concerne principalement les $CD4^+$ avec une physiopathologie complexe associant lympho-cytotoxicité, excès d'apoptose, sensibilité accrue à la lyse par le complément, de même qu'une baisse de la lymphopoïèse et des phénomènes de séquestration lymphocytaire. La lymphopénie, et surtout sa profondeur, est corrélée à l'activité du LES, aux nombres de complications viscérales. Elle constitue par ailleurs un facteur de risque prédictif d'infections bactériennes sévères, indépendam-ment des immunosuppresseurs rec¸us. Les réplications virales sont plus fréquentes mais le plus souvent sans conséquence clinique. Il est observé par ailleurs une fréquence non négligeable de germes haut pouvoir pathogène et/ou opportunistes. À ce jour, il n'existe pas de recommandations spécifiques de prise en charge de la lym-phopénie dans le LES. La prophylaxie anti-infectieuse doit rester exceptionnelle et à discuter au cas par cas, surtout en l'absence d'immunosuppresseurs associés.

Il est possible que les patients avec LES et lymphopénie, notamment profonde (< 500/mm^3), constituent un sous-groupe de LES avec déficit immunitaire primitif associé. À ce jour, très peu d'études ont spécifiquement évalué l'impact d'une telle lym-phopénie au cours du LES. Une étude de cohorte nationale va ainsi prochainement débuter, évaluant les potentielles associations clinico-biologiques et les complications infectieuses.

Déclaration de liens d'intérêts

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

Références

[1] Carli L, Tani C, Vagnani S, Signorini V, Mosca M. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical impact–a systematic literature review. Semin Arthritis Rheum 2015;45:190–4.
[2] Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997;40:1725.
[3] Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012;64:2677–86.
[4] Fayyaz A, Igoe A, Kurien BT, Danda D, James JA, Stafford HA, et al. Haematological manifestations of lupus. Lupus Sci Med 2015;2:e000078.
[5] Dhir V, Singh A, Aggarwal A, Naik S, Misra R. Increased T-lymphocyte apoptosis in lupus correlates with disease activity and may be responsible for reduced T-cell frequency: a cross-sectional and longitudinal study. Lupus 2009;18:785–91.
[6] Wouters CHP, Diegenant C, Ceuppens JL, Degreef H, Stevens EAM. The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenetic relationship. Br J Dermatol 2004;150:693–700.
[7] Messner RP, Kennedy MS, Jelinek JG. Antilymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1975;18:201–6.
[8] Lies RB, Messner RP, Williams RC. Relative T-Cell Specificity of lymphocytotoxins from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1973;16:369–75.
[9] Winfield JB, Winchester RJ, Kunkel HG. Association of cold-reactive antilymphocyte antibodies with lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1975;18:587–94.
[10] Lenert G, Lenert P. Human CD4-reactive antibodies from SLE patients induce reversible inhibition of polyclonal T lymphocyte proliferation. Hum Immunol 1996;49:113–21.
[11] Cappione AJ, Pugh-Bernard AE, Anolik JH, Sanz I. Lupus IgG VH4,34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. J Immunol 2004;172:4298–307.
[12] Shoenfeld Y, Zamir R, Joshua H, Lavie G, Pinkhas J. Human monoclonal anti-DNA antibodies react as lymphocytotoxic antibodies. Eur J Immunol 1985;15:1024–8.
[13] Noguchi M, Iwamori M, Hirano T, Kobayashi S, Hashimoto H, Hirose S, et al. Autoantibodies to T and B cell lines detected in serum samples from patients with systemic lupus erythematosus with lymphopenia and hypocomplementaemia. Ann Rheum Dis 1992;51:713–6.
[14] Stafford HA, Chen AE, Anderson CJ, Paul AGA, Wyatt EL, Lee LA, et al. Anti-ribosomal and "P-peptide"-specific autoantibodies bind to T lymphocytes. Clin Exp Immunol 1997;109:12–9.
[15] Li C, Mu R, Lu X, He J, Jia R, Li Z. Antilymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus: association with disease activity and lymphopenia. J Immunol Res 2014;2014:672126.
[16] Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated *in vitro* apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol 1994;152:3685–92.
[17] Lorenz H-M, Grünke M, Hieronymus T, Herrmann M, Kühnel A, Manger B, et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Arthritis Rheum 1997;40:306–17.
[18] Shah D, Aggarwal A, Bhatnagar A, Kiran R, Wanchu A. Association between T lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus. Free Radic Res 2011;45:559–67.
[19] Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, Ogura N, Jodo S, Nakabayashi T, et al. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. Clin Exp Immunol 1995;99:245–50.
[20] Silvestris F, Williams RC, Calvani N, Grinello D, Tucci M, Cafforio P, et al. Serum elevations of soluble Fas (CD95/apo-I) concur in deregulating T cell apoptosis during active lupus disease. Clin Exp Med 2002;2:13–27.
[21] Silvestris F, Grinello D, Tucci M, Cafforio P, Dammacco F. Enhancement of T cell apoptosis correlates with increased serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) in active lupus. Lupus 2003;12:8–14.
[22] Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, et al. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. J Biol Chem 1999;274:38241–50.
[23] Kaneko H, Saito K, Hashimoto H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Preferential elimination of CD28+ T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis. Clin Exp Immunol 1996;106:218–29.
[24] Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, et al. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. Proc Natl Acad Sci 1995;92:811–5.
[25] Silva LM, Garcia AB, Donadi EA. Increased lymphocyte death by neglect-apoptosis is associated with lymphopenia and autoantibodies in lupus patients presenting with neuropsychiatric manifestations. J Neurol 2002;249:1048–54.
[26] Wenzel J, Gerdsen R, Uerlich M, Bauer R, Tueting T, Bieber T. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: close in vivo association to autoantibodies targeting nuclear antigens. Br J Dermatol 2004;150:994–8.

[27] Lu R, Robertson JM, Bruner BF, Guthridge JM, Neas BR, Nath SK, et al. Multiple autoantibodies display association with lymphopenia proteinuria, and cellular casts in a large, ethnically diverse SLE patient cohort. Autoimmune Dis 2012:2012:819634.
[28] Williams RC, Peen E. Apoptosis and cell penetration by autoantibody may represent linked processes. Clin Exp Rheumatol 1999:17:643–7.
[29] Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruíz-Argüelles A. The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. J Autoimmun 1996:9:295–300.
[30] Alegretti AP, Schneider L, Piccoli AK, Monticielo OA, Lora PS, Brenol JCT, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients. Clin Dev Immunol 2012:2012:725684.
[31] Alegretti AP, Mucenic T, Merzoni J, Faulhaber GA, Silla LM, Xavier RM. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Cell Immunol 2010:265:127–32.
[32] Garcia-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jakez-Ocampo J, Soto-Vega E, Elias-Lopez D, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. Lupus 2006;15:600–5.
[33] Ruiz-Argüelles A, Lorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. Autoimmun Rev 2007:6:155–61.
[34] Papadaki HA, Boumpas DT, Gibson FM, Jayne DR, Axford JS, Gordon-Smith EC, et al. Increased apoptosis of bone marrow CD34(+) cells and impaired function of bone marrow stromal cells in patients with systemic lupus erythematosus. Br J Haematol 2001;115:167–74.
[35] Pyrovolaki K, Mavroudi I, Sidiropoulos P, Eliopoulos AG, Boumpas DT, Papadaki HA. Increased expression of CD40 on bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus: contribution to Fas-mediated apoptosis. Arthritis Rheum 2009:60:543–52.
[36] De Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon-γ on hematopoiesis. Blood 2014;124:2479–86.
[37] Lin Q, Dong C, Cooper MD. Impairment of T and B cell development by treatment with a type I interferon. J Exp Med 1998;187:79–87.
[38] Palanichamy A, Bauer JW, Yalavarthi S, Meednu N, Barnard J, Owen T, et al. Activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus. J Immunol 2014;192:906–18.
[39] Maeda K, Malykhin A, Teague-Weber BN, Sun X-H, Farris AD, Coggeshall KM. Interleukin-6 aborts lymphopoiesis and elevates production of myeloid cells in systemic lupus erythematosus-prone B6. Sle1. Yaa animals. Blood 2009;113:4534–40.
[40] Müller G, Reiterer P, Höpken UE, Golfier S, Lipp M. Role of homeostatic chemokine and sphingosine-1-phosphate receptors in the organization of lymphoid tissue. Ann N Y Acad Sci 2003:987:107–16.
[41] Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, et al. Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2010:62:3436–46.
[42] Wiener A, Schippers A, Wagner N, Tacke F, OstendorfT, Honke N, et al. CXCR5 is critically involved in progression of lupus through regulation of B cell and double-negative T cell trafficking. Clin Exp Immunol 2016:185:22–32.
[43] Fauci AS, Moutsopoulos HM. Polyclonally triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1981:24:577–83.
[44] Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. J Exp Med 2004:199:47–58.
[45] Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. Semin Immunol 2007;19:318–30.
[46] Tajima M, Wakita D, Noguchi D, Chamoto K, YueZ, Fugo K, et al. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. J Exp Med 2008:205:1019–27.
[47] Sawa S, Kamimura D, Jin G-H, Morikawa H, Kamon H, Nishihara M, et al. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. J Exp Med 2006;203:1459–70.
[48] Datta S, Sarvetnick NE. IL-21 limits peripheral lymphocyte numbers through T cell homeostatic mechanisms. PloS One 2008:3:e3118.
[49] Gensous N, Schmitt N, Richez C, Ueno H, Blanco P. T follicular helper cells, interleukin-21 and systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2016, http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kew297 [Epub ahead of print].
[50] Chang X, Zheng P, Liu Y. Homeostatic proliferation in the mice with germline FoxP3 mutation and its contribution to fatal autoimmunity. J Immunol 2008;181:2399–406.
[51] Le Campion A, Gagnerault M-C, Auffray C, Bécourt C, Poitrasson-Rivière M, Lallemand E, et al. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. Blood 2009:114:1784–93.
[52] McHugh RS, Shevach EM. Cutting edge: depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. J Immunol 2002:168:5979–83.
[53] Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Vanoye G, Crispín JC, Alcocer-Varela J. Quantitative and functional profiles of CD4+ lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. Clin Exp Immunol 2011:164:17–25.
[54] Zhang N, Bevan MJ. TGF-β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. Nat Immunol 2012:13:667–73.
[55] Carsetti R, Köhler G, Lamers MC, Transitional B. Cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J Exp Med 1995:181:2129–40.
[56] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science 2003:301:1374–7.
[57] Vilá LM, Alarcón GS, McGwin G, Bastian HM, Fessler BJ, Reveille JD, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort XXXVII: association of lymphopenia with clinical manifestations, serologic abnormalities, disease activity, and damage accrual. Arthritis Rheum 2006:55:799–806.
[58] González-Naranjo LA, Betancur OM, Alarcón GS, Ugarte-Gil MF, Jaramillo-Arroyave D, Wojdyla D, et al. Features associated with hematologic abnormalities and their impact in patients with systemic lupus erythematosus: data from a multiethnic Latin American cohort. Semin Arthritis Rheum 2016:45:675–83.
[59] Mirzayan MJ, Schmidt RE, Witte T. Prognostic parameters for flare in systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2000:39:1316–9.
[60] Huang Y-L, Chung H-T, Chang C-J, Yeh K-W, Chen L-C, Huang J-L. Lymphopenia is a risk factor in the progression of carotid intima-media thickness in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2009:60:3766–75.
[61] Merayo-Chalico J, Demichelis-Gómez R, Rajme-López S, Aparicio-Vera L, Barrera-Vargas A, Alcocer-Varela J, et al. Risk factors and clinical profile of thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus patients. Is this a distinctive clinical entity in the thrombotic microangiopathy spectrum ?: a case control study. Thromb Res 2014:134:1020–7.
[62] Yurkovich M, Vostretsova K, Chen W, Aviña-Zubieta JA. Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies. Arthritis Care Res 2014:66:608–16.
[63] Feldman CH, Hiraki LT, Winkelmayer WC, Marty FM, Franklin JM, Kim SC, et al. Serious infections among adult medicaid beneficiaries with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. Arthritis Rheumatol 2015:67:1577–85.
[64] Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1000 patients european working party on systemic lupus erythematosus. Medicine (Baltimore) 1999:78:167–75.
[65] Ng WL, Chu CM, Wu AKL, Cheng VCC, Yuen KY. Lymphopenia at presentation is associated with increased risk of infections in patients with systemic lupus erythematosus. QJM 2006:99:37–47.
[66] Merayo-Chalico J, Gómez-Martín D, Piñeirúa-Menéndez A, Santana-De Anda K, Alcocer-Varela J. Lymphopenia as risk factor for development of severe infections in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. QJM 2013:106:451–7.
[67] Ramos-Casals M, Cuadrado MJ, Alba P, Sanna G, Brito-Zerón P, Bertolaccini L, et al. Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2008:87:311–8.
[68] Pasoto SG, Ribeiro ACM, Bonfa E. Update on infections and vaccinations in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 2014:26:528–37.
[69] Declerck L, Queyrel V, Morell-Dubois S, Dewilde A, Charlanne H, Launay D, et al. [Cytomegalovirus and systemic lupus: severe infection and difficult diagnosis]. Rev Med Interne 2009:30:789–93.
[70] Fujimoto D, Matsushima A, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. Risk factors associated with elevated blood cytomegalovirus pp65 antigen levels in patients with autoimmune diseases. Mod Rheumatol 2013:23:345–50.
[71] Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol 2012:2012:370516.
[72] Kang I, Quan T, Nolasco H, Park S-H, Hong MS, Crouch J, et al. Defective control of latent epstein-barr virus infection in systemic lupus erythematosus. J Immunol 2004:172:1287–94.
[73] Larsen M, Sauce D, Deback C, Arnaud L, Mathian A, Miyara M, et al. Exhausted cytotoxic control of epstein-barr virus in human lupus. PLoS Pathog 2011:7:e1002328.
[74] Apor E, O'Brien J, Stephen M, Castillo JJ. Systemic lupus erythematosus is associated with increased incidence of hematologic malignancies: a meta-analysis of prospective cohort studies. Leuk Res 2014:38:1067–71.
[75] Knight JS, Blayney DW, Somers EC. Patients with systemic lupus erythematosus and haematological malignancy at a tertiary care centre: timing, histopathology and therapy. Lupus Sci Med 2014:1:e000051.
[76] Chakravarty EF, Michaud K, Katz R, Wolfe F. Increased incidence of herpes zoster among patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2013:22:238–44.
[77] Hu SC-S, Lin C-L, Lu Y-W, Chen G-S, Yu H-S, Wu C-S, et al. Lymphopaenia, anti-Ro/anti-RNP autoantibodies, renal involvement and cyclophosphamide use correlate with increased risk of herpes zoster in patients with systemic lupus erythematosus. Acta Derm Venereol 2013:93:314–8.
[78] Rondaan C, De Haan A, Horst G, Hempel JC, van Leer C, Bos NA, et al. Altered cellular and humoral immunity to varicella-zoster virus in patients with autoimmune diseases. Arthritis Rheumatol 2014:66:3122–8.
[79] Murray SG, Schmajuk G, Trupin L, Gensler L, Katz PP, Yelin EH, et al. National lupus hospitalization trends reveal rising rates of herpes zoster and declines in pneumocystis pneumonia. PloS One 2016:11:e0144918.
[80] Lertnawapan R, Totemchokchyakarn K, Nantiruj K, Janwityanujit S. Risk factors of *Pneumocystis jeroveci* pneumonia in patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int 2009:29:491–6.

[81] Ward MM, Donald F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue diseases: the role of hospital experience in diagnosis and mortality. Arthritis Rheum 1999:42:780–9.
[82] Kadoya A, Okada J, Iikuni Y, Kondo H. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis or systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1996;23:1186–8.
[83] Li J, Huang X-M, Fang W-G, Zeng X-J. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue disease. J Clin Rheumatol 2006;12:114–7.
[84] Porges AJ, Beattie SL, Ritchlin C, Kimberly RP, Christian CL. Patients with systemic lupus erythematosus at risk for *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Rheumatol 1992:19:1191–4.
[85] Wang LR, Barber CE, Johnson AS, Barnabe C. Invasive fungal disease in systemic lupus erythematosus: a systematic review of disease characteristics, risk factors, and prognosis. Semin Arthritis Rheum 2014:44:325–30.
[86] Vinicki JP, Catalan Pellet S, Pappalardo C, Cruzat VC, Spinetto MA, Dubinsky D, et al. Invasive fungal infections in Argentine patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2013:22:892–8.
[87] Molloy ES, Calabrese LH. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. Arthritis Rheum 2009:60:3761–5.
[88] Molloy ES, Calabrese LH. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with rheumatic diseases: are patients with systemic lupus erythematosus at particular risk? Autoimmun Rev 2008:8:144–6.
[89] Brandão M, Damásio J, Marinho A, Da Silva AM, Vasconcelos J, Neves E, et al. Systemic lupus erythematosus, progressive multifocal leukoencephalopathy, and T-CD4+ lymphopenia. Clin Rev Allergy Immunol 2012:43:302–7.
[90] Lesprit P, Pédrono G, Molina J-M, Goujard C, Girard P-M, Sarrazin N, et al. Immunological efficacy of a prime-boost pneumococcal vaccination in HIV-infected adults. AIDS 2007;21:2425–34.
[91] Suyama Y, Okada M, Rokutanda R, Min C, Sassé B, Kobayashi D, et al. Safety and efficacy of upfront graded administration of trimethoprim-sulfamethoxazole in systemic lupus erythematosus: a retrospective cohort study. Mod Rheumatol 2016:26:557–61.
[92] Pope J, Jerome D, Fenlon D, Krizova A, Ouimet J. Frequency of adverse drug reactions in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2003:30:480–4.
[93] Haute Autorité de santé. ZOSTAVAX, vaccin zona vivant atténué; 2017 [Accès au site le 02/01/2017] http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1774169/fr/zostavax-vaccin-zona-vivant-attenue.

II. Eléments physiopathologiques complémentaires concernant la rupture de tolérance au cours des DIPs et applications aux modèles complexes d'auto-immunité à travers l'exemple du lupus érythémateux dissémine (LES)

a) Perturbations de l'homéostasie lymphocytaire

- **Anomalies de l'apoptose** : l'exemple emblématique est celui des mutations de FAS dont certaines mutations AD sont responsables d'une maladie appelée ALPS (*Auto-immune Lymphoproliferative Syndrome*), au cours de laquelle, l'auto-immunité est particulièrement fréquente (72% à 30 ans) (Neven et al., 2011). Il s'agit en particulier de syndromes d'Evans (anémie hémolytique auto-immune et purpura thrombopénique auto-immun). Les patients ont fréquemment des auto-anticorps anti-nucléaires et une hypergammaglobulinémie. La présence de lymphocytes T CD3+ TCRαβ+ CD4- CD8- (DNT) est la signature de cette maladie.

  Il existe un modèle murin de souris déficiente pour FAS : la souris lpr/lpr (lymphoprolifération). Cette souris est atteinte d'une lymphoprolifération, d'une splénomégalie, d'une prolifération de cellules T doubles négatives (DN) $CD4^-/CD8^-$ et produit une quantité accrue d'IgM et d'IgG (Nagata and Suda, 1995). FAS est un récepteur de mort exprimé à la surface des cellules. Il possède un domaine de mort (*Death Domaine*, DD) qui va interagir avec FADD, Caspase-8 et Caspase-10 lors de l'activation du signal FAS pour induire l'apoptose de la cellule (Krammer et al., 2007; Schleich et al., 2013). Le défaut d'apoptose des lymphocytes mutés pour FAS est responsable de l'accumulation de lymphocytes auto-réactifs.

  De façon intéressante, des mutations somatiques (acquises) peuvent être retrouvées en plus des mutations germinales dans le syndrome ALPS. Ces mutations acquises surviennent dans les cellules souches hématopoïétiques et leur confèrent un avantage sélectif (survie) et d'échappement à la tolérance immunitaire (Janda et al., 2016; Magerus-Chatinet et al., 2011; Rieux-Laucat, 2017).

  De façon complémentaire, des polymorphismes de FAS et FASL ont été retrouvés au cours du LES (Xiang et al., 2013). Ainsi, l'implication des mutations somatiques dans les DIPs, pourrait éclairer certains mécanismes de pénétrance variable et pourrait permettre d'affiner encore la compréhension de mécanismes de rupture de tolérance tels qu'ils pourraient exister dans les maladies auto-immunes multigéniques (avec des mécanismes de rupture de tolérance en plusieurs étapes liés par exemple à une perte d'hétérozygotie ou à l'accumulation de plusieurs mutations somatiques comme on le voit en cancérologie).

- **La lymphopénie comme cause d'auto-immunité** :

L'implication de la lymphopénie dans la rupture de tolérance au cours des DIPs a été abordée plus haut (**papier 1** : (Guffroy et al., 2016)*)*. Elle est particulièrement illustrée dans l'exemple des mutations de RAG hypomorphe responsable d'auto-immunité et de granulomes (RAG-G/AI).

L'implication de la lymphopénie dans le lupus a été abordée plus haut (**papier 2** *:* (Martin et al., 2017)). Ces données montrent que des défauts d'homéostasie lymphocytaire peuvent créer les conditions de la rupture de tolérance en conférant un avantage selectif aux cellules auto-réactives (affinité pour certaines cytokines de survie comme BAFF ou IL7 ; défauts quantitatifs de lymphocytes T régulateurs dans le milieu ; pauvreté du répertoire allo-immun).

b) Anomalies intrinsèques de développement lymphocytaire B et anomalies d'activation des LB auto-réactifs

- **Anomalies de développement lymphocytaire B** : *AICDA* code pour AID, l'enzyme à l'origine de la commutation isotypique et de l'hypermutation somatique des lymphocytes B. Les mutations sur *AICDA* peuvent être à l'origine d'un syndrome hyper-IgM chez l'Homme et s'accompagnent d'une auto-immunité dans 30% des cas environ (polyarthrites, cytopénies auto-immunes, hépatites auto-immunes) (Durandy et al., 2005). Il existe en fait chez les patients atteints, un défaut de régulation négative des cellules B auto-réactives (d'isotype IgM) au niveau central (Cantaert et al., 2015). Chez le sujet sain, les cellules autoréactives vont co-exprimer RAG2 et AID, et la caspase 3 et entamer un processus d'apoptose. Le défaut d'AID entraine dans ce contexte un avantage selectif aux cellules auto-réactives en ne permettant pas le processus d'apoptose (Cantaert et al., 2015). On note en particulier un répertoire avec une utilisation plus fréquente de gènes VH associés à l'autréactivité comme le VH4-34(Cantaert et al., 2016). Les patients mutés pour *AICDA* présentent de plus un défaut de contrôle des lymphocytes auto-réactifs en périphérie, en partie lié au défaut du processus d'hypermutation somatique (SHMLes lymphocytes sont par ailleurs plus prompts à être activés en périphérie avec un taux plus élevé de BAFF presentent un défaut de contrôle par les lymphocytes T (diminution des lymphocytes T régulateurs, élévation des cytokines IL4, IL2, IL21 et augmentation des lymphocytes TFh). Les patients présentent une lymphoprolifération chronique et des organes lymphoïdes atypiques avec des centres germinatifs géants (Durandy et al., 2013; Meyers et al., 2011) (**Figure 7**). De telles anomalies de développement et d'organisation des organes lymphoïdes secondaires sont observées dans d'autres types de DIPs comme au décours du DICV (Unger et al., 2014; Warnatz et al., 2002).

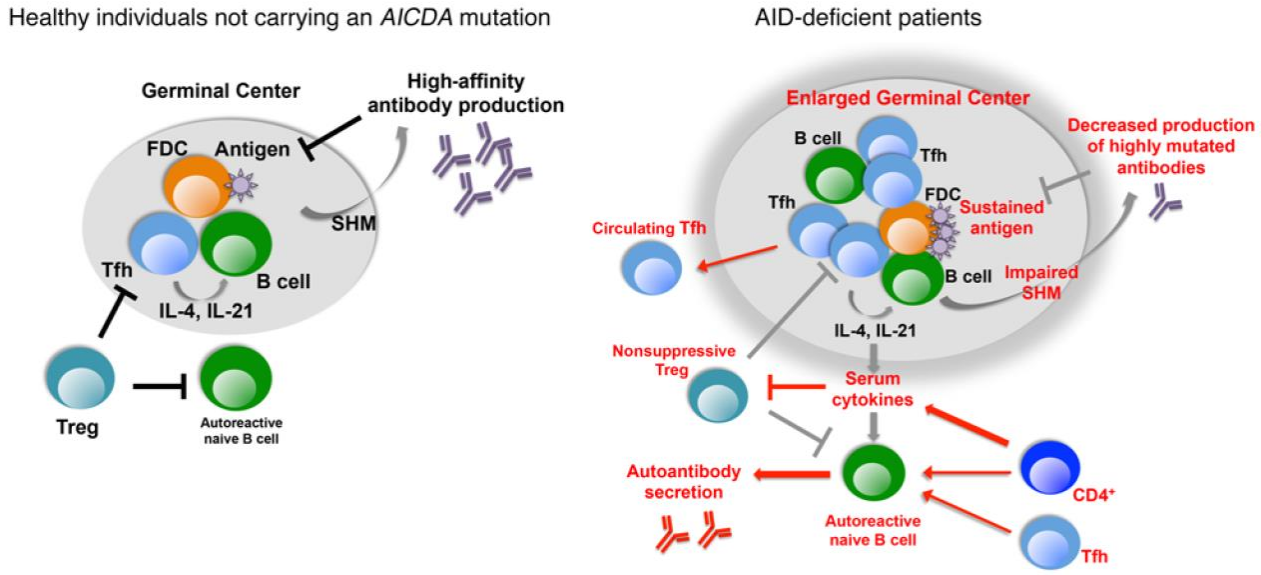


Figure 7 : mécanismes de rupture de tolérance chez les patients mutés pour *AICDA* ((Cantaert et al., 2015), *adapté***)**

c) Activation excessive du système immunitaire

Plusieurs mécanismes d'activation excessive du système immunitaire peuvent conduire ou participer à une rupture de tolérance. Il peut s'agir de mécanismes extrinsèques (comme l'activation du système immunitaire inné, l'accumulation de complexes immuns et de débris apoptotiques qui activent les lymphocytes par la voie des TLRs) ou de mécanismes intrinsèques liés à l'activation de voies de signalisation majeures pour la cellule :

Voie NFKB : la voie NFKB est l'une des voies clés de l'activation lymphocytaire T et B en réponse à un stimulus du TCR, du BCR ou des voies de réponse au TNFα ou aux corécepteurs lymphocytaires (CD40) (Ting and Endy, 2002). Cette voie intervient dans la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la réponse au stress cellulaire. Le signal NFKB est régulé par différents mécanismes impliquants des régulateurs (IKBα, IKBβ, IKBε, NEMO) dont le niveau d'expression et de dégradation conditionne la libération de NFKB dans le cytoplasme et sa capacité de translocation nucléaire (Hoffmann et al., 2002). Les mutations (AD) de *NFKB 1* sont à l'origine de phénotypes différents en fonction du type de mutation (Kaustio et al., 2017). Les manifestations associent une hypogammaglobulinémie et un phénotype de type DICV et diverses manifestations auto-immunes et auto-inflammatoires (atteinte digestive et aphtose de type Behçet-*like*, vascularites, cellulites/fasciites). Dans ce sens, la souris *NFkB 1*$^{-/-}$ présente une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires IL6, interféron (IFNγ) et TNFα (Bohuslav et al., 1998; Snapper et al., 1996). En parallèle, des anomalies de signal de NFKB ont été retrouvées dans des cohortes de patients atteints de

DICV avec auto-immunité et expansion des lymphocytes B $CD21^{low}CD38^{low}$ (Keller et al., 2016). Ces patients présentent une anomalie du signal calcique après engagement du BCR, en particulier dans la fraction $CD21^{low}$. La perte de fonction de NFKB 1, apparait actuellement comme l'une des mutations les plus fréquemment retrouvées au cours du DICV: 4% des patients dans une cohorte européenne de 390 patients et particulièrement associée avec le phénotype lymphoprolifératif et auto-immun avec expansion des $CD21^{low}$ (Tuijnenburg et al., 2018).

Voie PI3K (classe IA) : PIK3δ se situe en aval du co-signal CD28 dans les lymphocytes T. Son activation aboutit à la production de phosphatidyl inositol tri-phosphate (PIP3) qui est le substrat d'Akt. L'activation de cette voie aboutit à l'activation de mTOR, responsable d'une lymphoprolifération et d'une activation lymphocytaire T. Les mutations de *PIK3CD* (AD) et de *PIK3R1* (AR) sont responsables de syndrome APDS (*activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome*) ou PASLI (*p110δ–activating mutation causing senescent T-cells, lymphadenopathy, and immunodeficiency*). Il s'agit de déficits imunitaires combinés avec lymphoprolifération et auto-immunité fréquente (34% pour PIK3CD ; 17% pour PIK3R1) (Coulter et al., 2016; Elkaim et al., 2016). L'activation du signal PI3KCD est retrouvée au cours du LES (Suarez-Fueyo et al. J Immunol 2011) et les mécanismes de rupture de tolérance pourraient passer par des anomalies de sélection centrale thymique des lymphocytes T auto-réactifs (l'activation du signal PI3K favorise la survie des lymphocytes T activés et leur échappement à l'apoptose induite par activation) et par un défaut des lymphocytes T régulateurs (Di Cristofano et al., 1999; Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2003; Patton et al., 2006; Suzuki et al., 2001).

Voie ERK/MAPK dans les lymphocytes T : récemment, plusieurs déficits immunitaires dans la voie d'activation du TCR ont été décrits (*LAT, RASGRP1*). Le défaut de *LAT* est responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère avec une absence de lymphocytes T périphériques (SCID T-B+NK+) (Bacchelli et al., 2017). Le défaut de *RASGRP1* (Mao et al., 2018) est responsable d'un phénotype ALPS-like avec lymphoprolifération, auto-immunité (PTI, AHAI, anticorps anti-nucléaires, anti-TPO, Anti-SSA), une hypergammaglobulinémie et une susceptibilité aux infections. Des mutations de *RASGRP1* avec une baisse de l'activité enzymatique ont par ailleurs été rapportées au cours du lupus (Yasuda et al., 2007). RasGRP1 intervient dans la cascade d'activation du TCR (ZAP, LAT, SLP76, DAG) et aboutit à la phosphorylation de ERK1/2. Le mécanisme qui conduit à la rupture de tolérance chez les patients mutés pour *RASGRP1* n'est pas encore complètement élucidé. Il pourrait faire intervenir un défaut d'apoptose des cellules activées, un défaut de réponse aux cytokines régulatrices comme l'IL10, et à un défaut de maturation lymphocytaire B avec l'émergence de cellules $CD21^{low}$ (comme dans le DICV avec auto-immunité).

Voies JAK/STAT : la voie JAK/STAT est une voie essentielle d'activation et de régulation du système immunitaire. Situés en aval des récepteurs de nombreuses cytokines essentielles (en particulier interférons de type I/II/III pour STAT1 et IL6, IL2, IL21, IL10 pour STAT3), les JAKs contrôlent la phosphorylation et la dimérisation de facteurs de transcriptions STATs qui vont contrôler de nombreux gènes de la réponse immunitaire dans les lymphocytes T notamment. Il existe 7 types de protéines STATs qui peuvent former des homodimères ou des hétérodimères pour jouer des fonctions différentes dans les cellules cibles (Villarino et al., 2017).

Une auto-immunité survient dans les gains de fonctions de STAT1 avec la survenue de polyendocrinopathies, d'entéropathies auto-immunes (tableaux IPEX-like) ou de lymphoprolifération avec cytopénies auto-immunes (tableaux ALPS-*like*) avec en particulier un syndrome d'EVANS (Toubiana et al., 2016; Uzel et al., 2013). Les mécanismes à l'origine de la rupture de tolérance chez ces patients restent méconnus et pourraient passer par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (interférons de type I/II et III) (Forbes et al., 2018).

Principalement impliquées dans les réponses Th17, les anomalies de *STAT3* (défauts de fonction ou activation) vont aboutir à une susceptibilité aux infections bactériennes (staphylocoques et streptocoques) et fongiques (en particulier liées à *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* et candidoses). Les gains de fonctions de STAT3 vont donner des tableaux ressemblant aux ALPS (cytopénies auto-immunes et lympho-prolifération) (Haddad, 2015; Milner et al., 2015). On retrouve aussi des manifestations auto-immunes d'organe avec des hépatites auto-immunes ou des lymphoprolifération pulmonaires. Le gain de fonction de STAT3, en réprimant STAT5 et STAT1, diminue l'activité T régulatrice. Il augmente également la réponse à certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6. Ces deux éléments pourraient être à l'origine des phénomènes auto-immuns chez les patients mutés (Milner et al., 2015).

d) *Anomalies de coopération lymphocytaire T/B :*

Les lymphocytes T folliculaires (LTFh) sont des lymphocytes T CD4 spécialisés dans l'aide aux lymphocytes B vers la différenciation en cellules productrices d'anticorps (Chtanova et al., 2004). Localisés dans les structures folliculaires des organes lymphoïdes secondaires, ils sont difficiles d'accès en routine. Plusieurs travaux ont montré que le contingent de lymphocytes T folliculaires circulants (cTFh) peut être utilisé comme un reflet des cellules TFh dans les centres germinatifs(Crotty, 2011). Les lymphocytes TFhc produisent de l'IL21, sont BCL-6 positifs et expriment les marqueurs CD4, CD45RO et CXCR5, mais également des marqueurs de co-stimulation tels que CD40L, PD1 et ICOS. Les LTFhc sont séparés en TFh1,

TFh17 et TFh2 selon leur expression de CXCR3 et CCR6 (TFh1 CXCR3+CCR6-, TFh2 CXCR3-CCR6-, TFh17 CXCR3+ CCR3+) (Le Coz et al., 2013).

Du côté des déficits immunitaires, des anomalies au niveau de ces cellules ont été identifiées(Ma and Phan, 2017). Les patients atteints de DICV porteurs de mutations *ICOS* présentent une baisse de lymphocytes TFH qui serait à l'origine du défaut de commutation isotypique. Au cours du déficit immunitaire commun variable (DICV) avec auto-immunité les cTFh sont augmentés et il existe une élévation relative des TFh1 (non impliqués dans l'aide aux lymphocytes B) au profit des TFh2 et TFh17 *(Unger S et al. JACI 2017* ; *Turpin D et al. Clin Immunol 2018*). Ce profil est en particulier rencontré en cas de complications non infectieuses (lymphoprolifération et auto-immunité). Ces lymphocytes cTFh de phénotype TH1 sécrètent de l'interféron gamma (IFNγ) et présentent une augmentation du facteur de transcription T-bet. Ils pourraient participer à la rupture de tolérance en favorisant l'activation des lymphocytes B mémoires switchés résiduels et/ou en favorisant l'activation des lymphocytes B $CD21^{low}$ (enrichis en cellules auto-réactives)(Gensous et al., 2018).

Du côté de l'auto-immunité, des anomalies des lymphocytes TFh ont été mises en évidence comme au cours du LES (Crotty, 2014; Le Coz et al., 2013; Ueno et al., 2015). Une expansion des LTFHc ($CXCR5^{High}$, $ICOS^{High}$ $PD\text{-}1^{High}$) est ainsi corrélée avec le titre d'auto-anticorps dans le sérum et avec l'activité de la maladie (Choi et al., 2015). Dans ce sens également, une augmentation du signal OX40L/OX40 fourni par les cellules dendritiques myéloïdes stimulées par la voie RNP-CIC-TLR7 au cours du lupus, favorise l'activation des lymphocytes TFH (Jacquemin et al., 2015) et en parallèle une diminution de la fonction T régulatrice (Jacquemin et al., 2018).

e) Défauts de régulation immunitaire

- **Mécanismes centraux** : AIRE est un élément clé de la tolérance lymphocytaire T centrale au niveau thymique. C'est un facteur de transcription qui exerce de multiples fonctions : 1) expression d'auto-antigènes par les cellules épithéliales thymiques, cross présentation des antigènes ; 2) attraction et maturation des thymocytes ; 3) différenciation de l'épithélium thymique (en particulier de la medulla) (*Anderson MS et al. Immunity 2005*). Les mutations de *AIRE* (AR ou AD) sont à l'origine du syndrome APECED qui se caractérise par une auto-immunité d'organe (insuffisance surrénale, hypoparathyroïdie, thyroïdite, diabète) et une auto-immunisation anti-cytokines (anti-IL17, anti-IL22) à l'origine d'infections fongiques (candidoses cutanéo-muqueuses chroniques) (Kisand et al., 2010; Puel et al., 2010).

La souris AIRE *Knock Out* (KO) (Anderson et al., 2002; Kuroda et al., 2005; Ramsey et al., 2002), développe comme les patients APECED, une auto-immunité d'organe avec des infiltrats inflammatoires et des autoanticorps. La comparaison des analyses transcriptomiques des mTECs de souris AIRE KO et sauvages,

confirme bien que AIRE permet l'expression d'un ensemble d'antigènes tissus spécifiques (TRAs) dans les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) (Akirav et al., 2011). De plus, des souris athymiques recevant du stroma thymique de souris *Aire*$^{-/-}$ ne sont pas en mesure de prévenir le développement d'une auto-immunité, avec notamment la présence d'autoanticorps et une diminution de la sélection négative, contrairement aux souris greffées avec du stroma thymique sauvage (Gardner et al., 2008).

- **Mécanismes périphériques** : le gène *FOXP3,* codé par le chromosome X, est le facteur de transcription majeur des lymphocytes T-régulateurs (CD4+CD127-CD25++FoxP3+). Les anomalies de ce gène sont responsables d'une rupture de tolérance périphérique chez la souris KO (souris scurfy FoxP3$^{-/-}$) par non génération des LT régulateurs (Godfrey et al., 1991). Chez l'Homme, les mutations de FoxP3 sont à l'origine du syndrome IPEX, responsable d'une polyendocrinopathie auto-immune avec entéropathies et dermatite atopique sévère dès la période néonatale (Barzaghi et al., 2018). D'autres manifestations auto-immunes (cytopénies) peuvent survenir ultérieurement et se combiner avec une hyperéosinophilie. Les patients présentent une infiltration des organes par des lymphocytes T activés du fait du défaut de régulation T.

D'autres DIPs peuvent toucher la fonction régulatrice et aboutir à une rupture de tolérance T périphérique. Les défauts de *CD25, CTLA4* ou *LRBA* vont mimer certaines caractéristiques des mutations de FoxP3 et donner des tableaux IPEX-*like*. Les défauts de CTLA4 aboutissent à un défaut de fonction des LT régulateurs sur le contrôle de l'activation des lymphocytes T effecteurs (absence de signal inhibiteur médié par CTLA4). En effet, CTLA4 entre normalement en compétition pour le co-signal activateur CD80/CD86 – CD28 en ayant une affinité plus forte pour CD80/CD86 que la molécule activatrice CD28. Des anomalies d'expression de CTLA4 ont par ailleurs été observées à la surface des lymphocytes T régulateurs dans plusieurs pathologies auto-immunes (LES, PR)(Flores-Borja et al., 2008; Jury et al., 2010). Chez les patients mutés sur *CTLA4* (AD), des phénomènes d'auto-immunité (entéropathies inflammatoires, cytopénies auto-immunes, uvéites, polyarthrites, hépatites auto-immunes, endocrinopathies) sont fréquemment observés (62% de cytopénies auto-immunes, 58% d'entéropathies inflammatoires) du fait d'un défaut de contrôle des lymphocytes T effecteurs activés (Kuehn et al., 2014; Schubert et al., 2014; Schwab et al., 2018). De façon proche, les patients mutés sur *LRBA* présentent un défaut des fonctions T régulatrices médiées par CTLA4 du fait d'une altération d'expression et de recyclage à la membrane de CTLA4, normalement permis par la protéine LRBA (Alangari et al., 2012; Lo et al., 2015). D'autres fonctions de LRBA sont présumées être responsable des anomalies auto-immunes constatées chez les patients mutés tels que des défauts d'autophagies et des défauts d'activation et de maturation des lymphocytes B.

f) Implication du cytosquelette dans les mécanismes de rupture de tolérance :

Certains DIPs touchent à l'organisation du cytosquelette (Burns et al., 2017; Moulding et al., 2013; Parameswaran and Gupta, 2013). Les anomalies de fonction et d'organisation du cytosquelette vont impacter plusieurs grandes fonctions cellulaires : 1) la migration cellulaire, 2) l'adhésion, la recirculation et le *homing* 3) les contacts intercellulaires et la formation de synapses immunologiques, 4) l'expression de certaines molécules à la surface membranaire via l'organisation des radeaux lipidiques 5) La présentation antigénique, ou bien encore 6) la division et la prolifération cellulaire (Dustin and Cooper, 2000; Lagresle-Peyrou et al., 2016). Ces déficits immunitaires qui impactent la régulation et le fonctionnement du cytosquelette aboutissent le plus fréquemment à des tableaux de déficits immunitaires combinés ou des défauts de la phagocytose. Ils peuvent se compliquer d'auto-immunité dont les mécanismes sont multiples (**Table 1**).

Déficit immunitaire	Gène(s) impliqué(s)	Type de DIP	Transmission	OMIM	Auto-immunité	Mécanismes de l'auto-immunité	Références
Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)	*WASP*	CID syndromique	XLR	301000	Oui (eczema, AHAI, inflammation de l'intestin, arthrite, vascularites, glomérulonéphrites à IgA)	Défaut de fonction des LT régulateurs, défaut d'apoptose des LT activés, défaut de tolérance central (LB)	(Thrasher and Burns, 2010)
Défaut de DOCK8	*DOCK8*	CID	AR	243700	Oui (AHAI, colite, Cholangite sclérosante, vascularites)	Défaut des LT regs	(Janssen et al., 2014)
Défaut de la Moesin	*MSN*	CID	XLR	300988	Oui (alopécie, PTI, eczema)	NC (TFH et LTreg présumés sur le modèle murin qui développe un lupus)	(Hirata et al., 2012; (souris) Lagresle-Peyrou et al., 2016)
Défaut de ARHGEF1	*ARHGEF1*	CID	AR	601855	Oui (PTI)	NC	(Bouafia et al., 2018)
Défaut de DOCK2	*DOCK2*	CID	AR	603122	Non	/	(Dobbs et al., 2015)
Défaut de MST1	*MST1 / STK4*	CID	AR	614868	Non	/	(Abdollahpour et al., 2012; Nehme et al., 2012)
Défauts d'adhésion LAD (*Leucocyte Adhesion Defect*)	*ITGB2, SLC35C1 et FERMT3 et RAC2*	Déficit congénital de la phagocytose	AR	600065 605881 612840 602049	Non	/	(Burns et al., 2017)
Défaut de MKL1	*MKL1*	Déficit congénital de la phagocytose	AR	606078	Non	/	(Record et al., 2015)
Déficit de RHOH	*RHOH*	CID	AR	602037	Non	/	(Crequer et al., 2012)
Déficit en RLTPR	*CAMIL2*	Susceptibilité à EBV	AR	610859	Non (atopie)	/	(Schober et al., 2017)
RASGRP1	*RASGRP1*	Dérégulation immunitaire	AR	603952	Oui (souris, Homme) Auto-anticorps, AHAI, PTI	Défaut d'apoptose des LT activés	(Mao et al., 2018; Salzer et al., 2016)
Deficit en ARPC1B	*ARPC1B*	CID syndromique	AR	604223	Oui (ANA, ANCA)	NC	(Brigida et al.; Kuijpers et al., 2017)
Coronin 1A	*CORO1A*	CID	AR	605000	Non	/	(Punwani et al., 2015)
Déficit immunitaire avec atrésie intestinale	*TTC7A*	CID syndromique	AR	609332	Non	/	(Lemoine et al., 2014)

Table 1. Déficits immunitaires primitifs impliquant un dysfonctionnement du cytosquelette CID : *combined immunoeficiency* (déficit immunitaire combiné) – AR : autosomique récessif – AD : autosomique dominant – XLR : X-*linked* (lié à l'X) – PTI : purpura thrombotique immunologique – AHAI : anémie hémolytique auto-immune - NC : non connu

Au cours du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), jusqu'à 70% des patients présentent des manifestations auto-immunes (thrombopénie, neutropénie, anémie hémolytique auto-immune, maladies inflammatoires de l'intestin, vascularite, arthrites, néphropathie à IgA) (Dupuis-Girod et al., 2003; Imai et al., 2004). La souris *Was*$^{-/-}$ présente d'une part une augmentation de production d'IgA par les lymphocytes B spléniques et une glycosylation aberrante de ses IgA qui pourraient être à l'origine des glomérulonéphrites observées (Nikolov et al., 2010; Shimizu et al., 2012). Par ailleurs, WASP étant impliqué dans l'activation lymphocytaire T et B et le remodelage du cytosquelette et la polymérisation d'actine, des mécanismes de rupture de tolérance T et B sont observés avec : 1) des défauts de fonction des lymphocytes T régulateurs (Humblet-Baron et al., 2007), 2) un défaut d'apoptose induite par l'activation prolongée des lymphocytes T effecteurs, normalement médiée par FASL (Nikolov et al., 2010), 3) des anomalies de *homing* et d'activation des lymphocytes B (Meyer-Bahlburg et al., 2008), 4) des défauts de sélection centrale des lymphocytes B auto-réactifs médiés par une hyperréactivité du signal BCR/TLR (démontré dans le modèle murin de KO conditionnel WASP dans les lymphocytes B qui produit des auto-anticorps et développe une glomérulonéphrite) (Becker-Herman et al., 2011). 4) un défaut de formation de la synapse immunologique LT/CPA qui pourrait être à l'origine d'un défaut de clairance des pathogènes et d'une activation chronique du système immunitaire avec production de médiateurs pro-inflammatoires (IFN de type I) par les cellules denditiques plasmacytoïdes (pDCs) (Catucci et al., 2012).

A ce stade, nous pouvons compléter notre schéma (Figure 8).

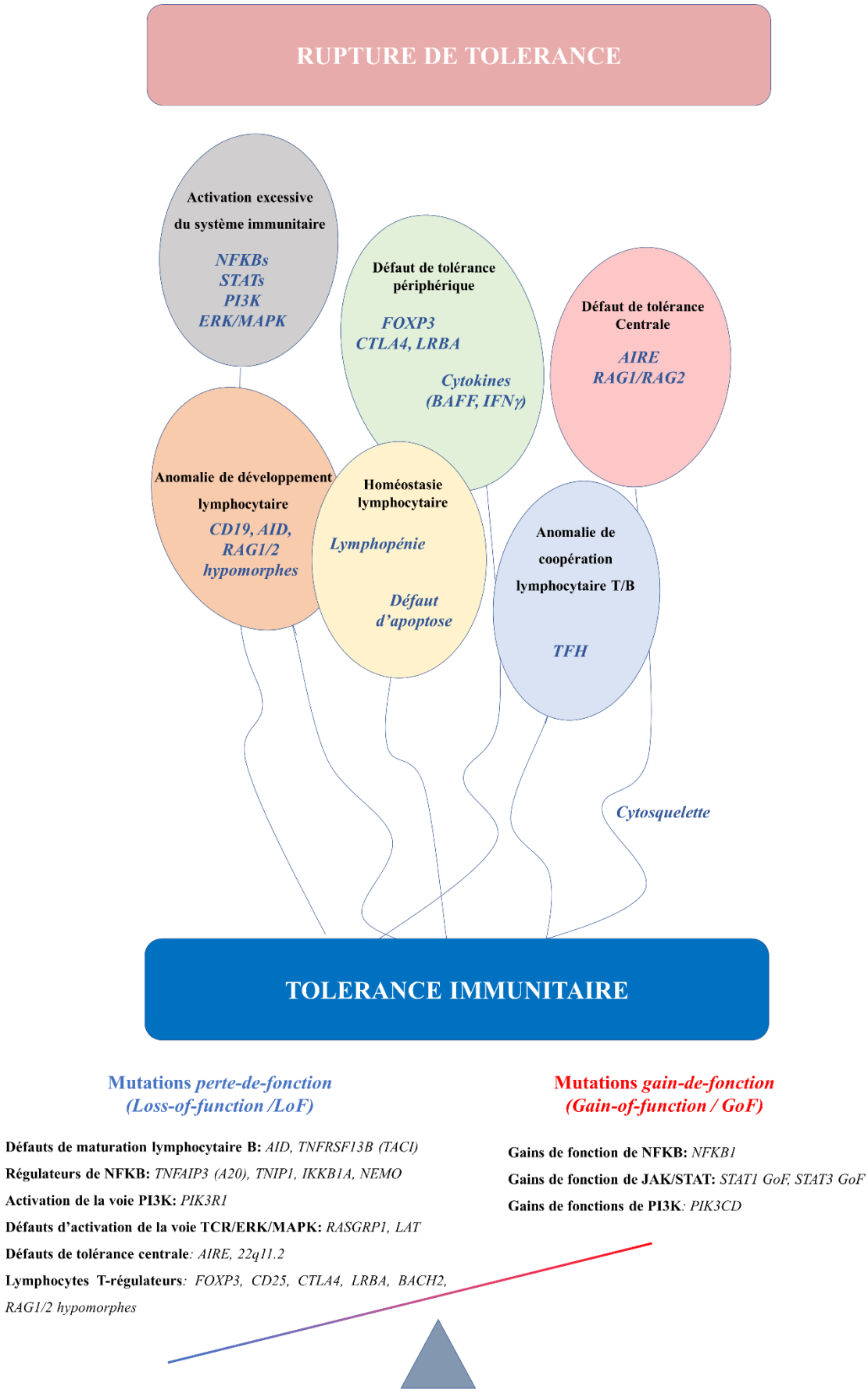


Figure 8 : **représentation schématique des mécanismes de rupture de tolérance dans les DIPs.**

III. Apport de l'étude des déficits immunitaires primitifs dans la compréhension de la physiopathologie des maladies auto-immunes complexes :

Au cours du LES, les études GWAS (Genome-wide association study) ont permis l'identification de centaines de polymorphismes génétiques associés à un risque accru d'auto-immunité (Deng et al., 2014; Niewold, 2015; Parkes et al., 2013; Yarwood et al., 2016). Nombre de ces variants sont susceptibles de modifier la signalisation du LB, incluant des gènes codant pour des récepteurs ou des protéines intervenant dans la cascade du BCR (*BANK, PTPN22, BLIMP1, LYN, BLK, TNFAIP3*).

Il est compliqué de comprendre la participation de chacun de ces variants dans le phénotype des maladies multifactorielles. Les modèles murins monogéniques ne présentent pas toujours des anomalies quantifiables de l'immunité. Les problématiques sur la multigénicité et le lien entre épigénétique et mutations génétiques ou bien encore sur la redondance du système immunitaire restent à élucider (Nowak et al., 1997). Lorsque l'on prend plusieurs maladies auto-immunes différentes (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, sclérose en plaque, polyarthrite, lupus), on peut également observer que de nombreux gènes impliqués sont communs entre les pathologies (exemple des variants sur les gènes *IL10, CTLA4, CD28, NFKB 1*) avec par ailleurs une diversité de gènes concernés (jusqu'à plus de 300 gènes dans les GWAS de polyarthrites rhumatoïdes). Cette remarque souligne le caractère potentiellement extrêmement hétérogène et plurifactoriel de pathologies dénommées sur la base de leur présentation clinique (Yarwood et al., 2016).

Nous souhaitons illustrer 3 mécanismes possibles à partir d'une mutation mise en évidence sur un gène et susceptibles d'entraîner une autoimmunité : 1) l'haplo-insuffisance, 2) le digénisme et 3) l'épigénisme.
Cettte illustration nous permet de mettre en comparaison les modèles monogéniques (couramment regroupés sous l'appelation DIPs) et multigéniques de maladies autoimmunes, et également de souligner la barrière ténue entre déficits immunitaires primitifs et maladies autoimmunes d'origine génétique, puisque ce sont en fait les même schémas de signalisation de l'immunité innée ou adaptative qui sont concernés, mais pas toujours dans les mêmes proportions ou dans le même « sens » (activation/répression).

a. *Haplo-insuffisance et auto-immunité* :

L'haplo-insuffisance est un mode de transmission autosomique dominant qui aboutit à un dysfonctionnement d'un seul allèle avec une activité résiduelle mais insuffisante de la protéine qui peut varier d'un individu à l'autre. Ce mécanisme est rapporté pour plusieurs DIPs de découverte récente (*CTLA4* ; *PIK3CD* ; *TNFAIP3 ; TACI).*

Dans la voie NFKB, il existe un exemple qui illustre bien les ponts potentiels entre des formes monogéniques d'auto-immunité dans les DIPs et des formes polygéniques dans les maladies auto-immunes systémiques comme le LES liés avec des mutations pour un même gène avec un « poids » différent sur le phénotype. C'est celui des **mutations de *TNFAIP3* (A20).** Il s'agit d'un régulateur négatif de NFKB impliqué après stimulation par les voies du TNFα mais aussi CD40, TLRs et IL1 (Catrysse et al., 2014). Les mécanismes de régulations de NFKB par A20 sont multiples et passent en particulier par une activité de déubiquitination sur les régulateurs de NFKB (NEMO, IKKs). Les polymorphismes de *TNFAIP3* ont été identifiés dans des études de GWAS pour être associés avec différentes maladies auto-immunes : LES, PR, Sclérodermie systémique, diabète de type 1, Sjögren (Ma and Malynn, 2012). D'autres études génétiques ont montré l'association de mutation de *TNFAIP3* (A20) avec la lymphomagenèse avec pour conséquence, une activation constitutive de la voie NFKB (Kato et al., 2009). Les souris KO hétérozygote *Tnfaip3*$^{-/+}$ ne présentent pas de phénotype sévère en dehors de l'apparition tardive d'auto-anticorps. En revanche, la souris *Tnfaip3*$^{-/-}$ présente un phénotype auto-inflammatoire sévère et décède précocement (Lee et al., 2000). Récemment, des mutations inactivatrices de *TNFAIP3* ont été repérées dans plusieurs familles avec une transmission AD. Ce nouveau DIP présente une grande hétérogénéité dans ses présentations phénotypiques avec des tableaux d'auto-immunité (auto-anticorps anti-ADNdb) et lymphoprolifération (ALPS-like) ou de pathologies auto-inflammatoires (Behçet-like) (Berteau et al., 2018; Takagi et al., 2016; Zhou et al., 2016).

Un autre exemple est celui de **l'haplo-insuffisance de *BACH2***. Afzili et al. ont ainsi rapporté 2 familles mutées sur le facteur de transcription BACH2 qui intervient au cours du développement lymphocytaire T et B (Afzali et al., 2017). La fonction de BACH2 est double (**Figure 9**) : Dans les lymphocytes B, BACH2 intervient comme un régulateur de l'expression de PAX5 (qu'il favorise) et de BLIMP1 (qu'il réprime) avec pour conséquence une diminution de la différenciation plasmocytaire et une augmentation du processus de commutation de classe isotypique. Les souris mutées *Bach2*$^{-/-}$ ont ainsi des plasmocytes non commutés (IgM) (Muto et al., 2004; Ochiai et al., 2006). Dans les lymphocytes T, BACH2 permet la régulation de la fonction effectrice en faveur d'un phénotype T-régulateur (Kuwahara et al., 2016). Ainsi, les anomalies de BACH2 vont occasionner un déficit humoral (défaut de plasmocytes commutés avec baisse des IgA, IgG) et de l'auto-immunité (entéropathie inflammatoire par défaut de T régulateurs et excès de réponse T effectrice). Des données de GWAS ont rapporté l'existence de polymorphismes sur *BACH2* en association avec plusieurs maladies auto-immunes : vitiligo (Jin et al., 2012), sclérose en plaque (*International Multiple sclerosis genetics consortium, Nature 2011*), diabète de type 1 (Cooper et al., 2008), Crohn (Franke et al., 2010) et maladie cœliaque (Dubois et al., 2010). De façon extrémement interessante, *BACH2* a la particularité d'avoir une expression finement régulée par des « super-enhancers » (SE) dans une région régulatrice de l'expression des gènes. Ces SEs sont retrouvés de façon plus fréquente dans les gènes issus de GWAS de MAIs (Vahedi et

al., 2015) ainsi que sur d'autres gènes impliqués dans des processus haplo-insuffisances (Afzali et al., 2017). Cela suggère que les gènes régulés par ces structures SE peuvent être impactés en dehors de mutations les affectant directement par des modifications éventuellement épigénétiques.

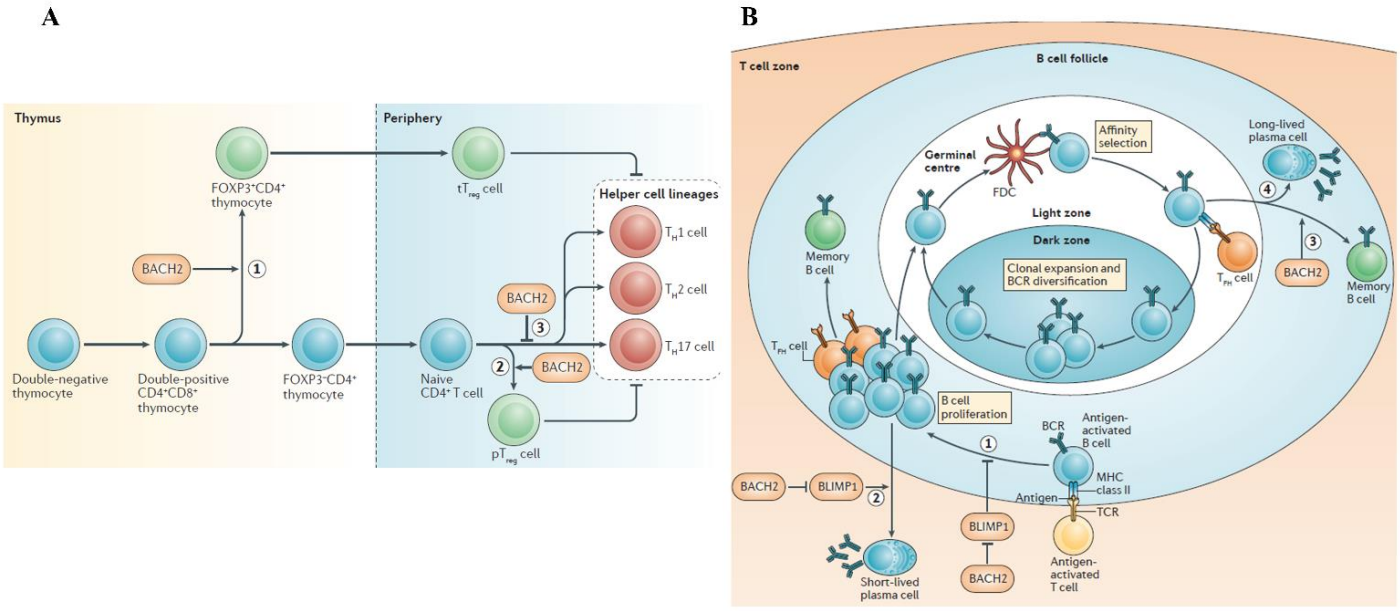


Figure 9 : mécanisme d'action de BACH2 dans les lymphocytes T (A) et les lymphocytes B (B). (*d'après* (Igarashi et al., 2017)).

b. **Digénisme et rupture de tolérance** :

Récemment, une famille atteinte de DIP avec auto-immunité lié à un digénisme (haploinsuffisance de *CTLA4* et gain de fonction de *JAK3*) a été publiée (Sic et al., 2017). Les conséquences de ces deux mutations sont : 1) une altération de liaison à CD80/CD86 de la protéine CTLA4 issue de la forme mutée de *CTLA4* avec pour conséquence un défaut de contrôle des lymphocytes T activés et une lymphoprolifération T et, 2) une réponse accrue aux stimuli provenant des cytokines telles que IL2 liée à la mutation gain de fonction de *JAK3*. Cela a pour effet de favoriser la différenciation en LTFh activés (augmentés en nombre) mais déficients pour apporter un *help* au lymphocytes B (avec un défaut de production cytokinique IL21, IL4), expliquant en partie le phénotype humoral (défaut de lymphocytes B mémoires switchés et de plasmocytes, excès de cellules $CD21^{low}$). Les patients indépendemment porteurs de l'une des deux mutations, ne sont pas malades. Un tel mécanisme pourrait expliquer la pénétrance variable de certaines mutations entre différents individus (APDS, ALPS-FAS) où certains individus porteurs de mutations délétères chez d'autres individus ne développent pas la maladie (Price et al., 2014).

c. **Epigénétique et auto-immunité** :

Du côté du déficit immunitaire, certains DIPs sont connus pour altérer des mécanismes impliqués dans le remodelage de la chromatine ou les modifications épigénétiques des gènes. C'est par exemple le cas du syndrome ICF1 (immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies-1) lié à des mutations sur *DNMT3B* (AR) qui intervient dans la déméthylation des gènes. La maladie aboutit à un déficit immunitaire combiné, des anomalies de développement et une instabilité centromérique de l'hétérochromatine visible sur un caryotype réalisé en milieu « cassant » (en particulier sur les chromosomes 1, 9 et 16). Ces anomalies sont en rapport avec une hypométhylation globale de la chromatine qui aboutit à une dérégulation du programme de transcription génétique (Ehrlich et al., 2001; Jin et al., 2008). En dehors de cet exemple, certains patients atteints de DICV présentent des anomalies de méthylation de l'ADN impliquant des gènes clés du fonctionnement lymphocytaire B (*PIK3CD, BCL2L1, TCF3*), qui pourrait être une des explications à l'absence de mutation retrouvée chez ces patients (Rodríguez-Cortez et al., 2015).

Du côté de l'auto-immunité, l'étude des jumeaux monozygotes atteints de maladies auto-immunes a montré une concordance extrêmement variable des phénotypes cliniques (11% dans le LES (Järvinen and Aho, 1994) jusqu'à 77% dans la cirrhose biliaire primitive (Selmi et al., 2004)). Pour expliquer cette discordance, des études se sont intéressées aux facteurs épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones, régulation par les micro-RNAs). Au cours du LES, la méthylation de l'ADN de certains gènes (*IFNGR2, PDX1, MMP14, PECAM1, LCN2* par exemple) est particulièrement différente entre jumeaux malade et non malade (Javierre et al., 2010). Les facteurs pouvant modifier ce statut de méthylation sont multiples (infectieux, chimiques, alimentaires, médicamenteux).

Pris ensemble, ces données suggèrent que des facteurs épigénétiques sont probablement responsables à la fois de certains phénotypes de DIPs, mais aussi de mécanismes de rupture de tolérance. Ces facteurs pourraient en particulier expliquer des variations phénotypiques chez des malades porteurs d'une même mutation génétique et des phénomènes de pénétrance incomplète.

En conclusion de cette partie, nous proposons le schéma récapitulatif suivant (Figure 10).

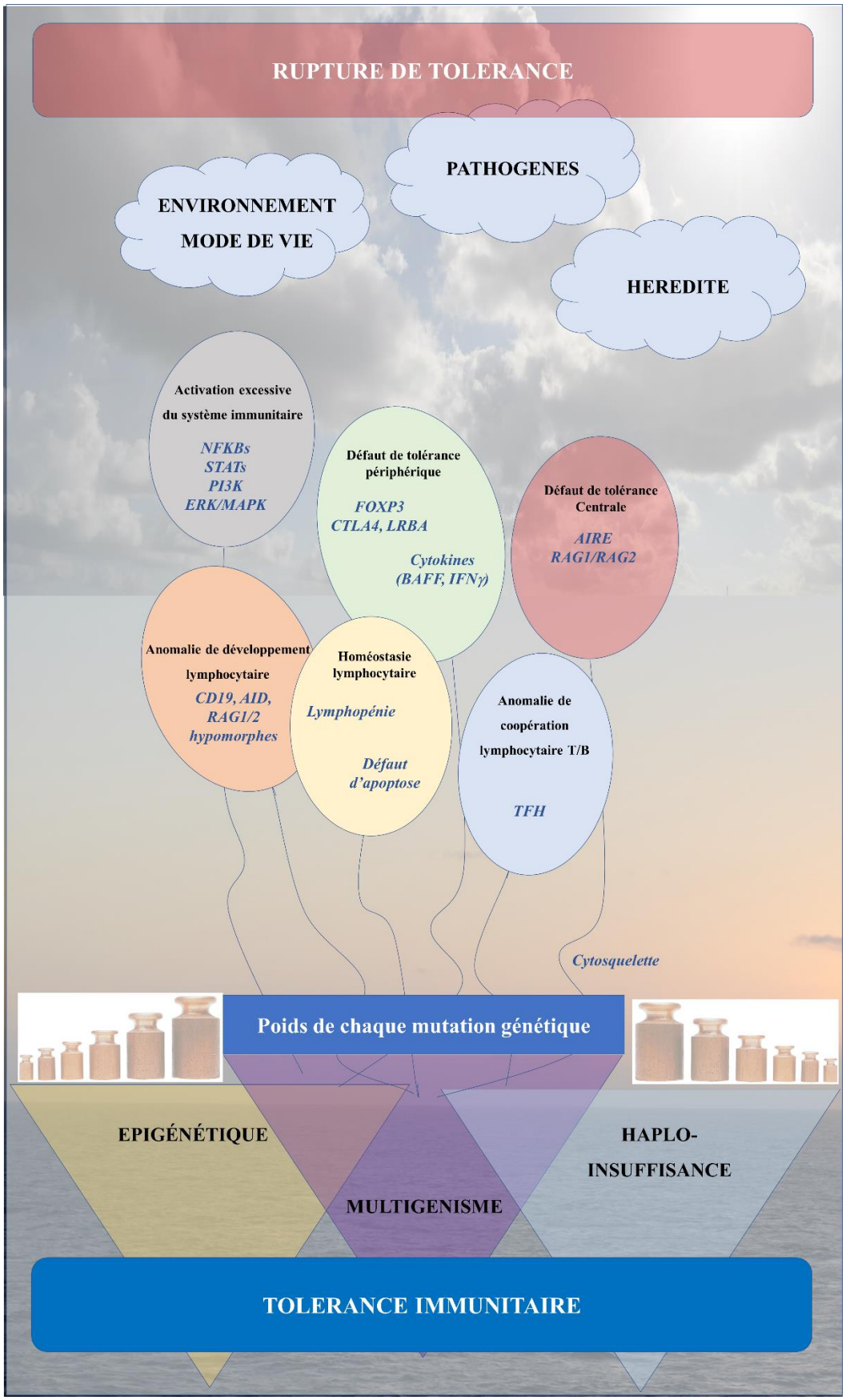


Figure 10 : Schéma complétant les hypothèses menant à la rupture de tolérance au cours de DIPs et des maladies auto-immunes multifactorielles.

INTRODUCTION – AXE III

ACP1 : UNE PHOSPHATASE UBIQUITAIRE DE FONCTION INCONNUE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE

AXE III : ACP1 : UNE PHOSPHATASE UBIQUITAIRE DE FONCTION INCONNUE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE

I. Introduction

La phosphorylation des protéines sur leurs résidus tyrosines est un mécanisme majeur d'activation et de régulation des voies intracellulaires telles que la croissance, la prolifération, la différentiation, la régulation du métabolisme, et la réponse immunitaire. En pathologie, l'altération de ces voies est à l'origine de différentes maladies (cancers solides ou hématologiques, déficits immunitaires et auto-immunité, maladies du développement ou du métabolisme).

La déphosphorylation des protéines est permise par l'action de phosphotyrosines phosphatases (PTPs) qui exercent généralement un effet régulateur négatif. Elles sont divisées en 4 catégories : 1°) Les phosphatases classiques ; 2) La catégorie des phosphatases de bas poids moléculaire (LMW-PTPs) ; 3) les tyrosines/thréonine phosphatases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ; 4) les tyrosines et serine/thréonines phosphatases.

Nous nous intéressons dans cette partie à une protéine phosphatase de bas poids moléculaire (ACP1 ou LMW-PTP) et à son rôle dans le système immunitaire. A partir de l'analyse d'une famille atteinte de déficit immunitaire de transmission autosomique dominante, nous pensons avoir trouvé le premier déficit immunitaire primitif associé à une mutation d'ACP1 (voir ***Résultats partie III.***).

II. Génétique fonctionnelle d'*ACP1*

ACP1 (ACid Phosphatase-1) a été découvert en 1979 (Junien et al., 1979). Auparavant, entre les années 50s et 60s, la protéine avait déjà été purifiée à partir de foie de bovins, dans les érythrocytes et dans le placenta humain (DiPietro and Zengerle, 1967; Tsuboi and Hudson, 1955). Le gène de 18 Kb et 7 exons est situé sur le bras court du chromosome 2 en position 2p25 (Bryson et al., 1995). Il code pour une phosphatase de 157 acides aminés et 18kDa qui lui doit ses autres dénominations de phosphatase de bas poids moléculaire (*Low Molecular Weight Protein Tyrosin Phosphatase* ou LMW-PTP ou LMPTP). Il existe 3 allèles (A, B et C), d'activité enzymatique différente (de la plus faible pour A à la plus forte pour C) à l'origine de 6 haplotypes (AA, AB, AC, BB, BC, CC). L'allèle B est le plus fréquent dans la population

(60%), suivi par l'allèle A (35%) et C (0,05%). L'étude des polymorphismes rs11553742 (Ser44) et rs7576247 (Gln/Arg105) permet de discriminer facilement l'allèle porté par un sujet (combinaison GC : allèle A, combinaison TA : allèle C, autre combinaison : allèle B) (Bottini et al., 2002a; Teruel et al., 2012). De plus, il existe un épissage alternatif de l'exon 3 et 4 (parfois dénommés 3 et 3bis) à l'origine de 2 isoformes de même poids moléculaire mais d'activité enzymatique différente dénommées *fast* (f) et *slow* (s) du fait de leur migration électrophorétique différente (pour un article de revue sur le fonctionnement du locus *ACP1* voir (Caselli et al., 2016). Enfin, une 3ème forme (forme C) d'activité catalytique nulle est produite par épissage des exons 3 et 4. Plusieurs études tendent à démontrer que les substrats et les régulateurs des formes *fast* et *slow* sont différents, attestant de fonctions cellulaires différentes (Alho et al., 2016; Su et al., 1994a; Zhang et al., 1998). Enfin, l'haplotype porté par un sujet donné conditionnerait le ratio de formes f et s (Dissing and Johnsen, 1992) (**Figure 11**).

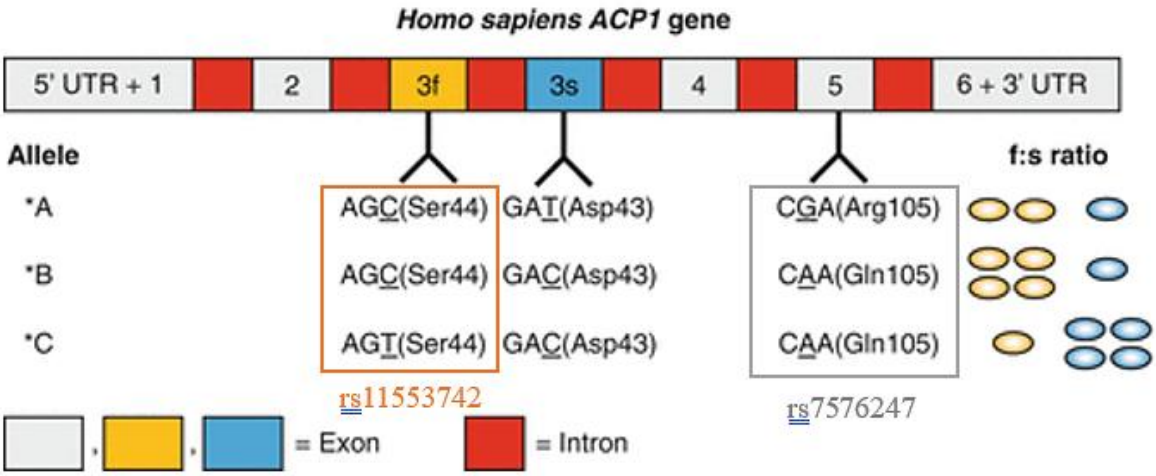


Figure 11 : fonctionnement du locus d'*ACP1* chez l'Homme

III. Fonctions protéiques connues d'ACP1

a) Ontogénie de la protéine ACP1

Sur le plan phylogénétique, la protéine ACP1 est très conservée à travers les espèces (depuis les procaryotes, jusqu'à l'Homme) (Caselli et al., 2016) (**Figure 12A**). Ainsi, l'équivalent de ACP1 chez *E. histolytica* constitue un facteur de virulence favorisant l'érythrophagocytose et la motilité du parasite. Chez les bactéries (*E.Coli*, Mycobactéries), elle

est également impliquée dans différents processus pathogènes comme l'inhibition de la phagocytose de l'hôte pour *mycobacterium tuberculosis* (Koul et al., 2004).

b) Structure de la protéine ACP1 :

La protéine ACP1 est exprimée sous deux formes actives (ACP1 *fast* et ACP1 *slow* aussi appelées IF1 et IF2) et plusieurs formes inactives (LMPTP-C ou SV4) principalement (Cirri et al., 1996; Modesti et al., 1998; Zabell et al., 2006; Zhang et al., 1998). Les deux isoformes actives, varient par la région adjacente au domaine d'activité catalytique (amino-acides 40 à 73), formant une structure tertiaire (boucle ou *P-loop*) différente leur conférant des spécificités de substrats et des activités enzymatiques différentes (Dissing and Johnsen, 1992). En particulier, les amino-acides 49, 50 et 54 (Tyr, Glu, Asn pour la forme *fast* et Trp, Asn et Arg pour la forme *slow*) sont essentiels pour la spécificité de substrats et pour la cinétique d'action des deux isoformes (Cirri et al., 1996; Stefani et al., 1993; Zhao et al., 1998). La longueur (157 aminos-acides) et le poids moléculaire de la protéine (18kDa) restent identiques entre les 2 isoformes. La structure tertiaire de la protéine est composée de 4 feuillets bêtas encadrés par 2 hélices alphas (Zabell et al., 2006; Zhang et al., 1998). Le site catalytiquement actif s'étend des acides aminés 12 à 19 et forme une séquence extrêmement conservée inter-espèce (**CLGNICRS**) entre la première hélice alpha et le premier feuillet béta (**Figure 12B**). De multiples liaisons hydrogènes entre les amino-acides (Asn15, Ser19, Ser43, His72) viennent rigidifier la structure de cette boucle enzymatique (Evans et al., 1996). Une étude de mutagenèse dirigée contre différents acides aminés de cette boucle catalytique a clairement démontré le rôle de la cystéine en position 12 de la protéine dans l'activité catalytique (Davis et al., 1994) (**Figure 12C et D**).

c) Expression de la protéine ACP1

La protéine ACP1 est quasi ubiquitaire, exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires (cellules endothéliales, érythrocytes, cellules épithéliales, nombreux tissus tels que le foie, le placenta, le système nerveux central) (Wo et al., 1992). La première étude en cristallographie a été publié dans les années 1990s (Su et al., 1994b) (**Figure 13**). Dans la cellule, il existe plusieurs localisations de la protéine. Une partie se trouve libre dans le cytosol (permettant des interactions avec des récepteurs de membrane par exemple) et une partie est

liée aux protéines du cytosquelette. La répartition dépendrait de l'état de phosphorylation de la protéine (Cirri et al., 1998).

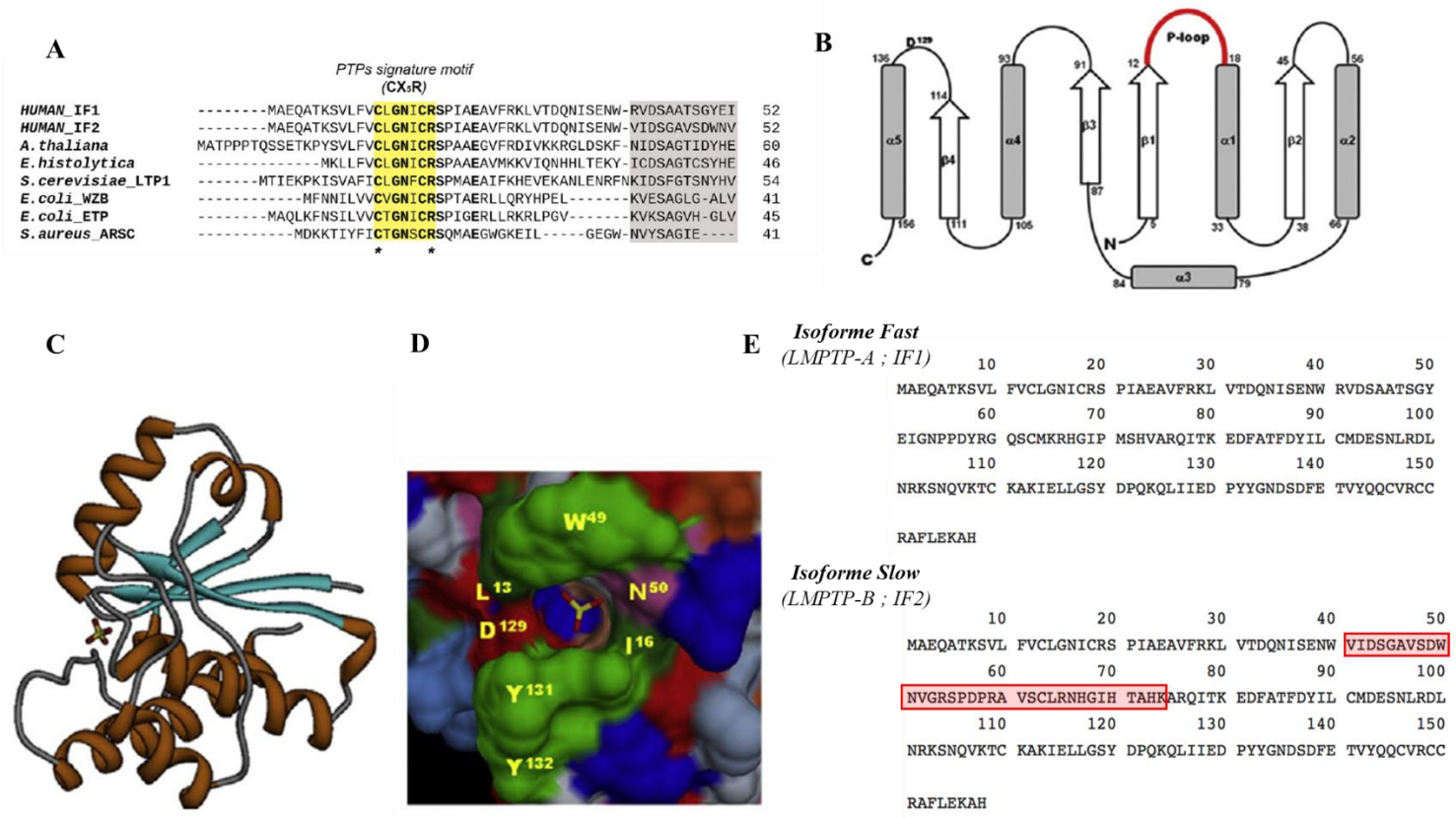


Figure 12 : structure de la protéine ACP1. Conservation phylogénique inter-espèce (A), organisation structurale (B), modélisation 3D de la protéine (C) et du site catalytique (D) et diffférences de séquence amino-acides entre la forme *Fast* et *Slow*. ((Caselli et al., 2016). *Adapté*)

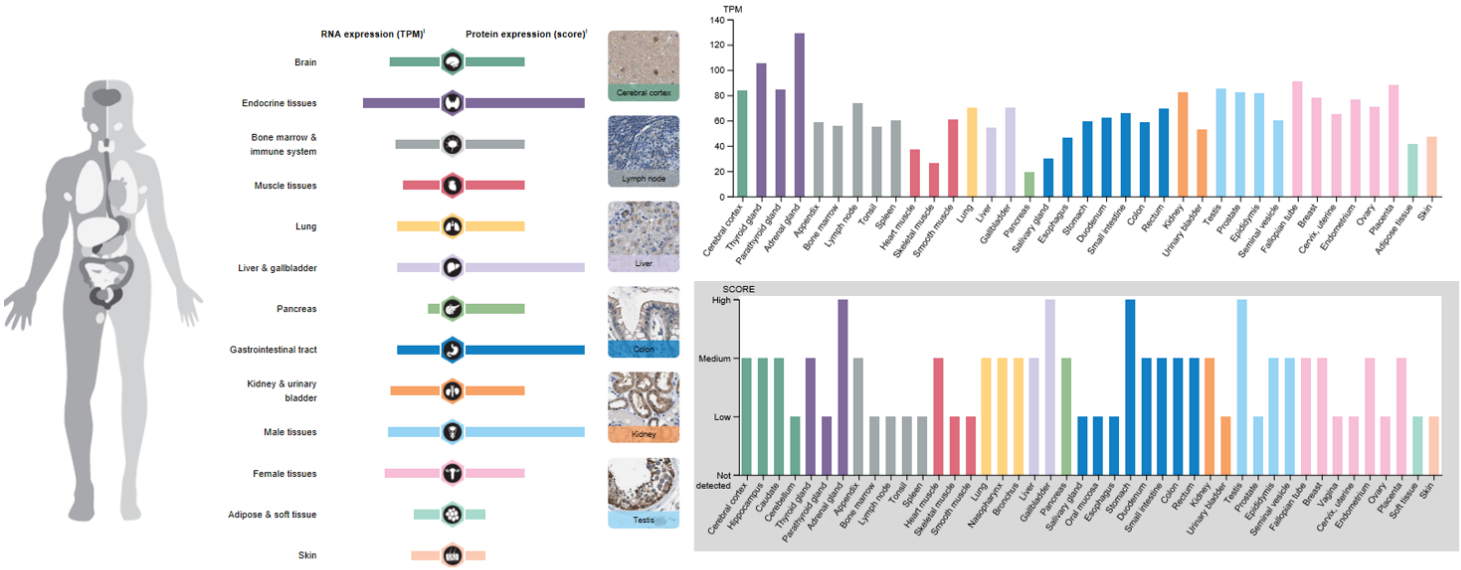


Figure 13 : Expression tissulaire de la protéine ACP1 (*données The Human Protein Atlas ; proteinatlas.org***)**

d) Fonctions de ACP1 :

- **Fonction acide phosphatase (métabolisme des flavoenzyme) :** ACP1 exerce une fonction de flavine mononucléotide phosphatase dans le métabolisme des flavoenzymes. C'est la fonction découverte en premier de cette protéine (dans les érythrocytes) et qui a été initialement le test de référence pour évaluer l'activité des isoformes protéiques (White and Butterworth, 1971).

- **Fonction phospho-tyrosine phosphatase** : ACP1 comporte un motif conservé entre les différents membres de la famille des PTPs sous la forme d'une séquence protéique CX5R(S/T) qui correspond au domaine d'activité catalytique (phosphatase) de la protéine. Dans le cas de ACP1, ce site se situe au niveau de la cystéine en position 12 de la séquence protéique (Cirri et al., 1993). Lors de la liaison à son substrat, la serine en position 19 de la séquence protéique forme un pont hydrogène avec l'anion thiol de la cystéine 12, permettant à la boucle catalytique d'adopter la conformation adéquate. Ensuite, la déphosphorylation s'opère par le transfert d'un proton à partir de l'asparagine 129. S'en suit une hydrolyse de cette liaison cysteinylphosphate thioester qui libère une molécule de phosphate inorganique et restaure la conformation initiale de la protéine (**Figure 13**) (Taddei et al., 1994).

e) Implications physiologiques et pathologiques :

Selon la situation (type de récepteur, type cellulaire), la fonction de ACP1 va être régulatrice ou activatrice du signal (résumé de ces fonctions dans la **Table 2**).
L'hyperexpression de ACP1 in vitro inhibe la prolifération cellulaire (Ramponi et al., 1992). Cet effet passe en partie par une inhibition du signal du PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*) mis en évidence dans les fibroblastes normaux et pathologiques (transformés) (Ruggiero et al., 1993). Cependant, d'autres mécanismes d'arrêt de la prolifération cellulaire induits par ACP1 sont décrits et indépendants du signal PDGFR.
ACP1 est ainsi impliquée dans la déphosphorylation de protéines tyrosines kinases telles que Src et plusieurs autres protéines de la voie STAT (diminution du signal STAT1 et STAT3) (Chiarugi et al., 1998; Zambuzzi et al., 2008). Ces interactions diminuent le potentiel prolifératif et la réponse aux mitogènes et favorisent la mobilité cellulaire (montré pour les fibroblastes et les ostéoblastes).

Des études épidémiologiques ont montré un lien entre les polymorphismes de ACP1 et plusieurs types de maladies :

1) Maladies métaboliques : diabètes de type 1 et 2 avec une augmentation des taux de glycémie chez les patients porteurs d'un allèle *Fast* (IF1) d'activité enzymatique augmentée (Iannaccone et al., 2005) mais aussi un âge de début plus précoce de la maladie chez les diabétiques de type 1 (Bottini et al., 2002b).
2) Association avec le risque de cancers et de potentiel métastatique des tumeurs (Alho et al., 2016).
3) Association avec le risque de cardiomyopathie hypertrophique (Bottini et al., 2002c).
4) Association avec certaines maladies inflammatoires (maladie de crohn, polyarthrite rhumatoïde) et allergiques (Bottini et al., 2002d, 2005)
5) Association des formes d'activité enzymatique diminuée avec la maladie d'Alzheimer (Shimohama et al., 1993).
6) Association avec les fausses couches itératives inexpliquées (Gloria-Bottini et al., 2006).

Initialement, il était rapporté que les spécificités d'action d'ACP1 dans certains types cellulaires ou tissus étaient lié au ratio de forme *fast* et *slow* (Tailor et al., 1997). Cependant, il semble que le mécanisme soit plus complexe, faisant notamment intervenir : 1. La sensibilité de la forme *slow* au GMPc (guanosine monophosphate cyclique) (Cirri et al., 1995) ; 2. La régulation de l'activité enzymatique par la phosphorylation des résidus Y131 et Y132 par v-SRC et c-SRC : la phosphorylation de la phosphotyrosine en position 131 augmente l'activité enzymatique (jusqu'à 25 fois) et en position 132 conduit au recrutement de Grb2 (Bucciantini et al., 1999; Tailor et al., 1997). 3. Une régulation par oxydoréduction des résidus cystéines (position 12 et 13) (Caselli et al., 1994), 4. Une régulation liée aux contacts cellule-cellule, 5. Une régulation de son activité liée aux interactions avec le cytosquelette (Silva et al., 2015). 6. Des substrats et des régulateurs différents entre la forme *fast* et *slow*. 7. Des substrats et des fonctions dépendants des compartiments cellulaires dans lesquelles la protéine intervient (exemple de l'interaction avec le PDGFR dans le cytosol ou avec les protéines du cytosquelette dans les cellules NIH3T3, (Cirri et al., 1998), mais aussi des durées d'interactions (courtes pour les récepteurs tyrosines kinases cytosoliques, longues pour les protéines du cytosquelette).

Nous détaillons ici quelques substrats moléculaires connus de ACP1 qui peuvent avoir une implication en immunologie.

- **PDGFR**: ACP1 interagit directement avec le PDGFR sous stimulations (courte et prolongée) qui aboutit à une déphosphorylation (tyrosine Y857) et à une régulation négative de Src et des molécules STATs (1 et 3) avec une diminution consécutive de l'expression de gènes tels que *c-myc* et *c-fos* (Bucciantini et al., 1999). Ceci a pour effet de diminuer la prolifération cellulaire. La croissance cellulaire et la densité cellulaire (confluence des cellules en culture) sous stimulation du PDGFR a pour effet d'augmenter le pool d'ACP1 disponible à la membrane et de diminuer la phosphorylation de PDGFR dans les lignées dérivées de fibroblastes ou myofibroblastes (Fiaschi et al., 2001).

- **Récepteur de l'insuline :** plusieurs études ont montré que ACP1 jouait un rôle de régulateur négatif du signal médié par le récepteur de l'insuline dans les hépatocytes et favorisait l'insulinorésistance et le développement du diabète (Gloria-Bottini et al., 2014; Iannaccone et al., 2005). Dans un modèle KO conditionnel d'*Acp1* (*Acp1*$^{-/-}$*fl)*, Stanford M et al. ont montré d'une part que les souris mutées soumises à un régime riche en sucres et en graisses développaient moins de diabète et d'autre part, que l'administration d'un inhibiteur sélectif d'ACP1 réduisait in vitro l'insulinoresistance des hépatocytes (Stanford et al., 2017).

- **Ephrines récepteurs :** ACP1 exerce un effet régulateur sur Ephrine A2 (EphA2). Ce récepteur tyrosine kinase est surexprimé par de nombreux types de cancers (mélanomes, carcinomes) et son activité est liée avec le potentiel agressif et métastatique de ces tumeurs (Kikawa et al., 2002). En particulier, le potentiel oncogénique est associé avec les formes déphosphorylées de la protéine. ACP1 favorise cette déphosphorylation et exerce donc un effet pro-oncogène. Cet effet se combine avec l'effet décrit sur le cytosquelette (partie f) ci-dessous) sur FAK et p190Rho-GAP pour favoriser le caractère invasif de la tumeur (Souza et al., 2009).

- **JAK2 et STAT5 :** Rigacci et al. ont montré que STAT5 était déphosphorylé par ACP1 in vitro dans une lignée mégacaryoblastique (DAMI) qui activent constitutionnellement la voie JAK2/STAT5. Dans ces cellules, ainsi que dans une lignée pancréatique (PaCa), ACP1 est inhibée par un signal dépendant de la NADPH reductase, ce qui entraine une augmentation de la phosphorylation et de l'activation de JAK2 et promeut la survie des cellules (Rigacci et al., 2003).

- **ZAP70 (voir partie III.).**

f) Interaction d'ACP1 avec le cytosquelette :

Le rôle d'ACP1 au niveau du cytosquelette est décrit depuis les années 90s avec les travaux de Cirri P et al. sur les cellules NIH3T3 (Cirri et al., 1998). La régulation de FAK et le recrutement de la protéine Rho favorisent le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation d'adhésions focales, mais aussi la migration cellulaire (Burridge et al., 2006). Rigacci *et al.* ont ensuite montré (sur lignée cellulaire NIH/3T3 modifiée hyperexprimant ACP1) qu'un excès d'ACP1 interfère avec la mobilité cellulaire (augmentée), les lésions focales intercellulaires (diminuées) en déphosphorylant FAK (focal adhesion kinase) après stimulation du PDGFR (Rigacci et al., 2002). Lorsque ces cellules sont marquées en immunofluorescence pour ACP1, le marquage est diffus dans le cytoplasme traduisant une localisation cytosquelettique de la protéine. L'activation de PDGFR va provoquer l'activation de c-Src qui va phosphoryler ACP1 sur ses résidus Y131 et Y132 uniquement lorsque la protéine est fixée au cytosquelette et augmenter considérablement son activité catalytique (Bucciantini et al., 1999). L'augmentation de l'expression et de l'activité de ACP1 aboutit à une déphosphorylation de FAK lors de l'engagement des récepteurs d'adhésion cellulaires tels que LFA1 (CD11a/CD18) et induit une diminution de la phosphorylation de ERK1/2. Cependant, l'interaction directe de ACP1 sur FAK n'est pas démontrée et ACP1 interagit également avec d'autres protéines du cytosquelette. De plus, ACP1 pourrait être considérée comme une protéine associée au cytosquelette plus qu'une protéine cytosolique lorsque les cellules sont adhérentes et ou activées de façon prolongées. Dans les cellules en suspension, ACP1 retrouve une distribution plutôt cytosolique (Rigacci et al., 2002).

g) Apport des modèles murins KO d'ACP1 :

Le modèle décrit par Wade et al. (Wade et al., 2015) est un modèle de KO murin par *gene trapping* (insertion d'un gène entre l'exon 4 et 5 d'*ACP1*) sur un fond génétique de souris Balb/c. Il en résulte une absence d'expression de *Acp1* (recherché dans différents tissus comme le cœur, le foie, le muscle, la graisse). Etonnamment, les souris naissent sans phénotype pathologique majeur (développement normal, pas de différence de croissance, pas d'anomalies morphologiques ou histologiques jusqu'à 16-21 mois). La souris $Acp1^{-/-}$ présente une protection vis-à-vis de la cardomyopathie de stress et les auteurs concluent que cibler ACP1 dans les pathologies cardiovasculaires pourrait être une piste intéressante.

Stanford et al. (Stanford et al., 2017) ont croisé ces souris sur un fond de souris B6 pour obtenir une souris *Acp1*$^{-/-}$ *KO B6*. Là encore, le phénotype rapporté n'est pas très morbide. Les auteurs constatent une protection vis-à-vis du diabète lorsque les souris sont placées sous un régime riche en graisse pendant 3 mois dans le modèle Acp1 KO par rapport au modèle sauvage.
Un second type d'inactivation de gène est décrit par Stanford et al. (Stanford et al., 2017). Il s'agit d'une inactivation utilisant le système de la Cre recombinase dans les cellules cibles de l'insuline. Cela aboutit là encore à une protection du risque de diabète.

A notre connaissance, il n'y a pas d'étude impliquant un KO murin qui se soit intéressée au rôle d'ACP1 dans le système immunitaire.

III. Rôle de ACP1 dans le système immunitaire

a) Association des polymorphismes d'ACP1 avec les maladies auto-immunes et allergiques

Plusieurs études ont retrouvé une association entre polymorphismes d'*ACP1* et maladies auto-immunes. Parmi celles-ci, on peut relever les associations suivantes :

- **L'eczéma et la dermatite atopique** (Bottini et al., 2002d) ***:*** pour les porteurs de l'allèle A d'ACP1 (d'activité enzymatique réduite). Par ailleurs, il existerait au sein d'une population géographique homogène, une relation opposée entre la répartition des allèles d'ACP1 selon le type de pathologie (plutôt Th1 ou plutôt Th2 médiée) : allèles d'activité enzymatique diminuée chez les patients atteints d'asthme allergique et allèles associés à une activité enzymatique augmentée plus fréquents chez les patients atteints de maladie de Crohn (Bottini et al., 2005).

- **Association entre lupus et polymorphismes d'ACP1** (Allèle C) (Teruel et al., 2012). En outre, les auteurs suggèrent qu'une augmentation du ratio de forme *slow* dans les cellules immunitaires pourrait être à l'origine d'une augmentation de leur activation et favoriserait l'auto-immunité.

Certaines études suggèrent l'absence d'association avec d'autres situations d'auto-immunité comme les cytopénies auto-immunes par exemple (Lioger et al., 2016).

- **Enfin, les porteurs de l'allèle C** (d'activité enzymatique augmentée) d'ACP1 auraient une susceptibilité augmentée pour les infections parasitaires et un taux plus bas d'IgE totales

(impliquées dans la réponse anti-parasitaire) (Bottini et al., 1999; Gloria-Bottini et al., 2010). En outre, une susceptibilité de l'allèle C pour les infections comme le paludisme pourrait expliquer sa très faible répartition dans les zones géographiques où cette maladie a été historiquement endémique (Sardaigne, plaine du Po) et serait corrélé à un comportement social de défense « immunitaire » avec un profil moins grégaire et sociable des porteurs de l'allèle C (Napolioni et al., 2014).

b) ***Rôle de ACP1 sur les lymphocytes T*** :

- **Observations initiales** : dans certaines situations pathologiques comme le cancer, il a été suggéré qu'une hyper-expression d'ACP1 augmentait l'oncogenèse et la stabilité des contacts inter-cellulaires (Chiarugi et al., 2004). Giannoni et al.(Giannoni et al., 2003) ont montré qu'une hyperexpression de ACP1 dans les cellules *Jurkat* (lignée T tumorale) était responsable d'un défaut de contact intercellulaire et qu'un défaut de fonction de ACP1 occasionnait une agrégation excessive des cellules, y compris en condition non stimulée. Ce constat suggère un rôle supplémentaire dans les lymphocytes T dans l'organisation et le remodelage du cytosquelette en dehors de la fonction sur ZAP70.

- **Interaction avec ZAP70** : ZAP-70 est une tyrosine kinase de 70kDa présentant deux domaines SH2 (Src Homology domain 2) en partie N-terminale et un domaine kinase en partie C-terminale, séparés par un interdomaine B possédant 3 sites de phosphorylation sur des résidus tyrosines : Tyr 292, 315 et 319 (Au-Yeung et al., 2009) (**Figure 13**). Le rôle principal connu de ZAP-70 est son implication dans la voie de signalisation du TCR (*T Cell Receptor*) (Chan et al., 1992). Lors de l'activation lymphocytaire T (TCR-dépendante), l'antigène qui est présenté via le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) d'une cellule présentatrice d'antigène au LT est reconnu spécifiquement via son TCR. Ce dernier est associé au complexe CD3 (constitué des chaines gamma, delta, et epsilon) et à un homodimère Zêta. Les liaisons du complexe peptide/CMH au TCR et des corécepteurs (CD4 ou CD8) au CMH conduisent à la phosphorylation des ITAMs (*Immunoreceptor family Tyrosine-based Activation Motif)* intracytoplasmiques du complexe CD3 et de la chaine Zéta par des tyrosines kinases de la famille Src (Lck ou Fyn). Par ses domaines SH2, ZAP-70 se lie aux ITAMs doublement phosphorylés de la chaîne Zêta, entrainant sa propre phosphorylation et son activation par Lck. Par la suite, ZAP-70 phosphoryle des protéines d'échafaudage (LAT et SLP76) qui transmettent

le signal en aval via l'activation de différentes voies dont PLCγ1/ERK/MAPK (Meinl et al., 2000) et des facteurs de transcription NFkB (Nuclear Factor-kappa B), NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et AP-1 (Activator Protein 1), induisant la transcription de gènes menant à terme à la prolifération et différenciation cellulaire (*Au-Yeung et al. 2017*) (**Figure 14**).

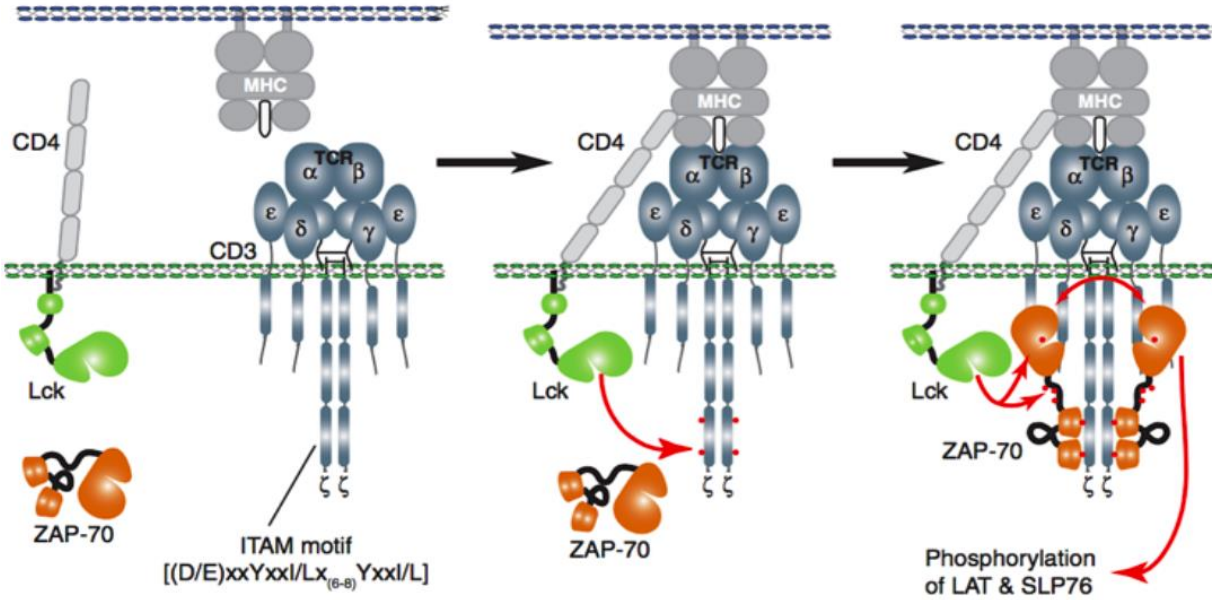


Figure 14 : recrutement de ZAP70 sur les motifs ITAM de CD3ζ après engagement de la voie du TCR (d'après (Wang et al., 2010)**).**

Les souris *Zap70*$^{-/-}$ présentent un blocage de maturation intrathymique de leur lymphocytes T au stade doubles négatives (DN) (Negishi et al., 1995). En pathologie, les mutations de ZAP70 conduisent à un DIP de type SCID avec un déficit complet et isolé en lymphocytes T CD8+, ce qui diffère du phénotype murin (Arpaia et al., 1994).

L'activation de ZAP-70 dans les LT est finement régulée via ses résidus tyrosines. Le résidu Y292 phosphorylé peut se lier à l'ubiquitine ligase c-CBL E3 et entrainer à la fois une ubiquitinylation de la chaine ζ et une désensibilisation du TCR ((Davanture et al., 2005). La phosphorylation de Tyr 292 semble ainsi jouer un rôle de régulation négative, notamment par sa liaison à Cbl (casitas B-lineage lymphoma). Toutefois, ceci n'affecte pas directement l'activité kinase de ZAP-70 ou sa liaison avec les chaînes Zéta. (Rao et al., 2000). La génération d'une souris *Zap70*^{Y292F} qui rend inactif le site Y292, montre un excès de signaling TCR avec une hyperphosphorylation consécutive de LAT, Cbl et SLP76 (*Magnan A et al. J Exp Med 2001)*. Les lymphocytes T de ces souris mutées prolifèrent plus lorsqu'elles sont stimulées, ont une diminution moins importante de l'expression de CD3ζ à la surface des LT activés,

présentent une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 et une activation de la voie des MAPK/NFKB, et produisent plus d'IL2 et IFNγ, traduisant un effet de régulateur négatif du site Y292. Une partie de cet effet régulateur passerait par l'interaction avec Cbl qui favorise la dégradation (ubiquitination) du complexe TCR-ZAP70 après activation du TCR (Naramura et al., 2002). Ce processus est essentiel pour la régulation du signal T après activation du TCR. Les souris KO pour Cbl (double KO *c-Cbl*$^{-/-}$ et *Cbl-b*$^{-/-}$) présentent une lymphoprolifération (splénomégalie, adénomégalie), une augmentation des marqueurs d'activation CD25, CD44 et CD69 et les souris Cbl-b$^{-/-}$ présentent une susceptibilité à l'auto-immunité (Bachmaier et al., 2000). Cependant, l'importance de cette interaction Y292/CBL a été remise en question dans un modèle murin transgénique, exprimant une c-CBL incapable de lier Y292, qui ne présentait pas d'altérations significatives de l'expression de ZAP-70 ni de sa fonction suggérant d'autres mécanismes régulateurs (Thien et al., 2003).

Tyr 315 et Tyr 319 sont au contraire des régulateurs positifs de l'activité de ZAP-70. Leur phosphorylation préviendrait le retour du domaine kinase dans un état d'auto-inhibition. Tyr 319 permet aussi la liaison du domaine SH2 de Lck (Pelosi *et al.*, 1999) et du domaine C-terminal SH2 de la phospholipase-Cγ (PLCγ) (Williams et al., 1999). Des mutations inhibitrices de ces résidus induisent un défaut de phosphorylation de PLC-γ et un défaut d'activation des voies d'aval (Gong et al., 2001; Magnan et al., 2001). Les résidus Tyr 492 et Tyr 493 peuvent s'autophosphoryler suite à l'engagement du TCR avec des effets opposés, Tyr 492 inhibant l'activité kinase de ZAP-70 et Tyr 493 l'activant (Wange et al., 1995).

Dans ce schéma d'activation, ACP1 interviendrait en jouant le rôle de régulateur positif de ZAP70 (activation) en déphosphorylant Y292. Le schéma d'interaction entre ZAP70, Cbl et ACP1 reste à préciser. Lorsque de faibles doses d'ACP1 sont administrées à des cellules *Jurkat* activées par la voie du TCR, on observe une augmentation de la phosphorylation globale de ZAP70 (principalement liée à la phosphorylation des résidus Y492 et Y493) et a pour effet d'augmenter l'activité catalytique (kinase) de ZAP70. L'effet sur la phosphorylation globale de ZAP70 passerait par une déphosphorylation du site Y292 car aboli dans un modèle de *Jurkat* ZAP70 Y292F mutant. Enfin, ACP1 augmente l'activité kinase de Erk dans les cellules *Jurkat*. Cette déphosphorylation semble assez spécifique mais entre en compétition avec Cbl qui intervient sur le même site de ZAP70 (Bottini et al., 2002a).

Le rôle de ZAP70 est également connu dans d'autres types cellulaires : ZAP70 est exprimé dans les lymphocytes B pathologiques de LLC (Rosenwald et al., 2001). Des mutations hypomorphes de ZAP70 dans les lymphocytes non tumoraux favoriseraient la rupture de tolérance comme cela a été montré chez la souris (Siggs et al., 2007)) avec un défaut de développement des LT régulateurs, une hypergammaglobulinémie et la présence d'anticorps anti-nucléaires, et plus récemment chez l'Homme (Poliani et al., 2013; Shirkani et al., 2017; Turul et al., 2009).

- **Interaction avec LFA1** : LFA1 (*lymphocytes function-associated protein 1*) est un récepteur présent à la surface des lymphocytes T qui est activé par la liaison aux intégrines de type ICAM (*InterCellular Adhesion Molecule*) : ICAM1, ICAM2 et ICAM3. Lors de l'activation lymphocytaire T, le signal LFA1 entraine la phosphorylation de FAK et induit le remodelage du cytosquelette d'actine. L'hyper-expression de ACP1 dans les cellules *Jurkat* diminue les contacts inter-cellulaires médiés par le signal LFA1 (Giannoni et al., 2003).

- **Conclusion sur le rôle de ACP1 dans les lymphocytes T** : sur la base des données de la littérature, la fonction de ACP1 dans les lymphocytes T pourrait sembler paradoxale. En effet, d'une part, la déphosphorylation de FAK dans les lymphocytes T exerce un contrôle négatif sur l'activation et l'adhésion lymphocytaire T (Souza et al., 2009) ; d'autre part, ACP1 pourrait exercer un effet activateur en déphosphorylant un site régulateur de ZAP70 (Mustelin, 2004).

A dose physiologique, dans les cellules *Jurkat*, ACP1 augmente la phosphorylation de ZAP70 et consécutivement active le signal T et la phosphorylation de la voie ERK (Bottini et al., 2002a). **A dose supra-physiologique, en cancérologie,** la surexpression de ACP1 provoque une diminution de la prolifération cellulaire et de la capacité à former des colonies et une augmentation de la capacité métastatique.

En fait, cet effet n'est pas forcément paradoxal si on considère que ces actions sont médiées par deux types de signaux différents (dans un cas, l'activation prolongée d'un élément du réarrangement du cytosquelette et dans l'autre, l'activation rapide de la cellule par la voie de son récepteur membranaire (ici, le TCR) et la molécule associée ZAP70).

- **Remarques complémentaires concernant le rôle de ACP1 au sein du système immunitaire** : à notre connaissance, il n'y a pas d'étude qui se soit intéressée au rôle de ACP1

dans d'autres types de cellules du système immunitaire. En particulier, il n'y a pas de données sur les lymphocytes B et/ou NK, les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. En outre, cette étude serait particulièrement intéressante s'il on considère d'une part l'implication d'ACP1 dans la cancérogenèse et d'autre part les applications des fonctions connues d'ACP1 dans la régulation du cytosquelette d'actine dans la formation de synapses immunologiques, la motilité cellulaire et la phagocytose. Quelques données sur le rôle d'ACP1 dans les plaquettes, dans lesquelles ACP1 se lie au récepteur FCγRIIA et diminue la régulation de l'activation induite par la liaison de complexes immuns circulants à ce récepteur, ouvrent des pistes sur le lien entre immunité innée humorale et fonctionnalité d'ACP1 (Mancini et al., 2007).

IV. Modulation de l'activité de ACP1 :

Le développement d'un inhibiteur sélectif d'ACP1, biodisponible au niveau intracellulaire, voire tissu/cellule spécifique et spécifique de l'une ou l'autre isoforme de la phosphatase pourrait avoir un intérêt majeur pour différentes pathologies (diabète, cancer, maladies inflammatoires et auto-immunes). Différents écueils sont signalés dans la littérature :

- Le caractère extrêmement conservé des PTPs de bas poids moléculaire
- La charge électrique importante de la protéine
- La conformation de la zone catalytique (petite et profonde)

Les stratégies possibles suggérées dans la littérature sont :

1) **Utilisation des purines** : in vitro, chez la levure *Saccharomyces cervisiae* l'adénine inhibe l'activité de la forme *Fast* de ACP1 tandis que l'hypoxanthine est activatrice. En revanche, l'hypoxanthine est sans effet sur l'activité de la forme *slow* (Wang et al., 2010).

2) **Utilisation des réactions d'oxydoréduction (via le NO)** : les molécules capables de produire du NO (S-nitrocysteine, sodium nitroprusside et 3-morpholinosydnomine) sont capables d'inhiber l'activité catalytique de ACP1. Le NO agit sur les cystéines (C12 et C17) du site catalytique de ACP1 en formant un pont disulfure (Caselli et al., 2016).

3) **Inhibition de ACP1 par ses substrats** : les 2 isoformes actives d'ACP1 interagissent avec la cavéoline-1 qui exerce un effet régulateur de la forme cytosolique/membranaire de ACP1 (Caselli et al., 2007).

4) **Modulation de la phosphorylation de la protéine ACP1** : Les Tyrosines 131 et 132 de ACP1 subissent une phosphorylation/déphosphorylation (par v-Src et c-Src) qui peut moduler l'activité enzymatique de la protéine (Bucciantini et al., 1999; Tailor et al., 1997). La phosphorylation en position 131 interviendrait dans la régulation positive de l'activité enzymatique, tandis que la phosphorylation du résidu tyrosine 132 régulerait négativement la fonction enzymatique (Chiarugi et al., 2000). Y132 interviendrait également dans la formation d'oligomères inactifs de ACP1 ; autre mécanisme possible de régulation de l'activité de la protéine (Blobel et al., 2009). Cependant, les mutants Y131 et Y132 d'ACP1 continuent à se localiser dans le cytosquelette, suggérant qu'une partie au moins de l'action de ACP1 au sein du cytosquelette est indépendante de l'état de phosphorylation de la protéine (Rigacci et al., 2002).

5) **Recherche d'inhibiteurs spécifiques :** Stanford M et al. (Stanford et al., 2017) décrivent plusieurs inhibiteurs dont l'un spécifique de ACP1 qui possède une activité inhibitrice préférentielle pour ACP1 *fast*. L'effet de l'inhibition est réversible. L'effet de leur molécule est d'empêcher la fonction catalytique de la protéine en empêchant l'accès de la molécule d'eau, nécessaire à la dernière étape de la catalyse d'ACP1 sur son substrat, par une liaison à la molécule de phosphocystéine formée de façon transitoire lors de la déphosphorylation. Par ailleurs, les auteurs montrent que la mutation des tyrosines Y49, Y132 et Y131 de ACP1 *fast* réduit fortement les capacités d'inhibition de la protéine par leur molécule inhibitrice, renforçant la notion de rôle de ces tyrosines dans la fonction catalytique de la protéine.

PROJET DE THESE

Nous l'avons vu dans l'introduction : derrière le paradoxe un peu trivial de l'association déficit immunitaire primitif et maladies auto-immunes, se cache une problématique complexe sur le plan physiopathologique avec des enjeux cliniques et thérapeutiques importants.

Sur le versant du déficit immunitaire primitif, mieux comprendre les fondements de ces maladies permettrait d'envisager une prise en charge plus adaptée des patients qui gardent un pronostic évolutif sévère lorsqu'ils cumulent les complications infectieuses et les dommages d'organes liés à leur déficit immunitaire et les complications liées aux immunosuppresseurs.

Sur le versant des maladies auto-immunes systémiques, l'enjeu est de mieux comprendre les voies physiopathologiques qui mènent à un phénotype donné pour mieux « classer » les patients et mieux cibler les traitements. En effet, si l'on prend l'exemple du lupus, de nombreuses thérapies ciblées qui pouvaient apparaitre séduisantes sur le plan fonctionnel, n'ont pas passé la barre des essais cliniques et ont échoué à améliorer le pronostic et la qualité de vie des malades.

L'objet principal de ma thèse était d'étudier les mécanismes de rupture de tolérance au cours des déficits immunitaires primitifs.

Ma thèse s'est développée autour de cette problématique au sein des thématiques de notre équipe de recherche (*homéostasie lymphocytaire et auto-immunité*). J'ai aussi pu tirer parti de mon activité clinique (CCA d'Immunologie Clinique et Médecine Interne au CHRU de Strasbourg), pour établir des ponts entre mes questions de recherche et mes questions cliniques. Je suis, dans ce sens, investigateur d'un APJ Jeune Chercheur (DRCI Grand Est, *NCT03427593 ClinicalTrial.gov*), qui constitue la **Partie I** des résultats de cette thèse (sur les liens physiopathologiques entre DIP et cytopénies auto-immunes au cours du DICV/CID). J'ai par ailleurs pu m'intéresser à la génétique des patients lupiques en tirant parti d'un projet en cours dans le laboratoire sur les patients de la cohorte tri-nationale LBBR de plus de 1200 patients lupiques. Ces résultats constituent la **Partie II** de cette thèse. Enfin, parmi les patients suivis au service dans le cadre du centre de compétence des déficits immunitaires héréditaires de l'adulte (Pr Anne-Sophie Korganow), nous avons pu étudier une famille atteinte de forme sévère de déficit immunitaire combiné et d'auto-immunité, identifiant par ce biais un nouveau gène candidat de DIP. Il s'agit de la **Partie III** de cette thèse.

Les questions qui ont guidé ces différents volets ont été :

1°) ***Peut-on identifier des voies physiopathologiques communes qui conduisent à une rupture de tolérance sur la base d'analyses génétiques de cohortes homogènes de patients ?***

- Nous partons ici de l'hypothèse que certains déficits immunitaires de l'adulte tel que le DICV n'ont pas de mutation génétique connue en raison d'une multigénicité et/ou de la combinaison de plusieurs composantes. Nous supposons qu'une analyse groupée de patients présentant un même phénotype pourrait améliorer la recherche de variants et de gènes candidats (**Partie I**).

- Nous avons souhaité vérifier, dans l'autre sens, l'hypothèse selon laquelle il existe des variants partagés ou une éventuelle oligogénicité (voies physiopathologiques communes) lorsque l'ont restreint l'analyse génétique des maladies auto-immunes complexes à des phénotypes restreints en prenant l'exemple du syndrome d'EVANS (PTI+AHAI), avec un début jeune de la maladie (avant 30 ans) (**Partie II**).

2) Que nous apprennent les formes monogéniques de rupture de tolérance immunitaire (DIP) sur les phénomènes généraux d'auto-immunité ?

- Cette question est développée au cours de la **Partie III** de mon travail. Nous avons identifié un nouveau gène impliqué dans un DIP. Au dela de la validation fonctionnelle de l'implication de cette mutation dans notre famille, l'intérêt de cette partie de mon travail est d'explorer la problématique des liens entre rupture de tolérance et déficit immunitaire.

MATERIEL & METHODES

I. PATIENTS ET TEMOINS :

- Les échantillons biologiques issus de patients ont été obtenus après consentement écrit dans le cadre de la biobanque INTERREG LBBR, du projet APJ DICEP, ou de l'étude DEFI. Ceux issus de témoins provenaient de volontaires sains (donneurs de sang à l'EFS de Strasbourg ou volontaires prélevés à l'hôpital dans le cadre des projets à la DRCI de Strasbourg). Ces différents projets ont été soumis à un CPP (Comité de Protection des Personnes) et bénéficient d'une autorisation spécifique.
- En particulier, pour les analyses génétiques, une information spécifique est donnée au patient et un délai de réflexion est respecté. Le patient informe ses proches pour l'analyse en trio et nous collectons les prélèvements au cours d'une consultation dédiée en présence des proches ou par envoi d'un kit d'extraction d'ADN à partir de la salive.

II. GENETIQUE ET ANALYSES *IN SILICO*

a. *Séquençage haut débit (NGS)* :

- **Obtention de l'ADN génomique :** l'ADN génomique est extrait du sang total en utilisant le kit d'extraction *QIAamp DNA blood Mini* de Qiagen® selon les recommandations du fabricant. La quantité d'ADN et la pureté sont vérifiées par dosage au Nanodrop® et sur Qbit® et par une migration sur gel.
- **Exome Sequencing :** les séquençages d'exomes ont été réalisés sur la plateforme de séquençage de l'institut Imagine (Paris, France) sur séquenceur Illumina HiSeq2500®. Les séquences obtenues ont été alignées sur la version Hg19 du génome humain. La moyenne de profondeur de lecture des exomes était supérieure à 300X et supérieure à 30X pour plus de 90% des séquences.
- **Panels NGS :**
    - **Panel NGS Imagine (Collaboration Frédéric Rieux Laucat, IHU Imagine, France) :** le panel BAIT1 comporte 235 gènes. Il a été conçu à partir des gènes connus impliqués dans des formes monogéniques de DIPs ou à partir de gènes candidats. Il couvre une région de 813,556kb avec essentiellement des régions codantes (exons) et les jonctions

exons-introns et régions régulatrices des gènes d'intérêt (librairies constituées avec 50mB SureSelect Humall All Exon Kit V3, Agilent Technologies®). Les variants sont identifiés en utilisant GATK Unified Genotyper et Freebayes et les annotations de gènes en utilisant la dernière version de Ensembl® et alignées sur la version Hg19 du génôme humain. La profondeur de lecture est supérieure 30X pour plus de 90% des séquences. Les variants annotés sont analysés dans polyweb® en utilisant les données bioinformatique de la plateforme Paris Descartes.

- **Panel NGS Fribourg (Collaboration Bodo Grimbacher, Reihnard Voll, Freibourg) :** sur un principe similaire à celui du panel BAIT détaillé ci-dessus, un panel de 135 gènes impliqués dans les lupus monogéniques, les DIPs avec auto-immunité et les GWAS de lupus a été conçu (détail des gènes de cette puce donné en Annexe 1 de la partie II des résultats). La méthode d'analyse à partir des fichiers annotés VarRank a été la même que celle décrite précédemment.

- **Analyse d'exome et de séquençage haut débit :**

L'analyse des variants issus du panel NGS ou des données d'exomes a été réalisée sur le logiciel Polyweb® de la pateforme Imagine (IHU Imagine, Paris, France). Pour le projet Lupus + EVANS, nous avons travaillé à partir des fichiers Varank fournis par nos collaborateurs allemands après une première étape d'analyse. Nos critères d'analyses sont les suivants :

1°) La fréquence du variant dans la population (bases de données 1000G, GnoMAD, *In-house*) : le seuil de 1% est utilisé dans un premier temps pour étudier la liste de façon globale, puis nous affinons jusqu'à 1/10 000 ou sur les variants inconnus.

2°) Les scores bio-informatiques :

- SIFT® : basé sur le degré de conservation de l'amino-acide, ce score (entre 0 et 1) est considéré comme délétère lorsqu'il s'approche de 0. Un score inférieur à 0,05 est retenu comme significatif.
- POLYPHEN-2® : prédit les conséquences physico-chimiques d'une mutation sur la base des modifications provoquées par la mutation. Ce score entre 0 et 1 est considéré comme délétère lorsqu'il s'approche de 1. Ici un seuil de 0,85 est fixé.
- MUTATION TASTER® : nous avons regardé la conséquence prédite par ce logiciel (*disease causing* ou *polymophism*)

- Score CADD® : plus ce score est élevé, plus les conséquences sont délétères (Kircher et al., 2014).

3°) Une vérification de chaque variant retenu a été faite sur Alamut® (localisation sur le transcrit, existance de mutations connues dans la région concernée, type de mutation, couverture de la zone séquencée).
4°) La vérification de la pathogénicité connue de chaque variant dans ClinVar (NCBI).
5°) Une fois triés de la sorte, nous avons regardé l'implication physiopathologique de chaque variant pour envisager la corrélation génotype/phénotype et l'implication potentielle d'une même voie physiopathologique (utilisation de différentes bases comme Immgen®, Omim®, Gencards®).

b. Séquençage Sanger (Collaboration C.Stoetzel, Inserm U1112):

Nous avons mis au point des PCR de séquençage pour les exons des gènes d'intérêts issus de l'analyse d'exome en trio de la famille décrit dans la partie III des résultats. Pour le gène ACP1, des PCR de tous les exons ont été mises au point.
La table ci-dessous donne les couples d'amorces utilisés pour ces PCR.
Brièvement, le séquençage se fait avec 35 cycles d'amplifications sur thermocycleur dans 100µL de milieu. On utilise une polymérase GoTAQ® ou Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) et 50ng d'ADN à amplifier. Les programmes (température d'élongation) sont optimisés par gradient de température pour déterminer la température optimale de chaque couple d'amorces. Du DMSO 5% et/ou de la Bétaïne sont rajoutés selon le rendement de la PCR et la structure de la région à amplifier (riche en GC ou non).

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length
TBXA2R-ex4-F	CTATGTCCCTCCCCATCCTT	289 bp
TBXA2R-ex4-R	GCTGGGATTACAGGCGTAAG	
LTBP1-ex18-F	CTGGGAGATGGGAGAGGTTT	205 bp
LTBP1-ex18-R	CAGCTGACTCACCCTCACAA	
ACP1-ex3F	AACTCCTCTGGGCAGGAAAT	253 bp
ACP1-ex3R	CGTTCCAGTCAGAAACAGCA	
TCF7-3'UTR-F	CCAGGTCTCTCCACTGCTCT	165 bp
TCF7-3'UTR-R	TGTCACTTTCAGGGGGTAGG	
PRKDC-ex75-F	TGAATCACTCCTCCTTGATCC	240 bp

PRKDC-ex75-R	GCTTCATTTAACATTGGGTGGA	
KMT2B-ex3-F	GCTGGAAAAAGCAGGAACAG	279 bp
KMT2B-ex3-R	GTGGAGGGGATGGTAGAGGT	
XKR6-ex1-F	CCAGTAGCACGAGGAGGTGT	222 bp
XKR6-ex1-R	GGAGCTGGGAAGAGAGTCAA	
ACP1-Ex1F	CAGGCGTGGCTCTCACAC	397bp
ACP1-Ex1R	GAGGGGACCCAGGTTTAGC	
ACP1-Ex2F	TACTTGGCTGGTTGGTTGGTGTCA	648bp
ACP1-Ex3R	GAACAAGACTTGTCTACCTGTCT	
ACP1-Ex4F	TTCTTTGCAGTACAATTTTGAGAAA	466bp
ACP1-Ex4R	TCCCTTTTCTAAGGTGTATTTCCTT	
ACP1-Ex5R	CTGCTGAGTGTTCCGTTTCA	593bp
ACP1-Ex6F	GAAACAGTAAGTCAACTGAACAAAGA	
TBXA2R-ex3cF	CTGGAGTACAGTGGCACGAT	292bp
TBXA2R-ex3cR	CTTCTGGACCCAAAGGAAAA	

Table 2 : amorces utilisées pour la ségrégation en Sanger (projet ACP1)

c. RNA-sequencing (Collaboration C.Keime IGBMC) :

- **Tri cellulaire et extraction des ARN totaux**. Les lymphocytes T $CD4^+$ et B du patient (en duplicat) et de 4 témoins ont été isolés par tri cellulaire magnétique négatif. L'analyse après tri a révélé une pureté supérieure à 95% (vérifié en cytométrie de flux). Les ARN totaux ont été extraits à partir de ces cellules, en utilisant le kit RNeasy micro kit (Qiagen®, Germantown, Etats-Unis) selon les instructions du fournisseur, incluant une étape d'élimination des ADN sur colonne.

- **Préparation des librairies et séquençage**. Les étapes de préparation des librairies et de séquençage ont été réalisées par l'équipe de la plateforme GenomEast de l'IGBMC, Illkirch, France. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été générés à partir d'1ng d'ARN total en utilisant le protocole Clontech SMART-Seq® v4 Ultra Low Input RNA (Clontech Laboratories, Mountain View, Etats-Unis). Brièvement, l'ADNc a été généré par transcriptase inverse en présence d'amorces polydT (3' SMART-Seq® CDS Primer II A) d'oligonucléotides (SMART-Seq® v4 Oligonucleotide), et d'une transcriptase inverse (SMARTScribe™ Reverse Transcriptase). Les ADNc ont été amplifiés par PCR longue distance (12 cycles) en présence

d'une ADN polymérase (Seq-Amp™ DNA polymérase) puis purifiés en utilisant le kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Les librairies ont ensuite été générées à partir de 600pg d'ADNc pré-amplifiés en utilisant le protocole Illumina® Nextera XT DNA Library Prep (Illumina®, San Diego, Etats-Unis) qui comporte une étape de tagmentation (fragmentation et ajout d'adaptateurs), d'amplification par PCR (douze cycles) et de purification (élimination des fragments courts, kit Agencourt AMPure XP). Les librairies ont ensuite été quantifiées et validées sur Bioanalyser (Agilent) puis séquencées par synthèse avec ajout de dinucléotides terminateurs réversibles marqués par un fluorochrome sur le séquenceur Hiseq4000 (Illumina®) en « single read » 50 paires de bases (pb).

- **Analyse Bioinformatique**. Après séquençage, une étape de pré-traitement en utilisant le logiciel Cutadapt (version 1.10) a permis d'éliminer les adaptateurs et les lectures (« reads ») de mauvaise qualité (score Phred inférieur à 20). Les lectures résultantes de moins de 40 pb ont été éliminées. Elles ont été alignées sur des séquences d'ARN ribosomaux (ARNr) pour éliminer les ARNr en utilisant le logiciel Bowtie (version 2.2.8). Puis les lectures ont été alignées sur la dernière version du génome humain (hg38, logiciel STAR v2.5.3a). L'expression des gènes a été quantifiée avec le logiciel HTSeq v0.6.1p1, en utilisant les annotations de la version 91 d'Ensembl. L'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les échantillons du patient et des témoins a été effectuée selon la méthode de Love en utilisant R et la librairie Bioconductor DESeq2 (version 1.16.1). Seuls les gènes avec une variation<100% entre les duplicats du patient ont été considérés. Une valeur de $p \leq 0,01$ a été retenue pour considérer la différence d'expression comme significative, après ajustement pour les comparaisons multiples d'après la méthode Benjamini-Hochberg. Les résultats ont été interprétés à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis et DAVID®.

d. *Q-PCR* :

- **Extraction d'ARN** : l'ARN est extrait à partir des populations cellulaires d'intérêt en utilisant le kit RNeasy Micro Kit (Qiagen®) adapté aux échantillons de moins de 5 millions de cellules. La quantification de l'ARN obtenu après procédure conforme aux recommandations du fabriquant, se fait sur NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®).

- **Production de l'ADNc** : la rétro-transcription se fait à partir de 5 à 10 ng d'ARN. Un volume de 4 µL de mix, contenant 2 µL de Random primer (0,5 µg/mL) (Promega) et 2 µL de dNTP Mix (10 mM) (Invitrogen) était déposé dans des barrettes à PCR (Sarstedt), auquel étaient ajoutés 9 µL d'ARN extrait, pour un volume final (Vf) de 13 µL. Après une incubation à 65°C 5 min, le mélange était immédiatement placé 1min sur glace puis étaient ajoutés 7 µL d'un deuxième mix, contenant 4 µL de 5X Buffer (Invitrogen), 1 µL de dithiothréitol (DTT) (Invitrogen), 1 µL de RNAse out (Invitrogen) et 1 µL de Superscipt III (Invitrogen), pour un Vf de 20 µL. Après amplification en thermocycleur (25°C 5 min, 50°C 45 min et 70°C 15 min), l'ADNc était immédiatement utilisé pour la suite des expériences ou conservé à -80°C.

- **Etape de pré-amplification** : lorsqu'elle est nécessaire, l'étape de pré-amplification est réalisée en utilisant le kit TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems®).

- **q-PCR :** les q-PCR sont réalisées en utilisant la methode TaqMan® ou SybrGreen® (normalisé sur la ROX) sur l'appareil StepOnePlus® (Applied Biosystem®). 5µL d'ADNc pré-amplifié, 10µL de tampon Taqman™, 1µL de sonde Taqman™ pure et 4µL d'eau (« RNAse Free Water ») ont été déposés par puit. Tous les échantillons ont été analysés en triplicats. La réaction a été réalisée dans un thermocycleur (StepOne Plus, Applied BioSystem™) selon le programme suivant : 10min à 95°C puis 40 cycles : 15sec à 95°C, 1min à 60°C. Les sondes Taqman™ et les amorces SybrGreen® sont détaillées dans la **Table 3.** L'expression relative des gènes d'intérêt a été normalisée par rapport à la moyenne d'expression de deux gènes de ménage : *GAPDH (Hs99999905_m1),* et *HPRT1 ((Hs01003267_m1)* selon la méthode des ΔΔCt. L'analyse des résultats a été réalisée au moyen du logiciel StepOnePlus (Applied Biosystem™).

- La **Table 3** ci-dessous donne les primers utilisés pour les qPCR :

TAQMAN	Séquence	Ref
GAPDH	RefSeq NM_001289746.1	Hs99999905_m1
HPRT1	RefSeq NM_000194.2	Hs01003267_m1
ACP1 43	RefSeq NM_007099.3	Hs00964346_m1
ACP1 77	RefSeq NM_007099.3 et Nm_001040649.2	Hs00962877_m1
ZAP70	RefSeq NM_001079.3 et NM_207519.1	Hs00896347_m1
LAT	RefSeq NM_001014987.1 et NM_001014988.1	Hs01065372_g1
NFKB 1	RefSeq NM_001165412.1 ; NM_001319226.1 ; NM_003998.3	Hs00765730_m1

SYBRGREEN		
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	378404907c1
HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA	164518913c1
ZAP70	CGAGCGTGTATGAGAGCCC ATGAGGAGGTTATCGCGCTTC	46488943c1
LCK	TGCCATTATCCCATAGTCCCA GAGCCTTCGTAGGTAACCAGT	112789547c1
LAT	GATGAGGACGACTATCACAACCC GAAGGCACTGTCTCGGATGC	62739158c1
ACP1 Slow	**TGCTGTTTCTGACTGGAACG** **TTGTGGATCATAGCTCCCAA**	Non commerciale
ACP1 Fast	TCCGGGTATGAGATAGGGAAC TCAGATTGCTTTCATCCATACA	Non commerciale

Table 3 : amorces utilisées en qPCR (Taqman® et Sybergreen®)

- **La Figure 15** ci-dessous illustre la localisation des couples d'amorces utilisés pour les qPCR d'ACP1 (remerciements C. Stoetzel) :



Figure 15 : localisation des amorces utilisées pour la qPCR SybrGreen d'ACP1.

III. CYTOMETRIE DE FLUX

a. Principes généraux :

- **Isolement des lymphocytes à partir des PBMCs :** pour toutes les expériences sur cellules humaines, les PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) ont été isolé par gradient de densité sur Ficoll (centrifugation 30 minutes à 2500rpm) suivi de 2 lavages PBS.

- **Isolement des lymphocytes T CD4 et CD19 :** les lymphocytes sont isolés des PBMCs en utilisant un tri magnétique négatif sur colonne (société Miltenyi®). Pour les CD4, le kit utilise un couple d'anticorps couplés à la biotine : CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ, and CD235a (Glycophorin A) et pour le tri CD19 le cocktail suivant : CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, and CD235a (glycophorin A). Les anticorps sont incubés pendant 5 minutes à +4°C puis un anti-isotype couplé à une bille magnétique (incubé 10 minutes à +4°C) permet de trier les cellules (en laissant passer les cellules non marquées d'intérêt CD4 ou CD19).

- **Principes généraux du marquage en cytométrie de flux :**
  Les cellules sont centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes et resuspendues dans le tampon de FACS (PBS-BSA-EDTA : PBE). Les cocktails d'anticorps sont incubés 20 à 30 minutes à +4°C avec les cellules à l'abri de la lumière avant d'être lavés 2 fois en PBS avant le passage au FACS.
  La viabilité est estimée en utilisant le marqueur FVD780 (Fixable Viability Dye) (eBioscience® ref.65-0865) au début des expériences de cytométrie (incubation 30 minutes, suivie de 3 lavages PBS).
  Un contrôle isotypique et une FMO (Fluorescence Minus One) sont réalisés lors de la calibration des expériences et en fonction du matériel disponible lors des expériences suivantes.
  Pour estimer les quantités de protéine en cytométrie de flux et l'intensité de leur expression membranaire ou intracellulaire, nous utilisons la MIF (Moyenne d'Intensité de Fluorescence) ou un ratio de la MIF de l'anticorps marqué sur la MIF du contrôle isotypique avec le même fluorochrome.

b. Immunophénotypages membranaires :

- **Liste des anticorps couramment utilisés :**

Cible antigénique	Isotype	Clone	Fluorochrome couplé	Fournisseur
CD19	IgG1 Mouse	J3-119	APC-AF700	Beckman Coulter
CD19	IgG1κ Mouse	HIB19	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen™
CD21	IgG1κ Mouse	B-ly4	FITC	BD Pharmingen™
CD24	IgG2aκ Mouse	ML5	PE	BD Pharmingen™
CD27	IgG1κ Mouse	M-T271	APC	BD Pharmingen™
CD27	IgG1 Mouse	B12701	APFC-AF750	Beckman Coulter
CD38	IgG1κ Mouse	HIT2	PE-Cy7	BD Pharmingen™
CD69	IgG1κ Mouse	H1.2F3	APC	BD Pharmingen™
CD86	IgG1κ Mouse	2331 (FUN-1)	FITC	BD Pharmingen™
IgD	IgG2aκ Mouse	HI10a	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen™
IgM	IgG1κ Mouse	G20-127	PE-CF594	BD Pharmingen™
CXCR5	IgG2b, κ Rat	RF8B2	AF-488	BD Pharmingen™
CXCR3	IgG1, κ, Mouse	1C6	APC	BD Pharmingen™
CCR6	IgG1, κ, Mouse	11A9	PE	BD Pharmingen™
CD57	IgM kappa	TB03	PE-Vio770	Miltenyi®
CD45RA	IgG2b	T6D11	PerCP Vio700	Miltenyi®

Table 4 : liste des anticorps usuellement utilisés dans les panels de cytométrie.

- **Les principaux panels utilisés pour l'immunophénotypage sont représentés ci-dessous :**

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8
Marquage 1 (T-reg)	LRBA + Anti-Rabbit-FITC	CTLA4-PE	CD45RA-Vio615	FoxP3 PerCp Cy5.5	CD127-PC7	CD25-APC	CD4-AF700	Fixable Viability Dye eFluor 780
Marquage 2 (TFh/Th1/Th2/Th17)	CXCR5 AF488	CCR6-PE	CD45RA-Vio615			CXCR3-APC	CD4-AF700	Fixable Viability Dye eFluor 780
Marquage 3 (B DICV)	CD24-FITC	CD27-PE	IgM-PeCf	IgD PerCp	CD38-PC7	CD21-APC	CD19-AF700	Fixable Viability Dye eFluor 780
Marquage 4 (B activation)	BAFFR	CD86-PE	CD27-PeCf	IgD PerCp	HLA-DR PeVio770	CD69 PE-Vio770	CD19	Fixable Viability Dye eFluor 780

Marquage 5 (T Activation)	CXCR5 AF488	CCR6-PE	CD45RA-Vio615	CD3 PerCp	CD69 PE-Vio770	CXCR3 APC	CD4 AF700	Fixable Viability Dye eFluor 780
Contôle Iso	Anti-rabbit FITC	IgG2aKappa-PE	CD45RA-Vio615	FoxP3 PerCp Cy5.5	CD127-PC7	CD25-APC	CD4-AF700	Fixable Viability Dye eFluor 780

Table 5 : Principaux panels utilisés pour l'immunophénotyage des patients (DIPs) et des témoins.

c. Mise au point d'un marquage CTLA4 et LRBA :

- **Tri des lymphocytes CD4+** : les lymphocytes T CD4+ sont trié après Ficoll par tri magnétique négatif sur colone selon la méthode détaillée précédemment.
- **Stimulation :** Les lymphocytes T $CD4^+$ ont été stimulés à 37°C avec du PMA à 10ng/mL ou des billes magnétiques couplées à un anti-CD3/anti-CD28 (Thermo Fischer® ref : 11161D) pendant 30 minutes.
- **Détermination de la quantité totale de LRBA et CTLA4 :** une partie des lymphocytes TCD4 triés et mise de côté (20 000 à 100 000 cellules) et perméabilisée (kit FoxP3 permeabilisation buffer, eBioscience®) selon les recommandations du fabricant, puis bloquée par du SVF (2µL) pendant 15 minutes. Le marquage intracellulaire CTLA4 et LRBA est ensuite réalisé 30 minutes à 4°C. Pour le marquage LRBA, un anticorps secondaire anti-mouse est utilisé avec un marquage de 30 minutes.
- **Stratégie de *gating* des lymphocytes T régulateurs et mesure de l'expression de CTLA4 à la membrane par cytométrie de flux :** Parmi les lymphocytes T $CD4^+$, les lymphocytes T régulateurs ($CD3^+$ $CD4^+$ $CD25^{high}$ $CD127^-$) ont été ciblés par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps (CD4, CD25, CD127) couplés à des fluorochromes.

  L'expression de CTLA4 à la membrane est mesurée par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps anti CTLA4 couplée à un fluorochrome (PE : Phycoérythrine) sur les cellules stimulées par PMA, anti-CD3 anti-CD28 et sur les cellules non stimulées.

  Pour les cellules stimulées et non stimulées, un contrôle isotypique est réalisé avec un anticorps IgG2 kappa, afin de vérifier l'absence de fixation non spécifique.

  Les cellules sont lavées et reprises dans 100µL de PBE= PBS-BSA1%-EDTA (100µL/1 million de cellules). 20µL de PBE sont ajoutés dans chaque puit ainsi que 100µL du mix d'anticorps dont la concentration a été étalonnée pour marquer 1 million de cellules et 100µL de suspension

cellulaire (soit 1 million de cellules). En parallèle, des simples marquages sont réalisés (un anticorps par tube) afin de pouvoir par la suite effectuer les compensations. L'ensemble est incubé 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière.

Les cellules sont ensuite lavées à deux reprises (dans 2mL de PBE), puis reprises dans 150µL de PBE et passées au cytomètre de flux.

- **Marquage de CTLA4 et de LRBA intramembranaire** :

Anticorps utilisés pour les marquages CTLA4/LRBA			
Anticorps	Clone	Isotype	Reference
CTLA4-PE	BNI3	IgG2a, κ (Mouse)	BD® 555853
LRBA	polyclonal	(Goat®)	Sigma®
Anti-mouse FITC Ab (anti-LRBA)			
CD127-PC7	MB15-18C9	IgG2a κ (Mouse)	BD® 560822
CD25-APC	M-A251	IgG1, κ (Mouse)	BD® 555434
CD4-AF700	RPA-T4	IgG1k (Mouse)	BD® 557922
FoxP3-Pe-Cy5	259D/C7	IgG1 (Mouse)	BD® 561493

Table 6 : anticorps utilisés pour le marquage CTLA4/LRBA

d. *Marquages intracellulaires* :

Pour les perméabilisations, différents Kit sont utilisés. Pour les marquages FoxP3, nous utilisons le kit FoxP3 BD (eBioscience® ref. 00-5521). Pour les autres marquages intra-membranaires (ACP1 par exemple), nous utilisons le kit eBioscience® permeabilisation buffer en respectant les indications du fabriquant. Pour les marquages phosphos, nous perméabilisons les cellules avec ce kit et nous utilisons du methanol pré-refroidi à -20°C.

- **Marquage ACP1 :** nous avons recherché et testé plusieurs anticorps d'ACP1 pour mettre au point nos expériences. Nous souhaitions initialement discriminer la forme *Fast* et *Slow* par un couple d'anticorps spécifiques. De tels anticorps n'étant pas disponibles dans le commerce, nous avons essayé de discriminer la partie N-terminale et la partie C-terminale de la protéine en utilisant un couple d'anticorps (ACP1 A-2, sc-393280, ACP1 B-2, sc-398459, SantaCruz®). Nous avons mis au point un marquage indirect utilisant une étape de perméabilisation, puis marquage avec ces anticorps

puis utilisation d'un anticorps anti-isotype murin marqué. Cependant, cette technique n'a pas donné de résultats convaincants (de même en western blot) et nous avons abandonné l'utilisation de ces anticorps.

Pour la suite des expériences de cytométrie ACP1, nous avons utilisé un anticorps déjà couplé reconnaissant ACP1 total (monoclonal) ACP1 D-3 (sc-390190, SantaCruz®) couplé à l'AF488. Cet anticorps reconnait les acides aminés 8-156 de la protéine. Le marquage se fait après perméabilisation à la dilution 1/100ème pendant 30 minutes.

- **Phosphorylations :** les marquages phosphos sont réalisés après perméabilisation et fixation des cellules, et incubation 45 minutes dans le methanol pré-refroidi à -20°C, pendant 30 minutes.

Anticorps utilisés pour les marquages phospho		
Anticorps	Clone	Isotype
Anti-ERK1/2-PE	20A	IgG1 (Mouse)
Anti-LAT AF-647	J96-1238.58.93	IgG1k (Mouse)
Anti-ZAP70 Y292	J34-602	IgG1k (Mouse)

Table 7 : principaux anticorps pour les marquages phosphos

e. **Acquisition et analyse :**

Les cellules marquées ont été analysées sur cytomètre de flux 10 couleurs (Gallios®, Beckman Coulter®) et les données traitées sur le logiciel Kaluza® version 5.1 pour Windows.

IV. CULTURES CELLULAIRES ET TRANSFECTIONS

a. *Principes de culture cellulaire et de stimulations* :

- **Cultures cellulaires :** les cultures cellulaires sont réalisées dans un milieu RPMI® contenant 10% de SVF, 1% de HEPES et 1% de Na Pyruvate et L-Glutamine ainsi que 500µL de Gentamycine.

- **Stimulations :**

  Le tableau ci-dessous résume les différents réactifs de stimulation utilisés et leur concentration finale.

Réactif	Cible	Référence	Concentration finale
Pokeweed	TLRs, PPRs	L9379	1µg/mL
PHA (Phytohaemaglutinin P) (Invivogen®)	NFAT-C	16L12-MM	1µL/mL
PMA (Phorbol 12-myrisate 13-acetate) (invivogen®	NFKB	16561-29-8	1µg/mL
Ionomycine (Invivogen®)	NFAT-C (canaux calciques)	56092-82-1	5µg/mL
Anti-CD3 Anti-CD28 (Gibco®)	CD3/CD28	11131D	25µL/Million de LT CD4 (ratio 1 :1)

Table 8 : principaux stimuli utilisés dans les experiences de stimulation

- **Lignées EBV et lymphoblastes T :**
  - *Lignée EBV* : la méthode de production des lignées EBV est adaptée du protocol de *Nilson K and Klein G* (1982). Brièvement, les lymphocytes B sont triés selon les méthodes décrites ci-dessus par tri magnétique négatif. 50,000 cellules sont déposées dans chaque puit en plaque 96 puits à fond rond. Les cellules sont mises en culture (milieu contenant 20% de SVF) avec du CpG à 2,5µM (agoniste TLR9) et de 50µL de surnageant de lignée B95-8 productrice d'EBV (ATCC® VR-1492). 50% du milieu est remplacé toutes les 24 à 48h la première semaine, puis les cellules sont divisées en 2 en fonction de la transformation et de la prolifération autour de J7. La lignée est maintenue en plaques (24 puits) pendant 1 mois en remplaçant le milieu de culture lorsque cela est nécessaire. Au-delà, une partie des cellules est cryoconservée à -80°C et une partie est maintenue en flasques.
  - *Lymphoblastes T* : à partir de 1 million de lymphocytes T triés selon la méthode décrite ci-dessus (tri magnétique négatif), les LT sont mis en culture dans un milieu comportant 10% de SVF et du PMA (1µg/mL) et de la Ionomycine (5µg/mL). Après 48 heures, les cellules sont séparées par gradient de Ficoll et cryoconservées ou maintenues en culture.

b. *Expériences de transfection avec un vecteur surexprimant ACP1F* :

Pour les expériences de transfection, nous avons utilisé un vecteur pCMV exprimant la GFP et ACP1F ou un vecteur vide exprimant seulement la GFP (vecteur ACP1 (SC111923, Origene®) et vecteur vide (PCMV6XL5, origene®)). La transfection se fait à l'aide de jetPEI® (polyplus transfection SA®) à 2µL pour 150nM de solution NaCL + 2µg de vecteur (dans 50µL de NaCl) pour 100.000 à 500.000 cellules par puits en plaques 24 puits. Le milieu de culture est changé à H6. Les cellules sont laissées à 37°C à l'incubateur pendant 48h à 7j selon les expériences.

c. Expériences de SiRNA

Nous avons essayé plusieurs techniques pour délivrer le siRNA dans les lymphocytes T CD4 triés. La technique qui présente le meilleur rendement est celle de l'electroporation (kit Amaxa 4D Nucleofector®, Lonza®, ref. V4XP-3024) en presence des siRNA (à 30nM) et d'un milieu de transfection (*Accel siRNA Delivery Media®, Dharmacon®)* pendant 6h00. A l'issue, les cellules sont lavées et reprises en milieu de culture (RPMI® + 20%SVF + 5% Hepes + Gentamycine) pendant 48 heures à 37°C.

Pour le silencing du gène ACP1, nous avons utilisé un pool de 3 siRNA ACP1 et un pool de SiRNA contrôle (témoin négatif) ainsi qu'un siRNA GAPDH (contrôle positif) et un vecteur exprimant la GFP (contrôle de transfection, pMaxGFP Vector (Lonza®)).

V. WESTERN BLOT :

- **Immuno-empreinte (western blot) d'ACP1:** Les lymphocytes T CD4+ du patient et de 3 témoins ont été isolés à partir des PBMCs par tri cellulaire magnétique négatif. L'éluât contenant les lymphocytes T $CD4^+$ a été récupéré (environ $5x10^6$ cellules). L'analyse par cytométrie en flux des échantillons a révélé une pureté supérieure à 95%.

Les lymphocytes B du patient et de 2 témoins ont été isolés à partir des PBMC par tri cellulaire magnétique négatif (EasySep™ Human B Cell Isolation Kit, StemCell™ Technologies, Vancouver, Canada). Brièvement, les PBMC ont été incubés avec un cocktail d'anticorps bi-spécifiques ciblant le dextrane et les antigènes des cellules du sang à éliminer (CD2, CD3, CD14, CD16, CD36, CD43, CD56, CD66b, glycophorine A), et des billes couplées au dextrane. Puis les cellules ont été placées dans un aimant de type MACS (« Magnetic Activated Cell Sorting », EasySep™ Magnet, StemCell™ Technologies). L'éluât contenant les lymphocytes B a été récupéré (environ $1x10^6$ cellules). L'analyse par cytométrie en flux des échantillons a révélé une pureté supérieure à 95%.

Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1500 RPM pendant 10min, puis lysées pendant 1h30 à 4°C dans 75µL de tampon RIPA (Tris HCl pH8 50 mM, NP-40 1%, Na desoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (EasyPack, Roche®). Après centrifugation pendant 10 minutes à 450 G et à 4°C, le surnageant contenant les protéines a été récupéré. La quantification de protéines extraites a été réalisée à l'aide du kit BCA (BiCinchoninic acid Assay,

Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific®) par mesure de l'absorbance à 560 nm (Promega Glomax Multidetection System®).

Quatre volumes de lysat protéique ont été mélangés à un volume de bleu de dépôt (5X) (0,6 M HCl pH 6,8 ; Glycérol 50 % ; 170 mM dodécylsulfate de sodium (SDS), 50 mM de Dithiothréitol (DTT) ; 0,1 % de Bleu de bromophenol) afin de dénaturer les échantillons, puis chauffés à 105 °C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel de polyacrylamide (MiniProtean TGX 4-20 % BioRad®) en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoScientific®). La migration a été réalisée à 130V dans un tampon de migration (25mM Tris base Sigma® ; 192mM Glycine Sigma® ; 0,1% SDS) pendant 1h30. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Mini Transfert Pack, BioRad®) grâce au dispositif BioRad Trans-Blot Turbo® pendant 7min à 1,3A/ 25V. La membrane a été saturée pendant 1h à RT dans un tampon de blocage (lait 2%, 100mM Tris pH7,5 ; 2,5mM EDTA pH8 ; 50mM NaCl ; 0,0001% Tween 20 Sigma®).

La membrane a ensuite été incubée avec une solution d'anticorps primaire de souris anti-ACP1 humain (ACP1-D3 SantCruz®) dilué au 500ème dans une solution de TBS-Tween® (100mM Tris pH7,5 ; 2,5mMEDTA pH8 ; 50mM NaCl ; 0,0001% Tween 20 Sigma®) à 2% de lait. Après une nuit d'incubation à 4 °C, la membrane a été lavée 5 fois 5min dans un tampon de lavage (Tris HCl 10 mM EDTA 0,5 mM, NaCl, Sigma®) puis incubée pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG murine, couplé à la HRP (HorseRadishPeroxydase) (Amersham GE Healthcare®) dilué au 15000ème dans la même solution que l'anticorps primaire. Après lavage, la solution a été incubée avec un mélange d'une solution de luminol et de peroxyde d'hydrogène (ratio 1:1, GEHealthcare-Amersham / ECL prime WB detection reagent®). La membrane a été révélée au moyen d'une développeuse avec impression sur film à rayons X (GEHealthcare Amersham Hyperfilm ECL®).

VI. PROTEOMIQUE (collaboration plateforme de protéomique, Philippe Hammann, IBMC, Strasbourg)

Brievement, (informations fournies par la plateforme de protéomique), après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-ACP1 (SantaCruz® D-3 sc-390190) ou la biotine (contrôle négatif), les échantillons ont été doublement précipités, réduit et alkylés, puis digérés à la trypsine. Les peptides générés ont été injectés sur le Qexactive+ puis identifiés avec Mascot contre la banque Human de swissprot. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R® et le script IP Inquiry 2.0®.

Nous avons filtré les résultats sur un FoldChange >2.00 avec une p-value ajustée inférieure à 0,05 et un filtre de spectre à 20 (au moins 20 spectres détectés de la protéine dans l'échantillons). Les données issues de R ont été représentées sous la forme d'un Volcano Plot et MDS (Multi Dimensional Scaling) pour visualiser la reproductibilité inter-échantillons.

VII. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses ont été réalisées sur le logiciel PRISM® (version 7) pour Windows (Graphpad Software, San Diego, California USA) en utilisant des tests non paramétriques bilatéraux. Une valeur du $P<0,05$ est considérée comme statistiquement significative (*) ; $P<0,001$ (**), $P<0,0001$ (***).

RESULTATS

RESULTATS

PARTIE I

Analyse de cohorte DICV/CID avec cytopénies auto-immunes (neutropénie)

PEUT-ON TROUVER DES VOIES PHYSIOPATHOLOGIQUES PARTAGEES AU SEIN D'UN GROUPE HOMOGENE DE PATIENTS ATTEINTS DE DEFICIT IMMUNTAIRE PRIMITIF AVEC CYTOPENIES AUTO-IMMUNES (NEUTROPENIE) ?

*Etude d'une cohorte homogène de patients atteints de déficit immunitaire commun variable avec auto-immunité (thrombopénie, anémie hémolytique auto-immune et neutropénie) à partir des patients issus de l'étude DEFI et de patients suivis au CHU de Strasbourg (**Appel à projet jeune chercheur DRCI Grand-Est 2017 « DICEP »**)*

I. Objectif principal :

Le déficit immunitaire commun variable (DICV) est la première cause de déficit humoral primitif symptomatique de l'adulte avec une prévalence variant de 1/20 000 à 1/50 000. Il peut débuter dans l'enfance mais se manifeste plus souvent à l'âge adulte entre la 2ème et 4ème décade. La maladie présente une grande hétérogénéité clinique sous-tendue par une hétérogénéité physiopathologique avec l'implication de différentes voies du système immunitaire. Dix à 15 % des patients présentent une forme monogénique de la maladie (parmi les gènes actuellement identifiés) (**Figure 16**). Ces formes, de transmission mendélienne récessive ou dominante, éclairent la compréhension des mécanismes des déficits immunitaires et ouvrent des voies de prises en charge thérapeutiques (voir *Introduction-Partie II*).

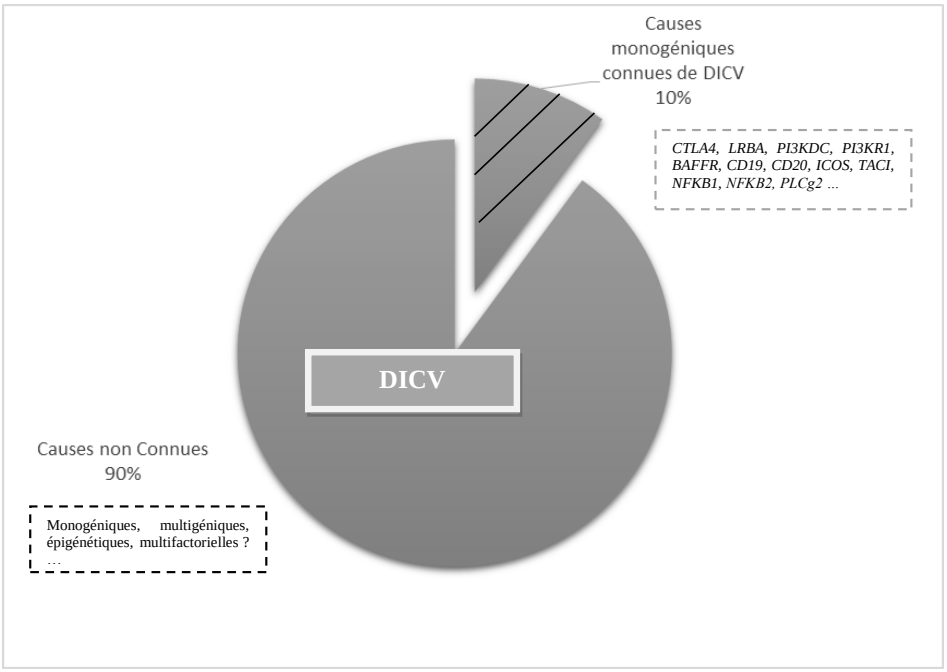


Figure 16 : Représentation schématique des causes génétiques connues de déficit immuntaire commun variable.

Entre 2015 et 2016, nous avons mené un travail sur des patients atteints de neutropénie au sein de l'étude nationale DEFI qui enrollait des patients atteints de déficit immunitaire humoraux (473 patients dans l'étude ; *Pr E Oksenhendler et Pr Claire Fieschi service d'Immunopathologie Clinique, Hôpital Saint Louis*). Cette analyse a montré qu'il s'agissait d'un trait rare dans le DICV (<5%, n=16 patients), qui touchait plus particulièrement les sujets jeunes, présentant un syndrome lymphoprolifératif non malin et/ou une volumineuse splénomégalie, un purpura thrombopénique et/ou une anémie hémolytique auto-immune (AHAI), des infections répétées et une hypogammaglobulinémie sévère avec ou sans lymphopénie CD4 (totale ou CD4 naïve) associée (patients LOCID : *Late-Onset Combined ImmunoDeficiency*). Globalement, le pronostic de ces patients était mauvais, avec des décès pas toujours liés aux complications infectieuses. La neutropénie était de façon quasi constante « auto-immune », c'est-à-dire périphérique, sans autre cause retrouvée, avec des anticorps anti-granuleux dans 50% des cas (**Figure 17** et **Papier 3** (Guffroy et al., 2017).

Concomitamment, étaient découverts deux déficits immunitaires primitifs (haploinsuffisance de *CTLA4* et défauts de *LRBA*) qui ouvraient la porte à une possible thérapie ciblée chez certains patients atteints de formes sévères de DICV (ou CID) avec syndrome lymphoprolifératif.

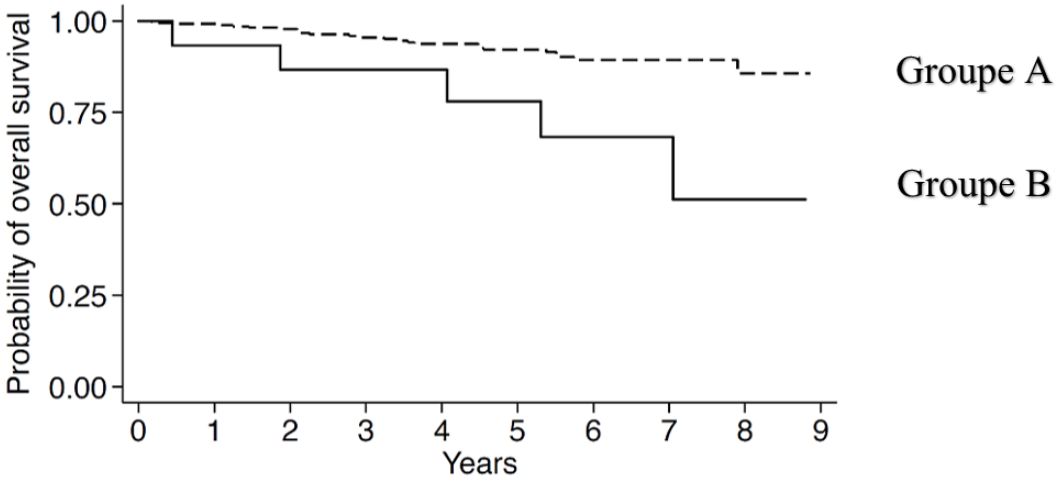


Figure 17 : survie des patients DICV non neutropéniques (Groupe A) en comparaison avec la survie des patients neutropéniques (Groupe B) au sein de l'étude nationale DEFI.

A partir du travail de recherche clinique que nous avons réalisé chez les patients atteints de DICV/CID avec auto-immunité (cytopénie auto-immune, neutropénie) publié dans le JOCI (*Journal of Clinical Immunology*), nous avons souhaité réaliser une analyse de cohorte avec deux volets :

1. Un **immunophénotypage** systématique comportant (voir ***Méthodes*** pour le détail des panels utilisés) :
   - Un immunophénotypage lymphocytaire T/B/NK
   - Un immunophénotypage cTFh, Treg (membranaire et/ou intracellulaire)

- Pour certains patients, une analyse de LRBA et CTLA4 sous stimulation (stock et expression à la membrane).

2. Une **analyse génétique** à la recherche de voies physiopathologiques communes (WES ou panel).

Notre hypothèse initiale, en 2015, était celle de l'existence de voies physiopathologiques communes engageant les lymphocytes T et en particulier CTLA4/LRBA (sans forcément retrouver une mutation sur l'un de ces gènes) sur la base des publications récentes sur le sujet (Kuehn et al., 2014; Lopez-Herrera et al., 2012; Schubert et al., 2014). L'identification de l'implication ou non d'une telle voie physiopathologique **aurait permis d'intervenir plus précocement dans la prise en charge de ces patients atteints de DICV à risque d'évolution péjorative** et éventuellement de guider une allogreffe de cellules souches hématopoïétique ou thérapie ciblée (CTLA4-Ig, abatacept).
Par ailleurs, des publications sur l'impact des lymphocytes TFh dans les déficits immunitaires (Alroqi et al., 2018; Ma et al., 2015) commencaient à proposer l'implication de ces cellules dans certains phénotypes de DIPs (notamment auto-immun et inflammatoire pour le DICV) (Turpin et al., 2018; Unger et al., 2017) et nous avons souhaité tester cette hypothèse dans notre sous-groupe de patients.

II. Caractéristiques cliniques et immuno-phénotypiques de patients atteints de DICV avec cytopénies auto-immunes et neutropénie

Tout d'abord, nous présentons les résultats de notre étude sur les patients atteints de Neutropénie et de cytopénies auto-immunes dans l'étude DEFI.

➢ Papier 3 (Article original) : **Guffroy A**, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, Pouliet A, Nitschké P, Hanein S, Bienvenu B, Chanet V, Donadieu J, Gardembas M, Karmochkine M, Nove-Josserand R, Martin T, Poindron V, Soulas-Sprauel P, Rieux-Laucat F, Fieschi C, Oksenhendler E, André-Schmutz I, Korganow AS; DEFI study group. ***Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome. J Clin Immunol. 2017***

PAPIER 3 :

NEUTROPENIA IN PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY : A RARE EVENT ASSOCIATED WITH SEVERE OUTCOME

Guffroy A, Mourot-Cottet R, Gérard L, Gies V, Lagresle C, Pouliet A, Nitschké P, Hanein S, Bienvenu B, Chanet V, Donadieu J, Gardembas M, Karmochkine M, Nove-Josserand R, Martin T, Poindron V, Soulas-Sprauel P, Rieux-Laucat F, Fieschi C, Oksenhendler E, André-Schmutz I, Korganow AS; DEFI study group.

Original article

Journal of Clinical Immunology (2017)

J Clin Immunol
DOI 10.1007/s10875-017-0434-2

ORIGINAL ARTICLE

Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome

Aurélien Guffroy[1,2] · Rachel Mourot-Cottet[3] · Laurence Gérard[4,5] · Vincent Gies[1,2] · Chantal Lagresle[6] · Aurore Pouliet[7] · Patrick Nitschké[8] · Sylvain Hanein[9] · Boris Bienvenu[10] · Valérie Chanet[11] · Jean Donadieu[12] · Martine Gardembas[13] · Marina Karmochkine[14] · Raphaele Nove-Josserand[15] · Thierry Martin[1,2] · Vincent Poindron[1] · Pauline Soulas-Sprauel[1,2] · Fréderic Rieux-Laucat[16] · Claire Fieschi[4,5] · Eric Oksenhendler[4,5] · Isabelle André-Schmutz[6] · Anne-Sophie Korganow[1,2] · the DEFI study group

Received: 16 May 2017 / Accepted: 15 August 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Aurélien Guffroy and Rachel Mourot-Cottet contribute equally to the work.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s10875-017-0434-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Anne-Sophie Korganow
korganow@unistra.fr

[1] Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, Strasbourg University Hospital, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Strasbourg, France

[2] CNRS UPR 3572 Immunopathology and Therapeutic Chemistry/ Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France

[3] Department of Internal Medicine B, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

[4] Department of Clinical Immunology, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

[5] EA3518, Université Paris Diderot Paris 7, Paris, France

[6] INSERM UMR 1163 Human Lympho Hematopopoiesis Laboratory, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Imagine Institute, Paris, France

[7] INSERM UMR 1163 Bioinformatic Platform, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Imagine Institute, Paris, France

[8] INSERM UMR 1163 Genomic Platform, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Imagine Institute, Paris, France

[9] INSERM UMR 1163 Translational Genetic Platform, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Imagine Institute, Paris, France

[10] Department of Internal Medicine, Caen University Hospital, Caen, France

[11] Department of Internal Medicine, Cabinet de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Pôle Santé République, Clermont-Ferrand, France

[12] Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hôpital d'enfants Armand-Trousseau, Paris University Hospital, Paris, France

[13] Department of Hematology, Angers University Hospital, Angers, France

[14] Department of Clinical Immunology, European Hospital Georges Pompidou, Paris University Hospital, Paris, France

[15] Department of Internal Medicine, Lyon University Hospital, Pierre-Bénite, France

[16] INSERM UMR 1163 Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases laboratory, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Imagine Institute, Paris, France

Published online: 26 August 2017

Abstract
Background : Common variable immunodeficiency (CVID) is characterized by infections and hypogammaglobulinemia. Neutropenia is rare during CVID.
Methods : The French DEFI study enrolled patients with primary hypogammaglobulinemia. Patients with CVID and neutropenia were retrospectively analyzed.
Results : Among 473 patients with CVID, 16 patients displayed neutropenia (lowest count [0–1400]*10^6/L). Sex ratio (M/F) was 10/6. Five patients died during the follow-up (11 years) with an increased percentage of deaths compared to the whole DEFI group (31.3 vs 3.4%, $P < 0.05$). Neutropenia was diagnosed for 10 patients before 22 years old. The most frequent symptoms, except infections, were autoimmune cytopenia, i.e., thrombopenia or anemia (11/16). Ten patients were affected with lymphoproliferative diseases. Two patients were in the infection only group and the others belonged to one or several other CVID groups. The median level of IgG was 2.6 g/L [0.35–4.4]. Most patients presented increased numbers of $CD21^{low}$ $CD38^{low}$ B cell, as already described in CVID autoimmune cytopenia group. Neutropenia was considered autoimmune in 11 cases. NGS for 52 genes of interest was performed on 8 patients. No deleterious mutations were found in LRBA, CTLA4, and PIK3. More than one potentially damaging variant in other genes associated with CVID were present in most patients arguing for a multigene process.
Conclusion : Neutropenia is generally associated with another cytopenia and presumably of autoimmune origin during CVID. In the DEFI study, neutropenia is coupled with more severe clinical outcomes. It appears as an Balarm bell^ considering patients' presentation and the high rate of deaths. Whole exome sequencing diagnosis should improve management.

Keywords Neutropenia · Autoimmune cytopenia · Common variable immunodeficiency (CVID) · Next genome sequencing

Abbreviations

AC	Autoimmune cytopenia
AIHA	Autoimmune hemolytic anemia
AIN	Autoimmune neutropenia
CVID	Common variable immuno-deficiency
ENT	Ears, nose, and throat
GAT	Granulocyte aggregation test
GIFT	Granulocyte immunofluorescence test
HNA	Human neutrophil antigen
ITP	Idiopathic thrombocytopenic purpura
LOCID	Late-onset combined immunodeficiency
LP	Lymphoproliferation
MAIGA	Monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen
OS	Overall survival

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent primary immunodeficiency with a clinical expression in adults. It is a heterogeneous group of diseases characterized by IgG hypogammaglobulinemia and low levels of IgA or IgM, coupled with a poor humoral response to vaccines. As a consequence, most patients develop recurrent bacterial infections, mainly in the upper respiratory tract. This common clinical presentation may result from several mechanisms. Although the vast majority of CVID patients do not have a defined genetic defect, failure of T-B cell cooperation, primary defects of T cells and/or B cells have been described [1, 2]. Monogenic familial forms are rarely diagnosed with many de novo cases and polygenic inheritance [3–7]. Beside infections, other clinical manifestations are very broad as chronic enteropathy (CE), benign or malignant lymphoproliferations (LP) or granulomatous disease, and autoimmune disorders including autoimmune cytopenia (AC). Indeed, more than 20% CVID patients displayed hemolytic anemia (AIHA) or thrombocytopenia (ITP) [8]. Prognosis depends on the clinical phenotype. The survival of infected only (IO) patients under Ig replacement therapy is more than 70% 20 years after the diagnosis. Those without complications have a normal life expectancy. However, CVID patients with LP, gastro-intestinal or chronic lung manifestations, AHAI and/or ITP, have significantly reduced survival [9–12]. Unfortunately, bone marrow (BM) allo-transplantation in very severe refractory situations does not appear to be the solution, considering the high rates of deaths in the already described series [13]. One hypothesis for some of these failures is that BM transplants occur too late in the course of the disease. Another hypothesis is that treatments need to be targeted to limit long-term immunosuppression. In both cases, the early identification of patients with reduced survival is a necessary step to prepare the more appropriate support [13].

Neutropenia is characterized by blood absolute neutrophil count below 1.5*10^9/L. The implications of neutropenia are variable, from a risk of life-threatening infections in cases of central drug-induced agranulocytosis to a benign finding as ethnic neutropenia. In the large cohorts of patients with CVID, neutropenia is cited but not individualized and poorly studied. Its exact frequency, mechanisms (autoimmune, congenital, drug, or virus-induced), course, and prognosis remain unclear.
Herein, we described the clinical and biological phenotypes of patients with CVID and neutropenia, in the large French DEFI study of CVID patients. For 8 representative patients, we performed targeted NGS on 52 genes of interest in PID.

Materiel and Methods

DEFI Data Base

DEFI is a French national study of adults with primary hypogammaglobulinemia. Inclusion criteria were hypogammaglobulinemia with serum IgG level < 5 g/L, or IgA level < 0.7 g/L, or IgM level < 0.4 g/L. IgG levels were determined before any replacement therapy. CVID diagnosis criteria were consistent with the European Society for Immunodeficiencies (ESID)/Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID) criteria : (1) decreased of at least 2 standards deviations (SD) below the mean level of IgG and a marked decreased in IgM or IgA levels, (2) onset of immuno-deficiency after 2 years-old, and (3) exclusion of underlying secondary cause of hypogammaglobulinemia. The study has been approved by the local ethics committee and all patients gave written informed consent. A total of 747 patients with 473 confirmed CVID patients from 47 centers were enrolled in this study from 2004 to 2013. Infections, autoimmunity, enteropathy, lymphoproliferative, or tumoral complications were compiled for each patient, along with family medical history. A blood sample collected on the day of enrollment was used to determine detailed B and T cell phenotypes and for genomic DNA extraction in some cases.

Study Design

We carried out a retrospective and descriptive study within the French nationwide multicentric DEFI study of all cases of CVID-associated neutropenia. Cases were carefully reviewed in terms of clinical and biological data.

We used the following clinical groups as detailed by Chapel et al. [9]: infections only (IO), autoimmune cytopenia (AC)—i.e., autoimmune thrombocytopenia (ITP) or autoim-mune hemolytic anemia (AIHA)—polyclonal lymphoprolif-eration (LP) (granuloma/lymphoid interstitial pneumonia/ persistent unexplained lymphadenopathy), and unexplained chronic enteropathy (CE). Splenomegaly and CT-proven bronchiectasis were not individualized as clinical forms considering their high frequency in CVID.

A neutrophil count below $1.5*10^9$/L defined the term neutropenia and was considered severe when neutrophils were under $0.5*10^9$/L. Neutropenia was classified as peripheral if morphologic examination of the BM was normal. History of drug medications or infections that could cause neutropenia were systematically researched. In almost half of the cases (7/16), tests to identify and characterize anti-neutrophil auto-antibodies were performed : granulocyte immunofluorescence test (GIFT), monoclonal antibody immobilization of granulo-cyte antigen (MAIGA), and granulocyte aggregation test (GAT).

Patients developing lymphoma within 1 year around the diagnosis were excluded (n = 25).

Genetics

CD19, CD20, and CD21 complete deficiencies were ruled out with cytometry profiles. Sanger sequencing of genes known, at the time of enrollment in the DEFI study, to be involved in CVID pathogenesis was performed for some patients (when technically possible)—i.e., genes coding for CD40 ligand, signaling lymphocyte activation molecule-associated protein, BAFFR (TNFRSF13C), TACI (TNFRSF13B), APRIL (TNFSF13), BCMA (TNFRSF17), and for male patients Bruton tyrosine kinase (BTK).

Secondary, when sufficient DNA quantity and quality were available from the DEFI biobank, we performed an analysis of a large panel of genes (for details, see Table S1) involved in primary immune deficiencies (Imagine Institute, Paris, France). A custom SureSelect gene panel (BAIT1) was designed using the SureDesign software (Agilent). The targeted regions (n = 2.911) covered 813,556 kb, including coding exons and splice junctions of 248 genes (295 transcripts) with 52 genes of interest in CVID (see supplemental methods). Variant calls were made with the GATK Unified Genotyper and Freebayes [14]. The annotation process was based on the latest release of the Ensembl® database. Variants were annotated and analyzed using the Polyweb® software interface designed by the Bioinformatics platform of University Paris Descartes and Alamut® software (version 2.9.0). PolyPhen-2® (http://genetics.bwh.harvard.edu//pph2/) and SIFT® v5.2.
5. (http://sift.jcvi.org/) were used to predict the mutations' functional effects.

Confirmed variations were also screened through the Human Gene Mutation Databases (ExAC®, ClinVar®, or 1000genome®) and NCBI to identify already known disease-associated variations and MAF when available (Minor Allele Frequency).

Statistical Analysis

Descriptive statistics were reported as median (range) or number (%). Statistical comparisons between characteristics of patients were based on the Fisher exact test for frequencies. Overall survival (OS) was estimated using the Kaplan-Meier method, from CVID diagnosis until the last visit or death from any cause. OS of neutropenic patients was compared with patients without neutropenia included in the DEFI study during the same timeframe, using log-rank test. All patients were followed until June 2015. Reported P values were two-tailed and considered significant if < 0.05. Statistical analysis was conducted using Stata Statistical Software version 14.2 (StataCorp, College Station, Texas USA).

Results

Clinical Vignettes

Case #1 (not in DEFI study): A 22-years-old male was referred to our department (Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital, Strasbourg, France) in 2013 for acute cytopenias (Hb < 6 g/dL, reticulocyte count 220,000/mm^3, lymphopenia 500*10^6/L, and severe peripheral neutropenia 260*10^6/L). Physical examination discovered a large splenomegaly and multiple lymphadenopathies. BM aspiration and biopsy revealed a highly regenerative sample without malignancy. Laboratory findings found a positive direct Coombs test (IgG^+; $C3d^-$) and a negative GIFT test. Diagnosis of CVID was made based on history of recurrent pneumonitis and ENT infections since childhood, and on serum immunoglobulins (Ig) level (2.1 g/L for total Ig, 1.8 g/L for IgG, IgA < 0.26 g/L, and 0.28 g/L for IgM). CD4 and CD8 T cell count was 418*10^6/L and 195*10^6/L, respectively. CD19 B cell count was at 56*10^6/L. Further investigation found a deep decrease of CD27 B cells and switch memory B cells, but surprisingly no expansion of $CD21^{low}$ B cell compartment as it could be expected considering the EUROclass trial [15]. Lymph node biopsy revealed a nonspecific lymphoid hyperplasia. The patient was treated with steroids (2 mg/kg eq. prednisone) and improved cytopenias within a few weeks. Simultaneously, he received subcutaneous Ig substitution (0.4 g/kg/month). Some months later, neutropenia relapsed and G-CSF therapy was necessary weekly at this time. Because of hypersplenism symptoms with spleen enlargement and recurrent thrombocytopenia, the patient was finally splenectomized during year 2015 (again follicular hyperplasia) with a rapid improvement of platelets and neutrophils levels. Nonetheless, the effect on neutropenia was transient and the course of neutropenia was marked by chronicity and frequent severe relapses requiring G-CSF therapy (Fig. 1a). Genetic investigation was performed (Necker Imagine) and did not find any known mutation in CTLA4, PIK3CD, or LRBA (Table S1).

Case #2 (patient #2 in this series): A 20-year-old patient was diagnosed as CVID in 1999 (low IgG, IgM, IgA levels, and poor responses to vaccine). Since he was 1 year old, he was affected with recurrent pneumonitis and sinusitis. He was first supplemented with Ig at the age of 9. Then, he developed autoimmune cytopenias (AIHA and ITP) and LP with spleen enlargement and lymphadenopathies. He also presented liver dysfunction (hyperplasia nodular regenerative). In fact, he belonged to the recently individualized late-onset combined immunodeficiency (LOCID) group, since he had severe lymphopenia less than 200*10^6/L $CD4^+$ T cells complicated by recurrent herpetic and fungal (esophageal candidiasis) complications. He referred to our department in 2007 for recurrent aphtosis and mild neutropenia (1000*10^6/L). The course was chronic and the depth was fluctuating but persistent despite splenectomy (absence of malignancy, Fig. 1b). Later, he suffered from portal hypertension. During summer 2010, severe episode of bleeding colitis occurred in a context of infections by Streptococcus and Candida and he needed an emergency surgical colectomy. Few weeks later, he died from Staphylococcus aureus septicemia secondary to a spot on his bottom.

Analysis of Patients with Neutropenia in DEFI Study

Among the nationwide multi-centric DEFI study, 473 patients were registered as CVID and 16 (3.4%) presented with neutropenia. Sex ratio (male/female) was 1.7. Median age at CVID diagnosis was 17 years [4–63]. Four CVIDs were familial forms; others were sporadic. Biological and clinical characteristics of these patients are provided in Table 1 and Table 2.

Median age at the diagnosis of neutropenia was 27 years [0–59]. Neutropenia appeared before the diagnosis of CVID in 5 cases, after in 9 cases, and concomitantly in the 2 last cases. The median level of neutrophils at neutropenia diagnosis was 426*10^6/L [200–1500] (Table 1). BM analysis was performed in 13 patients. In all cases except one (#14), mechanism of neutropenia was peripheral. Neutropenia was considered autoimmune when antineutrophil antibodies (n = 3 out of 7 patients tested) were detected, and suspected as auto-immune when associated with another AC (ITP, AHAI), or when immunosuppressive therapy was effective and by exclusion of the other causes (n = 8; Fig. 3 and Table 2a). One patient was affected with a large splenomegaly and the diagnosis of hypersplenism was considered, as no other alternative cause was found. One had sepsis-related neutropenia. Patient #14 presented central neutropenia early in life with fever and BM analysis revealed an absence of granulocytes and of their precursors. Later on, neutrophils normalized with normal BM examination, but then relapsed several times. Considering the two remaining cases, neutropenia was peripheral with no evident etiology. Neutropenia episodes lasted from one single and brief episode of several days to 18 years. In most patients (n = 11), neutropenia turned out chronic (Fig. 2 and Table 2a).

Among neutropenic patients, median levels of IgG, IgM, IgA at CVID diagnosis were low, respectively, 2.6 g/L [0.35– 4.4], 0.3 g/L [0–2.4], and 0.05 g/L [0–0.62]. Median level of B cells was 94*10^6/L [0–350]. Four patients had no B cells (< 1%). $CD21^{low}CD38^{low}$ B cell were high (> 10% B cells) in 12 patients. Switched memory B cells were very low (< 2% B cells) in 9 patients. Expansion of $CD21^{low}CD38^{low}$ B cell

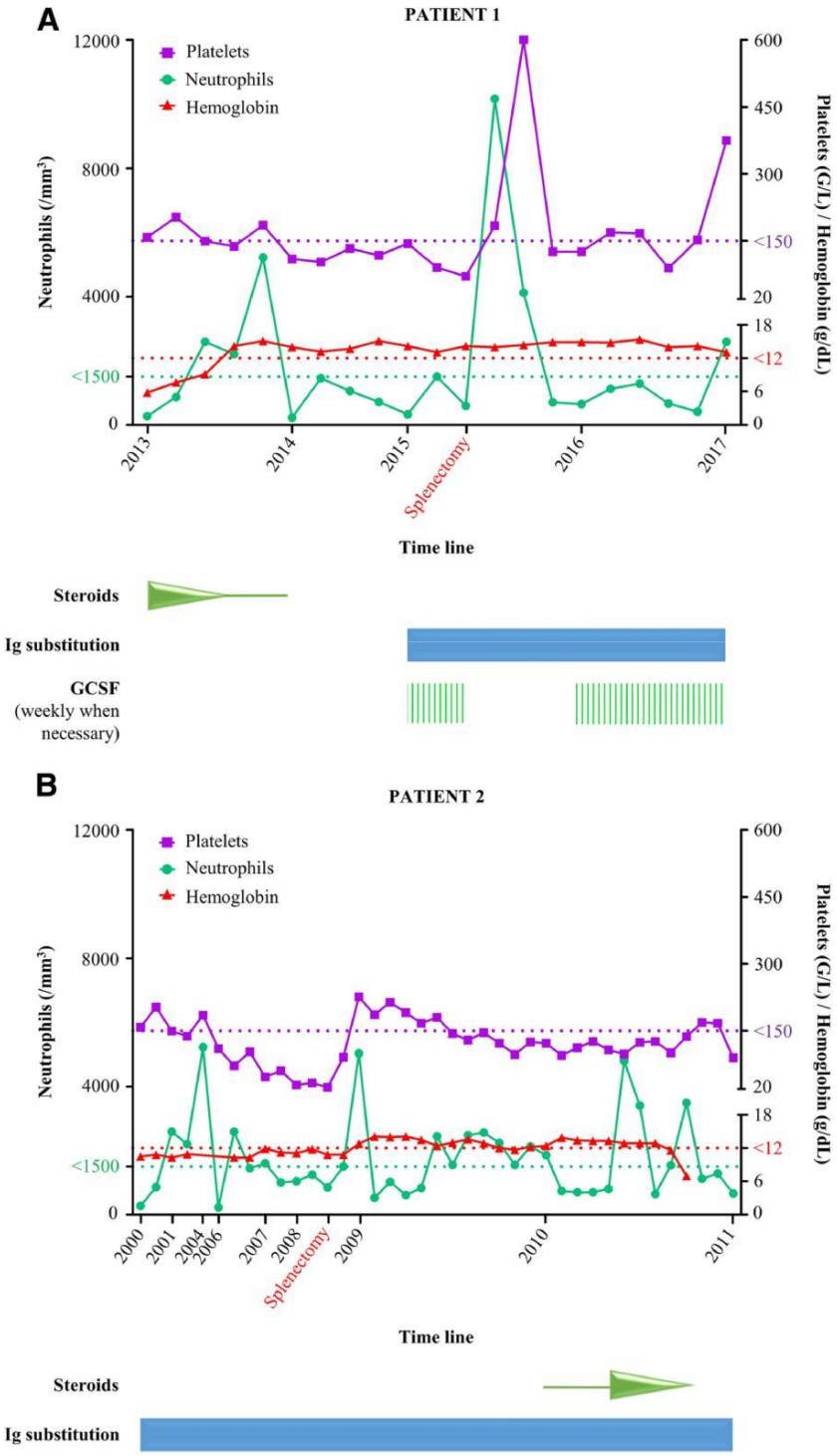


Fig. 1 Evolution of neutrophil count and platelets in two illustrative cases of neutropenia in CVID. GCSF granulocyte colony-stimulating factor

subset and low number of switched memory B cells has already been described in CVID, especially in CVID with autoimmune cytopenia [16]. Within the T cell population, we noticed a reduction in CD4 cell count: under $400*10^6$/L in 7 patients (44%) vs 20% expected among CVID patients [10]. The median level of naive CD4 T cells was comparable to the one described in the DEFI global AC group (9 vs 11%) compared to 37% in IO group and 45% in healthy controls. We also noticed an hyper-expression of Fas (CD95) marker on T cell surface (92 vs 91% in total AC group) compared to IO group and healthy controls (respectively, 70 and 43%) (Table 1) [17]. Considering ESID 2014 CVID criteria [18], patient #2 and patient #7 presented less than $200*10^6$/L CD4 T.

Table 1 Baseline clinical and biological data of CVID patients with neutropenia in the DEFI study

Number of neutropenic patients from DEFI study	16/473 (3.4%)
Age of diagnosis for CVID (median age (years), [range])	17 [4–63]
Age of diagnosis for Neutropenia (median age (years), [range])	27 [0–59]
Sex ratio (M/F)	10/6 (1.7)
Autoimmune cytopenia (AIHA, ITP)	11/16
Lymphoid hyperplasia (benign)	10/16
Lymphoma	2/16
Liver diseases	7/16
Respiratory tract diseases	8/16
Chronic enteropathy	5/16
Granulomatous diseases	4/16
Splenomegaly	12/16
Median level of neutrophils at diagnosis ($^{*}10^{6}$/L, [range])	426 [200–1500]
Median lowest neutrophil count ($^{*}10^{6}$/L, [range])	320 [0–1400]
Anti-neutrophils antibodies positivity	3/7
Median levels of immunoglobulins (g/L, [range])	3.3 [0.8–4.5]
IgG	2.6 [0.35–4.4]
IgM	0.3 [0–2.4]
IgA	0.06 [0–0.62]
Immunophenotyping (EUROClass*)	
B^{-} (B cells < 1%)	4/16
B^{+}	12/16
smB+	3/16
smB^{+} $CD21^{low}$	3/16
smB^{+} $CD21^{norm}$	0/16
smB^{-} (< 2% switch memory B cells)	9/16
SmB^{-} Tr ^{norm} $CD21^{low}$	7/16
SmB^{-} Tr ^{Hi} $CD21^{low}$	2/16
$CD21^{low}CD38^{low}$ (>10%)	12/16
B cells count (median level $^{*}10^{6}$/L, [range])	94 [0–350]
T cells count (median level $^{*}10^{6}$/L, [range])	1017 [300–2172]
$CD4^{+}$ T cells (median level $^{*}10^{6}$/L, [range])	597 [150–1878]
$CD8^{+}$ T cells (median level $^{*}10^{6}$/L, [range])	554 [44–1349]
$CD4^{+}$ $CD95^{+}$ T cells (% of CD4+ T cells, [range])	92% [32–100]
$CD45RA^{+}$/$CCR7^{+}$ $CD4^{+}$ T cells (% of $CD3^{+}$ T cells, [range])	9% [0.9–40]

• The EUROclass classification is based on (1) the frequency of B cells: B^{-} if $CD19^{+}$ B cells < 1%; B^{+} if CD19 B cells ≥ 1%, (2) the frequency of switch memory (smB) and transitional B cells (Tr), (3) the frequency of CD21 low B cells out of the total B cells [1]

CVID common variable immuno-deficiency, AIHA auto-immune hemolytic anemia, ITP idiopathic thrombocytopenic purpura

$CD4^{+}$ $CD95^{+}$ T cells are activated T cells, $CD45RA^{+}$ /$CCR7^{+}$ $CD4^{+}$ T cells are naive T cells; $CD45RA^{+}$ /$CCR7^{+}$ $CD4^{+}$ count (median level $^{*}10^{6}$ /L, [range]): 30.5 [1–575]

When classifying these patients into the four groups proposed by Chapel et al. [9], 11 patients presented with AC as classically defined in CVID (6 patients with ITP, 2 with AIHA, and 3 with both ITP and AHAI), 1 patient presented also with autoimmune erythroblastopenia, 10 patients were classified as LP, 5 as CE, and 2 patients belonged to the IO group excluding neutropenia (Figs. 3a, b and Table 2b). According to literature, these four clinical groups are exclusive in more than 70% of CVID cases [2]. However, it was not the case for CVID patients with neutropenia (Fig. 2a).

When comparing the results of patients with neutropenia and other CVID patients in the DEFI study, we found statistically more associated complications of CVID in the neutropenic group (Fig. 3b): 69 vs 15% for AC group, 31 vs 5% for CE group and 63 vs 23% for LP group, respectively ($P < 0.05$). Seven patients displayed liver diseases: 1 hepatic lymphoid hyper-plasia, 2 nodular hyperplasia, 2 granulomatosis, 1 cholestatic hepatitis, and 2 cirrhosis. Four patients were affected with bronchectasia, 4 with lymphoid pneumonia, and 1 with pul-monary hypertension (Table 2b).

Table 2 Detailed characteristics of the 16 neutropenic CVID patients of DEFI

a Characteristic of neutropenia

Patient	Age Dg CVID/Neutropenia	Dg level ($^{*}10^{6}$/L)	Nadir ($^{*}10^{6}$/L)	AC	BM	Anti-neutrophils Abs**	Presumed type of neutropenia/pattern
1	14/25	520	20	ITP/AIHA	P	+	AIN/Chronic
2	9/18	1040	650	ITP/AIHA	P	−	AIN/Chronic
3	41/51	1180	470	−	P	−	AIN/Chronic
4	53/55	1070	1070	−	P	ND	P/Transient
5	60/59	800	560	AIHA	ND	−	ND/Transient
6	18/21	1000	320	ITP	P	+	AIN/Chronic
7	8/28	306	306	ITP/AIHA/AIE	P	ND	AIN/Chronic
8	14/13	200	176	ITP	P	+	AIN/Chronic
9	4/4	< 1500*	NA	−	ND	ND	Infection?/Transient
10	13/26	500	190	−	P	ND	ND/Recurrent
11	63/50	1450	1400	ITP	P	ND	AIN/Chronic
12	16/8	< 1500	NA	ITP	P	ND	AIN/Transient
13	22/45	530	530	ITP	P	ND	AIN/Recurrent
14	7/0	207	0	−	C	ND	C/Chronic
15	45/37	1330	1330	ITP	ND	ND	AIN/Chronic
16	47/49	662	260	AIHA	P	−	AIN/Chronic

b Clinical manifestations

Patient	LH	GRA	Liver	Gut	Lung	Clinical group
1	+	−	+	−	+	LP/AC
2	−	−	+	+	+	AC
3	+	+	+	−	+	LP
4	+	+	+	+	+	LP/CE
5	−	−	+	−	−	AC
6	+	−	−	−	−	LP/AC
7	+	−	−	+	+	LP/CE/AC
8	+	−	−	−	−	LP/AC
9	−	−	−	−	−	IO
10	+	−	+	+	+	LP/CE
11	+	−	−	+	−	CE/AC
12	−	−	−	+	−	CE/AC
13	+	−	−	−	−	LP/AC
14	−	−	−	−	−	IO
15	+	+	+	−	+	LP/AC
16	+	+	−	−	+	LP/AC

c CD4 T cells count, opportunistic infections, and age of death

Patient	CD4 ($^{*}10^{6}$/L)	Opportunistic infections	Death (age—year)
1	770	+	+ 28
2	205	+	+ 20
3	487	−	alive
4	305	−	alive
5	911	+	alive
6	332	−	alive
7	150	+	+ 30
8	650	−	alive
9	1878	−	alive
10	322	+	+ 33
11	1123	−	+ 74

Table 2 (continued)

12	543	–	alive
13	657	–	alive
14	992	–	alive
15	272	–	alive
16	2100	–	alive

àNeutropenia below 1500*10^6 /L was noticed in DEFI database at the time of inclusion. Complete folder and values were not available retrospectively for two patients with transient neutropenia (#9 and #12) ** Anti-neutrophil Abs were identified in patient #6 as anti-CD16 (anti-FcRIIIb). Specificity was not identified for patients #1 and #8 AC autoimmune cytopenia, ITP idiopathic thrombocytopenic purpura, AIHA autoimmune hemolytic anemia, AIE autoimmune erythroblastopenia, BM bone marrow analysis, NA not available, ND not done, AIN autoimmune neutropenia, P peripheral, C central

Five patients presented 9 severe opportunistic infections: 3 pneumocystis, 2 mycotic deep infections, 1 cryptosporidia, 1 CMV colitis, 1 tuberculosis, and 1 aspergillosis. Therefore, these patients could be considered as LOCID patients, but among these, only 2 (#2 and #7) presented with deep CD4 lymphopenia compared to 16/28 in Malphettes et al. LOCID's group [18, 19] (Table 2c).

Considering cancers, 2/16 patients (#7 and #11) presented malignant hematological proliferation with non-Hodgkin B cell lymphoma vs 30/457 (P = 0.3) in CVID patients without neutropenia. One patient (#10) presented stomach cancer. Diagnosis was made after the onset of neutropenia.

Three patients received G-CSF therapy. Response to G-CSF was not always described in the patient reports. In two patients (patient in clinical vignette 1 and patient #7 in the DEFI Study), it significantly but temporarily improved neutropenia. Specific treatment for neutropenia (excluding G-CSF) was in general not administered. Eight patients received steroids but for diverse reasons, and again, it is difficult to tell the exact effect on neutropenia. At least, it was not efficient in all cases. Two patients were under immunosuppressive drugs (one in the context of pulmonary transplant, one for refractory Evans syndrome). No patient received Rituximab at the time of the study.

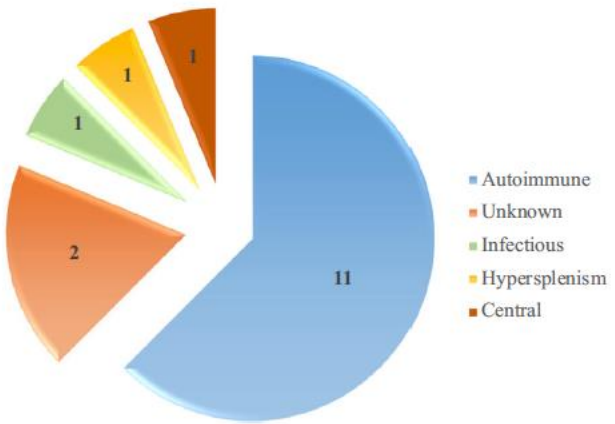


Fig. 2 Etiology of neutropenia in DEFI CVID patients

Five patients died during the available follow-up. Mortality rate increased rapidly in case of neutropenia associated with CVID when compared to the non-neutropenic patients (Fig. 4, Table 2c). The median age at death was 30 years old [20–74]. The median time between diagnosis and death was 14 years [11–22] (Table 2c). Causes of death were septic shock (n = 2),

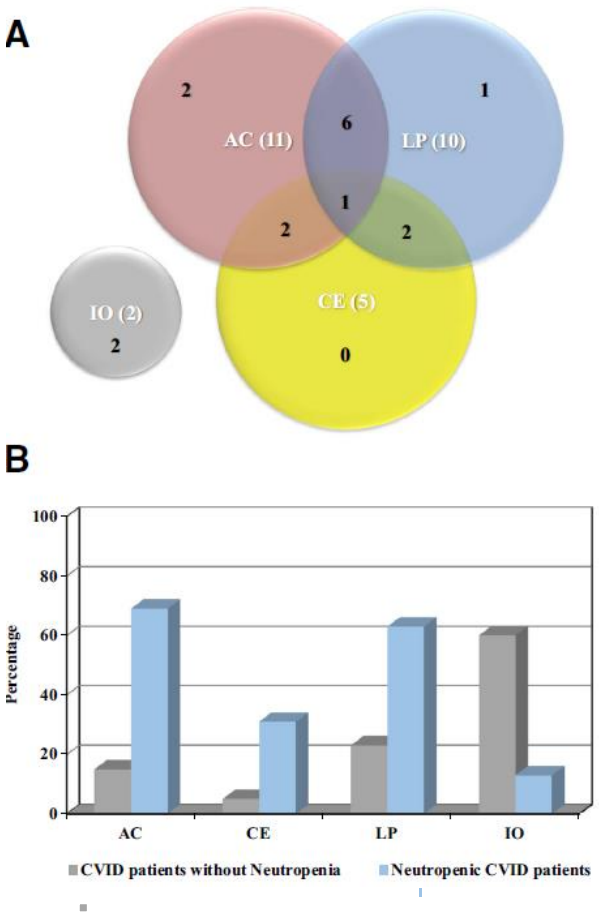


Fig. 3 Clinical manifestations of CVID patients with neutropenia in the DEFI group. a Classification beyond the Chapel' groups. b Comparison of prevalence of complication occurrence between neutropenic CVID patients and the global CVID group in DEFI study. AC autoimmune cytopenia (ITP and AIHA), LP lymphoproliferation, CE chronic enteropathy, IO infections only. All differences between groups are statistically significant (P < 0.05)

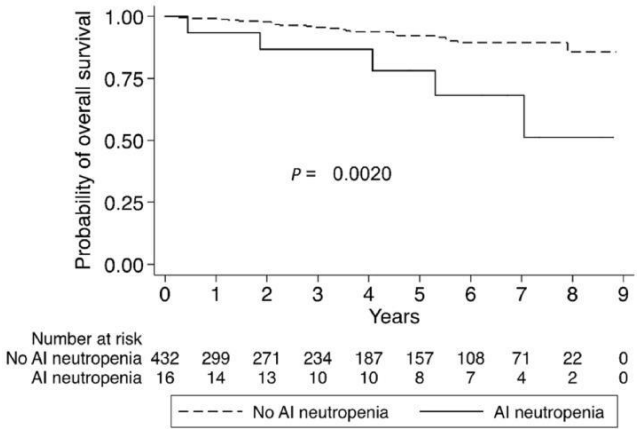


Fig. 4 Overall survival in CVID patients with neutropenia compared with CVID patients without neutropenia in DEFI study

cerebral hemorrhage after pulmonary transplantation (n = 1), encephalopathy of unknown origin (n = 1), and cardiac insufficiency during lymphoma management (n = 1). Eight-year overall survival (OS) was 87.5% in CVID-group without neutropenia and 50% in CVID-group with neutropenia (P < 0.05). Considering Resnick et al. results and the conclusion that all non-infectious events including AC were associated with a worst prognosis, we compared OS in CVID with neutropenia and CVID with AC but no neutropenia. OS among CVID patients with AC but no neutropenia appeared better at 1, 2, or 5 years (P = 0.057) (Fig. S1).

When patients were included in the DEFI study, CD19, CD20, and CD21 complete deficiencies were ruled out with cytometry profiles, and some patients were screened by target sequencing for a small panel of genes suspected at that time to be involved in CVID pathogenesis. To complete, a further analysis was carried out for 8 representative patients (including vignette 1 patient), with a large panel of genes involved in primary immune deficiencies (n = 52). All these patients presented peripheral neutropenia, and at least one other systemic manifestation of their disease (LP, AC, CE, see Fig. 1 and Table 2b for details). We especially focused on genes involved in CVID, lymphoproliferation, and autoimmunity. Each confirmed mutation was assessed in view of patient' phenotypes and literature data. Results are presented in Table S1. NGS data were compared with Sanger data of the DEFI study when available. We did not find any pathogenic mutation in genes coding for PI3K-δ, CTLA-4, or LRBA proteins. Altogether, we selected 22 variants (Table S1). Patient #1 presented a compound heterozygous RAG2 gene mutation with an LP/ AC phenotype. The first RAG2 mutation is a missense muta-tion c.1075C > G (Q359E) in the core region of the protein. The second mutation, c.-137 T > C (unknown consequence at the protein level), is localized in the intronic region between exons 1 and 2 and is associated with severe combined immune deficiency. A181E mutation in TACI for patients #13 and #16 and C104R mutation for patient of vignette #1 are known to be associated with auto-immune manifestations during CVID [21]. The other variants in TACI, BAFFR, or APRIL are not well characterized or are usually thought not to be responsible of CVID as relatively frequent in healthy controls [22, 23]. Patients #1, #4, and #9 had heterozygous BAFF-R mutations: c.191G > T (G64 V) and c.62C > G (P21R) mutations. Patient described in vignette 1 presented a heterozygous mutation in UNC13D, which is an undescribed frameshift mutation. Interestingly, variations of the UNC13D gene have been reported in patients with autoimmune lymphoproliferative syndromes [24]. Patient #13 presented an already known heterozygous mutation in CD19: c.1274C > T (S425F). CD19 mutation carriers have been shown to develop a breakdown in B cell tolerance [25] and autoimmunity. We found that 5 homozygous and 3 heterozygous mutations on APRIL: c.287A > G (A96S) and c.199G > A (G67A) mutations are thought to be tolerated in SIFT® and Polyphen® and even if reported before, are currently considered to be benign and not causing damages (Table S1A).

Discussion

Autoimmune cytopenias are the most common autoimmune manifestations in CVID, especially ITP and AIHA [26]. On the other hand, neutropenia appears to be rare during CVID and is poorly reported in large cohorts of patients [10, 12, 15, 27]. Indeed, Cunningham-Rundles et al. in their cohort of 248 patient's individualized 55 patients (22%) with autoimmunity among which 2 had neutropenia (prevalence 0.8%) [10]. Resnick et al. in a larger cohort in the same center confirmed a frequency below 1% for neutropenia among 473 patients and did not individualize these patients in further analyses [12]. Plebani et al. in their follow-up study of 224 patients (mean time of 11 years) with CVID reported a prevalence of 2.7% of neutropenia at diagnosis and an additional 1.1% during the follow-up [27]. The EUROclass trial, with 303 European patients with CVID enrolled, did not distinguished neutropenia of the others auto-immune cytopenias [9, 15]. Thus, we must refer to small series of patients with PID or CVID reported with neutropenia to analyze their clinical features and specificities [28–30]. Here, we took advantage of a large cohort of CVID patients to describe the prevalence and consequences of neutropenia in CVID.

In the light of our results, during CVID course, neutropenia is peripheral and can be a single event or chronic. In this series, six patients were treated with steroids for diverse reasons and five with G-CSF. Four patients were splenectomized. Most patients were recurrently infected, five of them with opportunistic infections, but the direct link with neutropenia was not obvious as none of the patients presented a life-threatening event concomitantly of neutrophils count below 200/mm3. A normal BM analysis, together with the exclusion of other causes of peripheral neutropenia (sequestration by the spleen, toxics, and medications), and often the association with ITP or AHAI allowed to consider neutropenia in CVID as autoimmune.

AC patients have been independently studied and compared to non-AC patients in the DEFI study. Males are more frequently affected and age at CVID diagnosis is younger than in the non-AC group, which is the case in CVID patients with neutropenia. Considering the B and T cell profiles, and as previously reported in AC, CD21^{low} B cells were expanded although their precise roles in autoimmunity remain to be determined [8]. These cells have been reported to produce auto-antibodies in several auto-immune conditions such as rheumatoid arthritis or SLE [31, 32] and are frequently suspected to be autoreactive cells [16, 33, 34]. The pro-inflammatory environment in this CVID' patients could pro-mote their expansion [35].

CVID patients with neutropenia are severe with an increased morbidity, even when compared to AC group, and displayed an increased frequency of non-infectious complications such as polyclonal LP, pulmonary, or digestive tract diseases. IgG levels can be very low with almost no B cells. Considering the infec-tious profile and the lower levels of T cells under 400*10^6/L in nearly half neutropenic patients, some of them carried risks as CID patients [18]. It is interesting to notice that in their series of CVID, Maffucci P. et al. [36] described two cases of neutrope-nia. Both patients presented several severe clinical manifesta-tions (LP, AC, others autoimmune) and one died at the age of Altogether, we propose that the occurrence of neutropenia in CVID should be considered as an Balarm bell^ event that burdens the global prognosis.

The treatment of autoimmune neutropenia occurring in CVID is not well established. It should be guided by the se-verity and the persistence of the neutropenia and potentially related septic complications. It could associate steroids, high-dose of immunoglobulins (1–2 g/kg), and G-CSF therapies. Some authors reported paradoxical neutropenia after immuno-globulin replacement, especially in ITP, but this effect is usually transient [29, 37, 38]. Splenectomy and rituximab therapies are generally useless and give transitional reversion of neutrophil counts [39]. Furthermore, they could increase the overall risk of infections, and rituximab should be used with caution as it could be associated with late-onset neutropenia due to polymorphisms in the FcyRIII [40]. Recently, abatacept and mTOR inhibitors (sirolimus) seem promising in LP and AC [41, 42]. Genetic analysis could help to guide the choice, but the vast majority of CVID patients do not have a defined genetic defect. In this series, most patients were not treated specifically for neutropenia but for other manifestations of their disease.

We collected genetic data for eight severely affected patients. Interestingly, one patient presented two mutations in RAG2. One of these two mutations is undescribed and although not predicted deleterious, it concerned RAG2 core region, which associates RAG1 in the RAG complex [43]. The other one has been described as polymorphism in CVID but concerns an intronic region. The phenotype of this patient, however, is not classical in view of a presumed hypomorphic RAG defect. Although he presented with LP and AC, no granulomatous disease was diagnosed and he was not profoundly lymphopenic. We identified in this small cohort several mutations in TACI and a rare damaging mutation in BAFF-R. TACI protein (calcium-modulating cyclophilin ligand interactor) is a cell membrane receptor for two ligands (APRIL and BAFF). BAFF binds also with high affinity to the BAFF-R and less strongly to another B cell receptor (BCMA). TACI ligation leads to B cell differentiation, isotype switch, and Ig production, mostly T-independent. Mutations in TACI are found in 10% of patients with CVID [36, 44], and TACI impairment, even in heterozygous forms, is associated with B cell defects in tolerance process and differentiation. Mice fully deficient for BAFF-R or TACI develop B cell defect, hypogammaglobulinemia, and a lymphoproliferative syndrome with autoimmunity for TACI knock-out [45, 46]. However, even human homozygous defects in BAFF-R and TACI present variable penetrance and TACI mutated CVID patients [47] are not constantly affected with LP and AC. APRIL heterozygous mutations were frequent in our analysis and intriguing considering that APRIL is a TACI ligand. Unfortunately, these APRIL mutations are difficult to interpret considering their general frequency and the absence of APRIL functional study in CVID. Several patients were affected with at least two mutations that can be related to CVID and/or their phenotype, as patient 1 with mutations in RAG2 and BAFF-R. These results highlighted the complex inheritance of CVID, with the involvement of still unknown genes and likely polygenicity. Systematic targeted NGS explorations may help in a rather low percentage of cases but more likely whole exome sequencing compared to familial data is probably the best option to help therapeutic, even in cohort with homogenous severe phenotypes.

Authors Contribution A.G., R.M-C., L.G., C.F, E.O., A.S.K de-signed the research.
A.G., R.M-C, L.G., B.B., V.C., J.D., M.G., M.K., R.N-J., T.M, V.P, P.S-S, C.F, E.O, and A.S.K performed the research.
A.G, R.M-C., V.G, C.L, A.P, F.R-L, I.A-S, and A.S.K. analyzed the data.
A.G., R.M-C., V.G., I.A-S, and A.S.K. wrote the paper.
All the authors read and approve the final manuscript.

Funding APJC (appel à projet jeune chercheur) DICEP GIRCI Grand Est 2016.
RARENET co-financed by the ERDF of the EU in the framework of the INTERREG V Upper Rhine program.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International consensus document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. J Allergy Clin Immunol Pract. 2016;4:38–59.
2. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for primary immunodeficiency 2015. J Clin Immunol. 2015;35:696–726.
3. Castigli E, Geha R. Molecular basis of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:740–6.
4. Kopecký O, Lukesová S. Genetic defects in common variable immunodeficiency. Int J Immunogenet. 2007;34:225–9.
5. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 2011;127:1360–1367e6.
6. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? J Med Genet. 2016;53:575–90.
7. Grimbacher B, Warnatz K, Yong PFK, Korganow A-S, Peter H-H. The crossroads of autoimmunity and immunodeficiency: lessons from polygenic traits and monogenic defects. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:3–17.
8. Boileau J, Mouillot G, Gérard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. J Autoimmun. 2011;36:25–32.
9. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, et al. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. J Allergy Clin Immunol. 2012;130:1197–8.
10. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol. 1999;92:34–48.
11. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. Br J Haematol. 2009;145:709–27.
12. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. Blood. 2012;119:1650–7.
13. Wehr C, Gennery AR, Lindemans C, Schulz A, Hoenig M, Marks R, et al. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:988–997.e6.
14. Garrison EBG. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. Q-BioGN. 2012:1207–3907.
15. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Blood. 2008;111:77–85.
16. Rakhmanov M, Gutenberger S, Keller B, Schlesier M, Peter H-H, Warnatz K. CD21low B cells in common variable immunodeficiency do not show defects in receptor editing, but resemble tissue-like memory B cells. Blood. 2010;116:3682–3.
17. for the DEFI Study Group, Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier J-L, Fieschi C, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. J Clin Immunol. 2010;30:746–55.
18. Bertinchamp R, Gérard L, Boutboul D, Malphettes M, Fieschi C, Oksenhendler E, et al. Exclusion of patients with a severe T-cell defect improves the definition of common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol Pract. 2016;4:1147–57.
19. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. Clin Infect Dis. 2009;49:1329–38.
20. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. Clin Infect Dis. 2008;46:1547–54.
21. Romberg N, Virdee M, Chamberlain N, Oe T, Schickel J-N, Perkins T, et al. TNF receptor superfamily member 13b (TNFRSF13B) hemizygosity reveals transmembrane activator and CAML interactor haploinsufficiency at later stages of B-cell development. J Allergy Clin Immunol. 2015;136:1315–25.
22. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. Nat Genet. 2007;39:430–1.
23. Kutukculer N, Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Berdeli A. Three different classifications, B lymphocyte subpopulations, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF-R), TNFSF13 (APRIL) gene mutations, CTLA-4 and ICOS gene polymorphisms in Turkish patients with common variable immunodeficiency. J Clin Immunol. 2012;32:1165–79.
24. Aricò M, Boggio E, Cetica V, Melensi M, Orilieri E, Clemente N, et al. Variations of the UNC13D Gene in Patients with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. Wallace GR, editor. PLoS ONE. 2013;8:e68045.
25. Morbach H, Schickel J-N, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco JL, et al. CD19 controls toll-like receptor 9 responses in human B cells. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:889–898.e6.
26. Lopes-da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. J Clin Immunol. 2008;28:46–55.
27. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. J Clin Immunol. 2007;27:308–16.
28. Kuijpers TW, de Haas M, de Groot CJ, von dem Borne AE, Weening RS. The use of rhG-CSF in chronic autoimmune neutropenia: reversal of autoimmune phenomena, a case history. Br J Haematol. 1996;94:464–9.
29. Lemos S, Jacob CMA, Pastorino AC, Castro APBM, Fomin ABF, Carneiro-Sampaio MMS. Neutropenia in antibody-deficient patients under IVIG replacement therapy. Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allerg Immunol. 2009;20:97–101.
30. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, Burg MV d, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. Blood. 2006;107:3045–52.
31. Hart M, Page E, Ford T, Greathead L, Wilson R, Loebinger M, et al. Increases in CD21low B cells are significantly associated with levels of circulating TNF family chemokines BAFF and APRIL in CVID patients. Immunology. 2010;131:96.
32. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter H-H, et al. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. Clin Immunol. 2004;113:161–71.
33. Isnardi I, Ng Y-S, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, et al. Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. Blood. 2010;115:5026–36.
34. Warnatz K, Wehr C, Dräger R, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, et al. Expansion of CD19hiCD21lo/neg B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. Immunobiology. 2002;206:502–13.

35. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevska A, Frede N, et al. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN-γ-associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2017.
36. Maffucci P, Filion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova J-L, et al. Genetic diagnosis using whole exome sequencing in common variable immunodeficiency. Front Immunol. 2016;7:220.
37. Berkovitch M, Dolinski G, Tauber T, Aladjem M, Kaplinsky C. Neutropenia as a complication of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy in children with immune thrombocytopenic purpura: common and non-alarming. Int J Immunopharmacol. 1999;21:411–5.
38. Niebanck AE, Kwiatkowski JL, Raffini LJ. Neutropenia following IVIG therapy in pediatric patients with immune-mediated thrombocytopenia. J Pediatr Hematol Oncol. 2005;27:145–7.
39. Dungarwalla M, Marsh JCW, Tooze JA, Lucas G, Ouwehand W, Pettengell R, et al. Lack of clinical efficacy of rituximab in the treatment of autoimmune neutropenia and pure red cell aplasia: implications for their pathophysiology. Ann Hematol. 2007;86:191–7.
40. Weng W-K, Negrin RS, Lavori P, Horning SJ. Immunoglobulin G fc receptor FcγRIIIa 158 V/F polymorphism correlates with rituximab-induced neutropenia after autologous transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2010;28:279–84.
41. Bride KL, Vincent T, Smith-Whitley K, Lambert MP, Bleesing JJ, Seif AE, et al. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial. Blood. 2016;127:17–28.
42. Zheng P, Chang X, Lu Q, Liu Y. Cytopenia and autoimmune diseases: a vicious cycle fueled by mTOR dysregulation in hematopoietic stem cells. J Autoimmun. 2013;41:182–7.
43. Notarangelo LD, Kim M-S, Walter JE, Lee YN. Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. Nat Rev Immunol. 2016;16:234–46.
44. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:468–76.
45. von Bülow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. Immunity. 2001;14:573–82.
46. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. Immunity. 2003;18:279–88.
47. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. Nat Genet. 2005;37:820–8.

III. Recherche de voies physiopathologiques communes

a. Patients et Méthodes

- **Patients et Témoins** :

La **table 10** ci-dessous résume les principales caractéristiques des patients explorés :

Patients	Sexe	Age	Splen-ectomie	Phénotype	AHAI	PTI	Neutro pénie	LP	Gra	EC	IS au phénotyp age	T/B/ NK	TFH CTLA4/ LRBA Treg	NGS
DIP 001	F	53,4	Oui	ALPS-*like* 21^{low} augmentées	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Cortancyl 25mg/j	Oui	Oui/Oui/ Oui	Oui$^{T;}$ WES
DIP 002	F	61,94	Non	B-CID	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Cortancyl 10mg (Ritux 18 mois auparavant)	Oui	Oui/Non/ Oui	Oui^{W} ES
DIP 003	F	34,5	Non	B-CID	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Plaquenil 200mg/j - Cortancyl 3mg/j - Zarzio 2inj/semaine	Oui	Oui/Oui/ Oui	Oui^{T,} WES
DIP 004	H	60,2	Oui	B+ SmB+ Tr Norm 21^{low} augmentées	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui/Non/ Non	Oui^{W} ES
DIP 005	H	23,3	Oui	B-CID	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui/Non/ Non	Oui$^{T;}$ WES
DIP 006	H	39,3	Non	B+ SmB+ Tr High 21^{low} augmentées	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui/Non/ Non	Oui^{T}
DIP 007	H	23,16	Oui	ALPS-*like* 21^{low} augmentées	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non puis Sirolimus	Oui	Oui/Oui/ Oui	Oui^{T,} WES
DIP 008	H	36,4	Non	B-CID	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui/Oui/ Oui	Oui^{W} ES
DIP 009	H	50,4	Non	ALPS-*like*	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Cortancyl 40mg/j	Oui	Oui/Non/ Oui	Oui$^{T;}$ WES
DIP 010	H	44,2	Non	B+ SmB-TrNorm 21low Norm	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui/Non/ Non	Oui^{T}
DIP 011	H	32	Non	B+ SmB+ 21^{low} augmentées	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui^{T,} WES
DIP 012	H	33	Oui	B-LO-CID	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui^{T}
DIP 013	H	63	Non	B+ SmB- Tr norm 21^{low} augmentées	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui^{T}
DIP 014	F	52	Non	B+ SmB-Tr norm 21^{low} augmentées	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui^{T}
DIP 015	H	24	Non	B+ SmB-Trhi	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui^{T}

				21^{low} augmentées										
DIP 016	F	32	Non	B+ smB- Tr norm 21^{low} augmentées	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui$^{W ES}$
DIP 017	H	26	Non	LOCID B-	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non/Non /Non	Oui$^{W ES}$

Table 10 : caractéristiques des patients explorés en immunophénotypage. H : Homme – F : Femme Oui : présence du critère – Non : absence du critère -AHAI : Anémie Hémolytique Auto-immune – CID : déficit immunitaire combiné -B : lymphocytes B, SmB : lymphocytes B mémoires switchés – Tr : cellules transitionnelles -21low : lymphocytes B CD21lowCD38low atypiques augmentés- LP : Lymphoprolifération – Gra : Granulome – EC : Entéropathie Chronique – IS : immunosuppresseurs – T/B/NK : immonophénotypage lymphocytaire T/B et NK – TFH, CTLA4/LRBA/T-reg : immunophénotypage T-régulateurs / NGS : séquençage haut débit (Next Generation Sequençing) – ^{T} : target NGS (panel de gènes) ; ^{wes} : whole Exome sequençing (séquençage de l'exome entier).

La **table 11** ci-dessous résume les caractéristiques des témoins :

Témoins	Sexe	Age	Splenectomie	AHAI	PTI	Neutropénie	LP	Granulome	EC	Traitements
Témoin 001	H	29,18	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 002	F	45,22	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 003	H	28,5	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 004	F	51,13	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 005	F	26,87	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 006	H	43,15	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 007	F	24,75	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 008	H	29,88	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 009	F	25,55	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun
Témoin 010	F	29,88	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Aucun

Table 11: caractéristiques des patients explorés en immunophénotypage H : Homme – F : Femme – Oui : présence du critère – Non : absence du critère -AHAI : Anémie Hémolytique Auto-immune – LP : Lymphoprolifération – Gra : Granulome – EC : Entéropathie Chronique

b. Résultats des immunophénotypages :

La Figure 18 donne les résultats de l'immunophénotypage standard des patients inclus dans notre analyse.

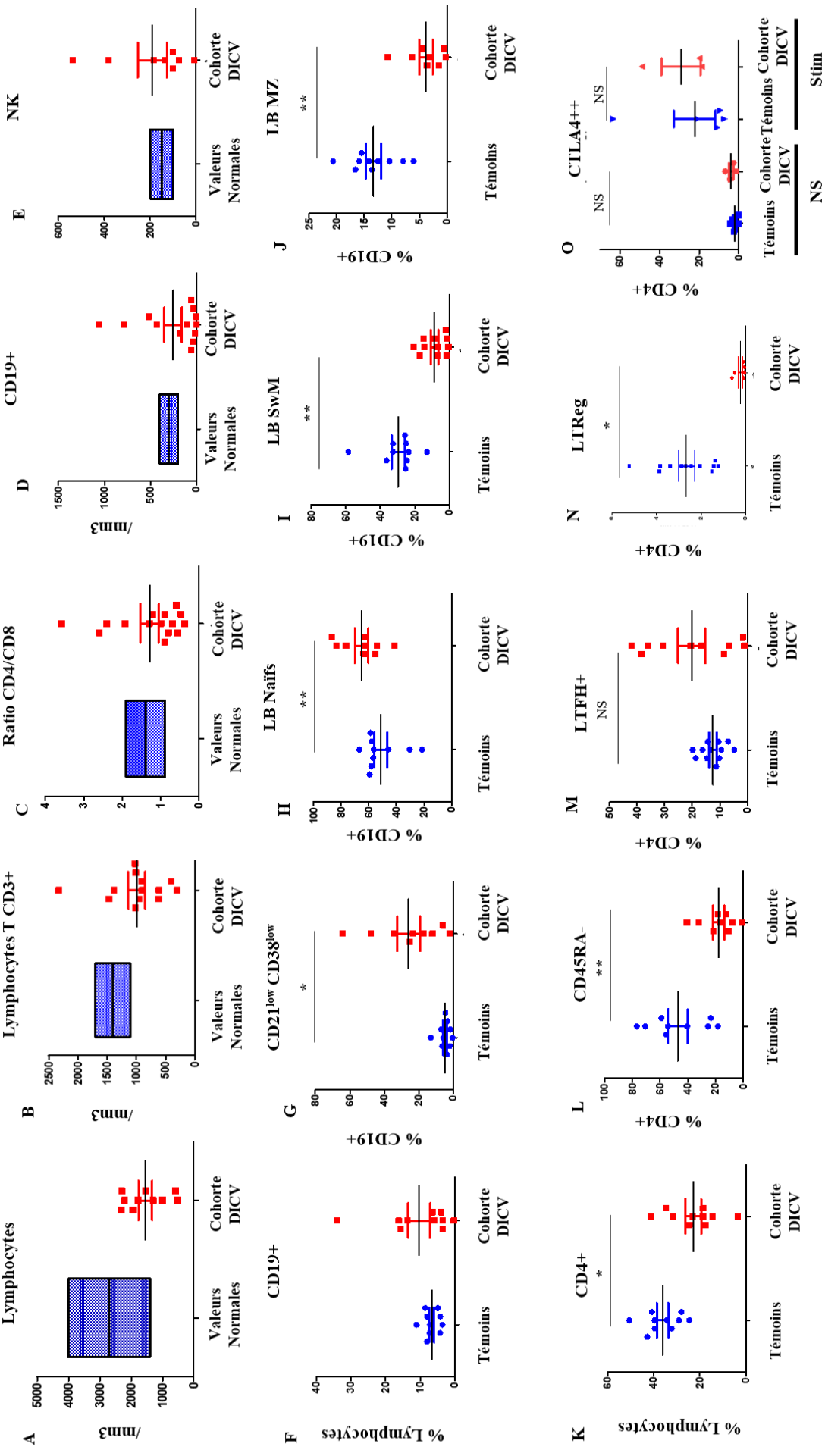


Figure 18 : Immunophénotypage des patients de la cohorte Neutropénie + DICV/CID. Immunophénotypage stadard comparé aux normes du laboratoire (lymphocytes totaux (A), T CD4, Ratio CD4/CD8, CD19+ et lymphocytes NK (B-E) ; Phénotypage B détaillé (F-J) comparé à 10 témoins ; Immunophénotypage T détaillé (K-N) et expression membranaire de CTLA4 chez 4 patients testé et 4 témoins (O). NS : Non stimulé ; Stim : anti-CD3aCD28

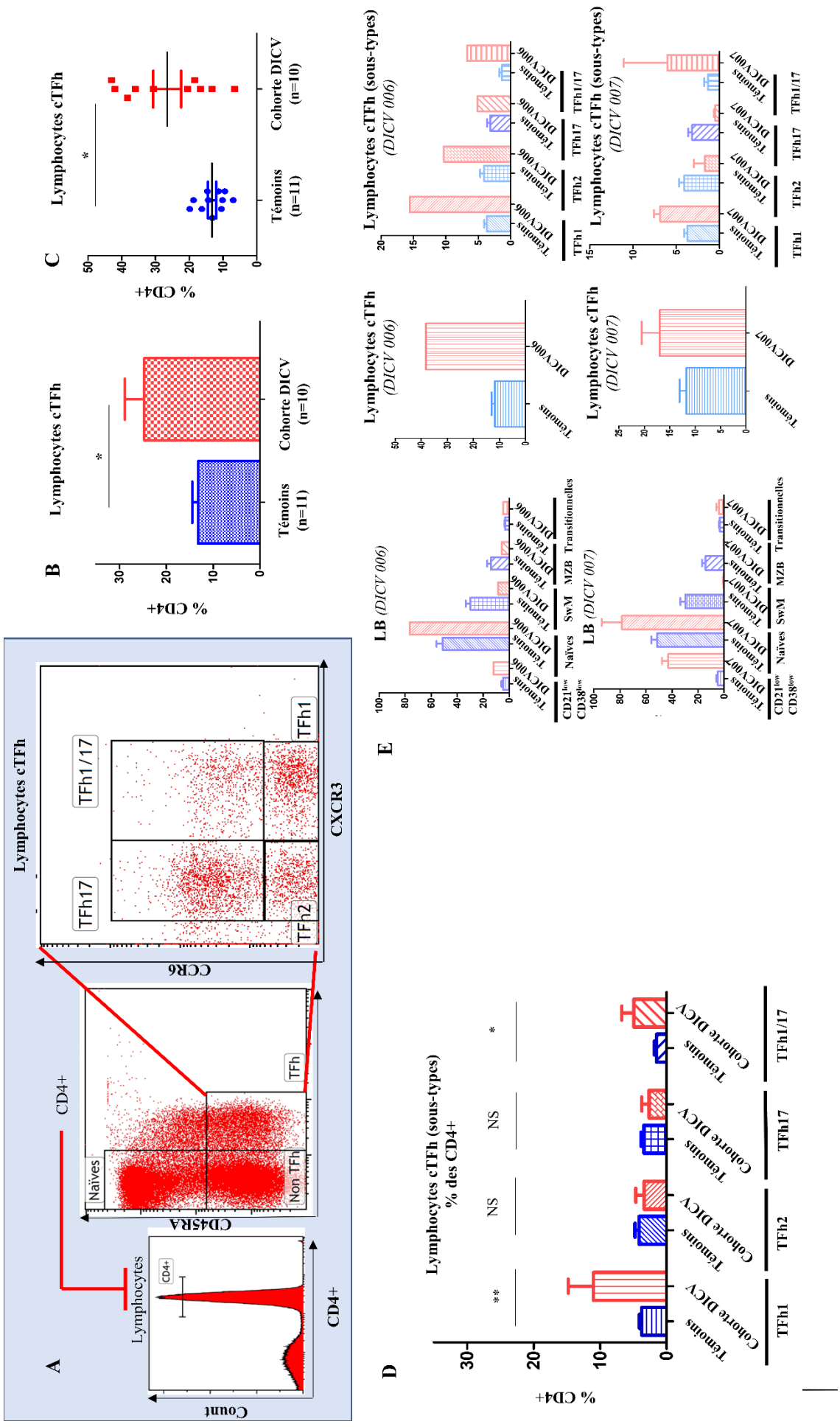


Figure 19: Immunophénotypage cTFh de la cohorte Neutropénie + DICV/CID. Stratégie de Gating des lymphocytes TFHc (A) et résultats sur la cohorte (B-C) ; Détail des sous population cTFH (D) et exemple des résultats chez 2 patients représentatifs (E).

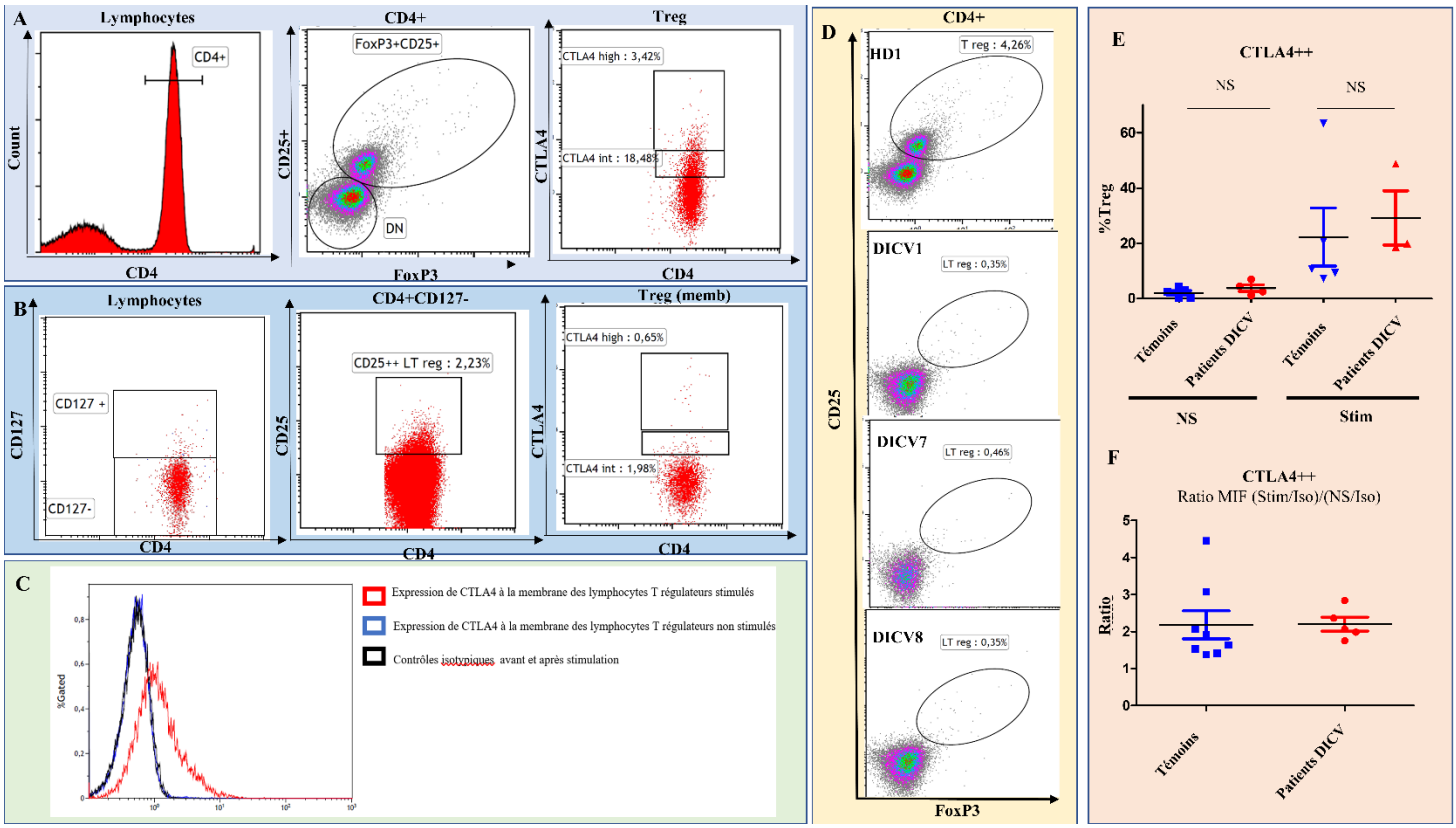


Figure 20 : Immunophénotypage des LT regulateurs des patients de la cohorte DICV/CID avec Neutropénie comparée aux témoins. Stratégie de gating des lymphocytes T régulateurs intracellulaire (A) ou membranaire (B) et du marquage CTLA4 dans chacune de ces conditions (A-B). Diminution des lymphocytes T régulateurs chez les patients (B) sans diminution de la capacité d'expression membranaire de CTLA4 (C). Expériences réalisées chez 5 patients DICV/CID avec Neutropénies et 8 témoins. Stim : stimulation aCD3aCD28 pendant 30 minutes.

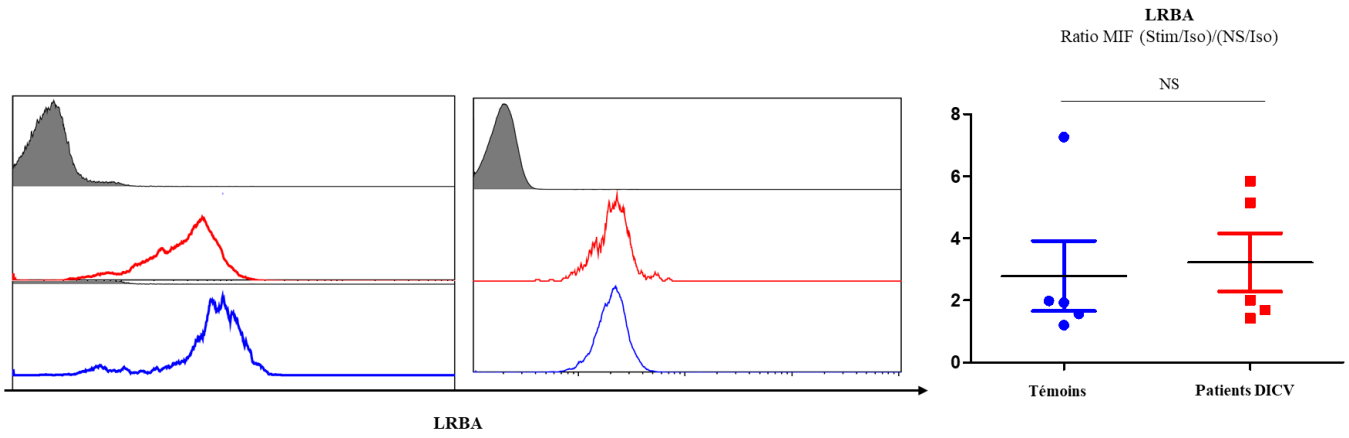


Figure 21 : Quantification intracellulaire de LRBA dans les lymphocytes T. Résultats chez 5 patients et 5 témoins.

c. Discussion sur les résultats de l'immunophénotypage :

- **Résultats de l'immunophénotypage B et T** :

Les patients de notre cohorte présentaient des caractéristiques de DICV ou de CID avec fréquemment une lymphopénie globale (**Figure 18A)** attestant d'une lymphopénie T CD3 (**18B**) et B CD19 (**18D**). Lorsque

l'on regarde les caractéristiques des sous populations lymphocytaires B, on observe une augmentation statistiquement significative des $CD21^{low}CD38^{low}$ et des lymphocytes B naïfs (CD27-) au détriment des CD27+ (LB mémoires switchés) (**18H et 18I**). Les lymphocytes T CD4 sont fréquemment diminués au détriment des lymphocytes T CD4 naïfs (**18K** et **18L**). Un tel phénotype s'accorde avec un profil pro-inflammatoire, associé à des complications auto-immunes, une lymphoprolifération voire une granulomatose au cours du DICV (cf. cohortes de DICV : (Boileau et al., 2011; Chapel et al., 2008; Cunningham-Rundles and Bodian, 1999; Resnick et al., 2012)).

- **Résultat de l'immunophénotypage cTFh** :

Suivant la stratégie de ciblage des lymphocyte cTFh que nous avons choisi (**Figure 19A**), nous avons mis en évidence une augmentation significative des lymphocytes T folliculaires circulants (cTFh CD4+CD45RA-CXCR5+) chez nos patients atteints de DICV/CID et neutropénie par rapport aux témoins (**Figure 19B**). Il s'agit plus particulièrement des sous-types TFh1 et TFh1/17 exprimant CXCR3 (**Figure 19C**). CXCR3 est induit sous l'effet de l'interférons (IFNγ en particulier). Les patients présentant des complications inflammatoires au cours du DICV présentent des taux augmentés d'IFNγ et une augmentation de transcription des gènes de réponse à l'interféron (Park et al., 2013). Cette caractéristique est fréquemment associée à une augmentation des lymphocytes B $CD21^{low}CD38^{low}$ tel que cela a pu être rapporté récemment (Turpin et al., 2018; Unger et al., 2017). Pris ensemble, ces données suggèrent un schéma INFg-dépendant dans lesquels les LTFh1 et les $CD21^{low}CD38^{low}$ pourraient servir de marqueurs. Par ailleurs, les LTFh1 et TFh1/17 exprimant CXCR3 ainsi produits exerceraient une aide (*help*) moins importante pour les LB dans les organes lymphoïdes secondaires, renforçant par ce mécanisme le déficit humoral.

- **Mise au point du marquage CTLA4/LRBA dans les lymphocytes T et résultats sur les lymphocytes T régulateurs** :

Le chiffre de lymphocytes T régulateurs CD3+CD4+FoxP3+CD25+ en marquage intramembranaire (**Figure 20A**) ou $CD3+CD4+CD127-CD25^{high}$ **(20B)** était particulièrement effondré dans notre cohorte (**Figure 3N**) rendant les expériences sur cette population difficile à réaliser. Cependant, pour certains patients (n=5), nous avons pu évaluer l'expression de CTLA4 (**Figure 20C**). L'étude de l'expression de CTLA4 consistait à faire un marquage CTLA4 membranaire à T0 sur les lymphocytes T CD4 triés puis à stimuler une partie des cellules non marquées pendant 30 minutes (aCD3aCD28) pour réaliser un marquage CTLA4 afin d'étudier la capacité d'expression de CTLA4 à la membrane (**20C**). Les résultats étaient exprimés en fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence du marqueur CTLA4 sur les cellules

CD3+CD4+CD25highCD127- (T-reg) (**20D**) puis comme ratio (normalisé sur le contrôle isotypique) de l'intensité de fluorescence de CTLA4 des cellules stimulées par rapport au cellules non stimulées (**20E**). En parallèle non regardions le marquage CTLA4 intracellulaire pour vérifier qu'il n'y avait pas de différence du « stock » de CTLA4 disponible dans les lymphocytes T CD4+. Pour LRBA, nous avons observé en intracellulaire la quantité totale de la protéine (par un marquage indirect tel que décrit par *Lo B et al.* (Lo et al., 2015) dans les CD4+ triés non stimulés et stimulés (**Figure 21**).
Il n'y avait pas de différence de l'expression de CTLA4 membranaire, intracellulaire ou de la capacité d'expression sous-stimulation à 30 minutes (stim aCD3aCD28) (**20D et 20E)**. Enfin, l'expression de LRBA intracellulaire n'était pas non plus diminuée (**Figure 21**).

Au total cet ensemble d'experiences sur les lymphocytes T CD4+ triés et en particulier les lymphocytes T régulateurs, montre une déplétion profonde de cette population chez les patients de la cohorte de DICV/CID avec neutropénie. Lorsqu'ils peuvent être analysés, ces lymphocytes T régulateurs ne présentent pas d'anomalies intrinsèques d'expression ou de capacité d'expression de CTLA4 ou LRBA (qui aurait pu guider vers une altération de cette voie chez les malades). **Ici, le défaut quantitatif domine le défaut qualitatif des T régulateurs pour participer au phénotype observé (lymphoprolifération, entéropathie, granulomatose) et à la rupture de tolérance, plutôt qu'une atteinte du schéma CTLA4/LRBA.**

IV. Etude génétique d'une cohorte de patients adultes DICV/CID avec auto-immunité (cyto-immunité et neutropénies)

a) Principes d'analyse

La description du panel NGS utilisé et des techniques de séquençage sont détaillées dans la partie *Matériels et Méthodes*. L'analyse des variants issus du panel NGS ou des données d'exomes a été réalisée sur le logiciel Polyweb® de la pateforme Imagine (IHU Imagine, Paris, France) qui permet en outre, une comparaison à la base de données d'exome et de séquençage (comportant majoritairement des patients atteints de déficits immunitaires primitifs). L'analyse *in silico* est réalisée en utilisant des filtres bio-informatiques habituellement utilisés et basés sur :

- La fréquence du variant dans la population (bases de données 1000G, GnoMAD, *In-house*) : le seuil de 1% est utilisé dans un premier temps pour étudier la liste de façon globale, puis nous affinons jusqu'à 1/10 000 ou sur les variants inconnus.
- Les scores bio-informatiques SIFT®, POLYPHEN®, MUTATION TASTER® et le score CADD® ont été utilisés lorsqu'ils étaient disponibles. Pour le score polyphen, nous avons retenu

les score > 0,85 et pour le score Sift un score inférieur à 0,05. Pour le score CADD, une valeur de 10 ou supérieure est retenue comme hautement délétère. Pour Mutation Taster, les variants sont classés selon leur potentiel impact (de « *polymorphism* » à « disease causing »).

- Une vérification de chaque variant retenu a été faite sur Alamut® (localisation sur le transcrit, existance de mutations connues dans la région concernée, type de mutation, couverture de la zone séquencée).
- La vérification de la pathogénicité connue de chaque variant dans ClinVar (NCBI).
- Une fois triés de la sorte, nous avons regardé l'implication physiopathologique de chaque variant pour envisager la corrélation génotype/phénotype et l'implication potentielle d'une même voie physiopathologique.

b) Résultats généraux de l'analyse sur panel NGS :

La **Table 12** donne le résultat des variants retenus sur le panel génétique pour chaque patient. La fonction connue des gènes correspondants à ces variants est donnée en **Annexe** 1 de cette partie. Nous restituons ici une analyse globale de ces résultats.

La première remarque est que nous ne retrouvons pas de mutations sur les gènes *CTLA4* et *LRBA* comme nous avions pu en émettre l'hypothèse initialement. Il n'y a pas non plus de mutations sur les autres gènes à présent rapportés en association avec ce phénotype de DICV/CID (LP/AC/Auto-immunité), à savoir *PI3KCD*, *NFKB 1*.

De façon intéressante, cette analyse a permis de porter le diagnostic de gain de fonction de STAT1 chez un patient (DIP15) suivi et décédé dans notre service d'une septicémie à staphylocoque (*vignette clinique #1 dans le papier 3 du JOCI ci-dessus*). Plusieurs patients (n=4) étaient porteurs de variants sur TACI (*TNFRSF13B*). Longtemps discutés dans les DICV, le rôle des variants hétérozygotes de TACI (présents chez environ 7% à 10% des patients atteints de DICV) pourrait être associé à une susceptibilité aux complications auto-immunes. Cependant, la vérification fonctionnelle n'est pas univoque sur cette question et le rôle de *TACI* dans le phénotype fait probablement intervenir d'autres facteurs (génétiques ou non) car ces mêmes mutations sont retrouvées chez environ 2% des sujets sains (Castigli et al., 2007; Martinez-Gallo et al., 2013; Salzer et al., 2005). Chez les patients porteurs de variants sur *TACI*, il existerait un défaut de régulation des clones auto-réactifs au niveau central qui pourrait ainsi expliquer la survenue plus fréquente de phénomènes auto-immuns. Chez les individus sains, mutés pour TACI, l'excès de clones auto-réactifs non bloqués au niveau central serait compensé par une régulation efficiente au niveau périphérique (Romberg et al., 2013). La mutation est donc plutôt considérée comme un facteur de risque à l'heure actuelle.

Concernant la mutation hétérozygote de *CD19*, on peut se référer à la discussion sur le rôle de CD19 dans l'auto-immunité (*Partie II de l'Introduction*). Seuls les patients homozygotes pour les mutations de CD19 ont été décrits et l'implication de variants hétérozygotes n'est pas connue. Cependant, ces patients sont rares et il est possible que des anomalies hétérozygotes de *CD19* puissent avoir une répercution sur l'expression de la protéine à la surface des lymphocytes B et favorisent la rupture de tolérance immunitaire par un défaut d'activation lymphocytaire B qui passerait par un schéma TLR9 (Morbach et al., 2016).

PATIENTS	*RESULTATS PANEL NGS*	CDNA	CONSEQUENCE	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	CLINVAR	CADD	FREQUENCE
DIP 013	***CD19*** rs142818579 (hétérozygote)	c.1274C>T	missense	0	NC	Polymorphisme	Incertain (RCV000296469.2) dans le DICV	NC	NC
DIP 007	***UNC13D*** (hétérozygote)	c.3006delC	Frameshift	NC	NC	NC	NC	NC	NC
DIP 015	***STAT1*** (hétérozygote)	c.1154C>T	missense	0	0,996	Disease Causing	Pathogene (RCV000133515.4) STAT1GOF	30	NC
DIP 007	***TNFRSF13B*** rs34557412 (hétérozygote)	c.310T>C	missense	0	1	Disease Causing	Pathogène (RCV000507544.1)	25,9	0,00318
DIP 009	***TNFRSF13B*** **rs34557412** (hétérozygote)	c.310T>C	missense	0	1	Disease Causing	Pathogène	25,9	0,00318
DIP 003	***ARHGEF28*** (hétérozygote)	c.649A>G	missense	0,33	0,54	Polymorphisme	NC	22,9	0
DIP 003	***TRAF1*** rs560261396 (hétérozygote)	c.583C>T	missense	0,01	0,004	Disease Causing	NC	22,9	0,0001
DIP 001	***TNFRSF13B*** rs72553883 (hétérozygote)	c.542C>A	missense	0,06	0,907	Disease Causing	Pathogene (RCV0000056626.2)	22,8	0,00459
DIP 013	***TNFRSF13B*** rs72553883 (hétérozygote)	c.542C>A	missense	0,06	0,907	Disease Causing	Pathogene	22,8	0,00459
DIP 016	***PTPN13*** (hétérozygote)	c.697C>G	missense	0,04	0,309	Disease Causing	NC	22,4	NC
DIP 006	***CFLAR*** rs552260635 (hétérozygote)	c.1136C>T	missense	0,15	0,117	Polymorphisme	NC	16,1	0,00008
DIP 005	***NLRP2*** rs11066658 (hétérozygote)	c.1346C>T	missense	0,02	0,006	Polymorphisme	Pathogene	14,6	0,00026
DIP 006	***NFATC1*** rs372954162 (hétérozygote)	c.2309C>T	missense	0,41	0,102	Disease Causing	NC	13,2	0
DIP 006	***JAK2*** (hétérozygote)	c.1279T>C	missense	0,85	0,053	Disease Causing	NC	13	NC
DIP 009	***PMS2*** rs1388387687 (hétérozygote)	c.1243G>A	missense	0,11	0,011	Polymorphisme	Incertain (RCV000296469.2)	10	0,0002

Table 12 : liste des variants retenus sur le panel NGS de 235 gènes (triés selon le score CADD)**.** NC : non connu. En *rose* lorsque la mutation prédite est délétère pour la fonction de la protéine ou que sa fréquence est rare (<1/10000). En *orange*, lorsque la valeur est intermédiaire ou incertaine et en *vert* lorsqu'elle est prédite non délétère.

c) Résultats généraux de l'analyse en cohorte :

La **Figure 22** donne le résultat des filtres utilisés pour cette analyse.

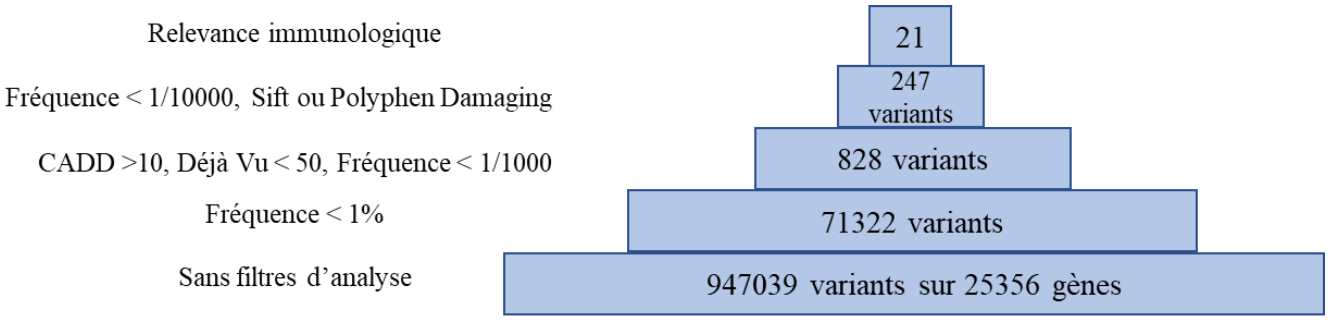


Figure 22 : stratégie de filtre des variants dans l'analyse d'exome en cohorte (n=7 patients).

La **Table 13** résume les résultats de l'analyse d'exome en cohorte. Là encore, la discussion de chacun des variants est proposée en Annexe.

De façon synthétique, il n'apparait pas de voie physiopathologique commune chez ces patients lors d'une analyse groupée. Les variants concernent à la fois des gènes impliqués dans l'immunité innée (C9, *IFI6*, *NCF2*, *IRAK3*, *TRAF1*, *IRAKBP1*, *NLRP3)* ou adaptative (*PTPN7*, *CD4*, *CD46).* Certains variants sont liés à des gènes impliqués dans des fonctions cellulaires comme le fonctionnement du golgi (*GOLGA3*) ou le fonctionnement du cytosquelette d'actine (*ITGB4*, *ANK1*, *ARHGEF28*, *ARHGAP25*, *DOCK8*). Certains variants orientent vers les modifications épigéniques (*PADI3*, *TOPBP1*). L'analyse patient par patient des variants *de novo*, n'a pas permis de trouver d'autres variants candidats (mais nous ne disposions du « trio » que pour la famille DIP007 dans cette analyse groupée). Une analyse en trio séparée de la famille DIP004 s'est également révélée non contributive.

Deux patients (DIP003 et DIP013) sont porteurs de variants inconnus sur *ARHGEF28* impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine. De ce fait, et du fait des travaux récemment publiés sur d'autres RhoGTPase (Bouafia et al., 2018), cela en fait un bon gène candidat à explorer sur le plan fonctionnel.

PATIENTS	*GÈNE*	NOM DU VARIANT	STATUT	cDNA	CONSÉQUENCE	SIFT	POLYPHEN	CADD	FREQUENCE (%)	MUTATION TASTER	CLINVAR
DIP 013	***ITGB4***	17_73726956_A_T	Het	c.1003A>T	gain de codon stop	NC	NC	40	0	NC	Non référencé
DIP 009	***PTPN7***	rs202124558	Het	c.626G>A	Missense	0	1	35	0,0003	Disease Causing	Non référencé
DIP 014	***C9***	rs199939436	Het	c.376G>A	Missense	0,03	1	34	0,022	Disease Causing	Non référencé
DIP 013	***IRAK3***	rs201109976	Het	c.166C>T	Missense	0	1	34	0,032	Disease Causing	Non référencé
DIP 003	***NCF2***	rs13306581	Het	c.836C>T	Missense	0,03	1	33	NC	Disease Causing	Bénin (RCV 000424476.1)
DIP 001	***DOCK8***	9_441915_T_A	Het	c.5396T>A	Missense	0	1	33	NC	Disease Causing	Non référencé
DIP 009	***ANK1***	rs199975878	Het	c.1540G>T	Missense	0	1	31	NC	Disease Causing	Non référencé
DIP 005	***CD4***	rs138218083	Het	c.1286C>T	Missense	0	1	29,6	0,094	Disease Causing	Non référencé
DIP 001	***IFI6***	NC	Het	c.221C>T	Missense	0,05	0,4	28,4	NC	Polymorphisme	Non référencé
DIP 007	***GOLGA3***	rs771048249	Het	c.1946T>G	Missense	0	1	28,3	0,00041	Disease Causing	Non référencé
DIP 001	***ARHGAP25***	2_69002524_A_G	Het	c.233A>G	Missense	0,01	1	26,6	NC	Disease Causing	Non référencé
DIP 009	***ILDR1***	rs115649165	Het	c.461C>T	Missense	0,3	0,799	26,5	0,045	Disease Causing	Incertain
DIP 003	***IRAKBP1***	rs765918588	Het	c.482T>C	Missense	0	0,98	26,2	0,0017	Disease Causing	Incertain (RCV0000150843.1)
DIP 009	***TOPBP1***	3_133379928_T_G	Het	c.44A>G	Missense	0,12	0,932	23,5	NC	Disease Causing	Non référencé
DIP 003	***CD101***	rs41276562	Het	c.1207G>A	Missense	0,01	0,994	23,4	0,0036	Polymorphisme	Non référencé
DIP 003	***LAD1***	rs766720549	Het	c.191C>T	Missense	0,01	0,999	23,2	0,0061	Polymorphisme	Non référencé
DIP 003	***ARHGEF28***	NC	Het	c.649A>G	Missense	0,89	0,85	22,9	NC	Polymorphisme	Non Connu
DIP 014	***PADI3***	rs748115863	Het	c.985A>C	Missense	0,02	0,427	22,5	NC	Polymorphisme	Non référencé
DIP 007	***CD46***	1_207934644_A_G	Het	c.526A>G	Missense	0,06	0,99	19,9	NC	Polymorphisme	Non référencé
DIP 013	***ARHGEF28***	NC	Het	c.3409T>C	Missense	0,55	0,87	16,3	NC	Disease Causing	Non Connu
DIP 007	***NLRP3***	rs147946775	Het	c.2182A>G	Missense	0,01	0,996	12,5	0,052	Polymorphisme	Incertain (RCV000626053.1)

Table 13 : liste des variants retenus à partir de l'analyse d'exome (trié selon le score CADD)**.** NC : non conuu. En *rose* lorsque la mutation prédite est délétère pour la foncion de la protéine ou que la fréquence est rare (<1/10000). En *orange*, lorsque la valeur est intermédiaire ou incertaine et en *vert* lorsqu'elle est prédite non délétère.

d) Corrélation phénotype-génotype :

La **table 14** ci-dessous donne la corrélation des variants retrouvés selon les patients concernés par ces variants.

PATIENTS	*GÈNE*
DIP 001	*TNFRSF13B*
DIP 001	*LRBA*
DIP 001	*DOCK8*
DIP 001	*IFI6*
DIP 001	*ARHGAP25*
DIP 003	*TRAF1*
DIP 003	*NCF2*
DIP 003	*IRAKBP1*
DIP 003	*CD101*
DIP 003	*LAD1*
DIP 003	*ARHGEF28*
DIP 005	*CD4*
DIP 005	*NLRP2*
DIP 006	*CFLAR*
DIP 006	*JAK2*
DIP 006	*NFATC1*
DIP 007	*UNC13D*
DIP 007	*GOLGA3*
DIP 007	*CD46*
DIP 007	*NLRP3*
DIP 007	*TNFRSF13B*
DIP 009	*TNFRSF13B*
DIP 009	*PTPN7*
DIP 009	*ANK1*
DIP 009	*ILDR1*
DIP 009	*TOPBP1*
DIP 009	*PMS2*
DIP 013	*CD19*
DIP 013	*TNFRSF13B*
DIP 013	*ARHGEF28*
DIP 013	*ITGB4*
DIP 013	*IRAK3*
DIP 014	*C9*
DIP 014	*PADI3*
DIP 015	*STAT1*
DIP 016	*PTPN13*

- Patient DIP 001 : cette patiente présente une lymphoprolifération, des cytopénies auto-immunes (AHAI, PTI) et une expansion des LB CD21^{low}. Au plan génétique, ce phénotype ALPS-*like,* est associé *ici* au variant A181E de *TACI* et à 2 variants non référencés sur *ARHGAP25* et *IFI6.* Ces 2 variants restent deux bons candidats pour expliquer ce phénotype. IFI6 joue un rôle dans l'immunité anti-VHC et apparait dans la voie de l'apoptose médiée par *TNFSF10* (TRAIL). ARHGAP25 est lié au réarrangement du cytosquelette d'actine, mais son rôle précis dans les cellules immunitaires n'est pas établi (plutôt associé à des phénotypes neurologiques).

- Patient DIP 003 : cette patiente a un phénotype de CID avec une auto-immunité (AHAI), une lymphoprolifération (hépato-splénomégalie, polyadénopathie) et une pancytopénie périphérique (hypersplénisme et auto-immune). Elle présente une lymphopénie T et B profonde. Elle a refusé la procédure d'allogreffe qui lui était proposée. *TRAF1*, *IRAKBP1* et *ARHGEF28* restent des bons gènes candidats. *TRAF1* parce que les défauts de ce gène chez la souris KO sont à l'origine d'une lymphoprolifération et d'une activation du signal NFKB dans les lymphocytes T (Tsitsikov et al., 2001)(*Tsitsikov et al. Immunity, 2001*). IRAKBP1 pour son implication dans la régulation de la voie NFKB et ARHGEF28 en tant que régulateur de l'organisation du cytosquelette d'actine et de son expression dans les cellules immunitaires.

Table 14 : liste des variants retenus par patients testés (panel et exome). En *bleu*, les variants de TNFRSF13 (voir discussion). En *jaune*, les variant potentiellement responsables du phénotype. En *saumon*, le variant de STAT1, publié et responsable d'un gain-de-fonction.

- Patient DIP 005 : le patient présentait une lymphopénie sévère avec un CID et de nombreux épisodes infectieux sévères dès l'enfance (2 méningites bactériennes à pneumocoque, des otites à répétitions, des bronchites et pneumopathies). Il avait un PTI et une AHAI de début pédiatrique et un eczéma. Il a été greffé du cœur et du poumon pour une insuffsance respiratoire terminale compliquée d'une HTAP. Le patient est décédé à l'âge de 28 ans. La corrélation des variants retrouvés (*CD4, NLRP2*) ne permet pas d'expliquer le phénotype.

- Patient DIP 006 : ce patient présente des épisodes infféctieux récurrents depuis l'enfance (ORL, bronchique) avec une lymphoprolifération (adénopathies, splénomégalie) et une granulomatose. Il a développé des manifestations auto-immunes à type de PTI et une atteinte rénale (glomérulonéphrite). Sur le plan immunologique, il présente un phénotype de DICV avec expansion des lymphocytes B $CD21^{low}CD38^{low}$. Les variants de *NFATC1* et de *CFLAR* constituent des candidats potentiels pour expliquer le phénotype.

- Patient DIP 007 : ce patient présente un phénotype de DICV avec lymphoprolifération ALPS-*like* sans qu'aucune mutation germinale ou somatique (*vérifiée par l'équipe de Rieux-Laucat, Imagine, France*) n'ait été retrouvée. Le frère de ce patient est également atteint d'une hypogammaglobulinémie mais sans lymphoprolifération et les parents n'ont pas de phénotype de déficit immunitaire primitif. Une analyse familiale complémentaire n'a pas révélé de variant supplémentaire et a permis d'invalider le variant UNC13D également présent chez les individus sains de la famille (parents). De même, *CD46* qui était un bon candidat du fait de son rôle présumé dans les lymphocytes T régulateurs est éliminé par la ségrégation (présent chez le père). L'analyse de l'exome sous l'hypothèse récessive, ne retrouvait aucun variant.

- Patient DIP 009 : ce patient présente un phénotype ALPS-*like* avec une évolution par poussées faites de lymphoprolifération (adénopathies, hépato-splénomégalie) et cytopénies auto-immunes qui répondent favorablement à la corticothérapie. Il n'a pas de réplication EBV sanguine ou histologique (marquage négatif sur les biopsies). Il a présenté des épisodes infectieux ORL et bronchiques répétés dans l'enfance. Il ne présente pas de lymphopénie profonde ni d'anomalies de l'immunophénotypage B. Les immunoglobulines sont à la limite de la norme. Il ne répond pas complètement aux critères de DICV. Par ailleurs il présente des auto-anticorps (anticardiolipines et anti-β2GP1) d'isotype IgM à taux élevés (sans manifestations thrombotiques jusqu'à présent). Dans ce contexte, aucun des variants

retrouvés ne permet d'envisager une corrélation génotype/phénotype. Le patient est porteur du variant de *TACI* (C104R).

- Patient DIP 013 : Ce patient présentait un DICV avec des troubles digestifs (malabsorption), des infections répétées en lien avec une hypogammaglobulinémie profonde. On notait la présence d'un vitiligo. L'immunophénotypage montrait une expansion des lymphocytes B transitionnels et $CD21^{low}$. Il a présenté un PTI puis un lymphome B diffus à grande cellules dont il est décédé à plus de 70 ans.

- Patient DIP 014 : Cette patiente présente un DICV, de l'auto-immunité (PTI) et une lymphoprolifération). Les phénomènes auto-immuns (dont la neutropénie) montrent une bonne corticosensibilité. On retrouve chez elle un variant sur *PADI3* la protéine PADI3 participe à la citrullination des protéines. Des auto-anticorps anti-PADI3 ont été retrouvés dans la polyarthrite rhumatoïde. Les mutations homozygotes de ce gène sont responsables d'anomalies des phanères. Ces données pourraient suggérer un rôle des phénomènes épigéniques au cours des DIP avec auto-immunité.

- Patient DIP 015 : la corrélation génotype/phénotype de ce patient a été discutée plus haut (gain-de-fonction de *STAT1* prouvé).

- Patient DIP 016 : cette patiente présente un phénotype de DICV avec auto-immunité (PTI) et une entéropathie chronique. L'immunophénotypage montre une expansion des $CD21^{low}$. Le seul variant retrouvé est celui de *PTPN13*, dont la corrélation avec le phénotype n'est pas aisée.

e) Discussion sur l'analyse génétique :

Notre analyse en cohorte n'a pas permis d'identifier de voie physiopathologique commune au sein d'un phénotype sévère et relativement homogène de patients atteints de déficits immunitaires primitifs avec auto-immunité (cytopénies auto-immunes) et neutropénie. En particulier, nous n'avons pas mis en évidence de schéma CTLA4/LRBA, envisagé compte tenu du phénotype et des données de la littérature disponibles au début de notre étude. Des variants classiquement décrits de TACI ont été retrouvés et certains gènes candidats ont été mis en lumière (en particulier impliquant le cytosquelette d'actine). Au sein de ce groupe sévère de DIPs humoraux (DICV/CID), certaines présentations inhabituelles de DIPs comme les gains-de-fonction de

STAT1 ne doivent pas être écartées, en particulier en cas de manifestations infectieuses atypiques pour un déficit humoral (candidoses, infections fongiques ou opportunistes).

V. Conclusions de la partie I - DICV/CID et Neutropénie :

Peut-on partir d'une analyse de cohorte homogène de patients pour isoler des voies physiopathologiques communes ?

Nous sommes partis de notre travail de recherche clinique sur les patients atteints de DICV/CID avec syndrome lymphoprolifératif, cytopénies autoimmunes et neutropénie pour explorer l'hypothèse de mécanismes physiopathologiques communs et ouvrir des pistes de prise en charge précoce et ciblée de ces patients avec un pronostic évolutif péjoratif.

- Au plan immunophénotypique, nous avons effectivement constaté une relative homogénéité des phénotypes avec une expansion des lymphocytes B $CD21^{low}$ $CD38^{low}$, une diminution des lymphocytes T naïfs et Treg, et des lymphocytes cTFh et cTFh1 et 1/17 augmentés. Ces anomalies biologiques (neutropénie) et d'immunophénotypage peuvent servir de marqueur de gravité et de pronostic péjoratif au cours des CID/DICV puisqu'elles sont associées avec les formes cliniques à risque d'évolution grave (cytopénies auto-immunes et auto-immunité, granulomatose, entéropathies) au cours du DICV.
- Nous avons exploré l'implication d'un schéma physiopathologique CTLA4/LRBA dans la mesure où les patients décrits dans la littérature présentant des défauts de la voie CTLA4/LRBA associaient un DIP cellulaire et humoral de profondeur variable, des syndromes lymphoprolifératifs et des cytopénies auto-immunes. Nous avons mis au point un marquage membranaire et intracellulaire permettant d'évaluer l'expression à la membrane et la capacité d'expression sous stimulation de CTLA4. Bien que fonctionnel chez des témoins, ce marquage s'est révélé complexe à mettre en œuvre chez des patients fréquemment lymphopéniques T avec des LT CD4 souvent diminués ou effondrés, mais nous l'avons validé. Lorsqu'il a été possible, nous n'avons pas vu d'anomalies significatives sur la capacité d'expression de CTLA4 chez nos patients par rapport aux contrôles. Une telle approche, étendue à plusieurs voies physiopathologiques conduisant à un même phénotype, reste théroriquement intéressante, tant sur le plan de la compréhension des mécanismes physiopathologiques aboutissant à des conséquences immunophénotypiques ou cliniques identiques, que des perspectives thérapeutiques (thérapie ciblée/thérapie personnalisée) qu'elle permet d'envisager.

- Au plan génétique, nous n'avons pas mis en évidence de forme connue monogénique de DIP (en dehors d'un gain-de-fonction de *STAT1*), en particulier sur *CTLA4/LRBA, NFKB 1* ou *PI3KCD.* Cela atteste une fois de plus de **l'hétérogénéité physiopathologique de ces maladies y compris lorsque l'on se focalise sur des phénotypes « extrêmes ».**

Notre analyse d'exome (n=7 patients) et sur panel NGS de 235 gènes a ainsi révélé une **grande hétérogénéité des variants génétiques** potentiellement délétères qui conduisent à des anomalies clinico-biologiques proches.

- Certains variants pourraient être, dans certains cas, la **cause directe de la maladie (formes monogéniques)** : dans ce sens, nous avons retrouvé le gain de fonction de *STAT1* sous une forme particulière de la maladie (plutôt DICV/CID avec auto-immunité et cytopénies auto-immunes). Dans ce groupe, on peut évoquer la possible implication des variants sur *IRAKBP1, ARHGEF28 et ARHGAP25, NFATC1, CFLAR.* La présence de ces variants pointe le doigt sur le rôle de la régulation du cytosquelette et de l'apoptose dans ce type de phénotype avec rupture de tolérance immunitaire. Ces variants doivent être confirmés par une étude fonctionnelle.
- D'autres variants pourraient être plutôt des **facteurs de risque** se combinant avec d'autres facteurs (génétiques, épigénétiques ou environnementaux) et expliqueraient d'une part la pénétrance variable de ces maladies et d'autre part le fait que l'on retrouve plus d'un variant par patient. Dans ce sens, on peut citer le rôle des variants de *TACI* (qui pourraient jouer un rôle de type « *human disease modifier gene* ») retrouvés fréquemment (4/10) chez nos patients DICV/CID et neutropénie. Un tel mécanisme pourrait s'envisager pour des variants touchant *CD19, UNC13D, RAG1/2, NLRP3, CD4, DOCK8* à l'état hétérozygote. Ceci reste à démontrer par des recherches *in vitro* et *in vivo* (utilisant par exemple des lignées crispr/cas9 ou des souris avec différents fonds génétiques de DIPs ou MAIs et le variant d'intérêt) pour étudier la rupture de tolérance. De telles approches pourraient aussi permettre de tester des hypothèses de digénisme (*RAG1/RAG2*) par exemple.

Enfin, certains variants, même rares et prédictibles d'un défaut de fonction de la protéine, **pourraient n'être qu'un épiphénomène** sans conséquence physiopathologique relevante que seule une étude fonctionnelle pourrait confirmer.

ANNEXE DE LA PARTIE I

COHORTE DICV/CID ET NEUTROPENIE

ANNEXE I : VARIANTS ISSUS DE l'ANALYSE DU PANEL DIP :

- ***Variant ARHGEF28 :*** ARHGEF28 est une protéine Rho-GTPase. Récemment, le défaut d'une autre protéine de cette famille a été rapportée à l'état hétérozygote (Bouafia et al., 2018). Cette protéine joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette, en particulier dans les cellules neuronales (Droppelmann et al., 2013). Le rôle de cette protéine dans les cellules immunitaires n'est pas connu.
- ***Variant CD19 :*** de rares cas de DICV familiaux (AR) impliquent CD19. Les patients présentent un phénotype classique de DICV avec un déficit humoral et pour certains une glomérulonéphrite. Les mutations hétérozygotes n'ont pas été décrites comme pathogènes. Les patients porteurs de mutations hétérozygotes pourraient avoir un défaut de réponse immunitaire B dépendant de l'activation TLR9 dépendante (Morbach et al., 2016).
- ***Variant CFLAR :*** CFLAR intervient dans la cascade d'activation de l'apoptose médiée par la caspase 8 après engagement du signal FAS/FASL. Cette mutation est un bon candidat pour une phénocopie de syndrome ALPS.
- ***Variant JAK2 :*** JAK2 appartient à la voie JAK/STAT de différents récepteurs de cytokines. Il intervient de façon majeure dans la thrombopoïèse et les mutations somatiques de *JAK2* (V617F pour la plus fréquente), sont responsable de thrombocytémies. A notre connaissance, il n'y a pas de déficit immunitaire primitif impliquant *JAK2*.
- ***Variant LRBA :*** Les porteurs hétérozygotes de mutations délétères sont sains (Lopez-Herrera et al., 2012).
- ***Variants NFATC1 :*** intervient dans la transduction du signal de plusieurs cytokines importantes pour la survie, la différenciation et l'activation lymphocytaire T (IL2, IL5, IL3, IL4). A ce jour il n'y a pas de déficit immunitaire primitif impliquant ce gène mais *Pahwa et al.* ont rapporté un patient atteint de CID qui présentait une anomalie de fonctionnement de NFAT. Ce patient répondait à l'administration d'IL2 recombinante (Pahwa, 1988).
- ***Variants NLRP2 :*** NLRP2 intervient dans l'activation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN de type I et II. Il se situe également dans la voie d'activation TLR4 dont le ligand est le LPS. La souris KO *Nlrp2*$^{-/-}$ ne présente pas de déficit immunitaire inné ou acquis. Il n'y a pas de défaut connu de NLRP2 en pathologie humaine.
- ***Variant PMS2 :*** PMS2 intervient dans le complexe de réparation des cassures d'ADN double brin. Les mutations de ce gène sont impliquées dans les cancers colorectaux héréditaires de type HNPCC

(AR). Il n'y a pas de lien apparent avec le déficit immunitaire primitif ou l'auto-immunité. Le gène est peu exprimé dans les cellules immunitaires (Immgen®).

- ***Variant PTPN13*** *:* PTPN13 (FAP1) est une phosphotyrosine phosphatase qui se lie à un domaine régulateur de FAS et inhibe l'apoptose médiée par FAS. Ce gène est donc un bon candidat pour une phénocopie de FAS. *PTPN13* est induit par IRF8.
- ***Variant STAT1*** *:* notre analyse nous a permis de retrouver une mutation publiée de STAT1 (T385M) validée sur le plan fonctionnel. Cette mutation est responsable d'un gain-de-fonction de STAT1 à l'origine d'une susceptibilité aux candidoses cutanéo-muqueuses, aux manifestations inflammatoires et auto-immunes et parfois à une lymphopénie et une hypogammaglobulinémie comme chez notre patient (Toubiana et al., 2016).
- ***Variants TNFRSF13B :*** l'implication clinique de ces variants est discutée dans le paragraphe ***IV.b)*** et leur signification n'est pas univoque.
- ***Variants TRAF1 :*** Il s'agit de l'un des deux récepteurs au TNFa. La souris KO présente un développement lymphocytaire T normal mais une lymphoprolifération. Il n'y a pas de défaut de ce gène décrit à l'origine de déficit immunitaire primitif.
- ***Variant UNC13D :*** les mutations homozygotes de ce gène sont responsables d'un syndrome d'hemophagocytose (HLH : *hemophagocytic lymphohistiocytosis*) héréditaire. Des mutations hétérozygotes composites ont été décrites chez des patients avec un phénotype ALPS-like (Aricò et al., 2013). Cependant dans notre cas, le patient présentait une mutation hétérozygote isolée et la ségrégation dans la famille retrouvait également cette mutation chez le père (non malade).

ANNEXE 2 : VARIANTS ISSUS DE l'ANALYSE D'EXOME EN COHORTE :

- ***Variant ARHGEF28 :*** Ce variant est discuté plus haut (Annexe I, pannel NGS).
- ***Variant ARHGAP25 :*** code pour une protéine qui régule négativement les RhoGTPases, ces protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine comme décrit plus haut. Les mutations de ce gène ne sont pas connues. Les données d'expression de cette protéine (Immgen®) au sein des cellules immunitaires montrent un profil particulièrement fort d'expression dans les lymphocytes B et T matures. Ces différents éléments en font un bon gène candidat.
- ***Variants ANK1 :*** les mutations hétérozygotes de ce gène sont responsables d'une anomalie des globules rouges (la sphérocytose) avec anémie hémolytique chronique. Le profil d'expression de *ANK1* dans les cellules immunitaires est faible et le rôle de la protéine dans le système immunitaire n'est pas établi. Ces éléments font du variant de *ANK1* un variant d'intérêt réduit.
- ***Variant IFI6 :*** *IFI6* appartient aux gènes de réponse aux interférons (type I). Sa fonction n'est pas bien connue dans les cellules immunitaires.
- ***Variant GOLGA3 :*** cette protéine est impliquée dans la dégradation des protéines, l'apoptose et la spermatogenèse. Elle est peu exprimée dans le système immunitaire. Ces éléments en font un variant peu prioritaire.
- ***Variant NCF2*** : est l'un des gènes responsables de granulomatose chronique familiale (OMIM 233710). Cette maladie suit une transmission autosomique récessive et les patients hétérozygotes ne sont pas atteints. La protéine (p67-Phox) est particulièrement exprimée dans les neutrophiles et les macrophages où elle contribue au complexe de la NADPH oxydase.
- ***Variant LAD1 :*** La ladinine est une protéine d'ancrage des membranes basales à la jonction dermo-hypodermique. On retrouve des pathologies dysimmunitaires dermatologiques avec des anticorps IgA anti-LAD1. L'expression de la protéine se fait majoritairement dans les kératinocytes.
- ***Variant NLRP3 :*** Les mutations délétères de NLRP3 sont responsables de syndromes auto-inflammatoires autosomique dominants (syndrome CINCA, Muckle-Wells). Son rôle est majeur dans la formation de l'inflammasome et du signaling de l'IL1 dans les macrophages.
- ***Variant CD46 :*** CD46 est un récepteur du complément (complexes C3B/C4B). *Kemper et al.* (2003) ont montré que CD46 était important pour l'activation des lymphocytes T régulateurs. Des mutations délétères (AR, AD) de *CD46* ont été décrites au cours de syndromes hémolytiques et urémiques atypiques (Kemper et al., 2003).

- ***Variant CD101*** *: IGSF2 ou CD101* est impliqué dans l'activation lymphocytaire T. Sur les lymphocytes T régulateurs, l'expression de CD101 serait associée avec une plus grande capacité immunosuppressive (Fernandez et al., 2007). Sa fonction précise reste inconnue.
- ***Variant TOPBP1 :*** la protéine TOPBP1 se lie à la topoisomérase II au cours du cycle cellulaire et des mutations de ce gènes ont été décrites dans les défauts de spermatogenèse et certains cancers (seins, gatriques). Dans les cellules immunitaires cette protéine est exprimée principalement dans les cellules immatures et les précursseurs T et B.
- ***Variant PTPN7*** code pour une protéine tyrosine phosphatase exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques myéloïdes. Son rôle au sein du sytème immunitaire est peu décrit.
- ***Variant C9 :*** Les défauts de C9 (AR) sont à l'origine d'un déficit immunitaire avec susceptibilité aux infections à méningocoque. Les patients hétérozygotes peuvent présenter une susceptibilité aux infections (méningites). Un cas de dermatomyosite a aussi été rapporté chez un patient atteint de déficit en C9 (Ichikawa et al., 2001).
- ***Variant ILDR1 :*** ILDR1 est impliqué dans le fonctionnement du système vestibulaire et les mutations de ce gène sont responsables de vertiges (AR). Elle est aussi exprimée dans les cellules distales des tubules rénaux. Initialement isolée de cellules lymphomateuses B, la protéine est finalement peu exprimée dans les cellules du système immunitaire.
- ***Variant IRAKBP1 :*** IRAKBP1 intervient dans la cascade d'activation de NFKB via le récepteur du TNFa (Luo et al., 2007). La protéine se lie au complexe IKKA/IKKB et régule l'activité de NFKB, ce qui en fait un bon candidat pour des anomalies du système immunitaire avec auto-immunité.
- ***Variant ITGB4 :*** ITGB4 est une intégrine de membrane exprimée par différents tissus et dont les mutations sont responsables de maladies dermatologiques bulleuses (AD/AR) et dont les mutations somatiques sont impliquées dans le potentiel métastatique des tumeurs. ITGB4 est peu exprimée par les cellules immunitaires.
- ***Variant IRAK3 :*** IRAK3 intervient dans la cascade d'activaton de l'IL1R et des TLRs (TLR4). Il n'y a pas de déficit immunitaire impliquant IRAK3. Son rôle est prépondérant dans les monocytes/macrophages. Les mutations de ce gène prédisposent à l'asthme.
- ***Variant CD4 :*** des mutations aboutissant à la perte de l'expression de CD4 (AR) aboutissent à une susceptibilité à l'auto-immunité (LES) et à la lymphoprolifération (Stohl, 2013).
- ***Variant DOCK8 :*** les mutations de DOCK8 sont à l'origine d'un syndrome hyperIgE (AR) avec atopie, eczéma et phénotype de déficit immunitaire primitif. Il n'y a pas de conséquences des formes hétérozygotes qui soient décrites.

RESULTATS

PARTIE II : Cohorte de patients Lupus + EVANS

PEUT-ON TROUVER DES VOIES PHYSIOPATHOLOGIQUES PARTAGEES AU SEIN D'UN GROUPE HOMOGENE DE PATIENTS ATTEINTS DE LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE AVEC SYNDROME D'EVANS ?

Etude de patients identifiés au sein d'un groupe homogène de patients lupiques avec syndrome d'Evans dans la biobanque tri-nationale « LBBR » (Lupus Bio Banque du Rhin supérieur)

I. Objectif principal :

Une des thématiques de notre équipe de recherche est l'étude des mécanismes génétiques de rupture de tolérance immunitaire au cours du lupus érythémateux systémique (LES).

D'un point de vue génétique, le LES est le plus souvent d'origine polygénique. Si l'on considère le LES dans son ensemble, plusieurs dizaines de gènes de susceptibilité ont été identifiés grâce aux études GWAS (études génétiques d'association sur génome entier réalisées sur de grands groupes de patients) présentant des signes cliniques très hétérogènes et probablement des maladies différentes sur le plan physiopathologique. Dans de rares cas (début pédiatrique, cas familiaux), le lupus peut être monogénique (**Table 15**) (Bentham et al., 2015; Morris et al., 2016; Tsokos et al., 2016).

	MALADIE	GÈNE	TRANSMISSION	FONCTION PROTEIQUE ET PHÉNOTYPE
INTERFERONOPATHIES	**AGS Syndrome d'Aicardi-Goutieres**	*TREX1*	AR / AD	Formes systémiques, engelures calcifications intracrâniennes et atrophie cérébrale. Fièvre. Pénétrance élevée.
		RNASEH2A/B/C	AR/AD	Formes systémiques, engelures calcifications intracrâniennes et atrophie cérébrale. Fièvre. Pénétrance élevée.
		SAMHD1	AR	Formes systémiques, engelures, calcifications intracrâniennes et atrophie cérébrale, Moya-Moya. Fièvre. Pénétrance élevée.
		ADAR		Formes systémiques, calcifications intracrâniennes et atrophie cérébrale. Fièvre. Pénétrance élevée.
		IFIH1	AD	Formes systémiques, calcifications intracrâniennes et atrophie cérébrale. Fièvre. Pénétrance élevée.
		DNASE1	AD	Formes systémiques
		DNASE1L3	AR	Formes systémiques avec néphrites et ANCA positfs
	SAVI	*TMEM173*	AD	Signes cutanés et vascularites prédominant, vascularite, ulcères digitaux, atteinte pulmonaire interstitielle.
Syndrome de Nakajo		*PSMB8*	AR	Signes cutanés et vascularites prédominant, fièvre, dermatose neutrophilique.
Femmes porteuses de mutations de CGD		*CYBB-carrier*	X	Signes cutanés et vascularites prédominant (lupus discoïdes)

Déficits en complément Y penser en cas de complément bas en rémission.	.	*C1QA/B/C*	AR	Formes plutôt systémiques, lupus pédiatriques, risque infectieux élevé (germes encapsulés). Lupus cutané, glomérulonéphrites. Début précoce.
		C4A/C4B	AR	Formes plutôt systémiques, lupus pédiatriques, risque infectieux élevé
		C2	AR	Formes plutôt systémiques, pénétrance moyenne (adultes)
		C3	AR	Formes plutôt systémiques, glomérulonéphrites membrano-prolifératives
		ADAR1	AR	Formes plutôt systémiques
SPENCDI		*ACP5*	AR	Formes plutôt systémiques, spondyloenchondrodysplasie, vitiligo, retard de croissance, atteintes rénales et hématologiques
Défaut d'apoptose	**ALPS** Défaut d'apoptose	*FAS/FASL*	AD (AR/Somatique)	Formes plutôt systémiques, lymphoprolifération, syndrome d'EVANS.
	Défaut d'apoptose	*PRKCD*	AR	Formes plutôt systémiques. Cytopénies auto-immunes, adénopathie.
Défaut de développement LB		*IKZF1*	AD	Formes plutôt systémiques
Syndrome Noonan		*PTPN11*	AD	Formes sytémiques, retard de croissance, anomalies cardiaques.
Susceptibilité aux infections mycobactériennes		*ISG15*	AR	Déficit immunitaire prédisposant aux infections mycobactériennes, calcifications intracraniennes, pénétrance faible.

Table 15 : formes monogéniques de lupus. AD : Autosomique Dominant. AR : Autosomique Récessif. (Adapté du PNDS lupus et (Tsokos, 2011; Tsokos et al., 2016))

Dans ce contexte, j'ai été amené à participer à l'analyse génétique d'un groupe de patients extraits d'une biobanque franco-allemande de 1024 patients lupiques (LBBR : Lupus BioBanque du Rhin supérieur). Le rationel de ce projet porté par le Pr Pauline Soulas-Sprauel et notre équipe était d'identifier des nouvelles mutations et si possible de relever des voies physiopathologiques partagées entre patients atteints d'un phénotype homogène de lupus avec syndrome d'Evans, c'est-à-dire associant purpura thrombopénique auto-immun (PTI) et anémie hémolytique auto-immune (AHAI). Les patients lupiques développant un syndrome d'Evans au cours de leur suivi représentent environ 6% de la biobanque LBBR, ce qui est cohérent avec les données des autres cohortes (atour de 4% (Cervera et al., 2003)). Dans la population générale, le syndrome d'EVANS est extrêment rare et le risque relatif de déficit immunitaire est jusqu'à 800 fois supérieur chez un patient atteint d'AHAI (Fischer et al., 2017).

Nous avons considéré qu'une sélection de patients atteints de LES présentant des caractéristiques phénotypiques resserées serait un bon pré-requis pour décrire de nouveaux variants géniques impliqués

dans la physiopathologie de la maladie. On peut supposer que les variants géniques décrits chez des patients appartenant à un même sous-groupe clinique vont avoir un impact phénotypique plus fort (odds ratio plus élevé) que dans le cas où l'on considère le LES comme une seule entité clinique.

Dans ce projet, nous avons eu accès, grâce à une collaboration franco-allemande avec le centre des déficits immunitaires de Fribourg (Pr Bodo Grimbacher et Pr Reinhardt Voll) à un panel NGS de gènes (n=135 ; ***Annexe 1***) associés à la fois à des GWAS de lupus et à des formes monogéniques de DIPs avec cytopénies auto-immunes ou manifestations cliniques lupus-*like* (vasculopathie, glomerulonéphrites, …).

Dans un premier temps, nous avons choisi de vérifier par une éude exploratoire, la pertinence de notre hypothèse et pour cela de séquencer 37 patients sur 60 répondants au phénotype choisi. Cette sélection s'est faite sur les critères suivants (non exclusifs) :

- Formes familiales de lupus
- et/ou début précoce de la maladie (avant 30 ans)
- et/ou qualité et disponibilité du matériel génétique.

Le rationel pour cette analyse préliminaire était de choisir les patients ayant le plus de risques d'avoir une composante génétique forte de leur pathologie. La **Figure 23** ci-dessous donne la stratégie que nous nous sommes fixés pour ce projet.

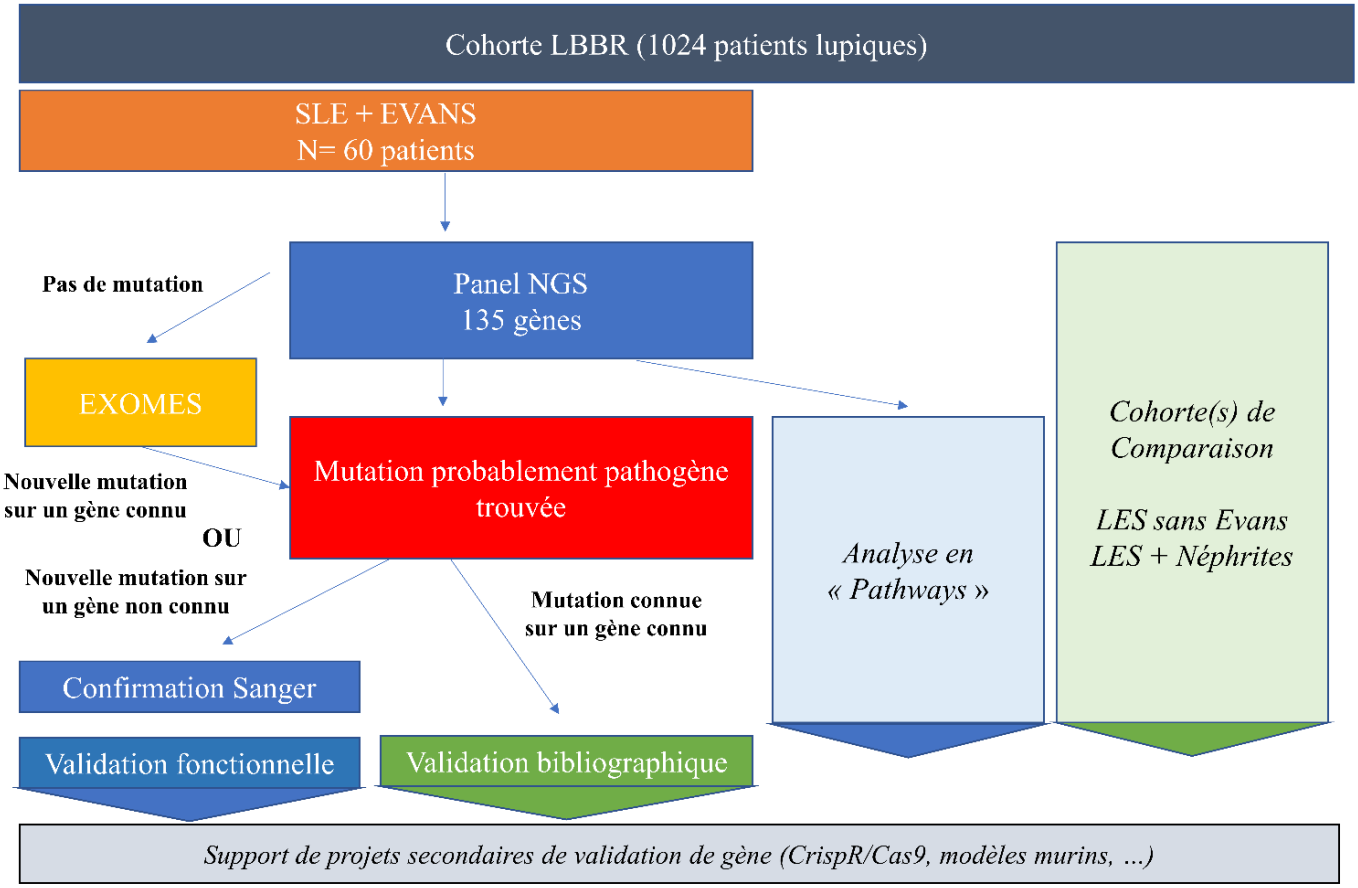


Figure 23 : Stratégie d'identification des variants dans le projet EVANS-Lupus. A partir d'une biobanque franco-allemande de 1024 patients lupiques (LBBR : Lupus Biobanque du Rhin supérieur), nous avons isolés 60 patients correspondant au phénotype Lupus+EVANS. Un premier groupe homogène de 37 patients a été testé sur un panel de 135 gènes impliqués dans la physiopathologie du lupus. La recherche de variants uniques ou pathogènes a été réalisé selon des filtres basés sur la fréquence (<0,01%, les scores bioinformatiques CADD, Mutation Taster, Sift,, Polyphen) et les données de ClinVar (NCBI). A l'issue, nous voulions à la fois comparer la fréquence de nos variants chez d'autres patients lupiques issues de la même biobanque et éventuellement réaliser une analyse d'exome dans le cas ou le schéma physiopathologique resterait inconnu. Enfin, les variants nouveaux et particulièrement interessants devaient être testés sur le plan fonctionnel au laboratoire.

II. Recherche de gènes candidats impliqués dans le LES avec EVANS par séquençage haut débit de gènes impliqués dans la physiopathologie du lupus.

a. Caractéristiques des patients étudiés :

Les **Tables 16 à 19** ci-dessous résument les principales caractéristiques des 60 patients atteints de LES + EVANS dans la biobanque LBBR comparés aux autres patients lupiques de LBBR (c'est-à-dire les patients lupiques sans EVANS de la biobanque LBBR, ici nommés « Patients LES contrôles »).

- Concernant les caractéristiques démographiques (**Table 16**) :

On ne note pas de différences statistiquement significatives sur le sexe, l'âge ou l'ethnie. En revanche, un **début plus précoce de la maladie** (début entre 10 et 19 ans) était remarqué chez les patients du groupe EVANS + LES.

	Patients LES Contrôles (n = 935)	**LES + EVANS (n = 60)**	**Chi2 test**
Genre, n (%)			
Feminin	833/935 (89.3)	49/60 (81.7)	0,65
Masculin	100/935 (10.7)	11/60 (18.3)	0,11
Age, Moyenne (DS), années	43.6 (17.0)	42.2 (14.8)	-
Origine Ethnique, n (%)			
Europe	815/933 (87.2)	54/60 (90.0)	0,87
Afrique de Nord	59/933 (6.3)	1/60 (1.7)	0,15
Afrique	21/933 (2.2)	0/60 (0.0)	0,24
Turquie	13/933 (1.4)	2/60 (3.3)	0,24
Asie	22/933 (2.4)	2/60 (3.3)	0,64
Antilles	5/933 (0.5)	1/60 (1.7)	0,27
Age de début de la maladie, n (%)			
Avant 10 ans	0/935 (0.0)	0/60 (0)	-
Entre 10 et 19 ans	146/935 (15.7)	19/60 (31.7)	**0.0095**
Entre 20 et 29	310/935 (33.3)	21/60 (35.0)	0,83
Entre 30 et 39	217/935 (23.3)	9/60 (15.0)	0,22
Entre 40 et 49	135/935 (14.5)	7/60 (11.7)	0,60
Entre 50 et 59	74/935 (8.0)	2/60 (3.3)	0,22
Entre 60 et 69	26/935 (2.8)	2/60 (3.3)	0,059
Entre 70 et 79	7/935 (0.8)	0/60 (0)	**0,044**
80 ans et plus	15/935 (1.6)	0/60 (0)	0,31
Tabagisme, n (%)			
Actif	174/918 (19.0)	16/59 (27.1)	0,22
Non fumeur	624/918 (68.0)	36/59 (61.0)	0,62

Table 16 : Caractéristiques démographiques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS). n : nombre de patients – LES : Lupus Erythémateux Systémique –

- Concernant les caractéristiques cliniques (**Table 17**) :

Sur la base des critères ACR 1997 révisés, **l'atteinte rénale** semblait plus fréquente chez les patients du groupe EVANS + LES (p<0,05). Ceci pourrait être lié au fait que les patients présentaient un début plus précoce de la maladie (atteintes rénales plus fréquentes en cas de lupus à début précoce (Cervera et al., 2014). Les autres paramètres cliniques ainsi que les comorbidités ne montraient pas de différences significatives.

	Patients LES Contrôles (n = 935)	**LES + EVANS (n = 60)**	**Chi2 test**
Critères ACR			
Rash malaire, n (%)	498/934 (53.3)	39/60 (65.0)	0.0859 (1.61)
Lupus discoïde, n (%)	207/925 (22.4)	16/60 (26.7)	0.4328 (1.27)
Photosensibilité, n (%)	585/933 (62.7)	39/59 (66.1)	0.5660 (1.18)
Ulcères buccaux, n (%)	248/927 (26.8)	12/60 (20.0)	0.2225 (0.67)
Arthrites, n (%)	666/934 (71.3)	43/60 (71.7)	0.8696 (1.05)
Sérites, n (%)	231/932 (24.8)	17/59 (28.8)	0.4747 (1.24)
Atteinte rénale, n (%)	308/933 (33.0)	31/59 (52.5)	**0.0020 (2.27)**
Atteinte neurologique, n (%)	105/934 (11.2)	10/60 (16.7)	0.1668 (1.64)
Atteinte hématologique, n (%)	596/935 (63.7)	60/60 (100)	
Activité de la maladie			***Mann Whitney***
SLEDAI, moyenne (DS)	4.3 (4.9)	3.9 (4.4)	0.7578
Autres manifestations auto-immunes			***Chi2 test (OR)***
Deuxième maladie auto-immune, n (%)	225/708 (31.8)	16/53 (30.2)	0.7064 (0.89)
Cas familiaux de maladies auto-immunes, n (%)	157/904 (17.4)	11/58 (19.0)	0.7982 (1.09)
Cas familiaux de lupus, n (%)	61/782 (7.8)	5/53 (9.4)	0.6788 (1.22)
Comorbidités			
Susceptibilité aux infections, n (%)	56/706 (7.9)	7/53 (13.2)	0.1857 (1.76)
Cancers, n (%)	44/762 (6.2)	3/52 (5.8)	0.9228 (0.94)

Table 17 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS). n : nombre de patients – OR (Odds Ratio) - LES : Lupus Erythémateux Systémique – SLEDAI : Score d'activité du lupus – DS : Déviation Standard

- Concernant les caractéristiques biologiques (**Table 18**) :

Sur la base des critères biologiques enregistrés dans notre biobanque (c'est-à-dire sur données rétrospectives à l'inclusion des patients), le profil des patients LES + EVANS est associé de façon statistiquement significatif aux **autres cytopénies** (neutropénie, *p<0,0001* ; lymphopénie, *p<0,005*), avec la **présence d'anticorps antiphospholipides** (anticoagulant circulant lupique, *p<0,0001* et anti-cardiolipine, *p<0,05*), ainsi qu'avec une **consommation du complément** (C3, C4, CH50, *p<0,05*).

	Patients LES Contrôles (n = 935)	LES + EVANS (n = 60)	Chi2 test
Paramètres Hématologiques			
Test de Coombs positif, n (%)	121/550 (22.0)	61/61 (100)	-
Thrombopénie, n (%)	112/919 (12.2)	61/61 (100)	-
Neutropénie, n (%)	173/924 (18.7)	33/60 (55.0)	**<0.0001 (5.6)**
Lymphopénie, n (%)	488/928 (52.6)	44/60 (73.3)	**0.0013 (2.55)**
Auto-anticorps			
Anticorps anti-nucléaires, n (%)	918/935 (98.2)	60/60 (100)	-
Anticorps anti-ADN, n (%)	715/933 (76.6)	51/60 (85.0)	0.1469 (1.70)
Anticorps anti-Sm, n (%)	128/845 (15.1)	11/57 (19.3)	0.4296 (1.32)
Anticorps anti-SSA, n (%)	271/637 (42.5)	17/51 (33.3)	0.1898 (0.67)
Anticorps anti-nucléosomes, n (%)	159/459 (34.6)	9/22 (40.9)	0.5890 (1.27)
Anticorps anti-phospholipides			
ACC (anticoagulant circulant), n (%)	115/584 (19.7)	22/51 (43.1)	**<0.0001 (3.23)**
Anti-β2 GP1, n (%)	70/559 (12.5)	5/41 (12.2)	0.9836 (0.99)
Anti-cardiolipine, n(%)	147/541 (27.2)	16/37 (43.2)	**0.0224 (2.17)**
Complement*			
Complément bas, n (%)	345/750 (46.0)	28/48 (58.3)	**0.0784 (1.69)**
CH50 bas, n (%)	148/539 (27.5)	29/50 (58.0)	**<0.0001 (3.73)**
C3 bas, n (%)	320/691 (46.3)	32/53 (60.4)	**0.0431 (1.79)**
C4 bas, n (%)	312/684 (45.6)	36/53 (67.9)	**0.0017 (2.54)**

Table 18 : Caractéristiques biologiques des patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS). n : nombre de patients – OR (Odds Ratio)

- Concernant les traitements reçus (**Table 19**) :

Malgré un phénotype d'allure plus sévère sur la base des critères énoncés ci-dessus (âge de début, atteintes rénales plus fréquentes, atteinte hématologique et consommation du complément), il n'était pas observé de différence en termes de traitements.

	Patients LES Contrôles (n = 935)	LES + EVANS (n = 60)	Chi2 test
Corticosteroids, n (%)			
<10 mg/day	**518/885 (58.5)**	**30/59 (50.8)**	0,54
>10 mg/day	**108/885 (12.2)**	**11/59 (18.6)**	0,21
Hydroxychloroquine, n (%)	**687/854 (80.4)**	**43/59 (72.9)**	0,58

Azathioprine, n (%)	**208/798 (26.1)**	**9/54 (16.7)**	0,21
Methotrexate, n (%)	**120/712 (16.9)**	**3/51 (5.9)**	0,067
Cyclophosphamide, n (%)	**93/744 (12.5)**	**6/51 (11.8)**	0,20
Mycophenolate mofetil, n (%)	**229/792 (28.9)**	**19/53 (35.8)**	0,60
Rituximab, n (%)	**35/699 (5.0)**	**6/52 (11.5)**	0,06
Belimumab, n (%)	**62/735 (8.4)**	**1/52 (1.9)**	0,11
IV Ig, n (%)	**23/700 (3.3)**	**2/50 (4.0)**	0,74

Table 19: Traitements reçus par les patients inclus dans la biobanque LBBR (groupe contrôle LES comparé au groupe lupus-EVANS). n : nombre de patients – OR (Odds Ratio)

b. *Stratégie d'identification des variants candidats :*

La stratégie d'analyse est commune à celle que nous avons utilisée pour filtrer les variants dans la biobanque Neutropénie et DIP (***Partie I***) et détaillée dans les *Méthodes*. A partir des variants issus de ce système de filtres (**Figure 24**), nous avons établi une « top-liste » des variants partagés ou uniques. Nous avons ainsi identifié 93 variants chez 37 patients soit une moyenne de **2,51 variants par patient**. Il n'était pas constaté de mutation connue pour donner une forme monogénique de lupus. Néanmoins, certains variants particulièrement interessants ont pu être identifiés et sont donnés dans la T**able 20** ci-dessous.

Patient	*Gène*	*cDNA*	*Protéine*	*Variant*	*Type*	*Hom /Het*	*Fréquence*	*Sift*	*Polyphen*	*Cadd*	*Mutation Taster*	*Conservation score*	*ClinVar*	*Conséquences ClinVar*
P212	*CD36*	c.905G>T	p.(Gly302Val)	rs146027667	Missense	Het	0.00056	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING (score: 1)	**29,8**	Disease causing (p-value: 1)	5.06	RCV000387636.1	Uncertain significance* - Platelet glycoprotein IV deficiency
P267	*C7*	c.1561C>A	p.Arg521Ser	rs121964920	Missense	Het	0,00230424	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity: 0. 14; specificity: 0.99	**26,3**	Disease causing (p-value: 0.013)	5.21	RCV000012888.23 RCV000012887.23	(Pathogenic - C7 and C6 deficiency, combined subtotal),
P221	*BLK*	c.211G>A	p.(Ala71Thr)	rs55758736	Missense	Het	0.010073260 073260074	Deleterious (score: 0)	POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.565 (sensitivity: 0. 88; specificity: 0.91)	**26,2**	Disease causing (p-value: 0)	5.22	RCV000116496.2 , RCV000445395.1 , RCV000379716.1 , RCV000013112.22	(Pathogenic - Maturity-onset diabetes of the young, type 11).
P181	*ITGAM*	c.3370A>C	p.(Thr1124Pro)	rs767195270	Missense	Hom	0,000178	Deleterious (score: 0.01)	POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.940 (sensitivity: 0. 80; specificity: 0.94)	**24,3**	Disease causing (p-value: 0.957)	5.17	ND	ND
P911	*TNIP1*	c.919C>G	p.Gln307Glu	rs75016666 9	Missense	Het	4,47424E-05	Deleterious (0) vs SureCall 0.08	Possibly damaging (0.912)	**23,7**	Disease causing	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre (5.05)	ND	**ND**
P808	*RNASEH2B*	c.788C>G	p.Thr263Ser	rs1837341 74	Frameshift	Het	0,00024	Deleterious (score: 0.02)	Probably damaging (0.977)	**23**	Disease Causing	ND	ND	ND
P463	*C1R*	c.336G>C	p.Met112Ile	rs139531404	Missense	Het	0,00283441	Deleterious	Deleterious	**22,2**	Disease causing	4.34	ND	ND
P749 P188	*NCF2*	c.298C>T	p.Gln100*	rs119103276	Stop gained, nonsense	Het	O,0011	Deleterious	Deleterious	**21,2**	Disease causing	ND	RCV000002332.3	Pathogenic - Chronic granulomatous disease, autosomal recessive cytochrome b-positive, type 2
P212 P350 P405	*RNASEH2A*	c.615T>A	p.Asp205Glu	rs6261978 2	Missense	Het	0,009157509	Tolerated	Benign	**20,4**	Disease causing	ND	ND	ND
P172	*TMEM173*	c.929G>A	p.(Arg310His)	rs144683867	Missense	Het	0.000040	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00)	**20,1**	Disease causing (p-value: 1)	5,56	ND	ND
N=16	*C4A*	c.1040C>A	p.Ser347Tyr	rs392610	Missense	Het/ Hom	0,00222338	Deleterious	Deleterious	**19,62**	Disease causing	ND	ND	ND
P49 P354 P297 P162	*PADI4*	c.926A>G	p.Tyr309Cys	rs33981382	Missense	Het	0.006868131 868131868	Deleterious (0.01)	Probably damaging (0.992)	**16,48**	Disease causing	AA très conservé jusqu'à tatou (4.97)	ND	ND
P519	*LGASL3*	c.137C>G	p.Pro46Arg	rs2004405 96	Missense	Het	0,00021651	Deleterious	Deleterious	**16,1**	Disease causing	ND	ND	ND
P183	*ICAM1*	c.571G>C	p.(Asp191His)	rs139053442	Missense	Het	0.001373626 3736263737	Deleterious (score: 0.05)	PROBABLY DAMAGING (score: 1)	**14,16**	Disease causing (p-value: 0.998)	4.11	ND	ND
P298	*IKZF1*	c.1150T>G	p.Ser384Ala	Unknown	Missense	Het	Unknown	Deleterious	Benign	**10,91**	Disease causing	ND	ND	ND

Table 20 : sélection des variants le plus significatifs identifiés sur le panel NGS de 135 gènes et triés sur la valeur du score CADD. Het : hétérozygote, D : délétère pour au moins une isoforme de la protéine, T : tolérée (mutation prédite non délétère), ND : Pas de données

c. Discussion sur les variants les plus significatifs et corrélation génotype-phénotype:

Nous proposons ici une analyse des 15 variants les plus significatifs retrouvés en essayant de faire une analyse de corrélation génotype/phénotype à partir des données cliniques et biologiques disponibles. De façon générale, dans cette liste, figurent des gènes impliqués dans l'immunité innée (*C1R, C4A, C7, ITGAM, TMEM173, RNASEH2A, RNASEH2B*), dans l'immunité adaptative (*BLK*) et dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes (*IKZF1*, *PADI4*). D'autres gènes sont des candidats potientiels issus de la littérature (GWAS) sans implications physiopathologiques clairement établies dans le lupus (*CD36*, *ICAM1*). Les autres variants retrouvés en dehors des 15 discutés ici sont présentés et discutés dans l'***Annexe*** de cette partie (**Figure S1 et sa légende**).

-*Le variant* ***CD36*** *(c.905G>T) : CD36* code pour la glycoprotéine IIIb qui est une protéine membranaire à la surface des plaquettes et des monocytes. Les mutations du gène sont responsables d'une thrombopathie (AR). Quelques données sur l'implication de CD36 dans la clairance des corps apoptotiques (Cairns et al., 2001; Yassin et al., 2010) en font un bon candidat dans la physiopathologie du lupus. Le patient P212 (homme) porteur du variant CD36 est entré dans la maladie entre 10 et 19 ans. Il présente un lupus cutané, articulaire, rénal et neurologique. Il présente un SAPL veineux (thromboses). De façon interessante, certaines données de la littérature montrent une augmentation du CD36 plasmatique chez les patients atteints de SAPL primaire ou de lupus et établissent un lien avec le risque pro-thrombogène et athérogène (CD36 étant également impliqué dans le métabolisme lipidique et le recyclage du cholesterol par les monocytes/macrophages mais aussi dans la reconnaissance de la phosphatidylsérine une des cibles des auto-anticorps dans le SAPL) (Kato et al., 2013; Reiss et al., 2009). Le variant retrouvé ici se trouve au début de l'exon 12 de la protéine. Sa signification est incertaine dans Clinvar®. On retrouve un autre variant à proximité (rs765809606) responsable d'une mutation frameshift.

-*Les variants de la voie du complément* ***C1R, C4A et C7*** : les déficits de la voie du complément sont particulièrement associés au lupus. Le mécanisme physiopathologique sous jacent est lié à la clairance des complexes immuns circulants et des corps apoptotiques. Le déficit en C1R est associé au lupus dans plus de 90% des cas (Arason et al., 2010; Sullivan, 1998). Le déficit en C4A s'associe au lupus dans plus de 75% des cas. Le déficit en C7 (AR), est responsable d'un déficit immunitaire primitif qui prédispose aux infections à Neisseria, est plus controversé dans la physiopathologie du lupus. Dans une étude en Malaysie, il n'était pas retrouvé de lien entre polymophismes de C7 (Lian et al., 2012) et lupus alors qu'une étude antérieure rapportait un possible lien entre lupus et déficit combiné C7 et C4B (Segurado et al., 1992). Dans notre travail, plusieurs patients (n=28) étaient porteurs de variants sur des gènes du complément (principalement sur C4A, n=16). Une comparaison de ces variants chez d'autres patients lupiques pourrait

être interessante pour voir s'il existe un enrichissement ou des particularités par rapport aux autres patients lupiques. L'étude des caractéristiques du patient P463, présentant le variant de C1R (c.336G>C), ne montre pas d'éléments notables de son lupus sur les paramètres enregistrés en dehors du sexe (masculin) et de la consommation du complément (sans pouvoir préciser si elle est constante ou ponctuelle). Le début de la maladie est entre 30 et 39 ans et le patient présente un SAPL avec posititvité des anticorps anti-phospholipides et thromboses. Le variant rs139531403 se trouve dans une région (exon 7) où l'on retrouve plusieurs mutations pathogènes (à l'origine d'un phénotype d'Ehler-Danlos (AD)). Le patient avec le variant de C7 (c.1561C>A) présente, lui, un début pédiatrique (<10ans), est de sexe masculin et présente une forme très hématologique avec une neutropénie et une lymphoprolifération. En revanche, il présente peu de critères de manifestations lupiques systémiques par ailleurs et il n'est pas rapporté de susceptibilité aux infections. Le variant rs121964920 est rapporté comme étant pathogène lorsqu'il est présent à l'état homozygote. Le complément total, C3 et C4 ne sont pas consommés chez lui.

-*Le variant* ***BLK*** (c.211G>A): BLK est une tyrosine kinase de la famille Src impliquée dans le développement lymphocytaire B et située dans la voie d'activation du BCR. Les polymorphismes de *BLK* sont associés au lupus (Hom et al., 2008). La patiente (P221) qui porte le variant *BLK* dans notre série présente un début entre 10 et 19 ans et une atteinte articulaire et cutanée de son lupus. Il n'y a pas de lymphopénie ni de susceptibilité aux infections déclarée dans la base de données. Elle est porteuse d'antiphospholipides sans manifestations thrombotiques ou obstétricales. Le variant dont elle est porteuse (rs55758736) est référencé comme pathogène dans le diabète de type MODY (AD). Au moment de son inclusion dans la biobanque, elle n'était pas diabétique.

-*Le variant* ***ITGAM*** (CD11b, c.3370A>C) *:* des études de liaison chez des paires de jumeaux ont montré une association entre lupus et ITGAM (Harley et al., 1998). Ceci a été confirmé dans les études de GWAS (Nath et al., 2008). ITGAM est une intégrine présente à la surface des leucocytes qui agit comme récepteur au C3. En cela, on peut rapprocher les défauts de ITGAM des anomalies de la voies du complément avec un défaut de clairance des corps apoptotiques (Teruel et al., 2012). La patiente (P181) mutée (homozygote) pour ITGAM dans notre série présente un début de la maladie entre 30 et 39 ans, la présence d'un SAPL veineux (thrombose veineuse profonde) et un C3 bas isolé (C4 et CH50 normaux). Il n'y a pas, à notore connaissance, de patient muté homozygote rapporté dans la littérature. La fréquence de ce variant à l'état hétérozygote dans Gnomad® est de 0.0001758 et aucun patient homozygote n'a été rapporté dans les bases de données. Ce variant constitue un bon candidat à explorer sur le plan fonctionnel.

-*Le* ***variant TNIP1*** (c.919C>G) ***:*** TNIP1 est un régulateur de A20 (TNAIP3) qui est lui-même un régulateur de la voie NFKB. Les souris *Tnfaip3-/-* développent un lupus. Les mutations de *TNFAIP3* sont rapportées

dans un déficit immunitaire primitif qui associe des manifestations inflammatoires (arthrites, vascularites et manifestations lupus-like ou Behçet-*like*) et parfois une lymphoprolifération (voir *Introduction partie II*.). Par ailleurs, les liens entre TNIP1 et lupus sont établis dans des études de GWAS (Zuo et al., 2014). La patiente (P911) qui porte le variant sur TNIP1 présente un début de la maladie entre 10 et 19 ans, une neutropénie associée aux autres manifestations hématologiques mais pas d'autres caractéristiques particulières en lien avec sa maladie d'après les caractéristiques enregistrées dans la base de données LBBR. Le variant (rs75016666) se trouve sur l'exon 9 de la protéine. Il n'y a pas de mutation pathogène décrite de TNIP1 à ce jour.

-*Les variants* ***RNASEH2A*** (c.615T>A) ***et RNASEH2B*** (c.788C>G): les mutations de ces gènes sont responsables d'une forme monogénique de lupus (syndrome d'Aicardi-Goutières ou AGS) (Crow et al., 2015)). Les patients présentent un lupus très précoce (1ère année de vie) avec des manifestations inflammatoires importantes (encéphalopathies, engelures, manifestations digestives, vascularites). La conséquence des mutations sur ces gènes est l'augmentation importante de la réponse interféron de type I dans le sang et le système nerveux central (SNC). De façon notable, les 4 patients atteints par des variants sur ces gènes dans notre série (3 femmes, 1 homme) présentaient tous un début précoce (entre 10 et 19 ans) de leur maladie (bien que cela constituait un de nos critères d'inclusion, ces patients font partie des plus jeunes patients atteints du groupe). Un seul patient sur les 4 est signalé comme ayant des manifestations neurologiques centrales en lien avec le lupus. Deux patients présentent une forme cutanéo-articulaire, deux ont un SAPL veineux associé et 2 une glomérulonéphrite. Le variants (rs 6261978) de *RNASEH2A* se situe sur l'exon 6 à proximité de 2 mutations connues pour donner un AGS, mais ce variant est plutôt référencé comme bénin dans Clinvar®. Le variant (rs183734174) du patient P808 est situé sur l'exon 10 de *RNASEH2B* à une position conservée (score PhyloP à 5,4) mais dans une région sans mutation d'AGS décrite à ce jour.

-*Le variant* ***NCF2*** (c.298C>T) *: NCF2* code pour la protéine p67-PHOX impliquée dans le complexe de la NADPH oxydase. Les mutations de ce gène (AR) sont responsables d'un déficit immunitaire primitif (granulomatose septique chronique familiale). Les GWAS de patients lupiques pointent fréquemment le doigt sur ce gène (Alarcón-Riquelme et al., 2016). Les deux patientes porteuses de variants sur ce gène présentent un lupus ayant débuté entre 10 et 19 ans. L'une des deux patientes (P749, P188) est référencée comme présentant des infections chroniques ou récurrentes (>3 épisodes/an ORL, bronchique) d'après l'intitulé de la catégorie « susceptibilité aux infections » dans notre biobanque. Le variant rs119103276 prédit l'apparition d'un codont STOP sur la protéine et est référencé comme pathogène dans la GCD (AR).

Il est situé sur l'exon 4 à proximité de plusieurs autres mutations pathogènes (CGD) comme c.304C>T ou c.304G>C.

-*Le variant* ***TMEM173*** (STING, c.929G>A) : les mutations de ce gène sont responsables d'un déficit immunitaire primitif nommé SAVI (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy*) (AD) qui se manifeste par des ulcérations digitales, une vascularite, des manifestations pulmonaires interstitielles. Le séquençage systématique de patients lupiques n'a pour l'instant pas permis de retrouver de mutations sur *TMEM173*. Le patient (P172) atteint par le variant de TMEM173 présente un début de la maladie entre 20 et 29 ans, une forme cutanéo-articulaire et hématologique (EVANS) et une glomérolonéphrite. Il présente également un SAPL veineux. Ces caractéristiques sont celles d'un lupus systémique mais pas d'un SAVI. Par ailleurs, le variant dont il est porteur se trouve dans une portion non touchée par des mutations délétères. Ici, le variant rs6261978 se situe sur l'exon 7 (avant dernier exon) où ne sont pas retrouvés de mutations de SAVI (exons 5 et 6). Cependant, une publication récente souligne l'importance éventuelle des variants de *TMEM173* dans d'autres conditions pathologiques (notamment en cancérologie avec des mutations somatiques (Patel and Jin, 2019).

-*Le* ***variant ICAM1*** (CD54, c.571G>C) : Des études d'association génétique montrent un lien entre lupus et *ICAM1* (Elwy et al., 2010; Ruiz-Larrañaga et al., 2016). Certaines études montrent des différences d'expression de ICAM1 entre patients quiescents et actifs (Sabry et al., 2007; Sari et al., 2002). Il n'y a pas d'association décrite entre ICAM1 et le syndrome d'EVANS. ICAM1 agit comme un ligand de LFA1 sur les leucocytes et intervient dans la prolifération, la mobilité et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose. Les modèles murins KO *Icam1*$^{-/-}$ présentent des anomalies de réponse anti-infectieuse avec défaut de margination des leucocytes et défaut de prolifération et de différenciation lymphocytaire T (Gottrand et al., 2015). La patiente (P183) présentant le variant (rs139053442) sur ce gène, a un lupus qui a débuté entre 20 et 29 ans, cutanéo-articulaire et neurologique. Le variant se situe à un endroit très conservé (AA très conservé inter-espèces).

-*Le* ***variant LGASL3*** (c.137C>G) : des études dans le lupus ont montré l'association de taux élevés de Galectine 3 (GAL3) dans les glomérules de patients atteints de néphrite lupique (Kang et al., 2009). L'absence de Galectine 3 est à l'origine d'un dysfonctionnement lymphocytaire B et provoque l'émergence d'auto-anticorps dans les modèles murins (Clark et al., 2013). Le taux plasmatique de Galectine 3 serait également un reflet de l'activité interféron de type I au cours du lupus (Nielsen et al., 2014). Les souris déficientes pour *LGASL3* produisent plus d'IFNγ et d'IL4 que les souris non mutées (Chen et al., 2009). GAL3 est recrutée au niveau de la synapse immunologique sur les lymphocytes T CD4 activés et agirait en stabilisant cette synapse. Elle agirait aussi en régulant l'activation des cellules T par la transendocytose de

certaines molécules activatrices (mécanisme de régulation de l'activation cellulaire). La patiente (P519) porteuse de ce variant (rs200440596) dans notre série présente un début de la maladie entre 10 et 19 ans, des manifestations cutanées et des sérites. Dans les particularités phénotypiques, il est rapporté des maux de têtes en lien avec le lupus ainsi qu'une alopécie. Il n'y a pas de pathologie humaine décrite en lien avec une mutation de LGALSL3 à ce jour à notre connaissance.

-*Le variant* ***PADI4*** (c.926A>G) *:* PADI4 est impliquée dans la déamination des histones et son rôle en physiopathologie a été démontré au cours de la NET-ose pour le lupus et la polyarthrite rhumatoïde. Quatre patients (P49, P354, P297, P162) de notre série ont un variant sur ce gène. Ces patients présentent un début de leur maladie entre 10 et 30 ans de la maladie et 4 patients sur 4 présentent des arthrites. Trois patients ont une glomérulonéphrite (classe IV) et tous ont un complément (C3, C4, CH50) diminué. Deux patientes ont eu des problèmes obstétricaux (petit poids de naissance et naissance prématurée, et une perte fœtale) en l'absence de SAPL. Trois patients sur 4 étaient fumeurs. Le variant rs 14468386 se situe sur une position très conservée (PhyloP 5,63) et l'acide aminé correspondant est très conservé entre les espèces.

-*Le* ***variant IKZF1*** (c.1150T>G) *:* IKAROS est un facteur de transcription impliqué dans la différentiation lymphocytaire B. IRF5, IRF4 et IRF8 régulent l'expression de *IKZF1* en se liant à son promoteur (Fang et al., 2012). Dans le lupus, les données de GWAS montrent une association avec IKZF1 (Hu et al., 2013). Une baisse d'expression d'IKZF1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de STAT4 et des voies de l'interféron prépondérantes dans le lupus. Ainsi, les patients mutés pour IKZF1 (AD) présentent un déficit immunitaire type DICV avec auto-immunité fréquente (Hoshino et al., 2017; Kuehn et al., 2016). La plupart des patients présentent des infections bactériennes récurrentes. Les mutations somatiques de IKZF1 sont impliquées dans la leucémogenèses (leucémies aiguïes lymphoblastiques). La patiente (P298) concernée par le variant sur IKZF1 présente une forme plus tardive (30ans) de lupus, parmi les patients que nous avons selectionnés. Il n'est pas rapporté de susceptibilité aux infections pour cette patiente. Enfin, lorsque l'on regarde la localisation du variant sur le gène, il ne se situe pas aux mêmes endroits que les mutations rapportées (la plupart dans le domaine de liaison à l'ADN) mais plus à distance (Boutboul et al., 2018; Kuehn et al., 2016).

d. *Répartition des variants en fonction des voies physiopathologiques :*

Nous avons ensuite classé les gènes du panel en fonction des principales voies physiopathologiques dans lesquelles ils intervenaient sur la base d'une dénomination consensuelle). La répartition des variants en fonction des catégories est repésentée dans la **Figure 25A et B**. Dans cette répartition, certains gènes pourraient se retrouver dans plusieurs voies mais nous avons fait le choix de ne pas accepter de redondance et de faire un choix pour l'une ou l'autre voie. Ainsi, les voies « *DNA repair* » et « *epigenetic regulation* »

se retrouvent déséquilibrées au profit des autres voies. Voici les catégories (ou « *pathways* ») ainsi constituées :

- ✓ La voie des immuns complexes et clairance des auto-antigènes : *« Self Ag / Immune complexes or waste clearance »* **(Figure 26) :** *ATG5, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C2, C3, C4A, C4B, CLEC16A, CYBB, DRAM1, FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B, FCRT, FYB, ITGAM, NCF2, PADI4, STK17A*
- ✓ La réponse immunitaire innée : *« Innate response (TLR/PRR or IFN I signaling, Inflammation/NFkB signaling, complement C5 to C9, monocytes etc…) »* **(Figure 27) :** *ACP5, ADAR, C5, C5AR1, C5AR2, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9, CECR1, CRP, CSF2, CTCF, DNASE1, DNASE1L3, ICAM1, ICAM4, ICAM5, IFIH1, IFNL1, IFNL2, IFNL3, IFNLR1, IRAK1, IRF5, IRF7, IRF8, ISG15, LGALS3, LGALS8, MEFV, MFGE8, NLRP3, PSMB8, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, SIGLEC10, TET3, TIRAP, TLR2, TLR4, TLR7, TLR9, TMEM173, TNFAIP3, TNIP1, TREX1, TYK2, UBE2L3*
- ✓ La réponse immunitaire adaptative : *« Adaptive response (lymphocyte activation/signaling, autoAg priming/presentation, regulation/tolerance) »* **(Figure 28) :** *CD40LG, CD80, CSK, CTLA4, ELF1, FAS, FASLG, FCGR2B, HLA-DQB1, HLA-DRB1, ICOS, IKZF1, IKZF3, IL10, IL10RA, IL10RB, IL21, LYN, PDCD1, PRDM1, PRKCB, PTPN11, PTPN22, PXK, SHOC2, STAT4, TBC1D10C, TNFRSF13C, TNFSF4*
- ✓ Le stress cellulaire et la régulation du cycle cellulaire : *« Cellular stress and cell cycle regulation »* **(Figure 29)** *: CDKN1B, ETS1, HSPA5, KRAS, NRAS, PDHX, PRL, PTPN1, PTTG1, RAF1, RASGRP3, SOS1*
- ✓ Les gènes potentiellements impliqués dans le syndrome d'EVANS : *« Genes possibly linked to Evans syndrome » : CD36*
- ✓ Les régulateurs épigénétiques : *« Epigenetic regulation » : TIMP3*
- ✓ La réparation de l'ADN : *« DNA repair » : XRCC1, XRCC3, XRCC4*
- ✓ Les gènes de fonctions inconnus ou n'entrant pas dans l'une de ces catégories : *« Unknown »* **(Figure 30) :** *JAZF1, MECP2, SLC15A4, TMEM39A, UHRFBP1, VDR, WDFY4, XKR6*

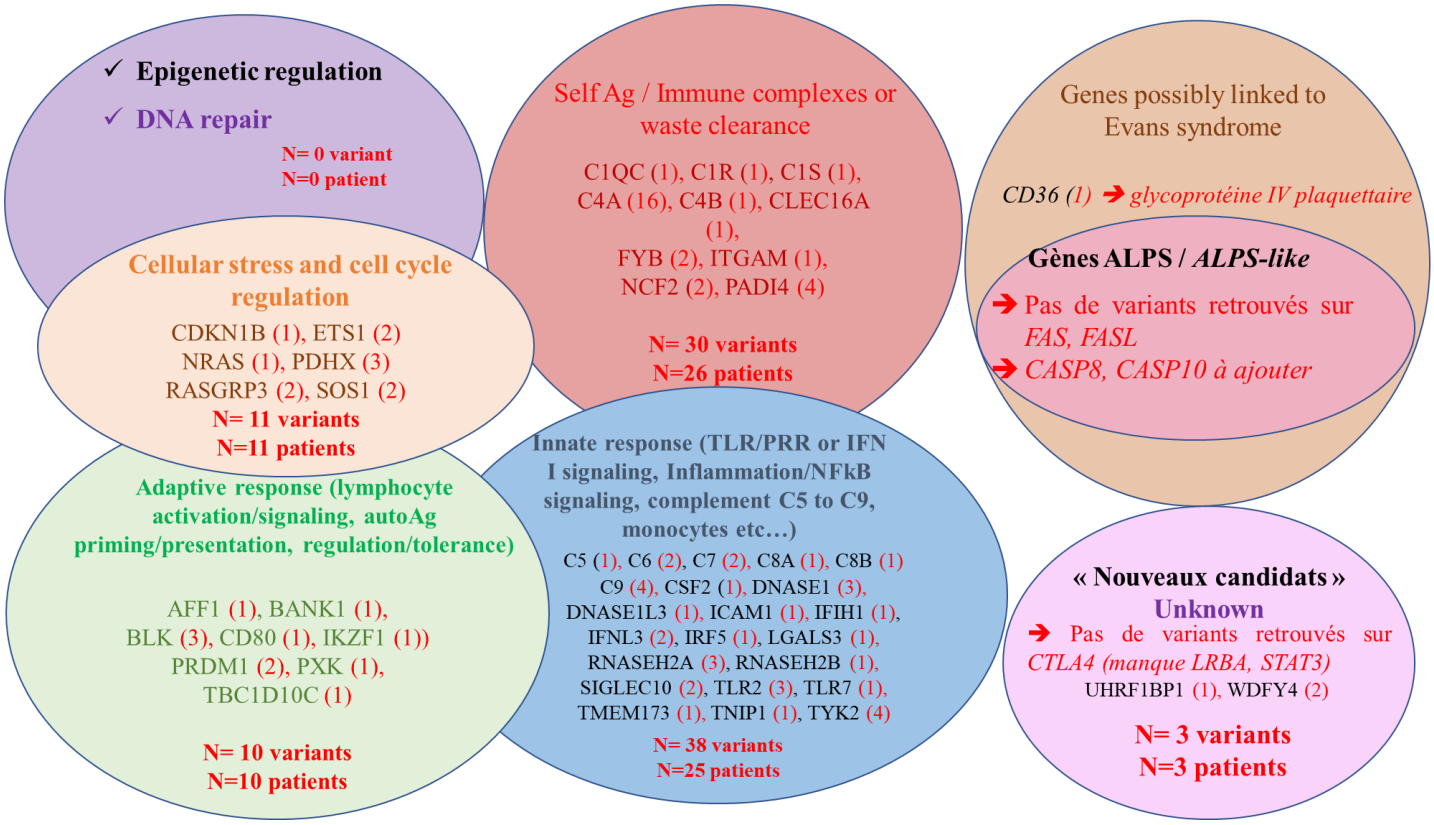


Figure 24 : Représentation schématique de la répartition des 93 variants issus de la première analyse de 37 patients LES+EVANS en fonction des voies physiopathologiques pré-déterminées sur le panel NGS. ALPS : auto-immune lymphoproliferative syndrome.

Avec ce choix de répartition, le groupe le plus représenté par la présence de variants est celui de la réponse immunitaire innée avec 39% des variants (**Figure 25B**).

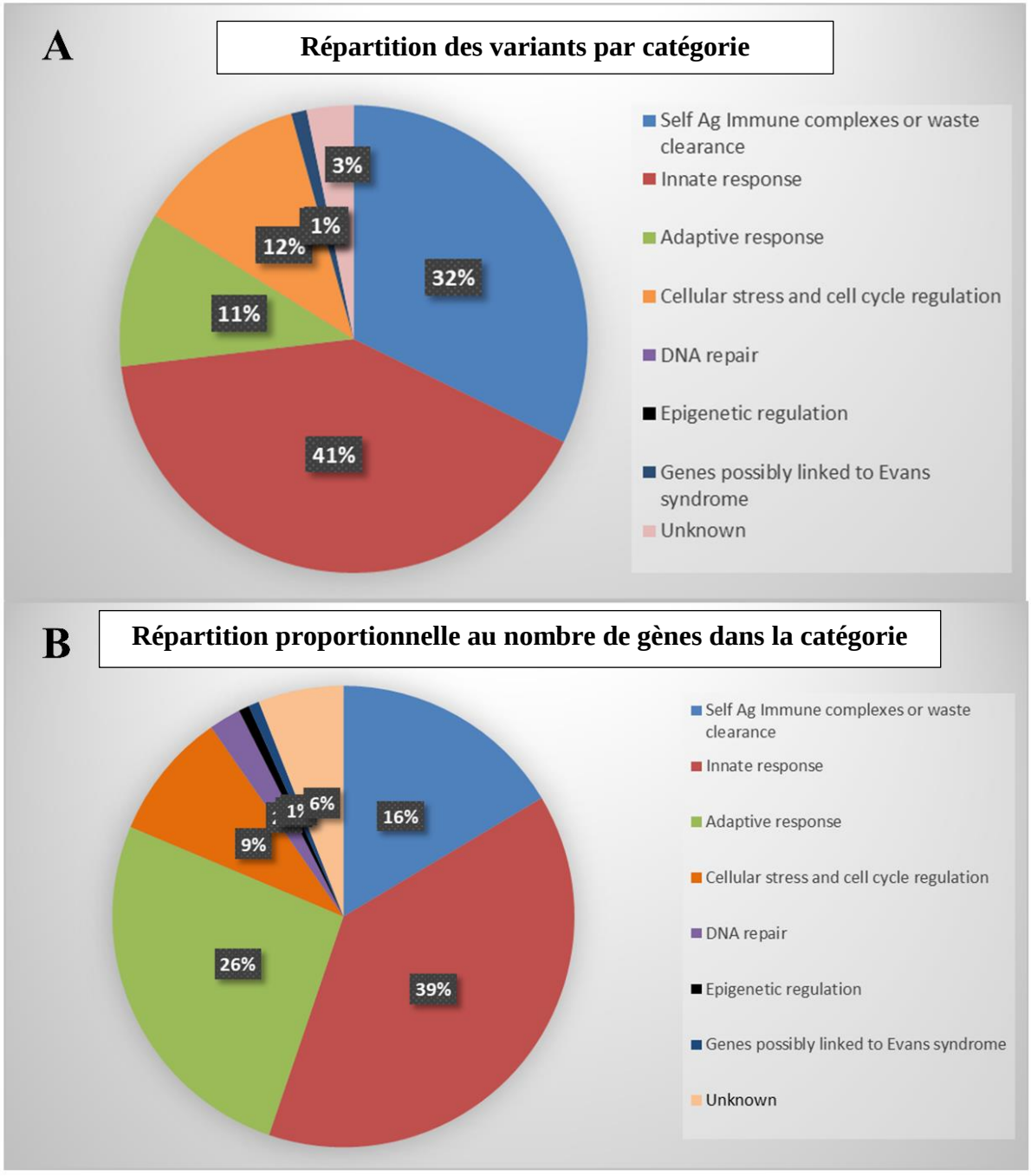


Figure 25 : Répartition des variants en fonction des catégories (pathways) constituées (A) et en fonction de la proportion de gènes par catégorie (B).

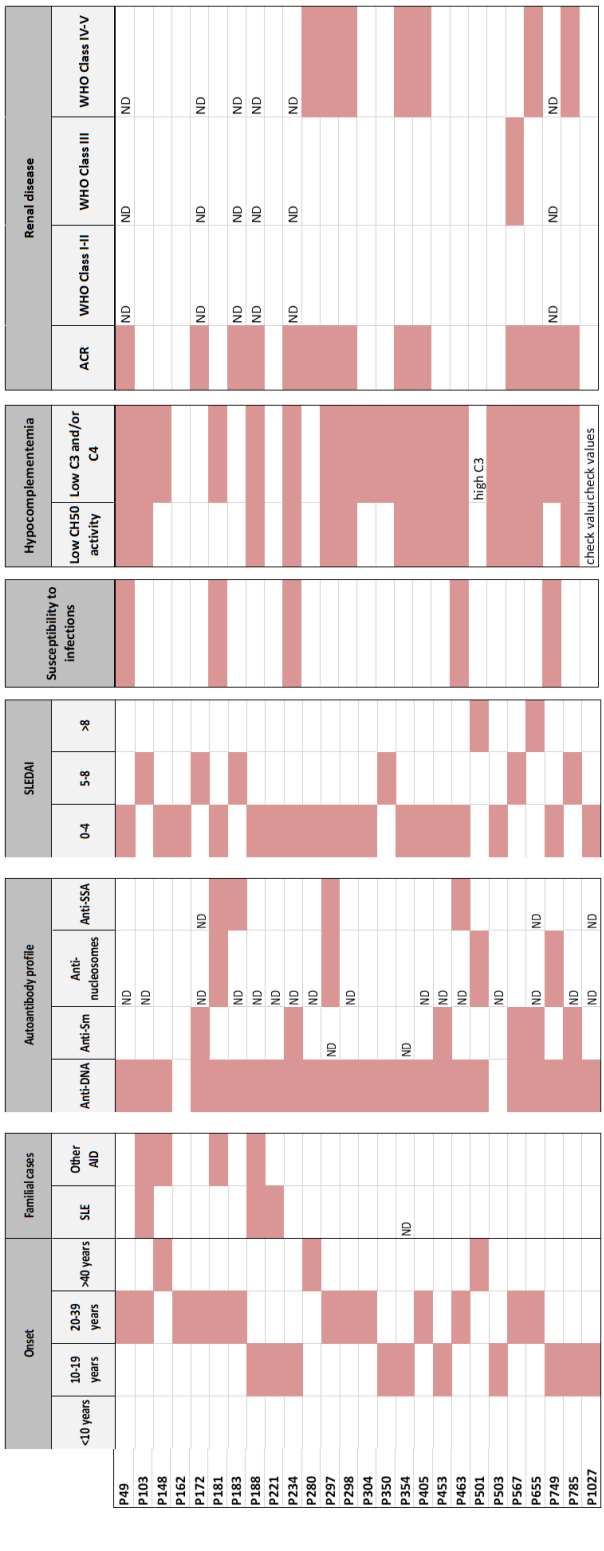
Nous avons ensuite analysé les caractéristiques des patients en fonction des pathways constituées (**Figures 26 à 31).**

Self Ag / Immune complexes or waste clearance (complement, apoptosis, autophagy, complement C1 to C4B, lysosome function etc…)

A

ATG5						
C1QA						
C1QB						
C1QC	P503					
C1R	P463					
C1S	P463					
C2						
C3						
C4A	P1027	P103	P148	P172	P181	P183
	P350	P354	P405	P501	P297	P298
	P567	P709	P749	P785		
C4B	P350					
CLEC16A	P453					
CYBB						
DRAM1						
FCGR2A						
FCGR3A						
FCGR3B						
FCGRT						
FYB	P567	P655				
ITGAM	P785					
NCF2	P188	P749				
PADI4	P162	P354	P49	297		
STK17A						

Nombre de gènes dans la voie	22
Nombre de variants	30
Nombre de patients concernés	26



B

Figure 26 : Répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « voie des immuns complexes et clairance des auto-antigènes » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

A Innate response (TLR/PRR or IFN I signaling, Inflammation/NFkB signaling, complement C5 to C9, monocytes)

ACP5	Innate response/ IFN I				
ADAR	Innate response/ IFN I				
C5	Innate response/ complement	P567			
C5AR1	Innate response/ complement				
C5AR2	Innate response/ complement				
C6	Innate response/ complement	P133	P183	P267	
C7	Innate response/ complement	P133	P172	P267	
C8A	Innate response/ complement	P280			
C8B	Innate response/ complement	P133			
C8G	Innate response/ complement				
C9	Innate response/ complement	P133	P655	P796	P971
CECR1	Innate response/ monocytes				
CRP	Innate response/inflammation				
CSF2	Innate response/inflammation	P375			
CTCF	Innate response/inflammation (APOA1 regulation) or Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement regulation ???				
DNASE1	Innate response/ IFN I	P103	P221	P234	
DNASE1L3	Innate response/ IFN I	P655			
ICAM1	Innate response	P183			
ICAM4	Innate response				
ICAM5	Innate response				
IFIH1	Innate response/ IFN I	P103			
IFNL1	Innate response/ IFN I				
IFNL2	Innate response/ IFN I				
IFNL3	Innate response/ IFN I	P20	P304	P709	
IFNLR1	Innate response/ IFN I				
IRAK1	Innate response				
IRF5	Innate response/ IFN I	P172			
IRF7	Innate response/ IFN I				
IRF8	Innate response/ IFN I				
ISG15	Innate response/ IFN I				
LGALS3	Innate response	P519			
LGALS8	Innate response				
MEFV	Innate response/inflammation				
MFGE8	Innate response				
NLRP3	Innate response/inflammation				
PSMB8	Innate response/inflammation				
RNASEH2A	Innate response/ IFN I	P212	P350	P405	
RNASEH2B	Innate response/ IFN I	P221	P808		
RNASEH2C	Innate response/ IFN I	P267			
SAMHD1	Innate response/ IFN I				
SIGLEC10	Innate response/ PRR	P212	P503		
TET3	Innate response/ IFN I				
TIRAP	Innate response/ PRR				
TLR2	Innate response/ PRR	P12	P453	P519	
TLR4	Innate response/ PRR				
TLR7	Innate response/ PRR	P463			
TLR9	Innate response/ PRR				
TMEM173	Innate response/ IFN I	P172			
TNFAIP3	Innate response/inflammation (NFkB)				
TNIP1	Innate response/inflammation (NFkB)	P911			
TREX1	Innate response/ IFN I				
TYK2	Innate response/ IFN I	P267	P280	P297	P354
UBE2L3	Innate response/inflammation				

Nombre de gènes dans la voie	53
Nombre de variants	38
Nombre de patients concernés	25

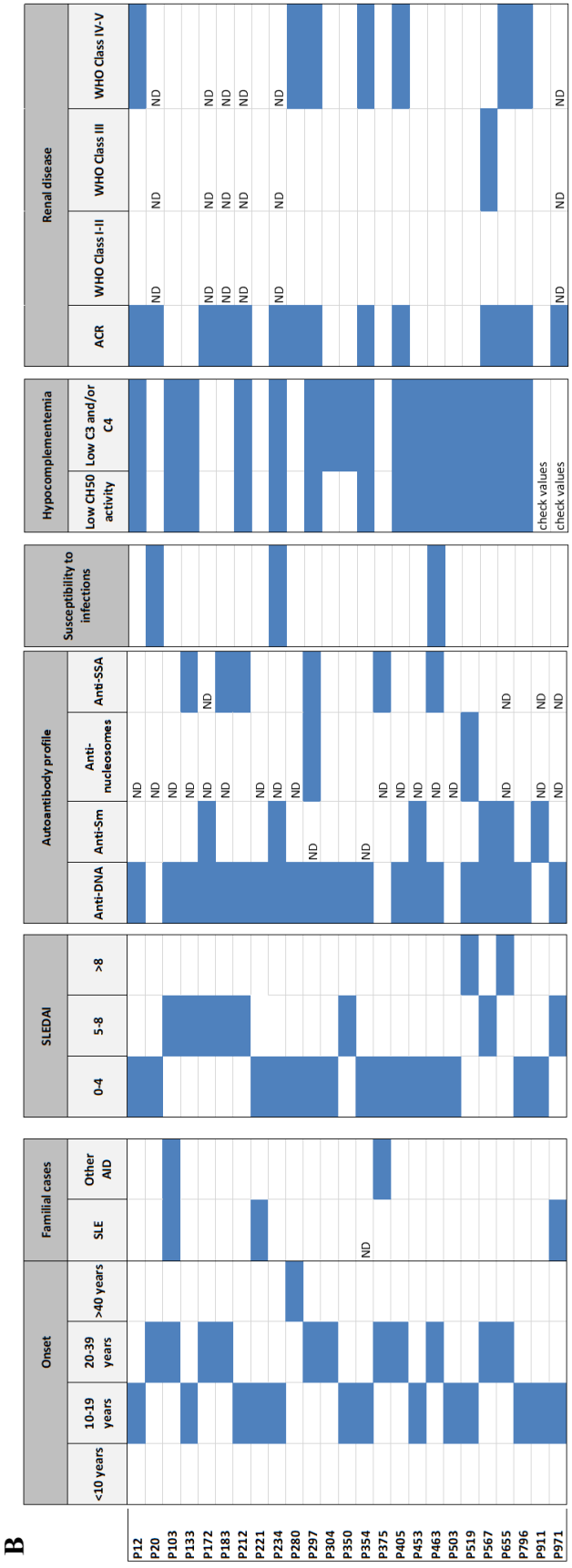


Figure 27 : Répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « réponse immunitaire innée » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Adaptive response (lymphocyte activation/signaling, autoAg priming/presentation, regulation/tolerance)

A

Liste des gènes	Liste des patients concernés		
AFF1	P212		
ARID5B			
BANK1	P103		
BLK	P221	P567	P368
BTLA			
CD22			
CD40LG			
CD80	P350		
CSK			
CTLA4			
ELF1			
FAS			
FASLG			
FCGR2B			
HLA-DQB1			
HLA-DRB1			
ICOS			
IKZF1	P298		
IKZF3			
IL10			
IL10RA			
IL10RB			
IL21			
LYN			
PDCD1			
PRDM1	P47	P785	
PRKCB			
PTPN11			
PTPN22			
PXK	P148		
SHOC2			
STAT4			
TBC1D10C	P267		
TNFRSF13C			
TNFSF4			

Nombre de gènes dans la voie	35
Nombre de variants	11
Nombre de patients concernés	11

B

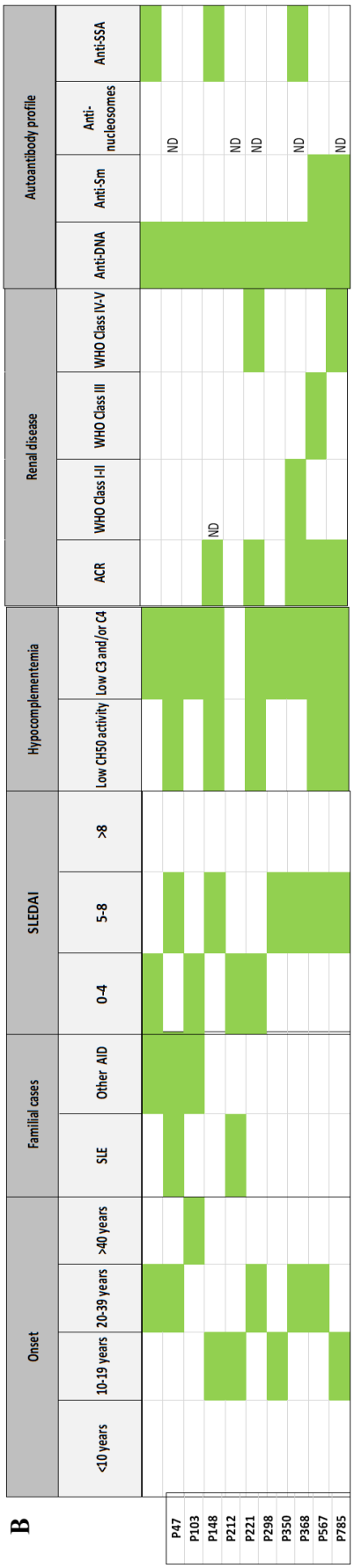


Figure 28 : Répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « réponse immunitaire adaptative » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

A

Cellular stress and cell cycle regulation

CDKN1B	P655		
ETS1	P12	P354	
HSPA5			
KRAS			
NRAS	P47		
PDHX	P162	P188	P350
PRL			
PTPN1			
PTTG1			
RAF1			
RASGRP3	P172	P463	
SOS1	P234	P503	

Figure 29 : Répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « stress cellulaire et régulation du cycle cellulaire » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

Nombre de gènes dans la voie	12
Nombre de variants	11
Nombre de patients concernés	11

B

	Onset				Familial cases		SLEDAI			Susceptibility to infections	Autoantibody profile				Hypocomplementemia		Renal disease			
	<10 years	10-19 years	20-39 years	>40 years	SLE	Other AID	0-4	5-8	>8		Anti-DNA	Anti-Sm	Anti-nucleosomes	Anti-SSA	Low CH50 activity	Low C3 and/or C4	ACR	WHO Class I-II	WHO Class III	WHO Class IV-V
P12													ND							
P47																				
P162																				
P172													ND	ND				ND	ND	ND
P188													ND					ND	ND	ND
P234													ND					ND	ND	ND
P350																				
P354					ND							ND								
P463													ND							
P503													ND							
P655													ND	ND						

A

Unknown

Gènes		Patients	
JAZF1	Unknown		
MECP2	Unknown		
SLC15A4	Unknown		
TMEM39A	Unknown		
UHRF1BP1	Unknown	P280	
VDR	Unknown		
WDFY4	Unknown	P148	P181
XKR6	Unknown		

Nombre de gènes dans la voie	8
Nombre de variants	3
Nombre de patients concernés	3

B

	Onset				Familial cases		SLEDAI			Susceptibility to infections
	<10 years	10-19 years	20-39 years	>40 years	SLE	Other AID	0-4	5-8	>8	
P148										
P181										
P280										

	Autoantibody profile				Hypocomplementemia		Renal disease			
	Anti-DNA	Anti-Sm	Anti-nucleosomes	Anti-SSA	Low CH50 activity	Low C3 and/or C4	ACR	WHO Class I-II	WHO Class III	WHO Class IV-V
P148										
P181										
P280			ND							

Figure 30 : Répartition des patients en fonction des gènes concernés dans la catégorie « inconnue » (A) et corrélation avec les données cliniques et biologiques (B)

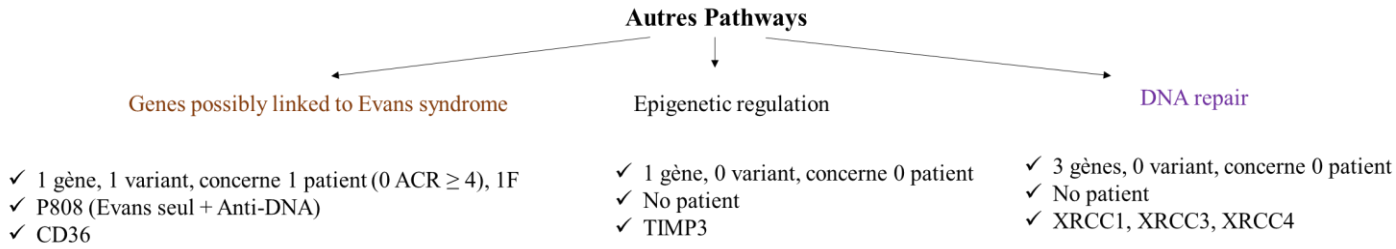


Figure 31 : commentaire sur les variants dans les autres pathways : « gènes possiblement associés au syndrome d'EVANS », « Régulation épigénique » et « Réparation de l'ADN »

A partir de ces résultats, du travail bibliographique et de l'analyse *in silico* on peut tirer les conclusions suivantes :

- Les patients présentent fréquemment plusieurs variants dans plusieurs voies (n=2,5 par patient en moyenne).
- Avec les caractéristiques telles que nous les enregistrons au moment du biobanking (pas de suivi de cohorte), il n'apparaît pas de sous-groupe génétique particulier uniforme dans le sous-groupe Lupus+Evans.
- Nous pouvons souligner l'absence de variants sur certains gènes associés aux DIPs avec syndrome d'EVANS tels que les ALPS (*FAS, FASL*) et ALPS-*like* ou DICV monogéniques avec EVANS (*CTLA4*). Il faut noter cependant l'absence de certains gènes sur la puce tels que *STAT3* ou *LRBA.*

d. Poursuite du projet EVANS-lupus :

A partir de cette analyse, nous avons reposé la question de la pertinence de notre proposition initiale d'identifier des voies physiopathologiques communes à un groupe homogène de patients sur la base des variants génomiques. En effet, si une telle approche peut permettre d'identifier de nouveaux variants d'intérêt dans le LES, il n'est pas certain qu'elle guide la compréhension des mécanismes physiopathologiques d'un groupe de patient. En particulier, dans un panel choisi de 135 gènes issus de GWAS de lupus et de DIPs, il n'apparait pas de réelle homogénéité.

Notre analyse a cependant permis l'identification de quelques variants particulièrement interessants (n=15) parmi lesquelles plusieurs mériteraient une étude fonctionnelle (*ITGAM, C7, C1R, ICAM1, TNIP1, IKZF1*). A titre de comparaison, dans une cohorte de patients atteints de syndrome d'EVANS pédiatriques entre 3 et 8 ans (non ALPS), *Besnard et al*. (Besnard et al., 2018) ont mené une analyse comparable de variants par NGS. Parmi les 18 patients explorés, 7 présentaient des mutations relevantes avec le phénotype sur *LRBA* (n=1), *CTLA4* (n=3), *STAT3* (n=2) et *KRAS* (n=1). Les auteurs de ce travail concluent que le

diagnostic moléculaire ne peut pas être fait sur la seule base du phénotype clinique ou immunobiologique, soulignant l'intérêt d'une approche incluant systématiquement la recherche d'un diagnostic moléculaire chez ces patients. Nous pensons qu'il en est de même pour certains phénotypes choisis de maladies systémiques comme ici le lupus avec syndrome d'EVANS.

A partir de là, nous souhaitons :

- Compléter les données sur les patients restants (n=23)
- Comparer nos résultats avec d'autres patients déjà séquencés (panel ou exome) de la cohorte dans d'autres projets (par exemple, une analyse par séquençage d'exomes est en cours dans le sous groupe lupus et glomérulonéphrite classe IV de la corhorte LBBR) pour voir si certaines voies ou certains variants sont enrichis dans notre sous-groupe Lupus avec Evans.
- Discuter la validation fonctionnelle de certains variants.

III. Conclusions de la partie II – Cohorte lupus avec syndrome d'Evans :

Peut-on identifier par le séquençage haut débit (panel de gènes ou exomes complets) des voies physiopathologiques partagées entre différents patients atteints d'un même phénotype dans une maladie auto-immune multifactorielle et multigénique ?

Nous voulions ici identifier des voies physiopathologiques partagées en reserrant l'analyse sur un nombre restreint de gènes (dans un premier temps) et sur un phénotype plus précis (lupus et EVANS) et chez des patients issus d'une large biobanque franco-européenne de patients ayant un fond génétique probablement proche et vivant dans un environnement commun (zone géographique limitée au Rhin supérieur). Ce type d'approche n'a jamais été publiée dans le LES (à notre connaissance).

La problématique d'identification de voies physiopathologiques partagées en partant d'un phénotype clinique restreint est difficile à aborder sur le plan fonctionnel. D'une part les grandes études épidémiologiques et génétiques (GWAS) dans le lupus ont identifié plus de 300 gènes différents (dont une soixantaine sont retrouvés de façon récurrente et confirmées par des méta-analyses de GWAS) associés à la maladie et que de nombreux variants se retrouvent dans plusieurs maladies auto-immunes systémiques (Cotsapas et al., 2011; Gutierrez-Arcelus et al., 2016). D'autre part, les formes monogéniques de la maladie sont exceptionnellement rares. L'étendue des possibilités physiopathologiques est donc vaste. Enfin, l'identification de variants rares prédisant une conséquence délétère pour la fonction protéique peut se voir, y compris chez les sujets indemnes de maladie auto-immunes (MacArthur et al., 2012) et il reste difficile d'établir le lien entre des variants hétérozygotes et la physiopathologie d'une maladie multifactorielle.

Nos résultats apportent une image de la diversité des mutations délétères retrouvées y compris lorsque l'on se focalise sur un panel de gènes restreint. Certains variants pourraient à eux seuls expliquer le phénotype et constituer de bons candidats pour une validation fonctionnelle sous une hypothèse monogénique (par exemple *ITGAM*). D'autres, pourraient constituer plutôt un facteur de risque qu'il sera plus difficile de valider dans les modèles expérimentaux (*BLK, TNIP1, CD36* par exemple*).*

Nous pensons que plusieurs chemins, potentiellement très variés (impliquant l'immunité innée ou adaptative) peuvent aboutir à un nombre restreint de caractéristiques physiopathologiques (signature interféron par exemple) clés à l'origine d'un phénotype clinique donné. La complexité du système immunitaire, la redondance des voies physiopathologiques et le nombre de partenaires moléculaires et cellulaires impliqués ainsi que la diversité des tissus concernés par les pathologies multisystémiques constituent chacun une gageure pour l'étude de ce type de mutations. Les analyses à grande échelle, et la mise en commun des informations issues d'analyses restreintes, associés à une étude détaillée des phénotypes cliniques permettront peut-être de reconstituer les éléments du puzzle à organiser dans ces maladies.

Ce type d'analyse génétique tirerait probablement avantage d'une **exploration intégrée multi-omique** (transcriptome, protéomique, immunophénotypage approfondi) pour identifier les conséquences moléculaires et cellulaires des variants identifiés, mais malheureusement, nous ne disposons pas du matériel suffisant pour réaliser ce type d'analyse chez tous les patients de la cohorte (Banchereau et al., 2016). L'intégration de telles données nécessitera probablement la mise en œuvre de techniques haut débit et d'analyse bio-informatique dont les outils ne sont pas encore développés à l'heure actuelle.

L'étape de validation fonctionnelle de chacun des variants rares (et/ou de leur combinaison) qui fait probablement fréquemment appel à des contextes de digénisme ou de multigénisme (plus de 2,5 variants par patient dans notre travail), s'avère difficile mais essentielle.

ANNEXE DE LA PARTIE II.

LUPUS-EVANS

- ANNEXE 1 : LISTE DES GENES DU PANEL NGS (SLE-EVANS) ET VOIE(S) BIOLOGIQUE(S) MAJEURE(S) CONCERNEE(S)

Gènes	Pathway
ACP5	Innate response/ IFN I
ADAR	Innate response/ IFN I
AFF1	Adaptive response
ARID5B	Adaptive response
ATG5	Self Ag, immune complexes or waste clearance / autophagy
BANK1	Adaptive response
BLK	Adaptive response
BTLA	Adaptive response
C1QA	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C1QB	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C1QC	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C1R	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C1S	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C2	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C3	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C4A	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C4B	Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement
C5	Innate response/ complement
C5AR1	Innate response/ complement
C5AR2	Innate response/ complement
C6	Innate response/ complement
C7	Innate response/ complement
C8A	Innate response/ complement
C8B	Innate response/ complement
C8G	Innate response/ complement
C9	Innate response/ complement
CD22	Adaptive response
CD36	Possibly linked to Evans syndrome
CD40LG	Adaptive response
CD80	Adaptive response
CDKN1B	Cellular stress and cell cyle regulation
CECR1	Innate response/ monocytes
CLEC16A	Self Ag, immune complexes or waste clearance
CRP	Innate response/inflammation
CSF2	Innate response/inflammation
CSK	Adaptive response
CTCF	Innate response/inflammation (APOA1 regulation) or Self Ag, immune complexes or waste clearance / complement regulation
CTLA4	Adaptive response
CYBB	Self Ag, immune complexes or waste clearance
DNASE1	Innate response/ IFN I
DNASE1L3	Innate response/ IFN I
DRAM1	Self Ag, immune complexes or waste clearance
ELF1	Adaptive response
ETS1	Cellular stress and cell cyle regulation
FAS	Adaptive response / Tolerance
FASLG	Adaptive response / Tolerance
FCGR2A	Self Ag, immune complexes or waste clearance
FCGR2B	Adaptive response

FCGR3A	Self Ag, immune complexes or waste clearance
FCGR3B	Self Ag, immune complexes or waste clearance
FCGRT	Self Ag, immune complexes or waste clearance
FYB	Self Ag, immune complexes or waste clearance
HLA-DQB1	Adaptive response / AtuoAg priming/presentation
HLA-DRB1	Adaptive response / AtuoAg priming/presentation
HSPA5	Cellular stress and cell cyle regulation
ICAM1	Innate response
ICAM4	Innate response
ICAM5	Innate response
ICOS	Adaptive response
IFIH1	Innate response/ IFN I
IFNL1	Innate response/ IFN I
IFNL2	Innate response/ IFN I
IFNL3	Innate response/ IFN I
IFNLR1	Innate response/ IFN I
IKZF1	Adaptive response
IKZF3	Adaptive response
IL10	Adaptive response / Tolerance
IL10RA	Adaptive response / Tolerance
IL10RB	Adaptive response / Tolerance
IL21	Adaptive response
IRAK1	Innate response
IRF5	Innate response/ IFN I
IRF7	Innate response/ IFN I
IRF8	Innate response/ IFN I
ISG15	Innate response/ IFN I
ITGAM	Self Ag, immune complexes or waste clearance
JAZF1	Unknown
KRAS	Cellular stress and cell cyle regulation
LGALS3	Innate response
LGALS8	Innate response
LYN	Adaptive response
MECP2	Unknown
MEFV	Innate response/inflammation
MFGE8	Innate response
NCF2	Self Ag, immune complexes or waste clearance
NLRP3	Innate response/inflammation
NRAS	Cellular stress and cell cyle regulation
PADI4	Self Ag, immune complexes or waste clearance
PDCD1	Adaptive response
PDHX	Cellular stress and cell cyle regulation
PRDM1	Adaptive response
PRKCB	Adaptive response / B cell activation
PRL	Cellular stress and cell cyle regulation (PRL regulate cell survival)
PSMB8	Innate response/inflammation
PTPN1	Cellular stress and cell cyle regulation
PTPN11	Adaptive response
PTPN22	Adaptive response
PTTG1	Cellular stress and cell cyle regulation
PXK	Adaptive response
RAF1	Cellular stress and cell cyle regulation
RASGRP3	Cellular stress and cell cyle regulation
RNASEH2A	Innate response/ IFN I

RNASEH2B	Innate response/ IFN I
RNASEH2C	Innate response/ IFN I
SAMHD1	Innate response/ IFN I
SHOC2	Adaptive response
SIGLEC10	Innate response/ PRR
SLC15A4	Unknown
SOS1	Cellular stress and cell cyle regulation
STAT4	Adaptive response
STK17A	Self Ag, immune complexes or waste clearance / Apoptosis
TBC1D10C	Adaptive response
TET3	Innate response/ IFN I
TIMP3	Epigenetic regulation
TIRAP	Innate response/ PRR
TLR2	Innate response/ PRR
TLR4	Innate response/ PRR
TLR7	Innate response/ PRR
TLR9	Innate response/ PRR
TMEM173	Innate response/ IFN I
TMEM39A	Unknown
TNFAIP3	Innate response/inflammation (NFkB)
TNFRSF13C	Adaptive response
TNFSF4	Adaptive response
TNIP1	Innate response/inflammation (NFkB)
TREX1	Innate response/ IFN I
TYK2	Innate response/ IFN I
UBE2L3	Innate response/inflammation
UHRF1BP1	Unknown
VDR	Unknown
WDFY4	Unknown
XKR6	Unknown
XRCC1	DNA repair
XRCC3	DNA repair
XRCC4	DNA repair

TABLE S1 : gènes présents sur la puce LES+EVANS et principales voies physiopathologiques de ratachement.

- **ANNEXE 2 : LISTE DES VARIANTS SELECTIONNES (n=93)**

Figure S1 (ci-contre). Liste des variants retenus après filtrage et analyse bio-informatique :

AFF1 est retrouvé dans des études de GWAS de lupus (Cen et al., 2012; Okada et al., 2012). AFF1 est impliquée dans la physiopathologie de leucémies lymphoblastiques de l'enfant. C'est un facteur de transcription qui régule la RNA polymérase II.

BANK1 est une protéine présente dans les lymphocytes B dont la fonction est essentielle pour l'activation cellulaire médiée par le BCR (mobilisation du flux calcique) et la phosphorylation d'IP3 par Src. Les polymorphismes de *BANK1* sont associés au lupus dans les études de GWAS.

C1Q est associé à une forme monogénique de lupus (AR), voir ***Table 15***.

DNASE1 et ***DNAS1L3*** codent pour des protéines qui participent à la clairance des débris nucléaires apoptotiques dont l'accumulation est un des mécanismes de rupture de tolérance dans le lupus. Les mutations de ces gènes sont responsables d'une forme monogénique de lupus (***Table 15***).

PRDM1 code pour Blimp1 qui est impliqué dans le développement lymphocytaire B où il réprime la transcription du gène *PAX5*. Il joue un rôle majeur dans les plasmocytes pour la différenciation et la production d'anticorps. Blimp1 réprime également la transcription de l'IFNγ. Des études ont montré que les taux de transcrits de Blimp1 sont augmentés chez les patients lupiques (Luo et al., 2013).

PXK est associé au lupus dans les études de GWAS (Martin et al., 2013). La protéine PXK est une sérine/thréonine kinase qui pourrait intervenir dans la régulation du signal de l'EGF (Epidermal Growth Factor).

TBC1D10C (Carabin) a été décrit par notre équipe comme régulateur négatif des lymphocytes B dont le défaut de fonction chez la souris lupique (NZB*NZW) précipite la rupture de tolérance (Schickel et al., 2012).

TLR2 est impliqué dans la réponse anti-infectieuse (reconnaissance de motifs de *S. aureus* par exemple). Les études de GWAS ont fréquement identifié l'implication de TLR2. Les souris lupiques (Lpr) chez qui *TLR2* est réprimé présentent des taux moins élevés d'auto-anticorps (Lartigue et al., 2009).

Patient	Gène	cDNA	Protéine	Exon	Version gène	Variant	Type	Hom/Het	Fréquence	Sift	Polyphen	Cadd	Mutation Taster	Conservation score	ClinVar	Conséquences ClinVar
P212	*AFF1*	c.2651C>T	p.Pro884Leu	Exon 14	NM_001116693.2	rs144038967	Missense	Het	0,00400484	Deleterious	D, P, P	24,9	D			
P103	*BANK1*	c.30G>C	p.(Trp10Cys)	Exon 2	NM_001083907.2	rs35978636	Missense	Het	0.005494505494505495	Deleterious (score: 0.01)	PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00)	29,8	Disease causing (p-value: 1	5.18		
P221	*BLK*	c.211G>A	p.(Ala71Thr)	Exon 4	NM_001715.2	rs55758736	Missense	Het	0.010073260073260074	Deleterious (score: 0)	POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.565 (sensitivity: 0.88; specificity: 0.91)	26,2	Disease causing (p-value: 0)	5.22	RCV000116496.2, RCV000445395.1, RCV000379716.1, RCV000013112.22	(Pathogenic - Maturity-onset diabetes of the young, type 11).
P567 + P368	*BLK*	c.116C>T	p.Pro39Leu	Exon 2	NM_001715.2	rs142352008	Missense	Het	9.157509157509158E-4	Tolerated (0.23) vs SureCall 0.02	Possibly damaging (0.552)	26,2	Disease-causing	AA faiblement conservé sur 12 espèces (5.54)	RCV000329303.1, RCV000242255.1	likely benign: maturity onset diabete of the young, likely benign: not specified
P503	*C1QC*	c.65_67dupTGC	p.Leu22dup	Exon 2	NM_001114101.1	rs763912542	disruptive_inframe_insertion	Het	Unknown	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P463	*C1R*	c.336G>C	p.Met112Ile	Exon 3	NM_001733.4	rs139531404	Missense	Het	0,00283441	D,D,D,T,T,D,D,D,D,D	D,D,P	22,2	D	4.34	ND	ND
P463	*C1S*	c.943G>A	p.Asp315Asn	Exon 8	NM_001734.3	rs117907409	Missense	Het	0.003205128205128205	Tolerated (0.14) vs 0.02 SureCall	Probably damaging (0.998)	25	Disease causing	AA très conservé jusqu'à tétraodon sur 12 espèces (5.6)	ND	ND
N=16	*C4A*	c.1040C>A	p.Ser347Tyr	Exon 9	NM_001252204.3	rs392610	Missense	Het/Hom	0,00222338	D,D	D,D	19,62	D	ND	ND	ND
P350	*C4B*	c.1646A>C	p.His549Pro	Exon 13	NM_001002029.3.2	rs2229405	Missense	Het	ND	T,T	B,P	21,7	N	ND	ND	ND
P103	*DNASE1*	c.350A>C	p.(Tyr117Ser)	Exon 5	NM_005223.3	rs34923865	Missense	Het	0.004578754578754579	0.0036	PROBABLY DAMAGING	16,6	Disease causing (p-value: 0.989)	5.49	ND	ND
P221 P234	*DNASE1*	c.379G>A	p.(Gly127Arg)	Exon 5	NM_005223.3	rs8176919	Missense	Het	0.018315018315018316	0.0218	PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00		Disease causing (p-value: 1)	5.27	ND	ND
P655	*DNASE1L3*	c.244G>C	p.Gly82Arg	Exon 3	NM_004944.3	rs74350392	Missense	Het	0.010073260073260074	Tolerated (score 0.58)	Benign (0.012)	14,55	Polymorphism	ND	RCV000177220.1	benign: not specified
P47	*PRDM1*	c.946C>T	p.Leu316Phe	Exon 3	NM_182907.2	rs141465160	Missense	Het	0.001	Tolerated (0.06) vs 0.15 SureCall	Benign (0.008)	15,69	Disease causing	AA conservé jusque poisson zèbre (5.31)	ND	ND
P148	*PXK*	c.1322G>A	p.(Gly441Asp)	Exon 15	NM_001289101.1	rs765552586	Missense	Het	4,11E-06	Tolerated (score: 0.91)	D,D	22,2	Disease causing (p-value: 1)	6.03	ND	ND
P463	*RASGRP3*	c.844G>A	p.Gly282Ser	Exon 10	NM_001139488.1	rs142000180	Missense	Het	0.0027472527472527475	Tolerated (0.17)	Probably damaging (0.977)	24,9	Disease causing	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre sur 12 espèces (5.74)	ND	ND
P808	*RNASEH2B*	c.788C>G	p.Thr263Ser	Exon 11	NM_024570.3	rs183734174	Frameshift	Het	0,00024	Deleterious (score: 0.02)	Probably damaging (0.977)	23	Disease Causing	ND	ND	ND
P267	*TBC1D10C*	c..1216C>T	p.(Arg406Trp)	Exon 10	NM_198517.3	rs201488188	Missense	Het	0.00039	Deleterious (score: 0.02)	PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00	15,42	Polymorphism (p-value: 1)	3.97		
P12	*TLR2*	c.1892C>A	p.(Pro631His)	Exon 3	NM_003264.4	rs5743704	Missence	Het	0.012820512820512822	Deleterious (score: 0.02)	PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity: 0.14; specificity: 0.99)	26,4	D	5.65		
P519	*TLR2*	c.650T>C	p.Phe217Ser	Exon 3	NM_003264.4	rs139227237	Missense	Het	0.0027472527472527475	Tolerated (0.06)	Possibly damaging (0.879)	23,2	N	AA faiblement conservé sur 12 espèces (5.08)		

Figure S1 (suite) :

Les déficits de la voie finale du complément (complexe d'attaque membranaire) : *C5, C6, C7, C8A&B et C9* prédisposent aux infections à neisseiria et à méningocoques (déficits complets autosomiques récessifs). Leur association à l'auto-immunité et au lupus est moins solide que celle de la voie classique du complément même s'ils ont pu parfois être identifiés dans les données de GWAS.

CD80 marqueur membranaire d'activation des lymphocytes B, CD80 se lie à CD28 (ou CTLA4) à la surface des lymphocytes T CD4. L'association des polymorphismes de CD80 avec le lupus reste sujet de débat malgrè le fait qu'il s'agisse d'un bon candidat théorique (Matsushita et al., 2000).

CDKN1B est une kinase impliquée dans la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Le gène a été identifié dans des études de GWAS et confirmé dans les méta-analyses (Yang et al., 2013).

CECR1 code pour ADA2, une protéine dont le déficit est responsable d'un déficit immunitaire avec manifestations inflammatoires. Des études suggèrent un lien entre les taux sériques d'ADA2 et l'activité du lupus (Saghiri et al., 2012).

CLEC16A l'implication de CLEC16A dans le lupus reste à déterminer. Certaines études de GWAS suggèrent une association.

CSF2 son rôle dans la physiopathologie du lupus reste à définir malgré certaines données de GWAS.

ETS1 est un facteur de transcription dont le rôle protecteur dans le lupus est suggéré par le phénotype des souris KO $Ets^{-/-}$ qui développent un lupus. Une étude récente suggère que son rôle serait prépondérant dans les LTFh en bloquant la différenciation en LTFh2 (Kim et al., 2019).

RASGRP3 intervient dans le développement et l'activation lymphocytaire T et B (voie Ras/ERK) qui aboutit à l'activation et à la prolifération cellulaire (Golec et al., 2016). Il a été impliqué dans des études d'association génétique avec le lupus (He et al., 2010; Wang et al., 2013).

Patient	*Gène*	cDNA	Protéine	Exon	Version gène	Variant	Type	Hom/Het	Fréquence	Sift	Polyphen	Cadd	Mutation Taster	Conservation score	ClinVar	Conséquences ClinVar
P567	C5	c.3940G>A	p.Asp1314Asn	Exon 30	NM_001735.2	rs771283592	Missense	Het	ND	Tolerated (score 0.57)	Benign (0.000)	14,21	Polymorphism	AA faiblement conservé sur 12 espèces (5.71)	ND	ND
P133	*C6*	c.1075G>A	p.Asp359Asn	Exon 8	NM_000065.3	rs373781885	Missense	Het	0,000280876	D,D	D	25	N	ND	ND	ND
P183	*C6*	c.2087A>G	p.Asp696Gly	Exon 14	NM_000065.3	rs41271067	Missense	Het	0,00699335	T,T	B	22,7	N	ND	ND	ND
P298	*C6*	c.542C>T	p.Thr181Ile	Exon 5	NM_000065.3	rs114609505	Missense	Het	0,00607228	T,T	B	7,774	N	ND	ND	ND
P133	*C7*	c.1201A>T	p.Arg401Trp	Exon 10	NM_000587.2	rs755704398	Missense	Het	3,25637E-05	D	D	5,228	N	ND	ND	ND
P267	*C7*	c.1561C>A	p.Arg521Ser	Exon 12	NM_000587.2	rs121964920	Missense	Het	0,00230424	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity: 0.14; specificity: 0.99	26,3	Disease causing (p-value: 0.013)	5.21	RCV000012888.23 RCV000012887.23	(Pathogenic - C7 and C6 deficiency, combined subtotal),
P172	*C7*	c.2350+2T>C		Exon 17	NM_000587.2	rs201240159	splice_donor_variant&intron_variant	Het	0,000268116	ND	ND	26,5	D	ND	ND	ND
P280	*C8A*	c.1454G>A	p.Arg485His	Exon 10	NM_000562.2	rs1620075	Missense	Het	0,00198318	D	B	13,29	P	ND	ND	ND
P133	*C8B*	c.1355G>C	p.Trp452Ser	Exon 9	NM_000066.3	rs200077558	Missense	Het	0,000809252	D,D,D	D,D,D	34	D	ND	ND	ND
P971	*C9*	c.499C>T	p.Pro167Ser	Exon 5	NM_001737.4	rs34882957	Missense	Het	0,003205128205128205	Deleterious (0.0) vs SureCall 0.73	Probably damaging (1)	24,4	D	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre sur 12 espèces (5.72)	Risk factor RCV000077786.2	Macular degeneration, age-related
P655	*C9*	c.133A>T	p.Met45Leu	Exon 2	NM_001737.4	rs41271047	Missense	Het	4,57875457875457E-4	Tolerated (score 0.93)	Benign (0.001)	13,51	D	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre sur 12 espèces (5.51)	ND	ND
P796	*C9*	c.185T>C	p.Phe62Ser	Exon 3	NM_001737.4	rs140251849	missense_variant&splice_region_variant	Het	0,000117766	T	D	24,4	D	ND	ND	ND
P133	*C9*	c.346C>T	p.Arg116*	Exon 4	NM_001737.4	rs121909592	stop_gained	Het	0,00081355	ND	ND	35	A	ND	ND	ND
P212	*CD36*	c.905G>T	p.(Gly302Val)	Exon 10	NM_000819911.1	rs146027667	Missense	Het	0.00056	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING (score: 1)	29,8	Disease causing (p-value: 1)	5.06	RCV000387636.1	Uncertain significance* - Platelet glycoprotein IV deficiency
P350	*CD80*	c.664C>T	p.His222Tyr	Exon 4	NM_005191.3	rs2229098	Missense	Het	0,00732321	D,D,T	P,P	11,33	N	ND	ND	ND
P655	*CDKN1B*	c.356T>C	p.Ile119Thr	Exon 1	NM_004064.4	rs142833529	Missense	Het	4,57875457875457E-4	Tolerated (score 0.6)	Benign (0.000)	12	Polymorphism	AA moyennement conservé sur 12 espèces (5.3)	RCV000457158.1, RCV000344750.1	uncertain significance
P785	*CECR1*	c.470A>C	p.Glu157Ala	missense_variant	NM_001282225.1	rs762092127	Missense	Het	8,12123E-06	T,T,T,T	B	5,177	N	ND	ND	ND
P453	*CLEC16A*	c.1145A>G	p.Lys382Arg	Exon 10	NM_001243403.1	rs200410772	Missense	Het	1,22E-05	Tolerated (0.43)	Benign (0.010)	16,21	N	AA moyennement conservé (5.62)	ND	ND
P375	*CSF2*	c.58G>A	p.Ala20Thr	Exon 1	NM_000758.3	rs200208265	Missense	Het	0,000457875	T	B	11,08	N	ND	ND	ND
P12	*ETS1*	c.205T>A	p.Cys69Ser	Exon 3	NM_001143820.1	rs751802157	Missense	Het	0,00000414645	T	B	22	D	ND	ND	ND
P172	RASGRP3	c.1003G>A	p.Val335Ile	Exon 10	NM_001139488.1	rs749067768	Missense	Het	0,0000243881 (gnome_exomes)	T	B	21,2	N			
P463	RASGRP3	c.844G>A	p.Gly282Ser	Exon 10	NM_001139488.1	rs142000180	Missense	Het	0.0027472527472527475	T	D	24,9	Disease causing	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre sur 12 espèces (5.74)		
P354	*ETS1*	c.451G>A	p.Ala151Thr	Exon 5	NM_001143820.1	rs79963544	Missense	Het	0,001373626	T	P,D,B	23,5	D	ND	ND	ND

Figure S1 (suite) :

FYB code pour une protéine présente dans les plaquettes, les cellules myéloïdes et les lymphocytes où elle intervient dans la mobilité, la prolifération l'activation cellulaire et la sécrétion de cytokines. La protéine interagit avec FYN lors de l'activation lymphocytaire T par la voie du TCR avec pour conséquence l'activation de SLP76. En outre, la protéine pourrait jouer un rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Des études de GWAS supportent son association avec le lupus (Addobbati et al., 2013).

IFIH1 code pour une hélicase et les gains-de-fonction sont responsables d'un syndrome d'Aicardi-Goutières (Crow et al., 2015).

TLR7 dont les polymorphismes sont associés au lupus et à la néphrite lupique code pour une protéine clée de la physipathologie du lupus. Impliqué dans l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, l'axe TLR7/CIC active ces cellules et augmente la production d'INF de type I.

SIGLEC10 code pour une lectine membranaire qui joue un rôle dans la transduction du signal de danger. Elle serait impliquée dans la régulation de l'activation lymphocytaire B lors de la réponse aux signaux de dangers (*HSP70*, *HMGB1*).

TYK2 est impliqué dans les syndromes hyper-IgE. C'est une tyrosine kinase de la voie des JAKs/STATs, impliquée dans le signaling des IFN de type I et III. Association TYK2/Lupus dans les GWAS (Tang et al., 2015). Le rôle des mutations décrites par (Diogo et al., 2015) pourrait être protecteur au cours du lupus.

Patient	*Gène*	cDNA	Protéine	Exon	Version gène	Variant	Type	Hom/Het	Fréquence (gnome_exomes)	Sift	Polyphen	Cadd	Mutation Taster	Conservation score	ClinVar	Conséquences ClinVar
P567 P655	***FYB***	c.307G>A	p.Gly103Arg	Exon 2	NM_001243093.1	rs184468828	Missense	Het	4.57875457875457 9E-4	Deleterious (0.000)	Probably damaging (1.000)	27,8	Polymorphism	AA très conservé jusqu'à poulet sur 12 espèces (6.17)	ND	ND
P298	***IKZF1***	c.1150T>G	p.Ser384Ala	Exon 8	NM_006060.5	Unknown	Missense	Het	Unknown	D,T,D,D,D,T,T,D	B	10,91	D	ND	ND	ND
P785	***ITGAM***	c.1610C>T	p.Thr537Met	Exon 14	NM_001145808.1	rs202010329	Missense	Het	0,000381974	T,T	D,D	23,1	N	ND	ND	ND
P183	***ICAM1***	c.571G>C	p.(Asp191His)	Exon 3	NM_000201.2	rs139053442	Missense	Het	0.0013736263736263737	Deleterious (score: 0.05)	PROBABLY DAMAGING (score: 1)	14,16	Disease causing (p-value: 0.998)	4.11	ND	ND
P103	***IFIH1***	c.2131C>A	p.(Gln711Lys)	Exon 11	NM_022168.3	Unknown	Missense	Het	Unknown	Deleterious (score: 0.05)	BENIGN with a score of 0.126 (sensitivity: 0.93; specificity: 0.86)	24,1	Disease causing (p-value: 0.999)	5.36	ND	ND
P304 P20 P709	***IFNL3***	c.400C>T	p.(Arg134Trp)	Exon 3	NM_172139.3	rs139176035	Missense	Het	0.00024	Deleterious (score: 0.01)	BENIGN with a score of 0.271 (sensitivity: 0.91; specificity: 0.88)	10,79	Polymorphism (p-value: 1)	3.95	ND	ND
P47	***PRDM1***	c.946C>T	p.Leu316Phe	Exon 3	NM_182907.2	rs141465160	Missense	Het	0.001	Tolerated (0.06) vs 0.15 SureCall	Benign (0.008)	15,69	Disease causing	AA conservé jusque poisson zèbre (5.31)	ND	ND
P785	***PRDM1***	c.1061G>A	p.Ser354Asn	Exon 5	NM_001198.3	rs143040512	Missense	Het	0,009157509	T	B	22,1	D	ND	ND	ND
P212 P503	***SIGLEC10***	c.913C>A	p.Pro305Thr	Exon 5	NM_033130.4	rs7258951	Missense	Het	0,00993709	T	B	ND	N	ND	ND	ND
P463	***TLR7***	c.1343C>T	p.Ala448Val	Exon3	NM_016562.3	rs5743781	Missense	Het	0,00289899	T	B	11,42	N	ND	ND	ND
P267	***TYK2***	c.3310C>G	p.(Pro1104Ala)	Exon 23	NM_003331.4	rs34536443	Missense	Het	0,0102	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING (score: 1.000)			ND	ND	ND
P280	***TYK2***	c.3488A>G	p.Glu1163Gly	Exon 25	NM_003331.4	rs55886939	Missense	Het	9,16E-04	D	B	ND		5.35	**SCV000410277.2, same rs**	Familial Atypical Mycobacteriosis, Autosomal Recessive
P297	***TYK2***	c.2783C>T	p.(Ala928Val)	Exon 20	NM_003331.4	rs35018800	Missense	Het	0,002289377	Deleterious (score: 0.04)	PROBABLY DAMAGING (score: 1.000)	21,7	D	5.61	**SCV000340763.2, same rs**	likely benign
P354	***TYK2***	c.157G>A	p.Ala53Thr	Exon 3	NM_003331.4	rs55762744	Missense	Het	0,003663004	D	D	24	D	ND	**SCV000340763.2, same rs**	likely benign

Figure S1 (suite) :

Les IRFs sont induits par l'exposition aux interférons. ***IRF5 :*** IRF5 se situe en aval de la cascade d'activation de 2 TLRs majeurs du lupus (TLR7 et 9) et de nombreuses publications associent des polymorphismes d'IRF5 avec le lupus et/ou certaines manifestations au cours du lupus (Li et al., 2015; Ruiz-Larrañaga et al., 2016). ***IRF8*** est également associé au lupus dans des études épidémiologiques (Cunninghame Graham et al., 2011). Les patients atteints de mutations *IRF8* présentent un déficit immunitaire avec susceptibilité aux infections virales et aux mycobactéries.

MECP2 est un facteur de transcription qui se lie aux régions CpG méthylées. Le locus *MECP2/IRAK1* est associé avec le lupus dans les études de liaison génétiques. Les polymorphismes de ce gène sont associés à des modifications de transcription de nombreux gènes, dont ceux impliqués dans la signature interféron (*IFI6, IRF6, BST2*) dans les lymphocytes T de patients lupiques et dans les modèles murins (Koelsch et al., 2013).

NRAS, SOS1 : Les « Rasopathies » (syndrome de Noonan et apparentés) sont des anomalies du développement qui se traduisent par une activation de la voie RAS/MAPK. Certains patients atteints de ces pathologies développent des manifestations de type lupiques (Bader-Meunier et al., 2013).

PDHX ce gène a été impliqué dans des études de GWAS (Lessard et al., 2011) de lupus. Il code pour une protéine du complexe pyruvate déshydrogenase

UHRF1BP a été identifié dans des GWAS de lupus (Gateva et al., 2009).

WDFY4 ce gène a été identifié par les études de GWAS. Il code pour une protéine impliquée dans le développement lymphocytaire B. WDFY4 régule aussi l'autophagie et les souris KO pour ce gène présentent une glomérulonéphrite (Yuan et al., 2018).

Patient	Gène	cDNA	Protéine	Exon	Version gène	Variant	Type	Hom/Het	Fréquence (gnome_exomes)	Sift	Polyphen	Cadd	Mutation Taster	Conservation score	ClinVar	Conséquences ClinVar
P172	IRF5	c.112G>A	p.Gly38Arg	Exon 2	NM_001098629.2	rs548286958	Missense	Het	3,65744E-05T	T	B	21,7	N	ND	ND	ND
P350	IRF8	c.602C>T	p.(Ala201Val)	Exon 7	NM_002163.2	rs144424711	Missense	Het	0.00457875457875457 9	Deleterious (score: 0.02)	BENIGN with a score of 0.000 (sensitivity: 1.00; specificity: 0.00)	4,746	Disease causing (p-value: 0.976)	4.95	ND	ND
P181	ITGAM	c.3370A>C	p.(Thr1124Pro)	Exon 29	NM_000632.3	rs767195270	Missense	Hom	0,000178	Deleterious (score: 0.01)	POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.940 (sensitivity: 0.80; specificity: 0.94)	24,3	Disease causing (p-value: 0.957)	5.17	ND	ND
P518	LGASL3	c.137C>G	p.Pro46Arg	Exon 3	NM_002306.3	rs200440596	Missense	Het	0,000216511	D	D	16,1	D	ND	ND	ND
P709	MECP2	c.311C>T	p.Thr104Met	Exon 5 (X chromosome)	NM_001316337.1	rs61749714	Missense	HOM	0,000638	Tolerated (score 0.18)	Benign (0.008)	16,36	N	AA faiblement conservé sur 12 espèces (5.48)	RCV000169928.4, RCV000224787.1, RCV000458698.1, RCV000225683.1	(Conflicting interpretations of pathogenicity* -
P749 P188	NCF2	c.298C>T	p.Gln100*	Exon 3	NM_000433.3	rs119103276	Stop gained, nonsense	Het	O,0011	D,D,D,D,D	D,D,D	21,2	D	ND	RCV000002332.3	Pathogenic - Chronic granulomatous disease, autosomal recessive cytochrome b-positive, type 2
P47	NRAS	c.325G>C	p.Val109Leu	Exon 4	NM_002524.4	rs730880966	Missense	Het	N/A	Deleterious (0.0)	Possibly damaging (0.701)	25,3	Disease causing	AA très conservé jusqu'à levure de boulanger (5.44)	uncertain significance	not specified
P49 P354 P297 P162	PADI4	c.926A>G	p.Tyr309Cys	Exon 8	NM_012387.2	rs33981382	Missense	Het	0.006868131868131868	Deleterious (0.01)	Probably damaging (0.992)	16,48	Disease causing	AA très conservé jusqu'à tatou (4.97)	ND	ND
P162 P188 P350	PDHX	c.749C>T	p.Thr250Ile	Exon 6	NM_003477.2	rs146876119	Missense	Het	0,000706921	D,T	B	11,86	N	ND	ND	ND
P212 P350 P405	RNASEH2A	c.615T>A	p.Asp205Glu	6	NM_006397.2	rs62619782	Missense	Het	0,009157509	T	B	20,4	D	ND	ND	ND
P808	RNASEH2B	c.788C>G	p.Thr263Ser	Exon 10	NM_024570.3	rs183734174	Missense	Het	0,000457875	T	D	23	D	ND	SCV000339813.2, SCV000384597.2	Aicardi Gouttiere Syndrome, uncertain significance/ NM_024570.3(RNASEH2B):c.787A>G (p.Thr263Ala) other rs: rs150363383
P518	SOS1	c.1964C>T	p.Pro655Leu	Exon 12	NM_005633.3	rs56219475	Missense	Het	0.005952380952380952	Tolerated (0.33)	Benign (0.066)	22,3	Disease causing	ND	ND	ND
P172	TMEM173	c.929G>A	p.(Arg310His)	Exon 7	NM_198282.3	rs144683867	Missense	Het	0.000040	Deleterious (score: 0)	PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00)	20,16	5.5Disease causing (p-value: 1)	5,56	ND	ND
P911	TNIP1	c.919C>G	p.Gln307Glu	Exon 10	NM_001252386.1	rs750166669	Missense	Het	4,47424E-05	Deleterious (0) vs SureCall 0.08	Possibly damaging (0.912)	23,7	Disease causing	AA très conservé jusqu'à poisson zèbre (5.05)	ND	**ND**
P280	UHRF1BP1	c.455G>T	p.Gly152Val	Exon 5	NM_017754.3	rs35356162	Missense	Het	0,00338442	T,T	D	23,6	D	ND	ND	ND
P148 P181	WDFY4	c.4199C>T	p.Ser1400Leu	Exon 23	NM_020945.1	rs143976297	Missense	Het	0,000667063	D,D	T	14,13	D	ND	ND	ND

RESULTATS

PARTIE III : ACP1

ETUDE D'UN NOUVEAU GENE RESPONSABLE DE DEFICIT IMMUNITAIRE PRIMITIF AVEC RUPTURE DE TOLERANCE : *ACP1*
A partir de l'analyse d'une famille atteinte de déficit immunitaire combiné et auto-immunité de transmission autosomique dominante

I. Objectif principal :

L'objectif principal de cette partie de ma thèse était d'identifier la cause du déficit immunitaire primitif au sein d'une famille présentant une transmission autosomique dominante (AD) de déficit immunitaire combiné (CID) avec auto-immunité.

Pour cela, nous avons dans un premier temps mené une analyse « en trio » par séquençage (NGS) complet de l'exome de trois individus (deux malades et un individu non malade) de la famille. Une analyse préalable sur un panel de gènes identifiés dans les déficits immunitaires, n'avait pas révèlé de cause connue. Sous l'hypothèse autosomique dominante, nous avons pu identifier un nouveau gène candidat candidat (*ACP1*), muté par l'apparition d'un codon STOP dont la ségrégation a été vérifiée dans la famille par séquençage sanger (à l'exclusion d'autres gènes candidats potentiels). Cette mutation était unique dans les bases de données disponibles ainsi que dans deux grandes bases d'exomes de déficit immunitaire primitif.

La seconde partie de mon travail a consisté à valider l'implication d'ACP1 dans le phénotype de cette famille et en parallèle de décrire le rôle de cette protéine ubiquitaire dans le système immunitaire puisque sa fonction précise dans les lymphocytes n'est pas connue.

Cette partie de mon travail de thèse a ouvert des perspectives de recherche et se poursuit actuellement au laboratoire par l'étude de deux lignées cellulaires KO générées par technologie Crispr/Cas9: une lignée lymphocytaire B (Ramos) et une lignée T (Jurkat) (projet financé par le CEREDIH (Centre d'Etude et de Recherche sur les Déficits Immunitaires Héréditaires) en 2018, porteur de projet Dr Sophie Jung – MCUPH Dentaire).

II. Identification d'un nouveau gène responsable de DIP avec auto-immunité : *ACP1*

a. Description phénotypique et transmission génétique

La transmission génétique dans cette famille semble suivre un mode AD. Bien que l'individu I.1 n'ait pas été suivi dans notre service et soit décédé en 1982, l'histoire clinique rapportée par la famille (infections

itératives, dilatation des bronches, insuffisance respiratoire) et la cause du décès (sepsis à point de départ pulmonaire) sont évocateurs de DIP (**Figure 32**).

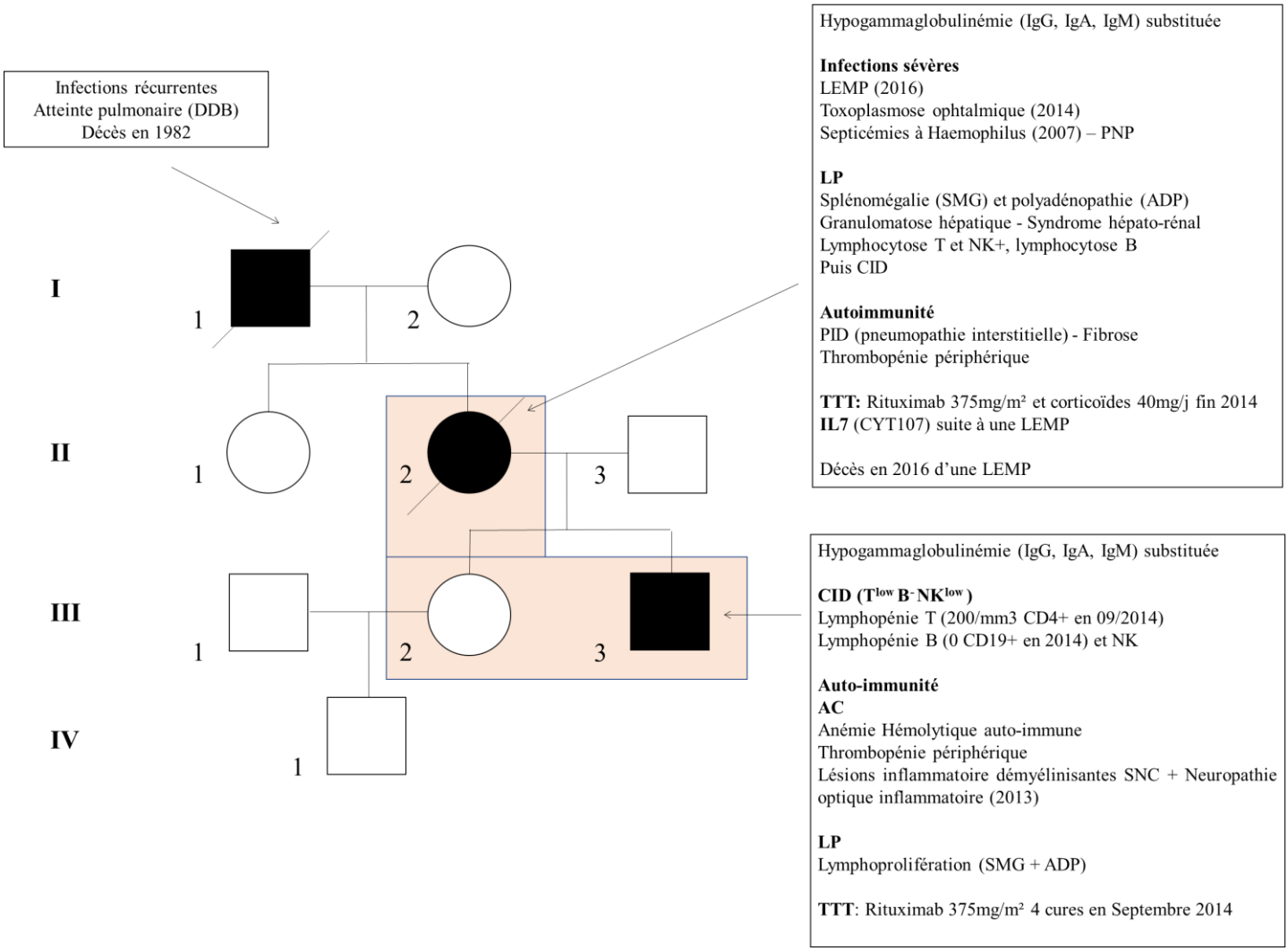


Figure 32 : arbre génétique de la famille et résumé des principales caractéristiques cliniques. Les individus en noir sont malades. Les individus en blanc sont sains. Les individus en surbrillance *saumon* sont ceux qui ont permis l'analyse en trio par WES.

- **Résumé de l'histoire clinique**

1. *Individu II.2* :

L'entrée dans la maladie chez cette patiente se fait à l'âge de 40 ans avec une suspiscion d'hémopathie lymphoïde devant l'existence d'une polyadénopathie, d'une splénomégalie (18cm) et d'une hépatomégalie (**Figure 33**). Elle présente des antécédents de psoriasis et des épisodes infectieux répétés (sinusites, bronchites, salpingite) depuis l'âge de 26 ans. La biopsie ostéo-médullaire alors réalisée retrouve une moelle riche et une plage d'infiltration lymphoïde monomorphe suspecte de lymphome. Une splénectomie diagnostique est alors réalisée ainsi qu'une biopsie hépatique. Les résultats histopathologiques concluent à une granulomatose systémique avec hépatite granulomateuse et

localisation splénique (granulomes épithélioïdes et gigantocellulaires non nécrosants). Par la suite, la patiente ne présente pas de complications jusqu'en 2006 où elle est réhospitalisée à plusieurs reprises pour des épisodes infectieux sévères : adénite cervicale gauche supurée (2006), otite supurée (2007), pneumopathie franche lobaire aiguë (2007), septicémie à *Haemophilus*. Elle présente alors une hypogammaglobulinémie profonde à 1g/L (IgG : 1,0g/L ; IgA <0,28g/L ; IgM<0,48g/L). La NFS montre une lymphocytose à 5800/mm3 alors rattachée à la splénectomie. Il existe aussi un syndrome inflammatoire biologique persistant et une thrombopénie périphérique modérée (100 à 120 G/L) Un lavage broncho-alvéolaire réalisé en 2007 après l'épisode de pneumopathie révèle par ailleurs une alvéolite lymphocytaire avec un rapport CD4/CD8 augmenté compatible avec une infiltration granulomateuse (sarcoïdose-*like*).

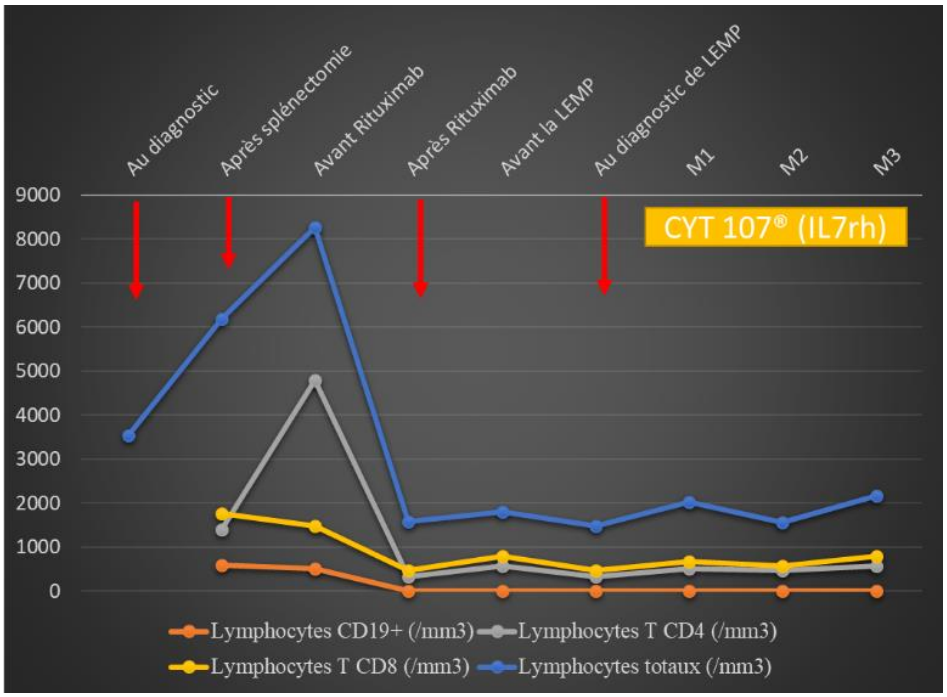


Figure 33 : Histogramme résumant l'évolution de la numération lymphocytaire (totale, T CD4 et CD8 et B CD19) au cours du temps et en fonction des thérapeutiques reçues chez la patiente II.2.

L'immunophénotypage montre une lymphocytose globale (T/B/NK) post-splénectomie. La patiente est alors substituée par immunoglobulines polyvalentes (IgIV) et traitée par antibioprophylaxie (Bactrim®). Par la suite, l'évolution sera péjorative sur le plan pulmonaire, avec une progression de l'atteinte interstitielle lymphoïde (**Figure 34 A et B**). Une corticothérapie au long court (jusqu'à 40mg/j) sera prescrite et en 2014, un traitement par Rituximab (anti-CD20) est administré pour la pneumopathie lymphoïde sans efficacité, notamment sur l'épargne cortisonique. A cette période, les immunophénotypages successifs montrent une diminution drastique du taux de lymphocytes circulants (**Figure 33**). En 2016, la patiente présente des épisodes de confusion fébrile, des troubles mnésiques et un syndrome frontal rapidement évolutifs sur quelques semaines pour lesquels elle est hospitalisée. L'IRM cérébrale puis la ponction lombaire confirment le diagnostic de leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) à virus JC (**Figure 35**). Malgré un traitement compassionnel par cidofovir et interleukine 7 recombinante (IL7rh / CYT107®), la patiente décèdera quelques semaines plus tard.

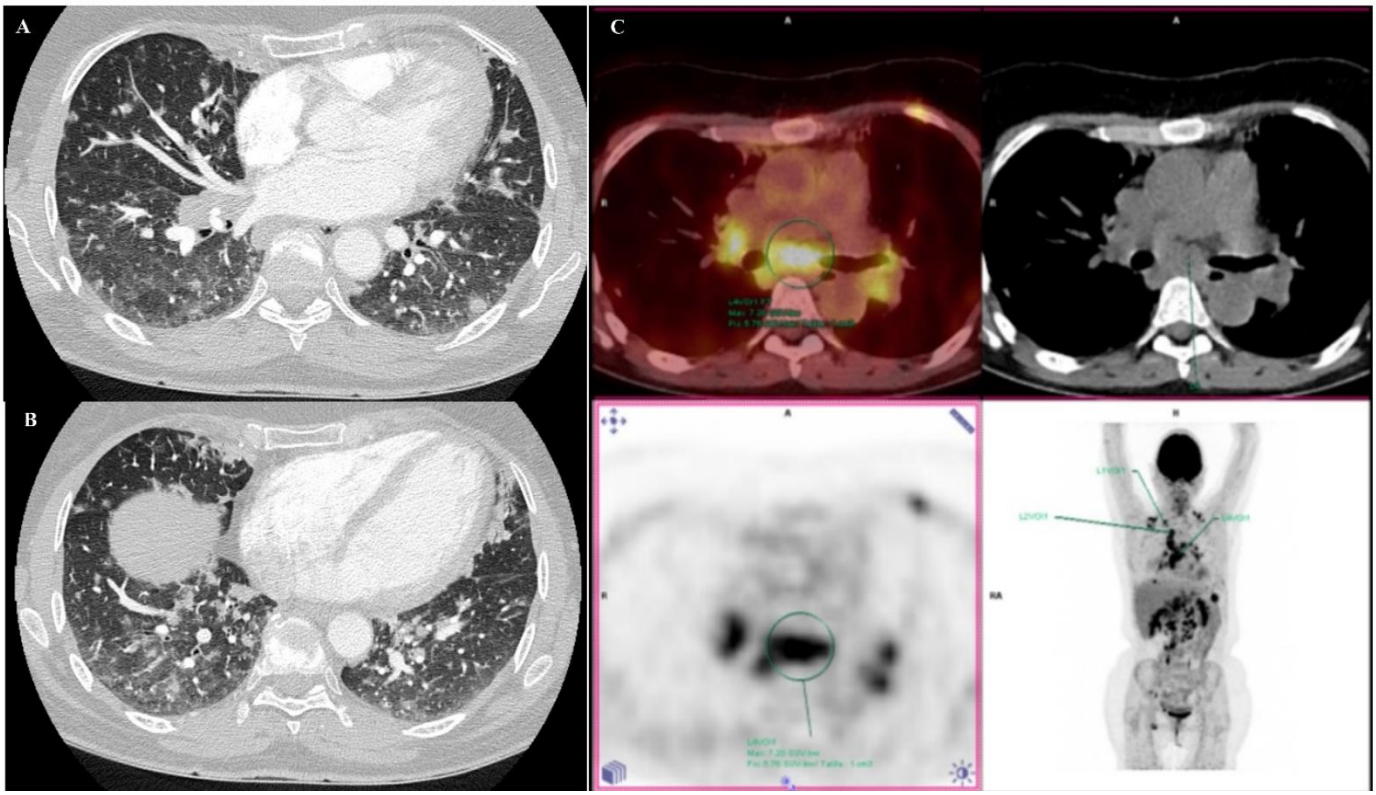


Figure 34 : examens d'imagerie chez la patiente II.2. A et B : TDM thoracique en coupes axiales montrant une pneumopathie interstitielle et fibrosante. C. TEP-TDP montrant un hypermétabolisme ganglionnaire diffus.

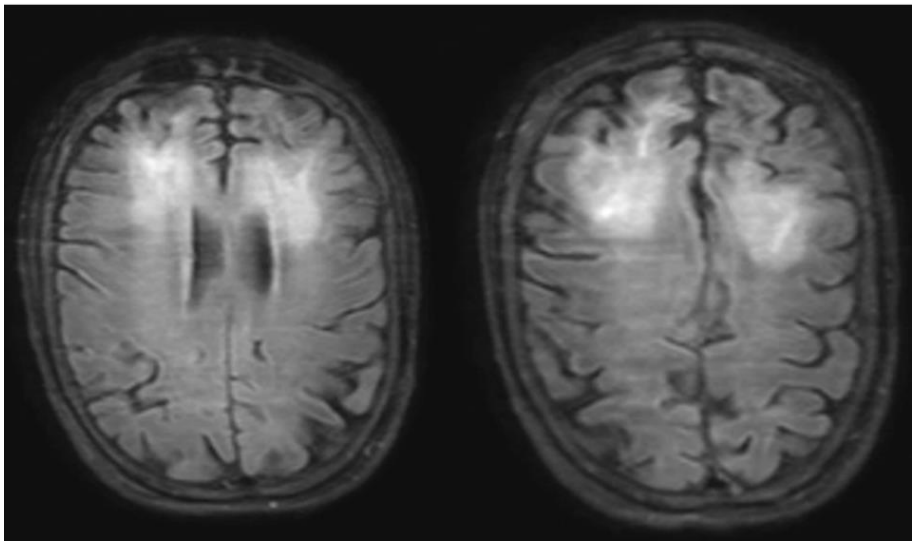


Figure 35 : IRM cérébrale réalisée chez la patiente II.2 montrant une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP). Coupe axiale FLAIR.

2. Individu III.3 :

L'entrée dans la maladie se fait en 2013, à l'age de 33 ans par des manifestations neuro-inflammatoires. Le patient III.3 présente des antécédents d'adénopathies cervicales biopsiés (anatomopathologie non disponible) et un épisode de pneumopathie peu de temps avant. Au décours, une baisse d'acuité visuelle brutale de l'œil gauche avec bilatéralisation en quelques jours l'amène à être hospitalisé en neurologie (acuité visuelle à 3/10 et 4/10 à droite et à gauche).

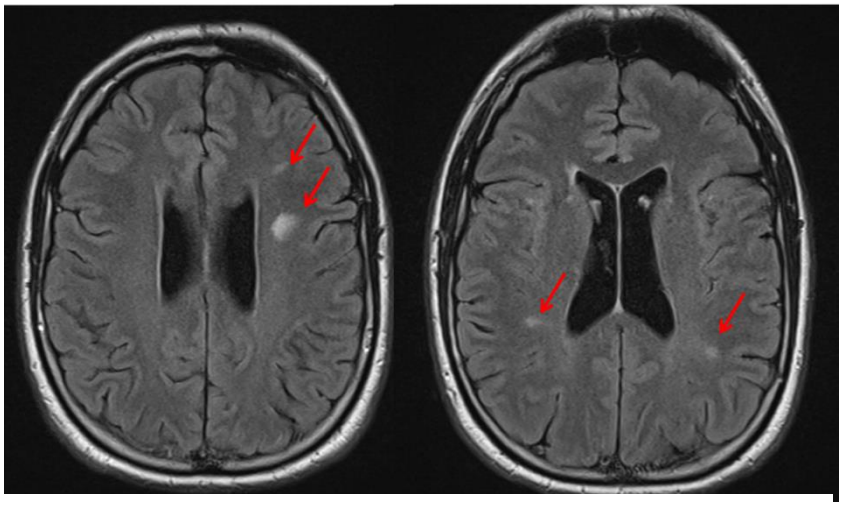


Figure 36 : IRM cérébrale du patient III.3. Coupes axiales, séquence FLAIR. Les flèches rouges indiquent les zones inflammatoires d'atteinte de la substance blanche.

Le bilan révèle une neuropathie optique démyélinisante (NORB). L'IRM cérébrale retrouve de multiples lésions de la substance blanche (**Figure 36**) compatibles avec une maladie démyélinisante mais ces lésions, qui ne prennent pas le contraste après injection, ne permettent pas à elles seules d'affirmer le diagnostic de sclérose en plaque. Dans le sens d'une maladie inflammatoire démyélinisante, la ponction lombaire montre une synthèse intrathécale d'immunoglobulines. L'évolution est favorable après bolus de corticoïdes et aucun traitement de fond n'est entrepris (simple surveillance clinique et IRM). Par la suite, en 2014, il est hospitalisé pour une anémie hémolytique auto-immune (AHAI) à anticorps chauds IgG+/C3d+. Le bilan de cette AHAI montre une hypogammagloulinémie sévère à 2,3g/L (en réalité déjà présente en 2013, mais non prise en compte) et une lymphopénie sévère d'emblée à 475/mm3 (216 CD4/mm3 ; 179 CD8/mm3 ; 10 CD19/mm3). Une thrombopénie modérée (120 G/L), périphérique (moelle riche) est également constatée. Les sérologies virales (VIH, VHB, VHC) et le bilan secondaire de déficit immunitaire est négatif. Le scanner thoraco-abdomino-pelvien révèle une splénomégalie et des adénopathies juxta-centimétriques multiples. Le patient est alors traité par corticoïdes (bolus) puis Rituximab (4 cures de 375mg/m2) permettant de sevrer rapidement les corticoïdes. Il est mis sous immunoglobulines polyvalentes (IgIV) et prophylaxies anti-infectieuses. L'évolution ne montrera pas de nouvel épisode neurologique central (un épisode de paresthésies non concluant en 2016 avec une IRM cérébrale et médulaire inchangées) et il ne présentera pas d'épisode infectieux majeur sur la période. La **Table 21** ci-dessous résume les principales caractéristiques cliniques et biologiques.

	PATIENT# II.2		PATIENT# III.2	PATIENT# I.1	VALEURS NORMALES
AGE (AU DIAGNOSTIC)	40		34	(diagnostic rétrospectif)	
PREMIERS SYMPTÔMES	26		34		
SEXE	F		H	H	
PHENOTYPE CLINIQUE					
INFECTIONS	ORL, SINUSITES BRONCHITES SEPTICEMIE (*Haemophilus spp*) ABCES CORNEEN (Toxoplasmose occulaire) LEMP		ORL ADENITE PNEUMOPATHIE	PNEUMONIE (DDB)	
LYMPHOPROLIFERATION	SMG/ADP LIP LLP GRANULOMES		SMG /ADP	ND	
AUTOIMMUNITE	PSORIASIS THROMBOPENIE		AHAI THROMBOPENIE NORB SEP-*like*	ND	
AGE DE DECES	61		-		
CAUSE DU DECES	LEMP		-	SEPTICEMIE	
GB* (*10^6/L)	12250		4540		
GR* (G/DL)	14,3		14.4		
NEUTROPHILES* (*10^6/L)	5810		2,770		
PLAQUETTES* (*10^6/L)	360,000		127,000		
LYMPHOCYTES* (*10^6/L)	5420		860		1,600 – 4000
IMMUNOPHENOTYPAGE STANDARD (VOIR FIGURE 5)	Après splénectomie	Dernière année	Au diagnostic		
LYMPHOCYTES B (CD19+) (*10^6/L)	6197	0	30		200-400
LYMPHOCYTES T (CD3+) (*10^6/L)	3045	797	600		1,100 – 1,700
NATURAL KILLER (CD16+ CD56+) (*10^6/L)	1850	594	184		200 - 400
GAMMAGLOBULINES (G/L) ***(AVANT SUBSTITUTION)***	1,3		3.5		8-14 g/L
IGG	1,06		3.38		7.2 – 14.7
IGA	<0,28		<0.2		1.10 – 3.60
IGM	<0,17		0.17		0.48 – 3.10
RESPONSE VACCINALE					
ANTI-TOXINE TETANIQUE**	ND		+		
ANTI-PNEUMOCOCCIQUE** (POLYSACCHARIDES)	ND		-		
ANA (ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES)	No		No		
MYELOGRAMME	Infiltrat lymphoïde monomorphe suspect		Richesse normale Pas d'infiltrat lymphocytaire		
TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS ET IMMUNOMODULATEURS	Anti-CD20 (Rituximab) 375mg/m^2*4 Corticoïdes IgIV CYT107(IL7Rh)		Anti-CD20 (Rituximab) 375mg/m^2*4 IgIV Corticoïdes		

Table 21: **Résumé des caractéristiques Cliniques et biologiques des patients.** F: Féminin – M: Masculin*: Numération au diagnostic – DDB: Dilatation Des Bronches - -GR: Globules ROuges – GB: Globules blancs - LEMP: Leuco-Encephalopathie Multifocale Progressive (JC-Virus) – AHA : Anémie Hémolytique Auto-Immune NORB : Neuropathie Optique rétrobulbaire- SMG: Splenomegalie – ADP: adénomegalie – LIP : (Lung Interstitial Proliferation) lymphoprolifération Interstitielle – LLP : Liver Lymphoproliferation with hepatitis/portitits (lymphoproliferation hépatique) – ND: pas de données disponibles – **: (+) : titre protecteur; (-) : titre non protecteur – IgIV: immunoglobuline intraveineuses –

Les autres membres de la famille ne présentent pas de caractéristiques d'immunodépression ou d'auto-immunité à ce jour. Nous avons réalisé une NFS et une électrophorèse des protéines plasmatique en 2017 chez les individus II.1 et III.2 qui se sont révélées normales.

Remarques sur le phénotype et la transmission :

- Le schéma de transmission apparait autosomique dominant si l'on considère que l'individu I.I était atteint de la même maladie (cependant, il n'a pas pu être suivi et exploré dans notre centre).
- La maladie présente une hétérogénéité dans sa présentation clinique et immunophénotypique. Les manifestations auto-immunes sont plus marquées chez l'individu III.3 et il a présenté moins d'épisodes infectieux malgré une lymphopénie profonde d'emblée. La patiente II.2 présentait une lymphoprolifération clinique (splénomégalie, adénopathies, pneumopathie lymphoïde) moins prononcée à l'heure actuelle chez le patient III.3. De même, la patiente II.2 avait une lymphocytose B importante sanguine (post-splénectomie) qui a par la suite évolué vers une lymphopénie et une alymphocytose B persistante (après traitement par Rituximab).
- La sévérité des infections chez la patiente II.2 (Pneumopathies sévères, sépticémie à Haemophilus, LEMP à virus JC) peut être expliquée par la combinaison du DIP avec auto-immunité et l'adjonction de séquelles pulmonaires importantes (bronchectasie, fibrose) ; d'un passé thérapeutique lourd (corticoïdes, splenectomie, Rituximab).
- Le patient II.2 présente en plus des manifestations démyélinisantes (NORB, lésions de la substance blanche) qui sont des manifestations inflammatoires rares au cours des DIPs (<1% (Fischer et al., 2017)).

b. Données sur l'immunophénotypage lymphocytaire des patients II.2 et III.3:

- **Immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires** :

La **Figure 37** présente les caractéristiques immunophénotypiques des individus malades.

- De façon globale : le taux de lymphocytes totaux est drastiquement diminué chez le patient III.3 depuis le diagnostic. En revanche, la patiente II.2 présente une lymphocytose (**37A**).
- Concernant le compartiment des lymphocytes B : le patient III.3 présente une lymphopénie B sévère depuis le diagnostic. La patiente II.2 présentait initialement une lymphocytose (lymphocytaire T) post splénectomie, ce qui se rencontre habituellement dans ce genre de situations (Cameron et al., 2011). Les lymphocytes B ont ensuite été complètement indosables suite au traitement par Rituximab (**37B**). De façon générale, les lymphocytes B des patients (II.2 et III.3) sont particulièrement impactés dans

leur développement avec un effondrement des lymphocytes B mémoires switchés au profit des lymphocytes B naïfs (**C**). On note une expansion relative de cellules B immatures de phénotype transitionnel (sujet III.3) ou atypique $CD21^{low}CD38^{low}$ (sujet II.2) (**37D**). Ces anomalies sont associées à l'auto-immunité dans les cohortes de DIP (en particulier le DICV).

- Concernant <u>les lymphocytes T</u> : Les lymphocytes T naïfs sont particulièrement affectés par la maladie (**37B**) et les lymphocytes T régulateurs sont significativement diminués (**37E**), corroborant nos résultats et ceux d'autres sur les lymphocytes T régulateurs chez les patients atteints de DIP avec auto-immunitéc (Fevang et al., 2007). Parmi les lymphocytes T mémoires CD45RA-, une proportion importante est représentée par des lymphocytes cTFh. En particulier de sous-phénotype cTFh1. Ce résultat va aussi dans le sens des études sur les lymphocytes cTFh dans les déficits immunitaires avec auto-immunité (*voir Introduction et partie I des Résultats*) (**37F**).

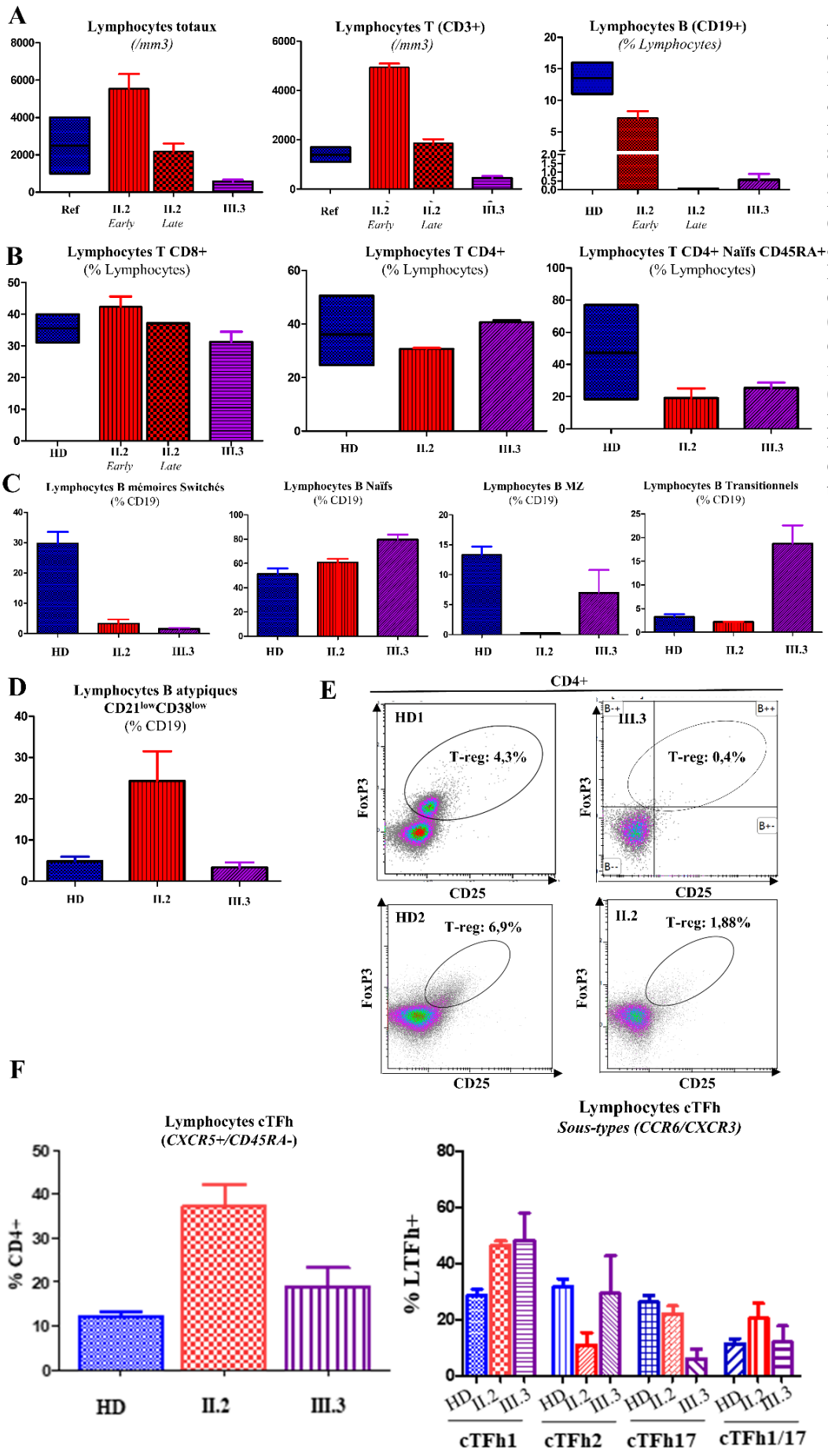


Figure 37 : Immuno-phénotypage des patients II.2 et III.3 Numération lymphocytaire réalisée au laboratoire comparée aux valeurs normales (A). Phénotypage des sous-population T CD8, CD4 et CD45RA (B), sous-typage lymphocytaire B (C) et B atypique $CD21^{low}CD38^{low}$ (D) comparées aux valeurs de 10 témoins au laboratoire de recherche. Résultats des lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25++FoxP3+) (patients comparés à un témoin à chaque fois) (E). Numération cTFh (CD4+CD45RA-CXCR5+) et sous populations cTFh sur la base du marquage CCR6/CXCR3 et comparé aux données de 10 témoins. HD : témoins.

- **Etude des marqueurs membranaires à la surface des lymphocytes T (NS et Stim) :**

  Nous avons observé que les lymphocytes T CD8+ du patient III.3 présentaient un phénotype sénéscent avec une expression augmentée de CD57 (**Figure 38**). L'expansion d'une population CD8+CD57+ est décrite au cours de plusieurs déficits immunitaires (Cura Daball et al., 2018; Heurtier et al., 2017; Lagresle-Peyrou et al., 2016). En particulier, cette population est associée avec les tableaux de lymphoprolifération avec splénomégalie et avec la présence d'une lymphopénie B plus profonde au cours du DICV et une granulomatose (Mullighan et al., 1997; Wright et al., 1990).

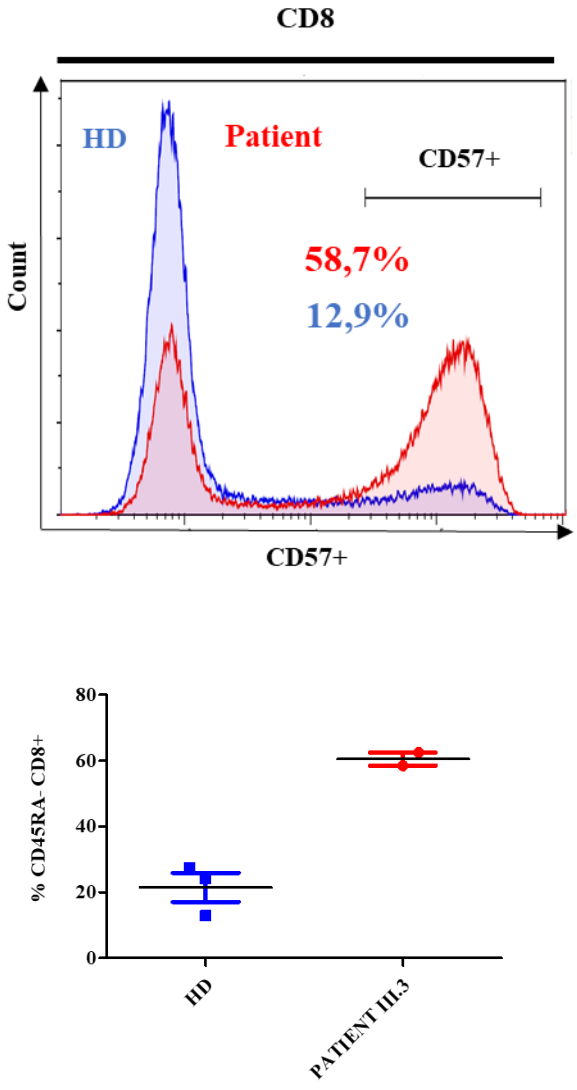


Figure 38 : expression de CD57 à la surface des lymphocytes T du patient III.3 (non stimulés). HD : témoin. L'experience est représentative de 2 expériences indépendantes avec 3 témoins différents. La même différence est observée après stimulation des lymphocytes (PMA Iono et PHA).

- Concernant les autres marqueurs étudiés : nos expériences ont été réalisé simultanément à d'autres experiences de stimulation pour une raison de disponibilité du materiel (prélèvement patient). Aux temps observés (T0 et H48) et dans les conditions de stimulation (PHA et PMA + Ionomycine), nous n'avons pas observé de différence à l'état basal pour CD69 sur les lymphocytes T CD4 triés du patient (**Figure 39**). A 48 heures, il n'y a pas non plus de différence pour les stimulations PHA et PMA Iono sur CD69. Nous n'avons pas vu non plus vu de différence sur l'expression de HLA-DR à 48h (eperience réalisée une seule fois).

  CD70, le ligand de CD27 a été rapporté comme marqueur de populations productrices d'IFNγ et d'IL17 au cours de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (Park et al., 2013). Ici, nous ne retrouvons pas de différence d'expression de CD70 à la surface des LT CD4 non stimulés et stimulés (à 48h).

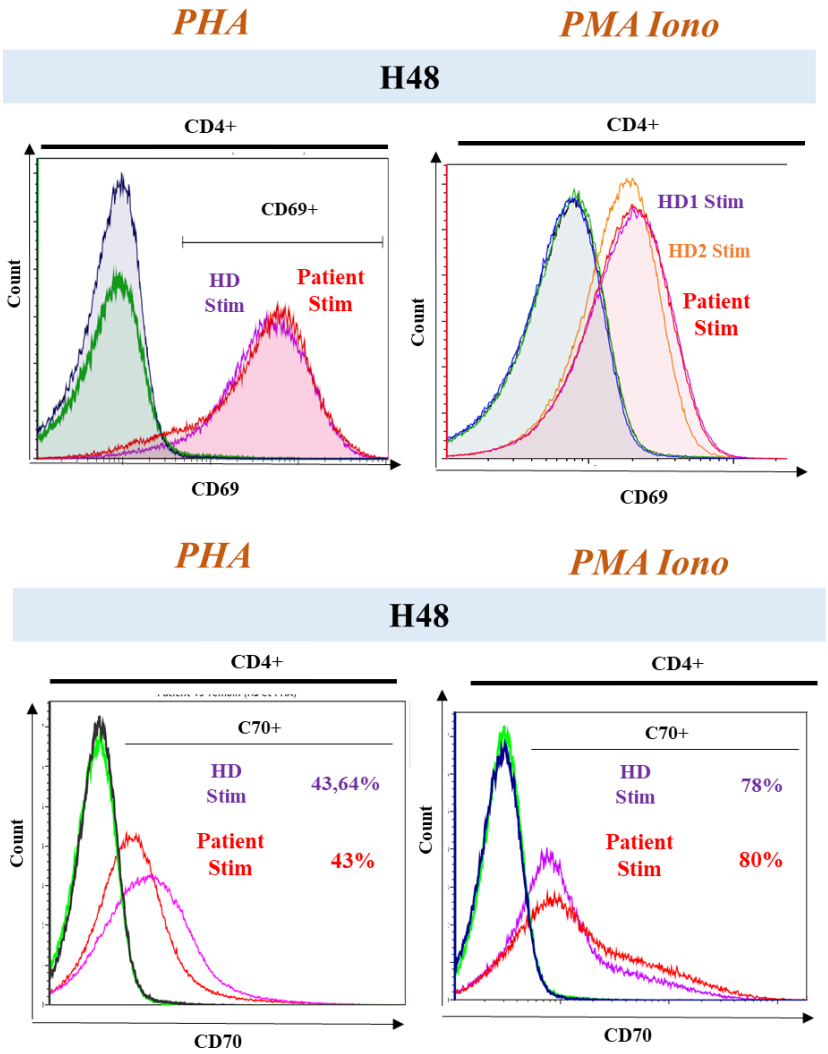


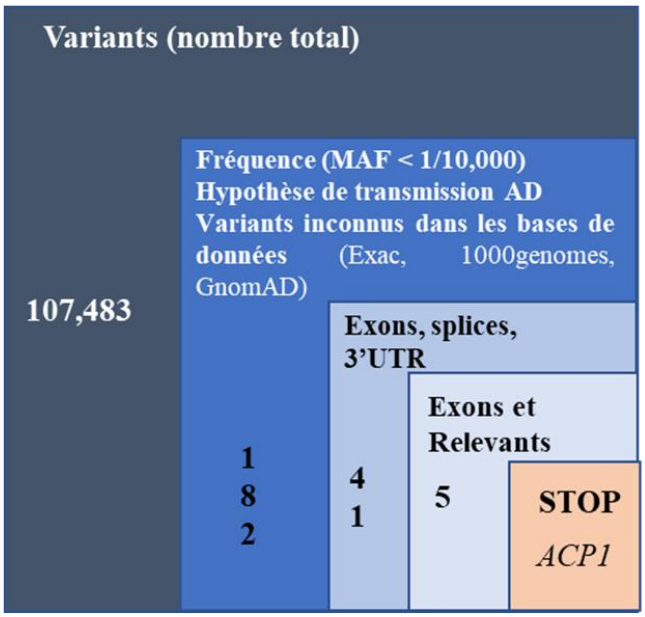
Figure 39 : expression membranaire de CD69 et CD70 à la surface des lymphocytes T CD4+ du patient III.3 (non stimulés et stimulés). HD : témoin. L'experience est représentative de 2 expériences indépendantes avec 2 témoins différents.

Pris ensemble, ces résultats montrent que les patients présentent un immunophénotype hétérogène avec néanmoins pour constantes : une lymphopénie T avec une augmentation relative de lymphocytes T mémoires (CD45RA-) liée à une déplétion en lymphocytes T naïfs, pro-inflammatoires (cTFh1) et sénescents (CD8+CD57+). Il existe un défaut de maturation lymphocytaire B avec une diminution des lymphocytes B mémoires switchés et un excès de cellules immatures (transitionnelles pour l'individu III.3) ou atypiques ($CD21^{low}$ $CD38^{low}$ pour l'individu II.2). Enfin, il existe une diminution importante des lymphocytes T régulateurs pour les 2 individus. **Ces anomalies concordent avec un phénotype de déficit immunitaire combiné avec manifestations auto-immunes.**

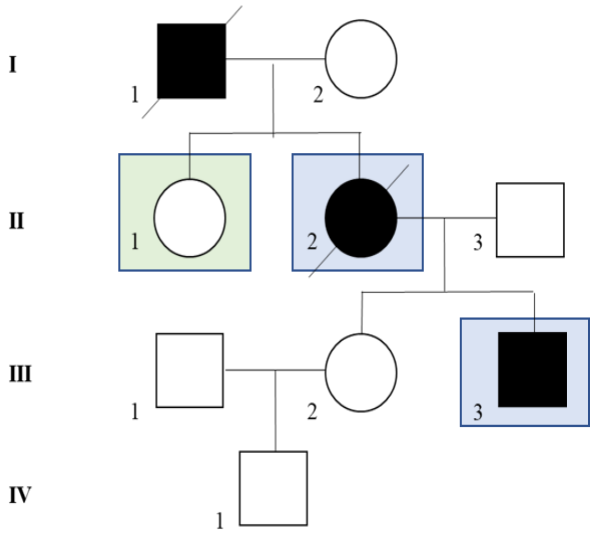
c. *Stratégie d'identification du gène responsable du phénotype*
Collaboration Pr H Dollfus, C.Stoetzlel, Inserm U1112, Strasbourg

La Figure 40 ci-dessous résume la stratégie d'identification de gène candidat. Nous avons réalisé une analyse de séquençage d'exome en trio (sujets surlignés en saumon dans **la Figure 32**) par NGS puis séquençage Sanger et ségrégation des variants dans la famille (sujets surlignés en vert et bleu dans la **Figure 40**). Sous l'hypothèse AD, nous avons identifié 182 variants potentiels avec le premier système de filtre. Ce chiffre a pu être ramené à 41 (liste donnée en **Annexe**) en ciblant les mutations strictement dans les régions codantes ou liées à des sites d'épissage ou régulatrices d'intérêt où lorsque la fonction de la protéine n'était pas connue avec une mutation forte sur le plan bio-informatique (**40A**). A ce stade, une étude bibliographique détaillée, nous a permis de ne retenir que 5 variants relevants sur le plan immunologique permettant une corrélation génotype phénotype (**40B**). Nous avons alors mis au point une PCR pour chacun des gènes candidats afin : 1) de vérifier la présence du variant dans le gène concerné par séquençage Sanger ; 2) d'éliminer éventuellement l'un ou l'autre de ces variants par une étude de ségrégation en utilisant un $4^{ème}$ sujet (II.1 sain, (40**C**)). Avec cette stratégie, nous avons pu éliminer 3 des 5 gènes (**40D et E**). La vérification du séquençage sur les séquences BAM (fichiers sources du séquençage d'exome) du variant retrouvé sur *KMT2B* nous a fait présumer d'un défaut de couverture et de séquençage de cette région liée à une forte répétition du motif nucléotidique AAG (répété plusieurs fois) (**Figure 41**).

A



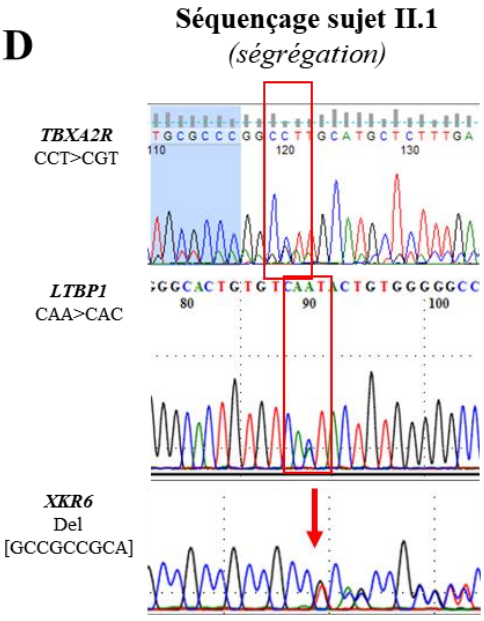
C



B

Gène	Génomique	Conséquence	Type de mutation	Commentaire
TBXA2R	hg19 chr19:g.[3594931G>C]	p.P376R	Missense	Thromboxane A2 receptor. Expression forte dans le thymus et la rate. Souris KO présente une lymphoprolifération.
LTBP1	hg19 chr2:g.[33500919A>C]	p.N974T	Missense	Mutation sur une protéine de liaison du TGF-b.
ACP1	hg19 chr2:g.[272094C>T]	p.R59*	codon STOP	Impliqué dans la phosphorylation d'un site régulateur de ZAP70 (pY292)
KMT2B	hg19 chr19:g[36211355_36211360delAAGAAG]	p.E372_E373del	Délétion	Epigénétique: méthylation de l'histone H4. Les LB déficients en KMT2B ont un défaut de switch (modèle murins).
XKR6	hg19 chr8:g.[11058726_11058734delGCCGCCGCA]	p.C39_G41del	Délétion	Protéine fortement exprimée dans les cellules T CD3+. Fonction inconnue.

D



E

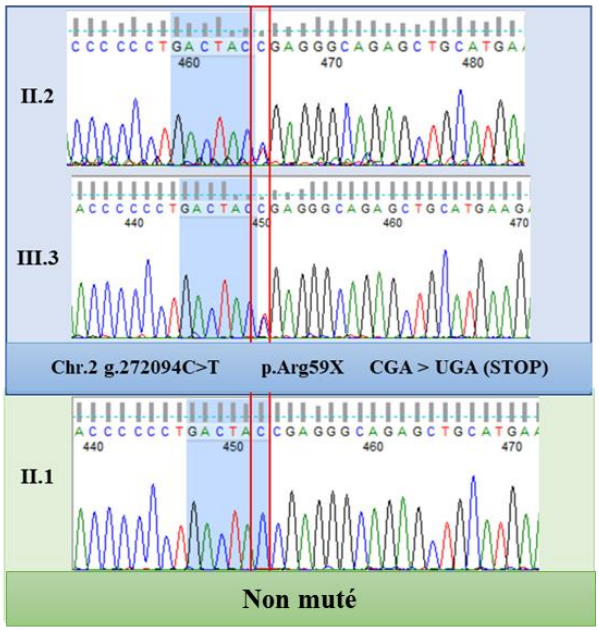


Figure 40 : Stratégie d'identification de gène par WES (A) et séquençage Sanger des variants d'intérêt (B-E). Les individus II.1 II.3 ont permis l'analyse de ségrégation des variants d'intérêts issus de l'analyse d'exome (A-C). Des PCR spécifiques des gènes candi été mises au point pour 3 gènes (D) et la mutation a été vérifiée sur le gène ACP1 retenu à l'issue de cete analyse (E).



	II.2	III.3
Profondeur de couverture de la région	Moyenne 1X Max 60x >30X 1%	Moyenne 18X Max 231x >30X 6%

Figure 41 : défaut de couverture de la région mutée de KMT2B initialement sélectionné dans les variants potentiels.

A l'issue, nous avons donc gardé le variant d'*ACP1* (substitution c.175G>T) comme unique variant candidat (**Figure 42**). Ce variant est inconnu dans les principales bases de données (GnomAD, 1000G, EXAC). Il est responsable de l'apparition d'un codon STOP dans l'une de ses 2 isoformes issue d'un épissage alternatif de l'exon 3 sur l'un de ses 2 allèles (**42A et B**). Cette mutation est prédite avec un CADD score de 21,1 (**42B**). L'acide aminé est particulièrement conservé entre les espèces (**42D**). *ACP1* existe sous deux formes enzymatiquement actives (ACP1 *Fast* et ACP1 *Slow*). Une autre forme codante est rapportée (isoforme C) mais n'a pas d'activité enzymatique (voir *Introduction partie III*)

A



B

ACP1 Fast	Génomique	cDNA	Protéine
Référence	ENST00000272065.9	c.175C>T	NP_04291
Localisation	Hg19 2:272094C>T		
	g.7955C>T	Exon 3F	p.Arg59*
CADD score	**21,1**		

C

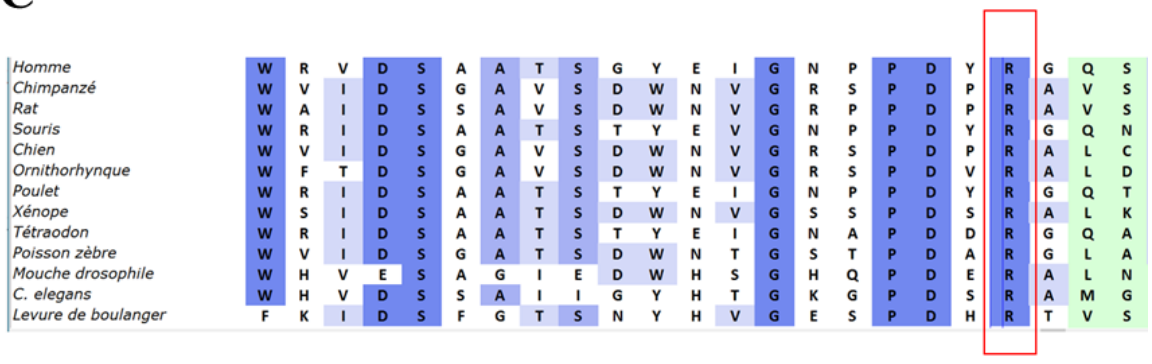


Figure 42 : *ACP1* est un gène qui possède 2 isoformes de 158 acides aminés issues d'un épissage alternatif de l'exon 3 et 3 bis. Organisation du gène ACP1 sur le chromosome 2 (A) ; description de la mutation retrouvée dans notre famille (B) ; conservation importante de la zone mutée inter-espèce (C).

En résumé, notre identification de gène candidat n'a pas retrouvé de mutation délétère sur un gène déja connu impliqué dans un DIP. Du fait du type de mutation retenue (un seul allèle sur une seule isoforme de la protéine), du mécanisme de fonctionnement des allèles et des génotypes d'ACP1 (détaillés dans l'introduction et dans le paragraphe **e.** ci-dessous), et du manque de données disponibles sur le

fonctionnement de la protéine en cause (ACP1) dans les cellules immunitaires ; il n'était pas facile d'envisager une stratégie de validation fonctionnelle simple de cette mutation.

Nous avons choisi comme point de lecture, la phosphorylation de ZAP70 sur le site Y292, décrite comme spécifique d'ACP1 dans les lymphocytes T (Bottini et al., 2002a).

d. Remarque sur les variations prédictibles de l'activité enzymatique de ACP1 en fonction du génotype

En préambule aux études fonctionnelles qui font appel à l'activité enzymatique de ACP1 sur ses substrats (en particulier ZAP70-pY292 étudié ici), nous souhaitons discuter du génotype porté par le patient. Celui-ci, déterminé selon la méthode publiée (Apelt et al., 2009) (**Table 21**) a montré que les différents individus de cette famille (en particulier celui que nous avons étudié en détail, le patient

	Ser44 (Rs11553742)	**Asp43 (Exon 3bis)**	**Arg105 (rs7576247)**	**Génotype**
II.1 (sain)	AGC/AGC	GAT/GAC	CCA/CGA	AB
II.2	AGC/AGC	GAT/GAC	CCA/CGA	AB
III.3	AGC/AGC	GAT/GAC	CCA/CGA	AB

Table 21 : Table déterminant le génotype prédictif de l'activité enzymatique d'ACP1 dans notre famille.

III.3) sont AB (ce qui représente la combinaison allélique la plus fréquente dans la population caucasienne), prédisant une activité enzymatique classique et « moyenne » de la phosphatase (**Table 22).**

	Fréquence de l'Allèle	**Génotype**	**Fréquence du Génotype**
A	35%	**AA**	12,25%
		AB	42%
B	60%	**BB**	36%
		CA	3,5%
C	5%	**BC**	6%
		CC	0,25%

Table 22 : table prédictive de l'activité enzymatique en fonction du génotype et fréquence de chaque génotype dans la population caucasienne (*d'après Alpet et al. 2009*). L'activité enzymatique prédite est matérialisée par les couleurs (de la moins active (bleu) à la plus active (orange)).

Pour cette raison et pour des raisons réglementaires liées à l'accessibilité des témoins et au consentement particulier qui auraient été nécessaires pour séquençer *ACP1* chez les témoins, nous n'avons pas déterminé le génotype chez les témoins. Cependant, ceux-ci sont tous caucasiens, appariés sur l'âge et sur le sexe. Notre mutation prédisant une perte de fonction au moins

partielle de la protéine, seuls les cas de figures ou tous les témoins seraient de génotype AA (activité enzymatique la plus faible) pourraient potentiellement empêcher nos analyses. Ceci représente un risque inférieur à 0,35*0,35 de 12,25 par témoin, multiplié par le nombre de témoins utilisés (au moins 5 différents pour la manip pY292-ZAP par exemple) soit un risque de 0,0027%. Dans le cas où l'activité enzymatique de nos témoins serait supérieure à celle du patient, les résultats seraient majorés et la différence constatée plus importante. Cependant, cela ne devrait pas avoir d'incidence sur la quantité de protéine qui doit rester comparable.

III. Validation fonctionnelle du rôle de *ACP1* dans le phénotype de la famille

a. Etude de l'ARNm d'ACP1 et des transcrits des voies d'activation lymphocytaire T:

Pour vérifier la conséquence de la mutation STOP sur la transcription d'*ACP1*, nous avons mis au point une PCR quantitative des isoformes *Fast* et *Slow* de la protéine (*Méthodes*). En effet, il n'existait pas de sondes de qPCR isoformes spécifiques disponibles dans le commerce **Figure 43**).

Plusieurs hypothèses étaient à vérifier :

1. La modification éventuelle du taux de transcrit lié à la mutation d'un des deux allèles *Fast*.
2. La présence de la mutation au niveau des transcrits du gène (pour voir si l'allèle muté est transcrit ou non).
3. L'existence d'un phénomène de compensation de la transcription de l'isoforme *Slow* ;
4. La comparabilité des résultats de qPCR entre les témoins.
5. L'effet éventuel des modifications de transcription d'*ACP1* sur d'autres gènes impliqués dans les voies d'activation lymphocytaires T.

Nos résultats sur ces différents points, montrent que dans les lymphocytes T CD4 :

- Les transcrits *Fast* et *Slow* ne sont pas quantitativement modifiés en qPCR Sybrgreen (43**A**). Par ailleurs, la qPCR Taqman (sondes reconnaissant les exons 1-2 ou 5-6) de *ACP1* confirment l'absence de modification sensible de la transcription d'ACP1 chez le patient (**43C**).
- Le transcrit *Fast* est bien muté (à l'état hétérozygote) lorsque l'on séquence l'ADNc du patient (**43C**).
- Il n'y a pas de conséquence de cette mutation sur la quantité de transcrit des gènes suivants : *ZAP, LAT, NFKB , PLCγ, AKT, ERK, CBL* dont les protéines correspondantes sont supposées interagir directement ou indirectement avec ACP1 dans les lymphocytes T. (**12C**, figure de gauche). Nous

avons répliqué ce résultat en SybrGreen pour *ZAP*, *LAT et LCK* (**43C**, figure de droite). Cependant, la significativité de ces résultats reste modeste, et c'est l'une des raisons pour lesquelles nous les avons complétés par l'étude en RNAseq.

- Nous n'avons pas observé de différences majeures de l'activité transcriptionnelle chez les témoins à l'exception d'un (point le plus en haut des qPCR). Ce témoin présente une activité transcriptionnelle augmentée de l'ordre de 2 fois par rapport aux autres (à la fois pour la forme *Fast* et *Slow*).

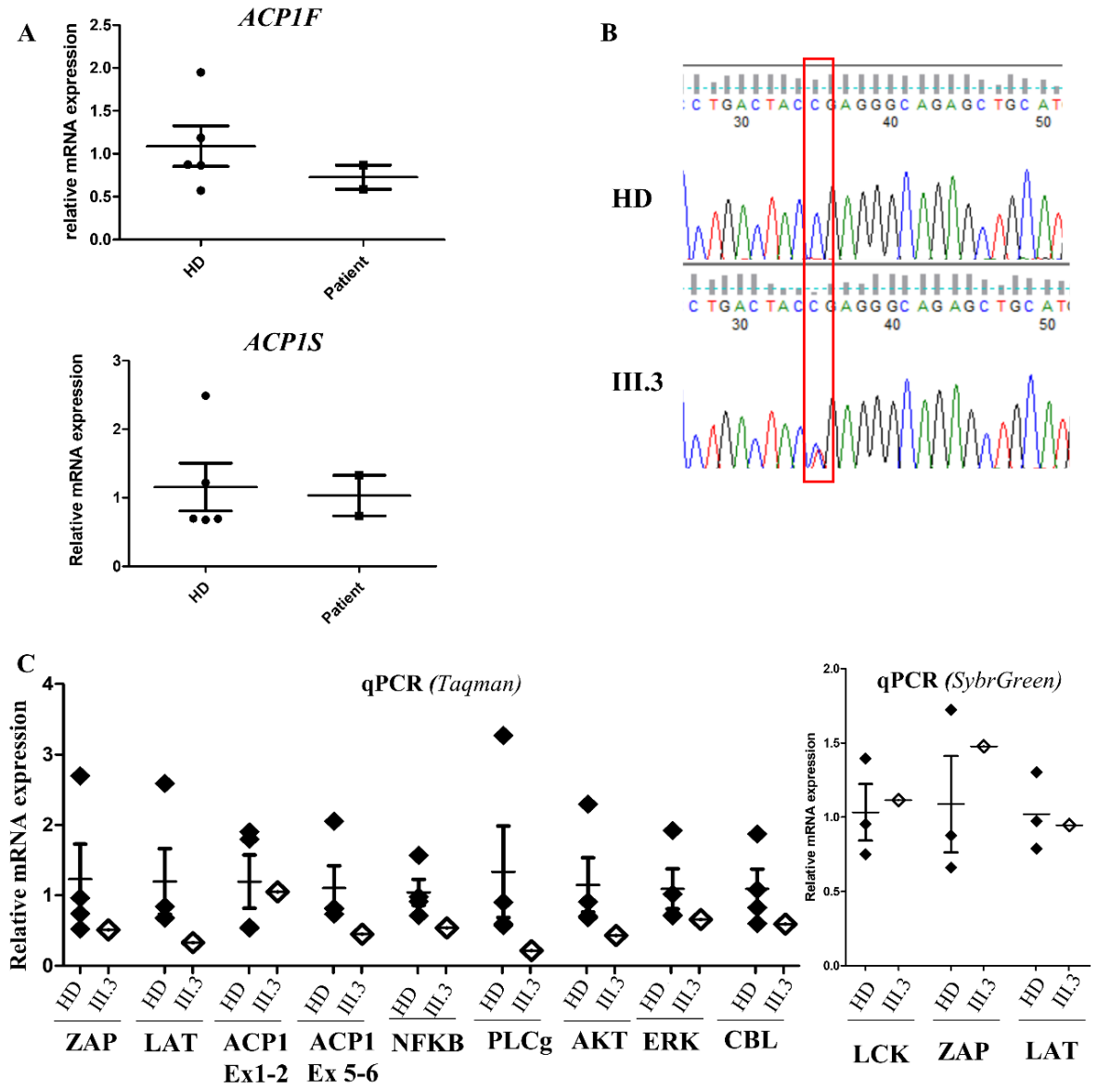


Figure 43 : analyses des transcrits d'*ACP1 (A-C)* et de gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire T (C) en qPCR SybrGreen (A et C gauche) ou Taqman (C droite).

b. Etude de la traduction de la protéine :

Nous avons voulu par la suite étudier les conséquences de la mutation STOP d'*ACP1* sur la protéine. Il n'existe pas, à notre connaissance d'anticorps isoforme spécifique d'ACP1. Pour ces experiences d'immunotransfert protéique par Western Blot (WB), nos hypothèses étaient les suivantes : 1. La quantité totale de protéine peut-être diminuée chez notre patient du fait de la mutation d'ACP1 ; 2. La quantité totale de la protéine n'est peut-être pas diminuée mais il existe une double bande d'ACP1 total en WB traduisant l'existence d'une protéine tronquée ; 3. La quantité d'ACP1 totale n'est peut être pas diminuée car il existe un phénomène de régulation de la dégradation protéique pour maintenir sa fonction.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons donc utilisé un anticorps reconnaissant la forme totale de la protéine (**Figure 44**). Celui-ci nous a permis de conclure à une diminution de la quantité protéique dans les lymphocytes T (**44A**), lymphocytes B (**44B**) et fibroblastes (**44C**).

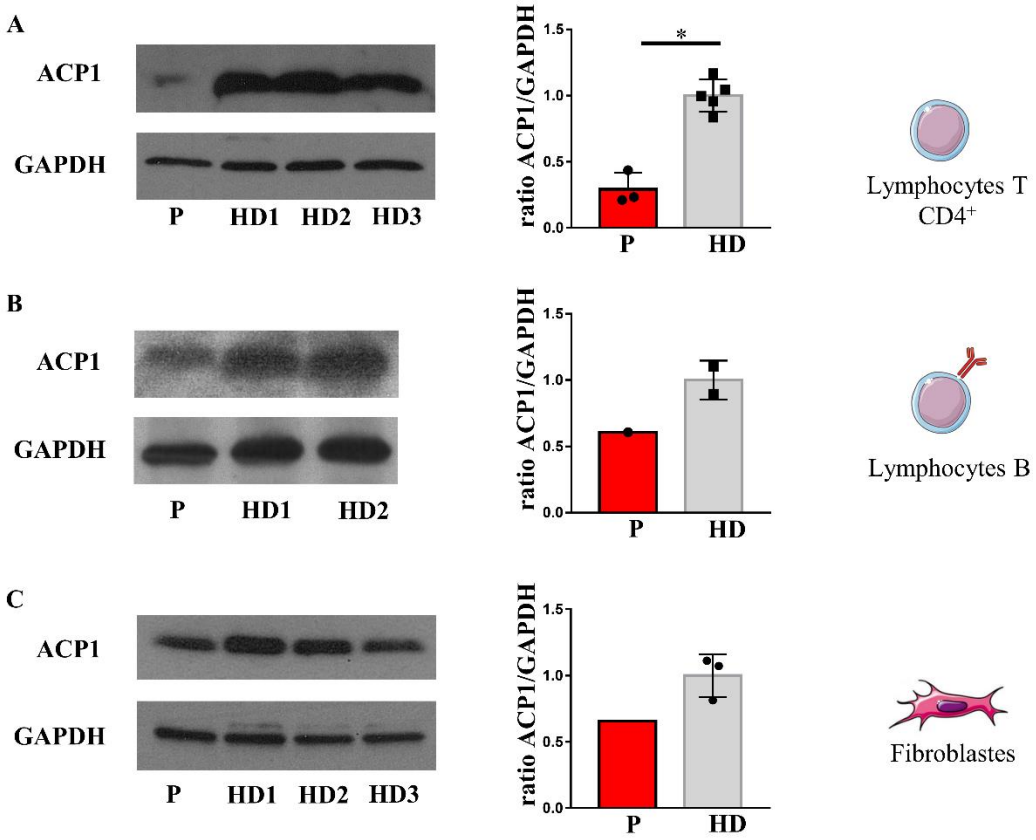


Figure 44 : Western Blot (WB) d'ACP1. Représentation (à gauche) et quantification (à droite) par immunotransfert d'ACP1 chez le patient III.3 et des témoins dans les lysats cellulaires de lymphocytes T CD4+ (A), de lymphocytes B (B) et de fibroblastes (C). La quantification pour les lymphocytes T CD4+ résulte de 3 expériences indépendantes. *p<0.05. P : patient III.3 . HD : témoin.

Ce résultat a aussi été vu en cytométrie avec un anticorps (même clone), couplé à l'Alexafluor 647 (AF647) (**Figure 45**).

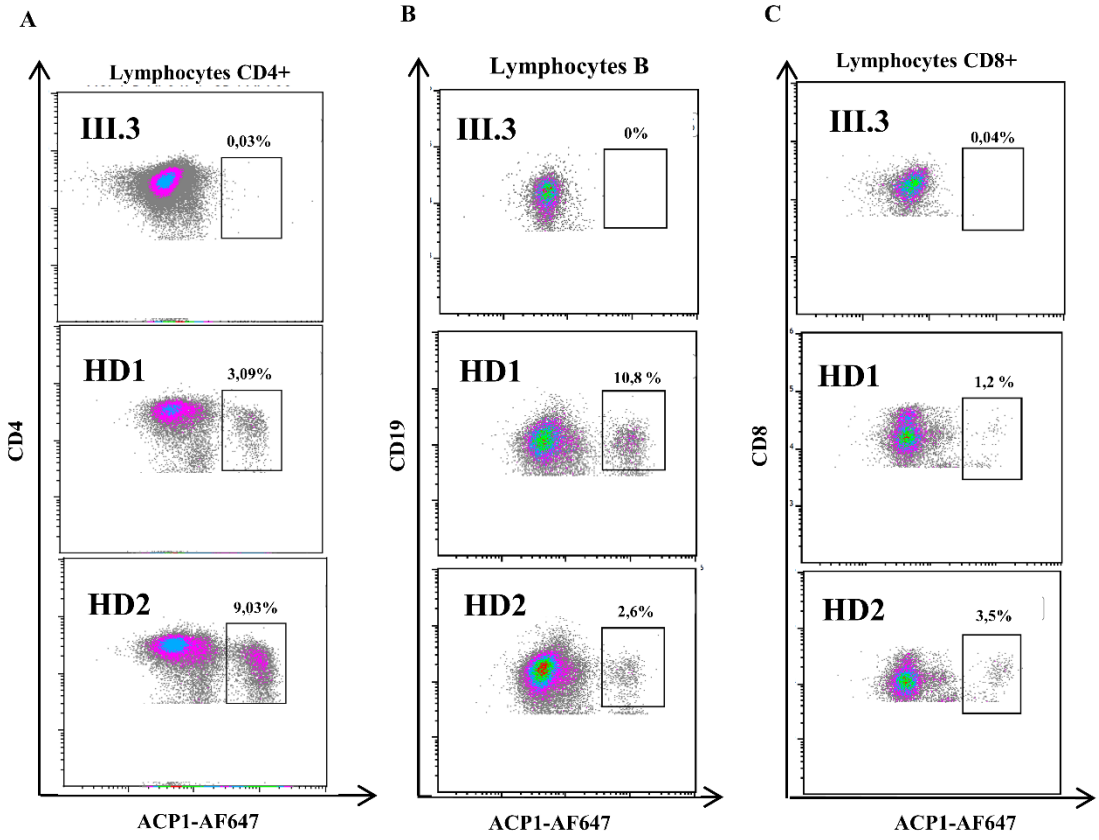


Figure 45 : Cytométrie de flux du marquage ACP1. Marquage intracellulaire dans les lymphocytes T CD4 (A), lymphocytes B (B) et T CD8 (C) d'ACP1.

c. *La baisse de production d'ACP1 est associée à des modifications de la phosphorylation de ZAP70 sur le site spécifique d'ACP1 (Y292) :*

Constatant la diminution de la protéine ACP1 dans les lymphocytes du patient, nous avons cherché à savoir si cette baisse quantitative était responsable de modification fonctionnelle sur une des cibles de déphosphorylation connue d'ACP1 : le site de phosphorylation Y292 de ZAP70.

A l'état basal (non stimulé), nous avons observé chez le patient une hyperphosphorylation de pY292-ZAP70 dans ses lymphocytes T CD3+ et CD4+ (**Figure 46A).** De façon physiologique, lors de l'activation du TCR, ACP1 permet la déphosphorylation de ZAP70-Y292 (**46B**). Chez notre patient (III.3), les différents stimuli utilisés montrent une hyperphosphorylation du site pY292 à tous les temps de stimulation (15 minutes à 72 heures) (**46C**). Cependant, il existe un écart plus important pour la stimulation TCR dépendante (anti-CD3 anti-CD28) par rapport à des stimuli aspécifiques (PHA, PMA+Ionomycine). En revanche, le même effet semblait être observé avec le mitogène Pokeweed (**46C**).

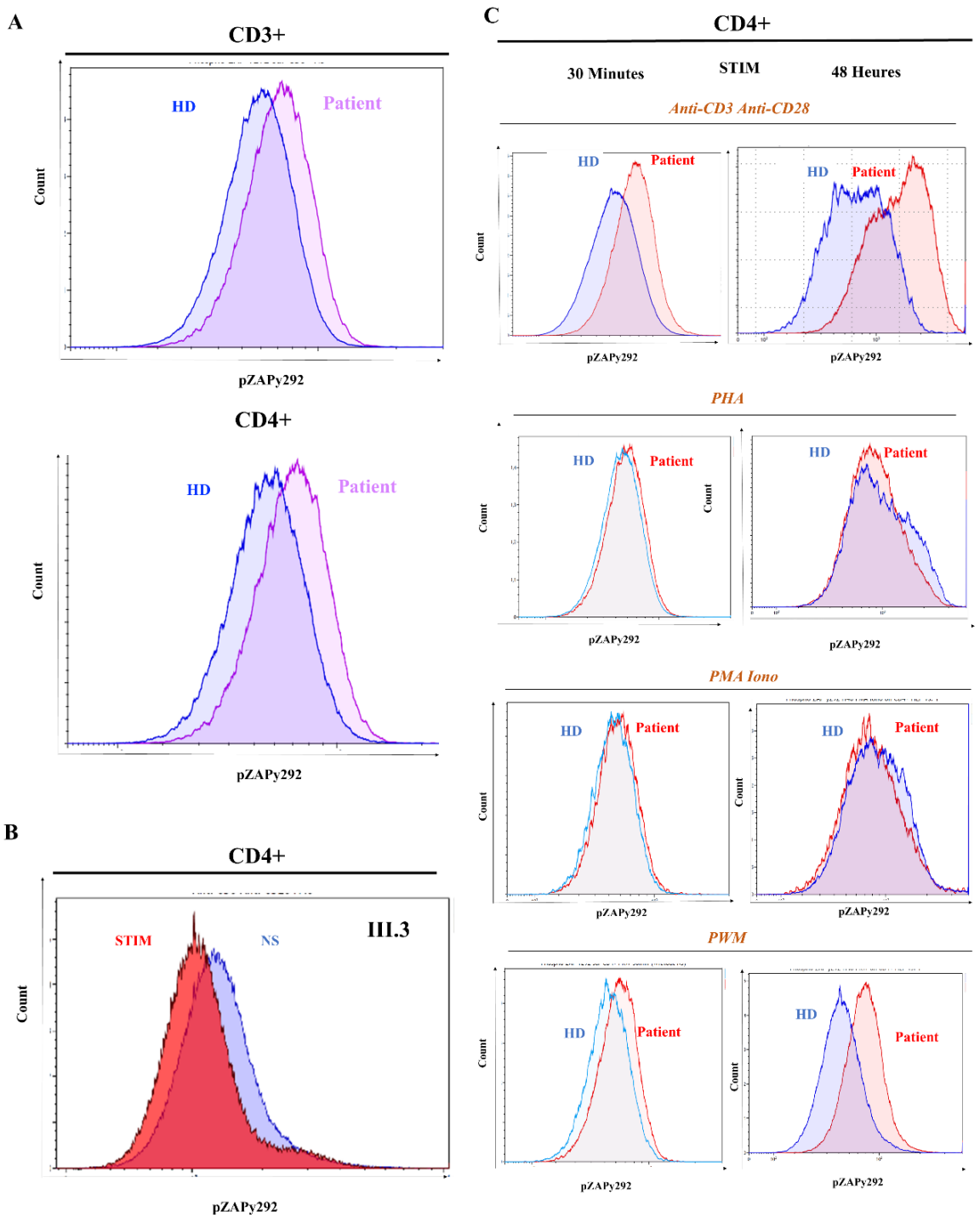


Figure 46 : phosphorylation du site pY292 de ZAP70 à l'état basal et sous stimulations dans les lymphocytes T. phosphorylation basale de pY292-ZAP70 chez le patient III.2 et les témoins (n=5) (A); évolution normale de la phosphorylation de pY292-ZAP70 sous stimulation à 48 heures (B) ; évolution de la phosphorylation du site Y292-ZAP70 dans les lymphocytes T CD4 à 30 minutes et 48 heures sous différentes conditions de stimulation (TCR-dépendante ou TCR-indépendantes) (C). HD : témoins – Patient : sujet III.3. *Les graphiques de cytométries sont l'illustration d'au moins 3 expériences indépendantes avec 5 témoins différents.*

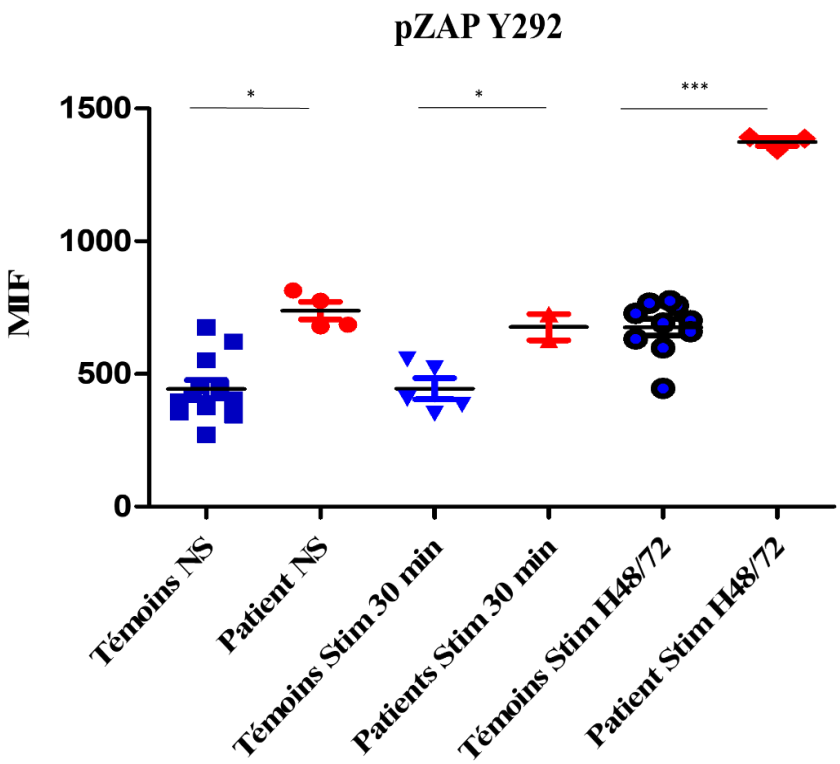


Figure 47 : stimulation TCR dépendante révèlant une hyperphosphorylation du site pY292 de ZAP70. L'hyperphorylation du site Y292-ZAPP70 est représentée en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) en cytométrie de flux. Le stimulus utilisé est TCR-dépendant (aCD3aCD28) à 30 minutes et 48 heures. HD : témoins – Patient : sujet III.3. **P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001*.

L'hyperphosphorylation de pY292 est constitutionnelle dans les lymphocytes T de notre patient. Ceci traduit un rôle d'ACP1 avant l'activation du TCR comme gardien d'un état déphosphorylé du site Y292. Cependant, l'hyperphosphorylation était particulièrement marquée à 48 heures lors d'une stimulation TCR dépendante par rapport à une stimulation courte (**Figure 47**). Ce résultat peut traduire un rôle chronologiquement retardé et régulé d'ACP1 sur le site pY292-ZAP, comme l'utilisation d'un pool non disponible immédiatement ou secondairement traduit de la protéine. **Dans cette hypothèse, ACP1 agirait à l'état basal comme régulateur constitutionnel de ZAP70 (avec un pool immédiatement disponible sous-membranaire) et secondairement comme un régulateur de l'activation prolongée du TCR via un pool secondairement recruté (autre compartiment cellulaire dans le cytoplasme) ou secondairement produit.**

C'est ce résultat notamment qui nous a poussé à étudier l'impact de la mutation d'ACP1 sur des temps prolongés d'activation (48 heures) par rapport à des temps plus courts.

d. Les modifications de la phosphorylation de ZAP70 ont des conséquences sur le signaling lymphocytaire T :

L'une des conséquences de l'activation du lymphocyte T par la voie du TCR est une activation de ERK. Nous avons donc étudié la phosphorylation de ERK en cytométrie de flux (Figure) et constatée une augmentation basale et sous stimulation TCR-dépendante de ERK1/2. Là encore, la différence était particulièrement marquée à 48 heures (**Figure 48**).

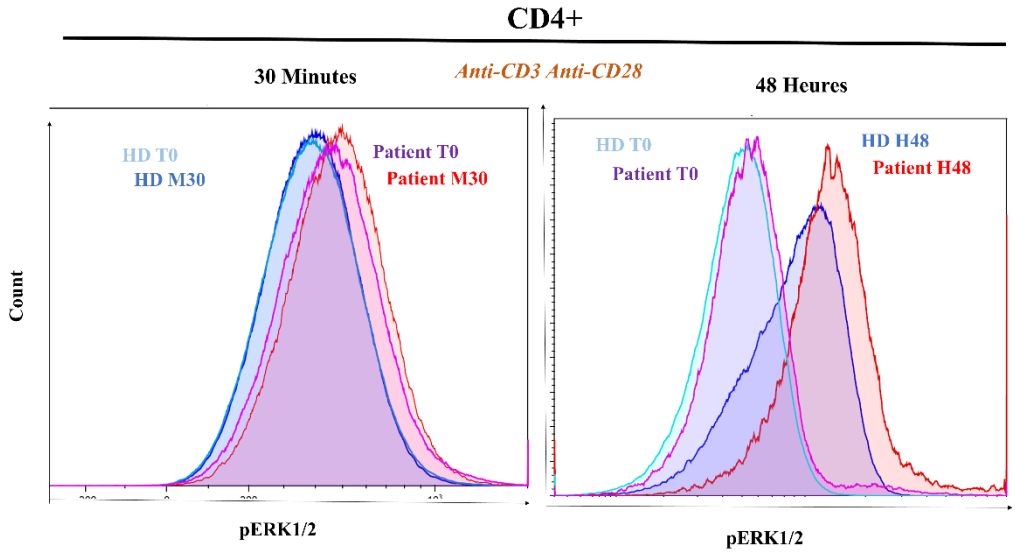


Figure 48 : stimulation TCR-dépendante des lymphocytes T CD4 révèlant une hyperphosphorylation de ERK1/2 dans les cellules du patient III.3.

A ce stade, nous souhaitons vérifier la phosphorylation de ZAP total, de NFKB et de ERK par des méthodes complémentaires (WB). Ces experiences sont en cours au laboratoire.

e. Modulation d'ACP1 dans les lymphocytes T primaires et conséquences fonctionnelles :

Pour étudier les conséquences d'une modification d'ACP1 dans les lymphocytes T, nous avons mis au point plusieurs expériences de sur- et sous-expression de la protéine dans les cellules primaires de témoins ou bien dans une lignée tumorale T (Jurkat) exprimant un récepteur T.

- **Sur-expression d'ACP1 :**

La première série d'experience a consisté à faire surexprimer la protéine ACP1F dans les lymphocytes T (**Figure 49**). Pour cela, nous avons utilisé un vecteur lentiviral sous la dépendance d'un promoteur pCMV et exprimant la GFP disponible dans le commerce (49**A**).

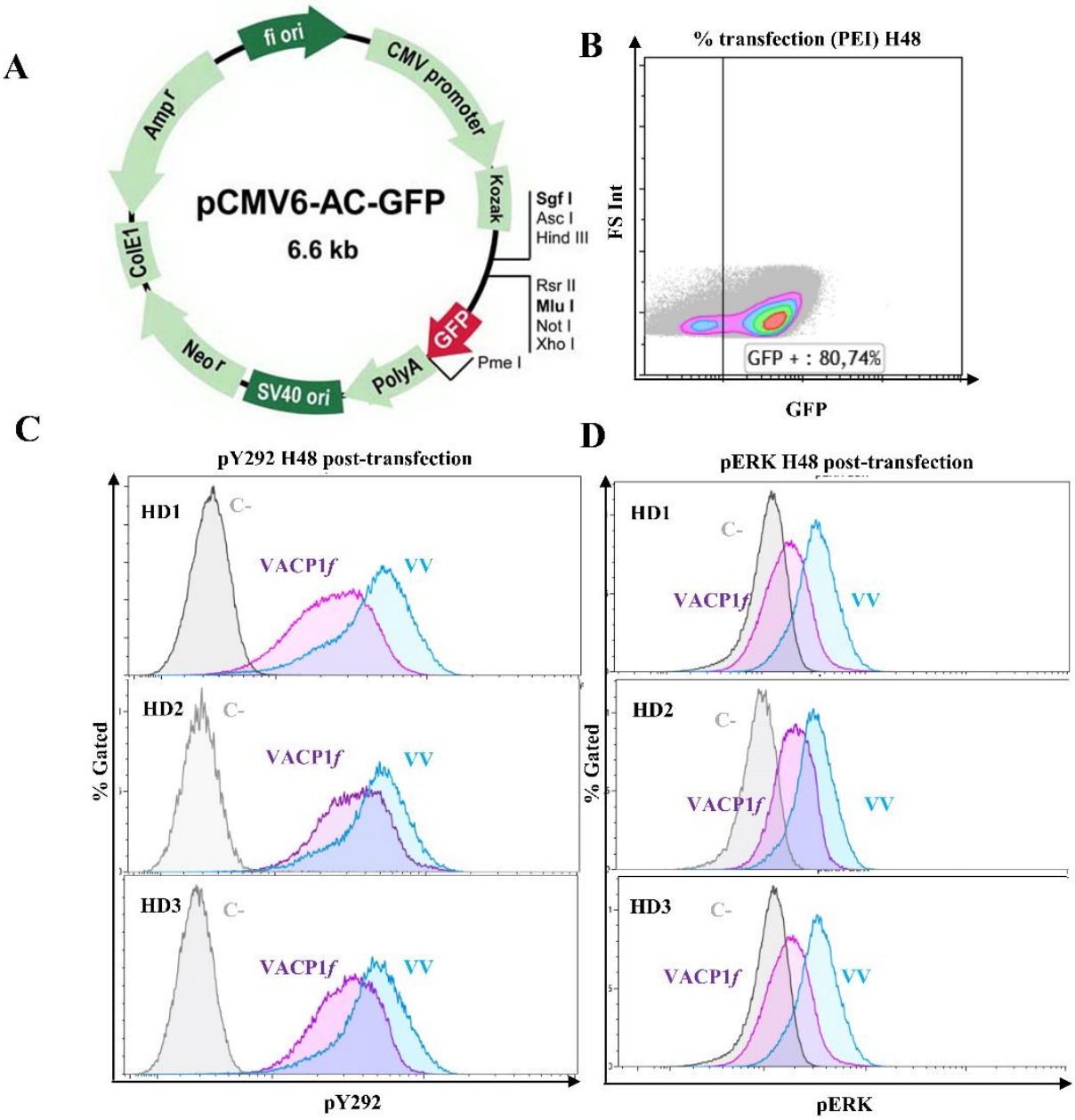


Figure 49 : utilisation d'un vecteur sur-exprimant ACP1F. Construction générale du vecteur fourni par le fabriquant (A). Taux de transfection à 48 heures dans les lymphocytes T transfectés avec le PEI (*polyethylenimine*) estimé par le taux de cellules GFP+ en cytométrie de flux (B). Phosphorylation du site pY292-ZAP70 dans les LT CD4 primaires de 3 témoins transfectés avec le vecteur ACP1F (VACP1*f*, violet), un vecteur vide (VV, en bleu) ou non transfecté (gris) (C) Phsophorylation de ERK à 48h dans les cellules transfectées de témoins (D). HD : témoin.

Ces expériences montrent que l'utilisation du vecteur *ACP1F* diminue la phosphorylation du site pY292-ZAP à 48 heures dans les cellules primaires T CD4 par rapport aux contrôles non transfectés ou transfectés avec un vecteur vide **(49A**). Cependant, l'utilisation en lui-même du vecteur était responsable d'une activation de la cellule et d'une hyperphosphorylation majeure des sites observés (pY292, pERK). Dans ces conditions, la phosphorylation de ERK (**49D**) était fortement augmentée par l'utilisation du vecteur vide et l'utilisation du vecteur ACP1F n'augmentait pas plus cette phosphorylation. Nous avons aussi essayé de stimuler les cellules par la voie du TCR (aCD3aCD28) pour réaliser ces expériences, mais l'activation liée à la transfection était trop forte et ne permettait pas de conclure sur l'état du site de phosphorylation de ERK.

Lorsque l'on observe les conséquences de cette transfection (**Figure 50**) en terme transcriptionnel, on note une élévation de 50 à 100 fois du taux de transcrit *Fast* dans les cellules primaires (**50A**) et dans les Jurkat (**50C**). Cet effet supra physiologique ne peut pas facilement être contrôlé in vitro. Dans ces conditions, la transfection provoque une augmentation spontanée de la prolifération lymphocytaire à 48 heures (**50B**) dans les cellules primaires non stimulées et stimulées. Cependant, l'utilisation d'un vecteur surexprimant ACP1F permet de réverser cet effet sur la prolifération et cet effet se maintient après stimulation TCR-dépendante (**50B**) dans les cellules primaires. Cet effet est aussi obervé dans les Jurkat à 48 heures (**50D**). Ces cellules prolifèrent spontanément, et cela n'apportait rien de les stimuler par la voie du TCR dans cette expérience. Par ailleurs, les transfections dans les Jurkat, montraient une mauvaise stabilité avec un phénomène d'échappement de la lignée lié à un probable avantage lymphoprolifératif des cellules n'ayant pas incorporé le vecteur avec pour conséquence la disparition rapide de cellules GFP+ en culture.

Nous n'avons pas poursuivi les expériences de sur-expression en raison de la fiabilité de l'extrapolation des résultats liés à ces différents points :

- Activation basale des cellules primaires lié à la transfection d'un vecteur vide ;
- Effet supra-physiologique de la sur-expression (>100 fois) d'une phosphatase (**Figure 50A et C et Figure 51A**) ;
- Echappement de la lignée Jurkat à la transfection ;
- Impossibilité d'utiliser cette stratégie pour tenter de réverser le phénotype observé chez le patient (**Figure 51B**).

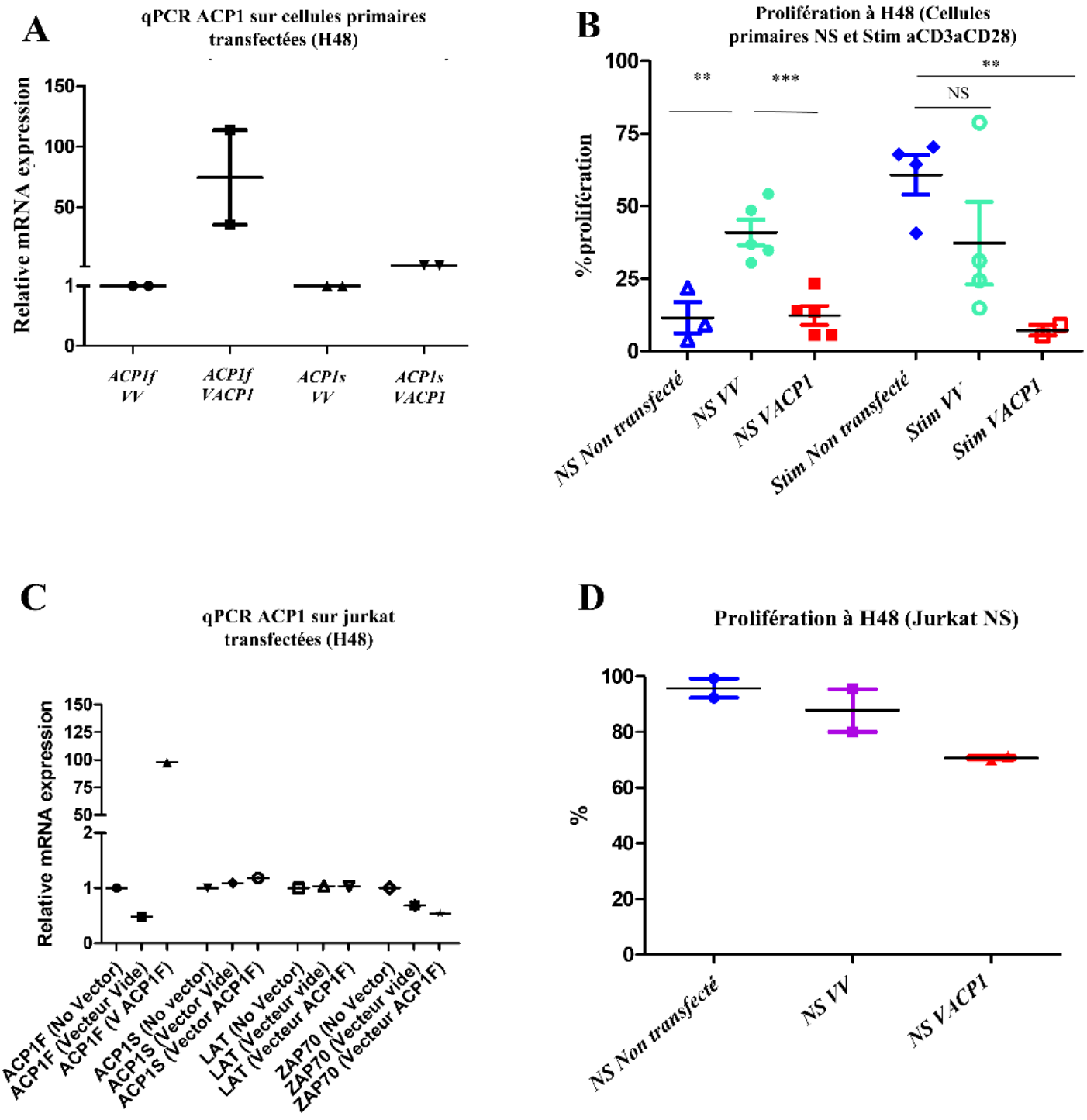


Figure 50 : augmentation du transcrit d'*ACP1F* dans les cellules transfectées et étude de la prolifération à H48. Augmentation relative du transcrit ACP1F (ACP1f) dans les cellules primaires transfectées par rapport au vecteur contrôle et par rapport à la forme *Slow* (ACP1s) (A). Conséquences sur la prolifération cellulaire des cellules primaires non stimulées et stimulées 48heures par la voie du TCR (aCD3aCD28) (B) ; augmentation relative du transcrit *Fast* dans les cellules Jurkat transféctées par rapport aux cellules non transfectées (No Vector) ou transfectées avec un vecteur vide (Vecteur Vide) et conséquence sur la transcription des gènes *LAT* et *ZAP70* (C). Conséquence sur la prolifération des cellules Jurkat (D).

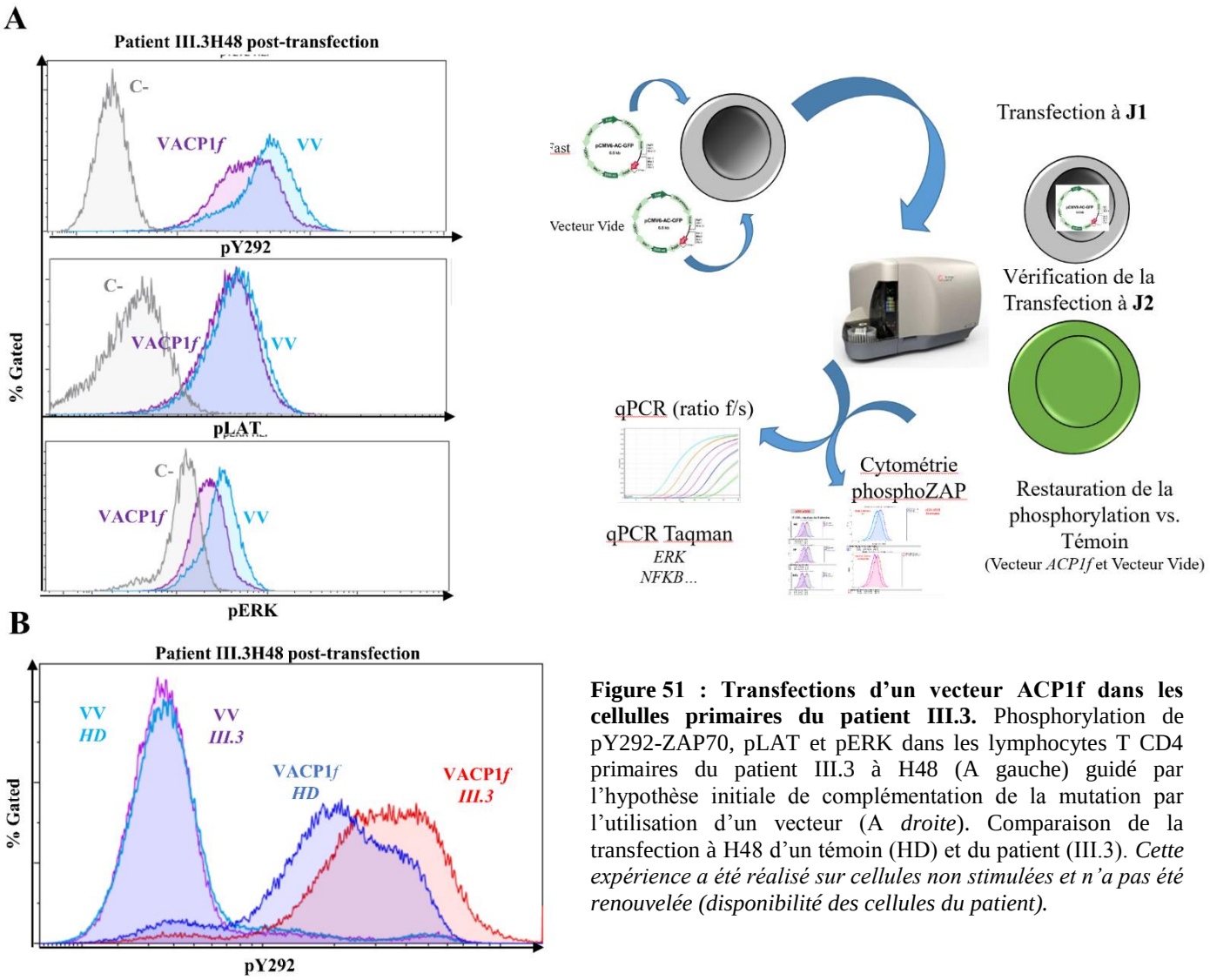


Figure 51 : Transfections d'un vecteur ACP1f dans les cellulles primaires du patient III.3. Phosphorylation de pY292-ZAP70, pLAT et pERK dans les lymphocytes T CD4 primaires du patient III.3 à H48 (A gauche) guidé par l'hypothèse initiale de complémentation de la mutation par l'utilisation d'un vecteur (A *droite*). Comparaison de la transfection à H48 d'un témoin (HD) et du patient (III.3). *Cette expérience a été réalisé sur cellules non stimulées et n'a pas été renouvelée (disponibilité des cellules du patient).*

- **Sous-expression d'ACP1 :**

Dans un second temps, nous avons essayé de reproduire les conséquences de la mutation du patient par une approche de répression de la transcription du gène ACP1 dans les cellules primaires. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie de siRNA du gène ACP1 total (siRNA de la forme *Fast* non disponible) (**Figure 52**). Cette approche est efficace pour diminuer l'expression du transcrit de ACP1 (*Fast* et *Slow*) dans les lymphocytes T et l'on obtient une baisse d'environ 50% des transcrits (**52D**) ainsi qu'une diminution de la quantité protéique (**52E**) ce qui semblait être une approche pertinente pour reproduire la mutation de notre famille (en dehors de la baisse concomittante de la forme *Slow*).

Nous avons mis au point un protocole de transfection avec plusieurs SiRNA d'ACP1 disponibles dans le commerce afin de constituer un pool qui permette de diminuer l'expression du transcrit (et de la protéine) sans pour autant l'abolir si possible.

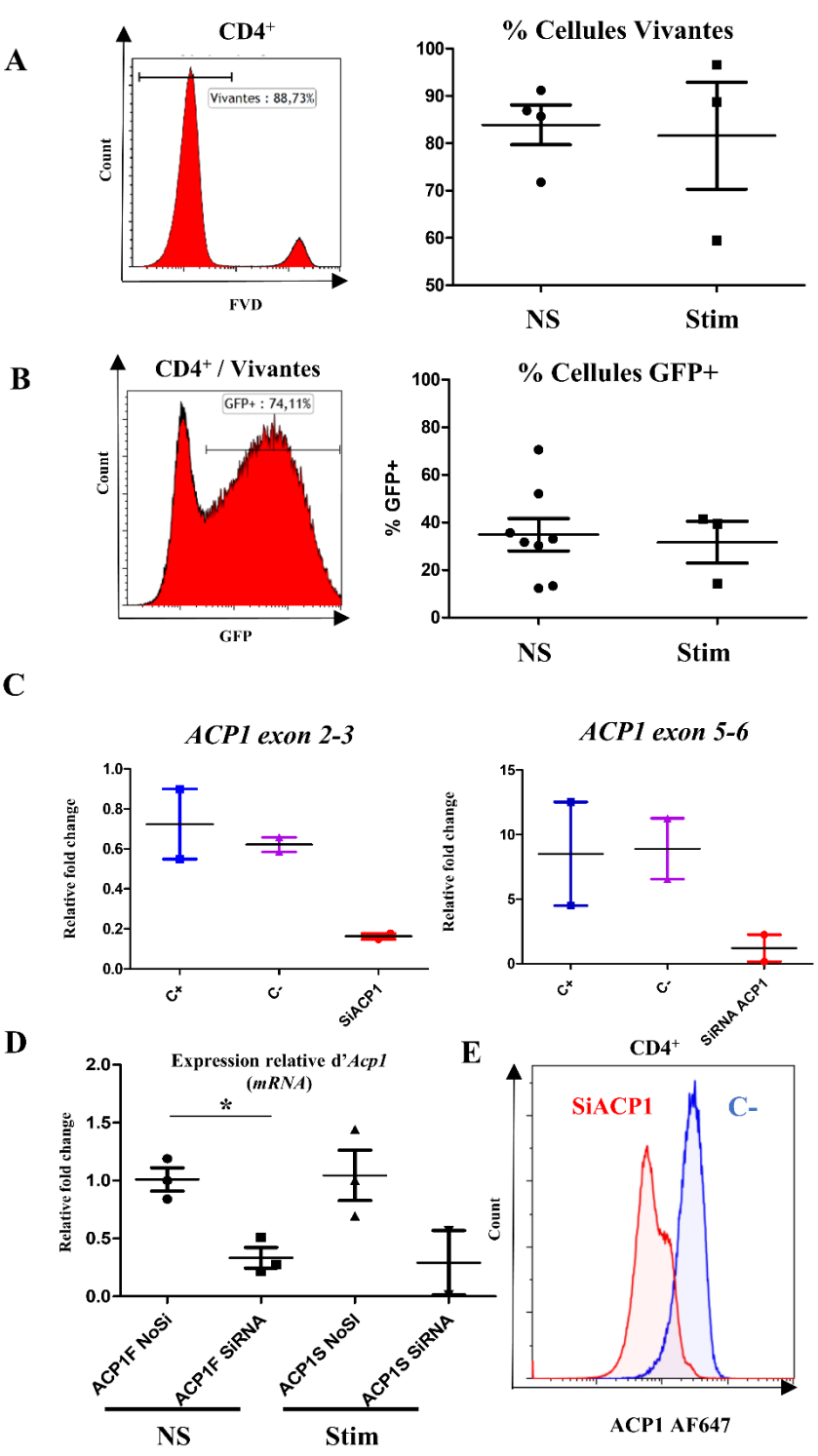


Figure 52 : sous-expression de ACP1 par siRNA dans les lymphocytes T CD4. Viabilité des cellules à 48 heures post-transfection (A) et pourcentage de cellules GFP+ (B) à 48 heures. Diminution du transcrit en qPCR sur cellules non transfectées (C+), transfecté avec un pool de SiRNA contrôle (C-) ou avec le Si ACP1 (SiACP1) (C). Diminution du transcrit sur cellules transfectées non stimulées et stimulées par anti-CD3 anti-CD28 (D). Diminution de la protéine ACP1 en cytométrie de flux après transfection (E).

C- : témoin transfecté avec un pool de SiRNA n'interférant pas avec *ACP1*.

SiACP1 : siRNA de ACP1 total (pool)

- Conséquence sur les phosphorylations en cytométrie de flux (**Figure 53**) :
  - Lorsque l'on observe les conséquences sur la phosphorylation, on note effectivement une augmentation de la phosphorylation basale et sous stimulation du site Y292-ZAP70 dans les cellules transfectées par rapport au contrôle (**A**).
  - L'effet sur la phosphorylation de LAT n'est pas directement mesurable par cytométrie de flux (**B**) y compris après stimulation TCR-dépendante.
  - Les conséquences sont mesurables sur la phosphorylation de ERK (augmenté à 48 heures de façon significative dans les cellules transfectées avec un siRNA ACP1), mais non encore statistique après 3 expériences dans les cellules stimulées. En particulier, concernant la stimulation, on note que la phosphorylation de ERK à 48 heures est moindre que lors des expériences de stimulation initiale sur les cellules primaires non transfectées (**Figure 48**). Le taux d'inhibition par le siRNA ou l'inhibition concommitante de la forme *Slow* qui est aussi diminué dans ce modèle, sont des hypothèses que l'on peut avancer.

- Conséquences sur l'expression des marqueurs membranaires en cytométrie de flux (**Figure 54**):
  - La plupart des expériences n'atteignent pas la significativité statistique mais montrent en tendance vers la surexpression de CD69 et CD57. Cependant, l'expression de CD57 sur les lymphocytes T CD4 (étudiés ici) est moins nette que sur les lymphocytes T CD8 du patient (**23C**) et la signification de l'expression de CD57 sur les lymphocytes T CD4 est moins bien connue. Il pourrait s'agir de lymphocytes T particuliers avec une faible capacité lymphoprolifération et un phénotype cytotoxique (*Alshekaili J et al. Scientific reports 2018*), ce qui reste à préciser dans notre cas.

Au total, ces expériences de sous-expression à l'aide d'un pool de SiRNA d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 triés montrent qu'il est possible de diminuer l'expression du transcrit d'ACP1 et de sa protéine. Cette approche permet d'envisager un moyen de reproduire in vitro le fonctionnement de l'haploinsuffisance d'ACP1 dans des cellules primaires sans trop les modifier. Nous souhaitons à ce stade compléter nos observations sur les conséquences fonctionnelles de la sous-expression d'ACP1 dans les lymphocytes T primaires :

- Confirmer les anomalies de signaling par une étude en western blot (phospho-ZAP, phospho-ERK)
- Etudier la prolifération et la survie
- Eventuellement envisager des expériences sur le cytosquelette en cytométrie et en microscopie confocale (voir le point **III.f.** ***et*** **IV** ci-dessous)

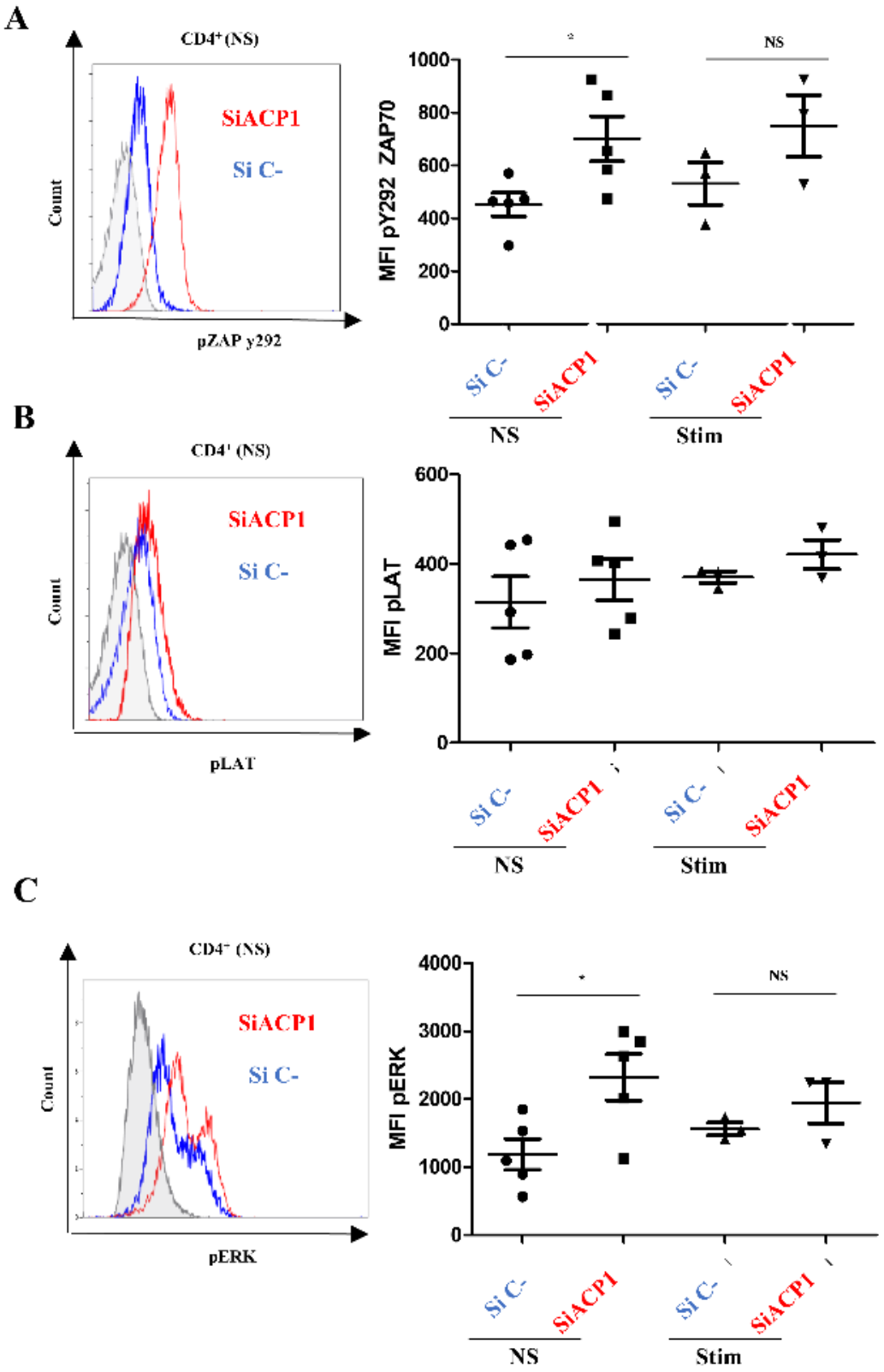


Figure 53 : conséquences de la sous-expression d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 sur les phosphorylations de ZAP-Y292 et de ERK.

Phosphorylation dpY292-ZAP70 à 48 heures en conditions non stimulés et stimulés par aCD3aCD28 dans les cellules primaires CD4+ de témoins (A) et phosphorylation de LAT (B) et ERK (C) en cytométrie de flux.

C- : témoin transfecté avec un pool de SiRNA n'interférant pas avec *ACP1*.

SiACP1 : siRNA de ACP1 total (pool)

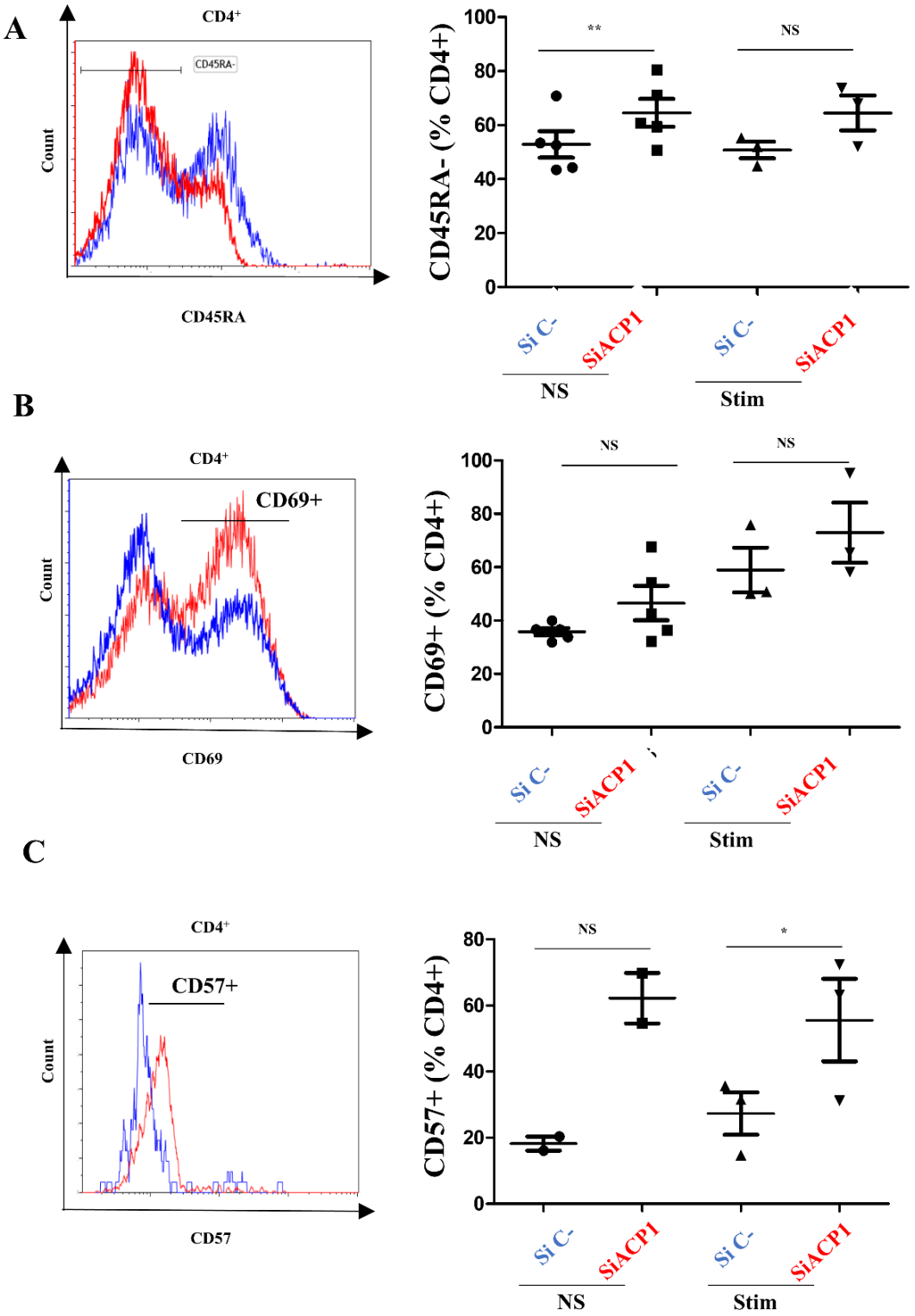


Figure 54 : conséquences de la sous-expression d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 sur l'expression membranaire de CD45RA, CD69 et CD57.

Expression de CD45RA sur les LT CD4+ de lymphocytes T primaires à 48 heures sur cellules non stimulées ou stimulées par la voie du TCR (aCD3aCD28) (A). Expression du CD69 membranaire sur cellules transfectées à 48 heures et non stimulées ou stimulées (B). Expression de CD57 sur les lymphocytes T CD4.

C- : témoin transfecté avec un pool de SiRNA n'interférant pas avec *ACP1*.

SiACP1 : siRNA de ACP1 total (pool)

f. Comportement des cellules en cultures et implications potentielles :

Du fait de la faible disponibilité des échantillons d'étude (prélevés essentiellement chez un seul patient) (III.3), nous avons d'emblée tenté et à plusieurs reprises (3 tentatives), de produire une lignée B immortalisée ainsi que des lymphoblastes T du patient III.2. Lors de la production de ces cellules, nous avons observé d'importantes anomalies de prolifération.

Pour la lignée B EBV, celle-ci présentait initialement une transformation correcte avec la formation de clones au fond du puit de culture. A partir de J7, cette prolifération s'est stoppée et les cellules n'ont plus formé de clones. Elles semblaient adhérer au support de culture. Par la suite les cellules ne proliféraient plus y compris en les maintenant de façon prolongée (2 mois) en culture (Figure).

Pour les lymphoblastes T, les mêmes anomalies ont pu être constatées avec l'absence de formation de clones et de clusters malgré une lymphoprolifération initiale importante (**Figure 55**).

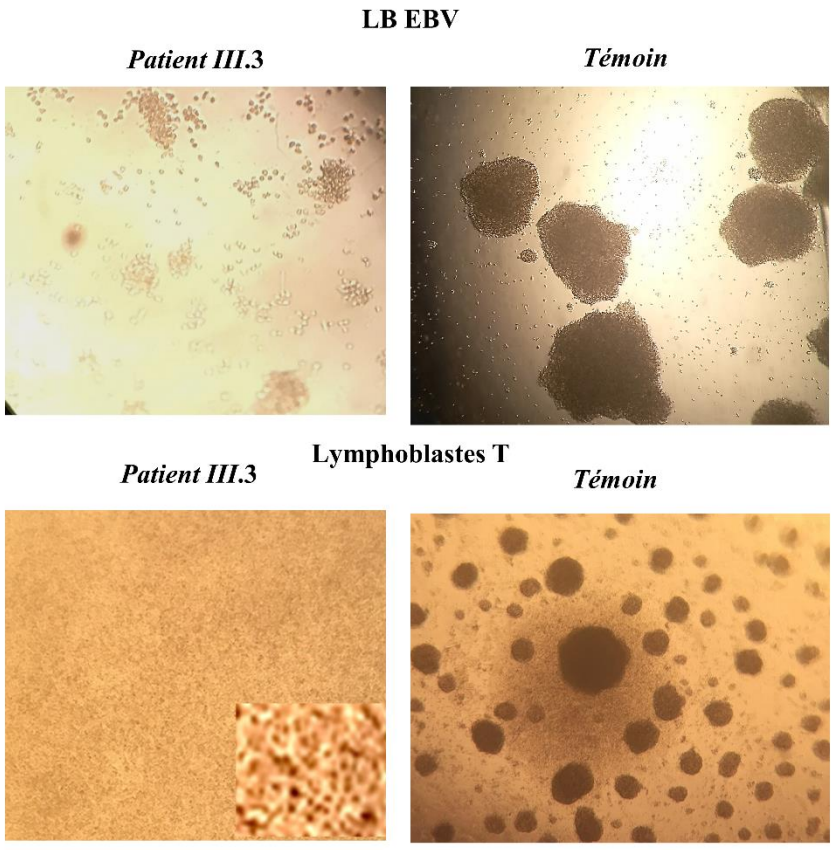


Figure 55 : photos en microscopie optique des cellules du patient III.3 et de témoin. Lymphocytes B EBV immortalisés à J7 et lymphocytes T traités au PHA à J2.

IV. Rôle d'*ACP1* dans le fonctionnement du système immunitaire et dans la tolérance :

Pour aller plus loin dans la compréhension des fonctions d'ACP1 dans les lymphocytes T CD4 et éventuellement B, et pour identifier les voies cellulaires affectées par la mutation d'*ACP1*, nous avons décidé de réaliser :

1. D'une part **une analyse transcriptomique** des cellules triées du patient (*collaboration d'analyse avec la plateforme de séquençage de l'IGBMC, Illkirch, C.Keime)*. Pour cela, nous avons utilisé un réplicat de cellules triées du patient III.3 que nous avons comparé à 3 témoins appariés en âge et en sexe. Les cellules ont été triées par un tri magnétique négatif (CD4 ou CD19) et la pureté a été vérifiée au cytomètre. Les échantillons ont tous passé les filtres de pureté pré-analytique de la plateforme et le séquençage présentait une très bonne courverture (cf. *Méthodes*). L'objectif était d'identifier des voies physiopathologiques dysfonctionnant du fait de la mutation hétérozygote *c.175C>T ACP1*.
2. D'autre part une **analyse protéomique** de PBMCs, lymphocytes T primaires et lymphocytes B primaires de témoins afins d'étudier les interactions normales dans ces cellules.

a. Anomalies lymphocytaires T (lymphocytes T CD4) :

L'analyse du RNAseq selon les modalités détaillées dans les méthodes (P-value ajustée <0,01 ; Fold Change < valeur absolue 2 ; ecart moyen entre les 2 échantillons patients <100%) a permis d'identifier **156 gènes surexprimés et 92 gènes sous-exprimés** de façon significative chez le patient II.2 dans ses lymphocytes T triés par rapport aux témoins.

- La première remarque est que lorsque l'on regarde le nombre de lecture du gène *ACP1* pour ses transcrits *Fast* et *Slow*, on retrouve une prépondérance de la forme *Fast* dans les cellules par rapport à la forme *Slow*, ce qui irait dans le sens des données publiées. Par ailleurs, le résultat du RNAseq corrobore notre résultat de qPCR puisque les transcrits *Fast* et *Slow* sont quantitativement comparables entre le patient et les témoins **(Figure 56A**). De plus, on retrouve la mutation du transcrit *Fast* à l'état hétérozygote (**Figure 56B).**
- Concernant l'analyse des gènes sur-exprimés et sous exprimés, nous observons (**Figure 57 et 58**) :
    - La surexpression de chémokines et de récepteurs de chémokines. On peut citer ici *CXCR5* pour exemple.
    - La surexpression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération. On peut citer ici *KI67*.

- La surexpression de certaines kinases impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine (*PLK1*) ou la division cellulaire (*PKMYT1, TTK1*)
- L'absence de sous-expression majeure d'une voie physiologique bien identifiée d'après nos analyses *in silico*.

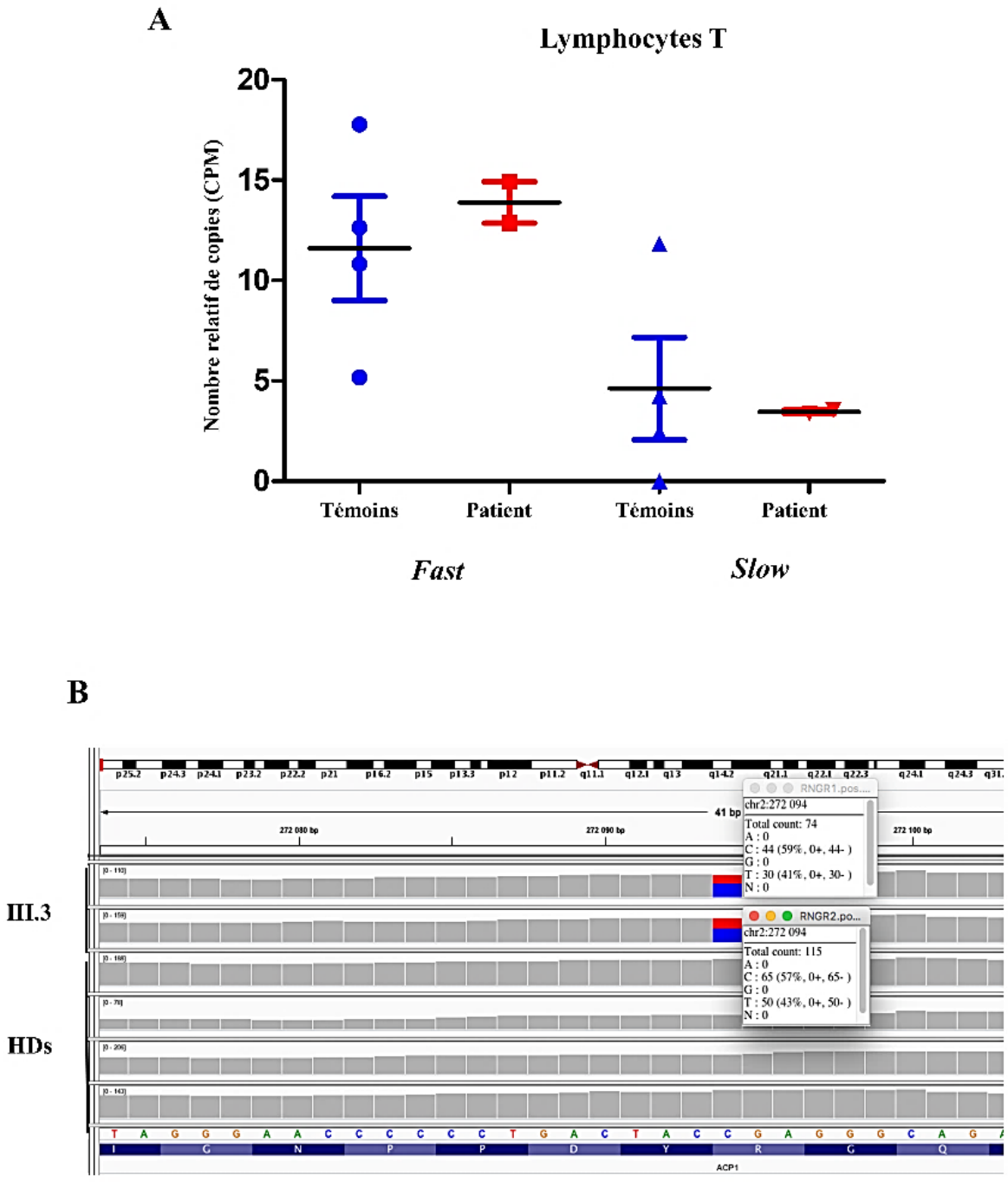


Figure 56 : quantification des transcrits *Fast* et *Slow* dans le RNAseq des lymphocytes T (A). La mutation hétérozygote d'*ACP1* est retrouvée sur le séquençage sur 50% des transcrits (B). les transcrits sont évalués en copies par million (cf méthodes).

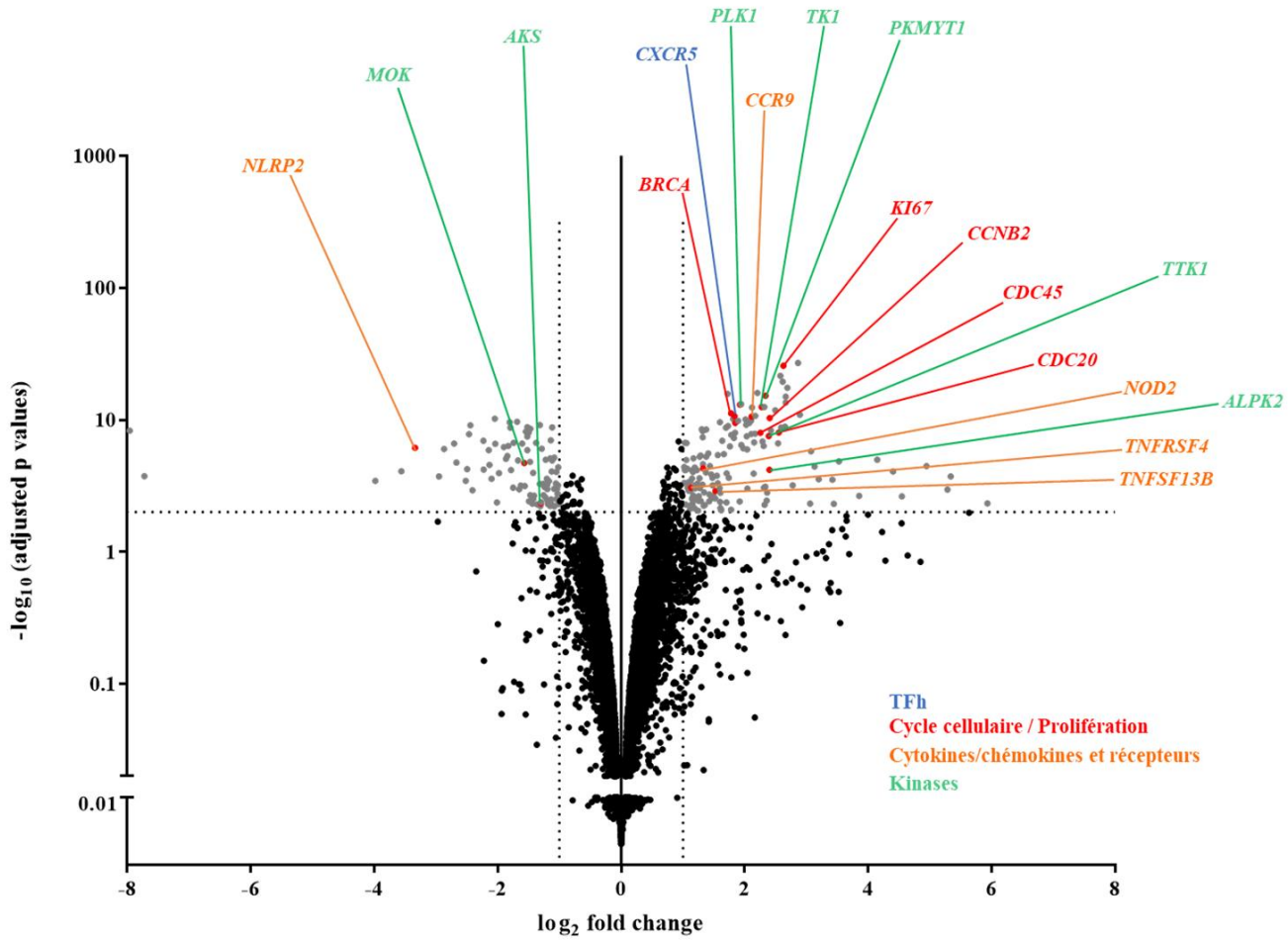


Figure 57 : Volcano Plot des résultats de RNAseq dans les LT. Certains gènes représentatifs sur-exprimés et sous-exprimés chez le patient sont donnés. On note la sur-expression de gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (rouge) ainsi que certaines kinases (vert) et des gènes codant pour des chémokines, cytokines et leurs récepteurs (bleu et orange).

VOIES SUREXPRIMEES							
Cycle cellulaire	*BUB1B*	*BUB1*	*E2F1*	*E2F2*	*TTK*	*CDC20*	*CDC45*
	CHEK1	*CCNB1*	*CCNB2*	*CCNE2*	*CDKN2A*	*ESPL1*	*MCM4*
	PTTG1	*PLK1*	*PKMYT1*	*YWAH*	*CDC6*		
p53	*CHECK1*	*CCNB1*	*CCN2*	*CCNE2*	*CDKN2A*	*RRM2*	
PI3K AKT	*CREB5*	*COL5A3*	*CSF1*	*CCNE2*	*ITGA4*	*OSM*	*YWHAH*
Cyctokines et récepteurs de cytokines	*CCR9*	*CXCR5*	*TNFRSF4*	*CSF1*	*OSM*	*TNFSF13B*	
VOIES SOUS-EXPRIMEES							
Aucune dans Kegg							
Métabolisme des glutathione dans Reactome	*GSTM2*	*GSTM3*					

Figure 58 : principales voies sur-exprimées et sous-exprimées dans les lymphocytes T du patient III.3 *(d'après DAVID®, Kegg® et Réactome®).*

b. Anomalies lymphocytaires B

Remarques préalables concernant le RNAseq des lymphocytes B :

- Le patient II.2 étant particulièrement lymphopénique B, les conditions techniques de l'extraction ont été particulièrement difficiles. Cependant, la qualité et la pureté des échantillons fournis permettait théoriquement une analyse fiable.
- Du fait du défaut de maturation lymphocytaire observé et de la lymphopénie profonde, nous avons choisi de travailler sur les CD19+ triées totales. Cette population est donc très différente de celle des contrôles puisqu'il existe en particulier une diminution des LB switchés. Du point de vu des contrôles, les CD19+ circulants constituent un pool plus hétérogène de cellules à différents stades de maturation.

L'extrapolation des résultats de ce transcriptomes sont à regarder et à interpréter à la lumière de ces observations.

- La première remarque là encore est que le nombre de lecture du gène *ACP1* pour ses transcrits *Fast* et *Slow* montre une prédominance de la forme *Fast* dans les lymphocytes B par rapport à la forme *Slow*. Cette information n'était pas rapportée dans la littérature à notre connaissance. Là aussi, les transcrits *Fast* et *Slow* sont quantitativement comparables entre le patient et les témoins **(Figure 59A)** et on retrouve la mutation du transcrit *Fast* à l'état hétérozygote (**Figure 59B**).
- Concernant les observations sur les gènes sur-exprimés et sous-exprimés, nous pouvons signaler (**Figure 60 et 61**) :
    - La surexpression de gène de la voie JAK/STAT (sur-expression *IL6R, STAT1, STAT4, TLR4, TLR5* et *SOCS3*)
    - La surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette (*PAK1, ITGA2B, ACTN1*)
    - La surexpression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et les contacts intercellulaires (*ICAM1*)
    - Quelques gènes appartenant aux transcriptome T sur-exprimés de façon abérrante (sans pour autant qu'il y ait de contamination par des lymphocytes T observée lors du tri cellulaire (vérification au cytomètre de la pureté)) comme ZAP70, CD4, CD8.

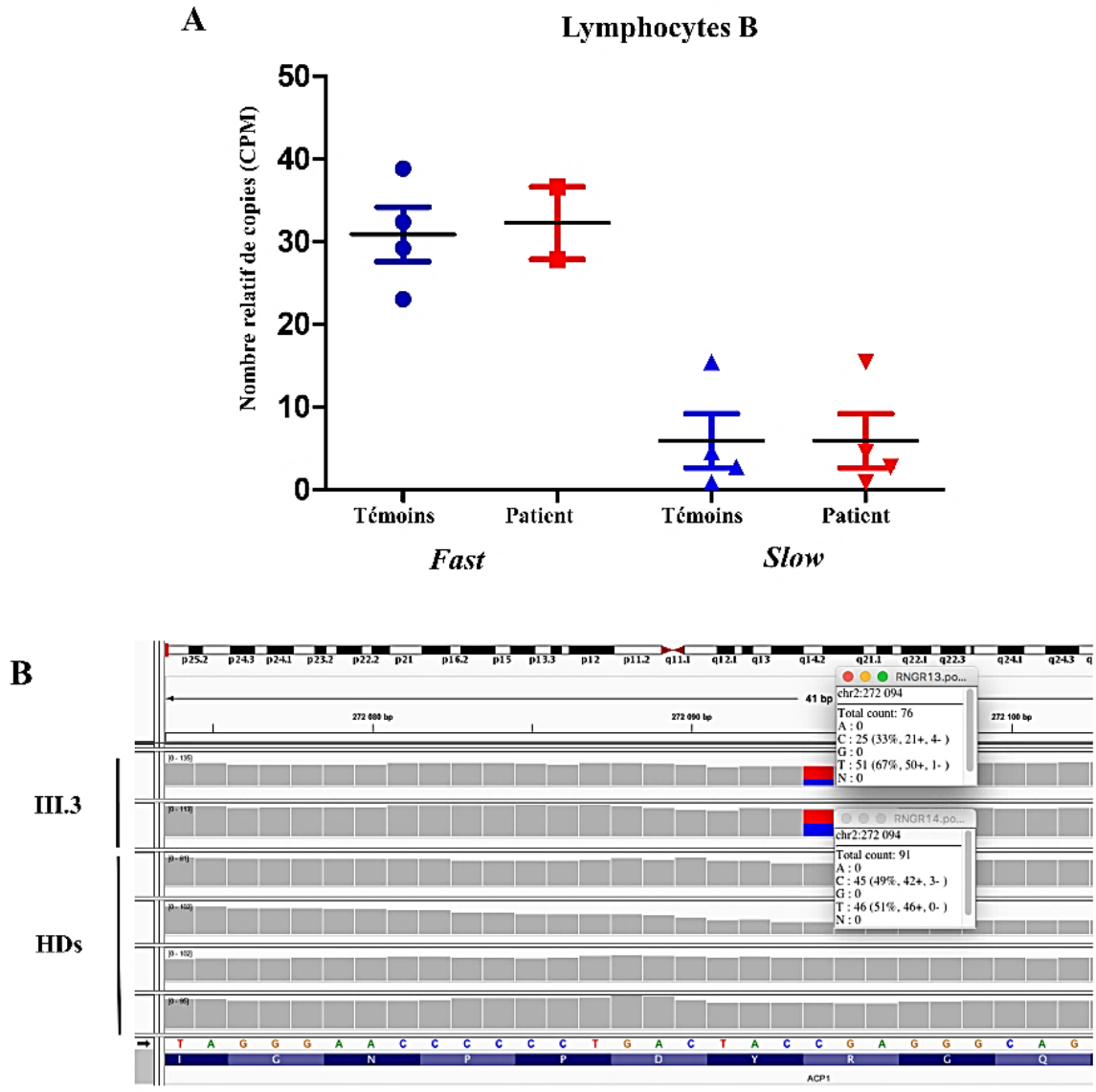


Figure 59 : quantification des transcrits *Fast* et *Slow* dans le RNAseq des lymphocytes B CD19+ (A). La mutation hétérozygote d'*ACP1* est retrouvée sur le séquençage sur 50% des transcrits (B). Les transcrits sont évalués en copies par million (cf méthodes).

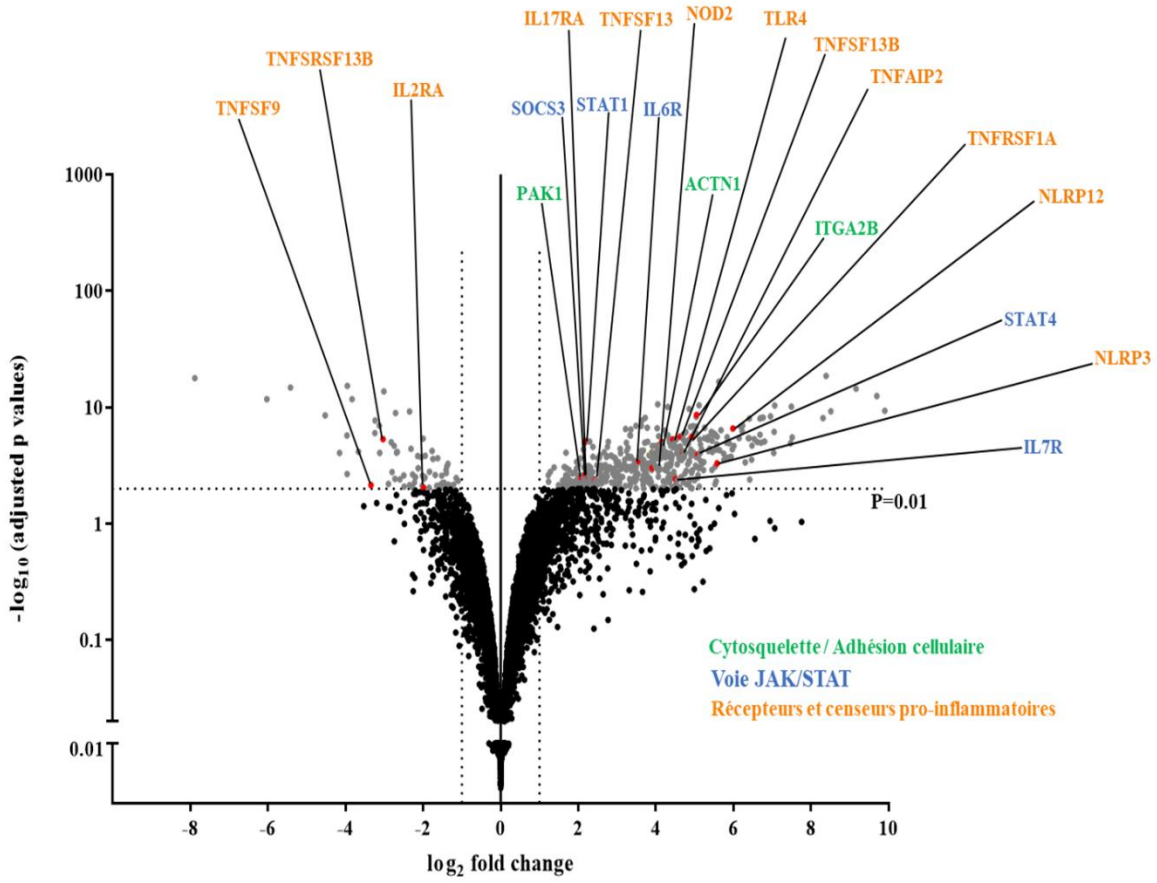


Figure 60 : Volcano Plot des résultats de RNAseq dan les LB. Certains gènes représentatifs sur-exprimés et sous-exprimés chez le patient sont donnés. On note la sur-expression de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette et l'adhésion cellulaire (vert), ainsi que des gènes de la voie JAK/STAT (bleu) et des récepteurs de cytokines (jaune).

VOIES SUREXPRIMEES									
Cytokines et récepteurs de cytokines	*CCL5*	*CCR1*	*CCR2*	*CXCR1*	*CX3CR1*	*TNFRSF1A*	*ACVR1*	*CSF3R*	*TNFSF13B*
	IL17RA	*IL2RB*	*IL6R*	*IL7R*	*OSM*	*PF4*	*PPBP*	*TNFSF13*	
Régulation du cytosquelette d'actine	*IQGAP2*	*TIAM1*	*ACTN1*	*CYFIP1*	*EGF*	*ITGA2B*	*ITGA5*	*ITGA6*	
	ITGAX	*ITGB3*	*ITGB5*	*MYL9*	*MYLK*	*PAK1*	*PXN*		
Récepteurs d'adhésions cellulaire (CAMs)	*CD2*	*CD226*	*CD4*	*CD8a*	*TIGIT*	*CLDN5*	*ESAM*	*ITGA6*	*ICAM1*
	NECTIN2	*SELPLG*	*SELP*	*SPN*	*VCAN*				
Récepteur T	*CD247*	*CD3D*	*CD3E*	*CD3G*	*CD4*	*CD8A*	*GRAP2*	*LCP2*	*PAK1*
	PRKCQ	*ZAP70*							
NFKB pathway	*TNFRSF1A*	*ICAM1*	*PTGS2*	*PRKCQ*	*TLR4*	*TNFSF13B*	*ZAP70*		
VOIES SOUS-EXPRIMEES									
PI3K-AKT	*COL4A3*	*IL2RA*	*LPAR5*	*NOS3*					
Insulinorésistance	*NOS3*	*PYGM*	*PPP1R3E*						

Figure 61 : principales voies sur-exprimés et sous-exprimés dans les lymphocytes B du patient III.3 *(d'après DAVID®, Kegg® et Réactome®).*

c. Analyse protéomique :

- L'analyse dans les PBMCs de témoins (n=6) (**Figure 62 et Annexe**) montre des interactions d'ACP1 avec des protéines impliquées dans l'organisation et la régulation du cytosquelette comme FCHSD1 et COL1A2. Ces interactions sont retrouvées dans les lymphocytes T CD4 triés (n=3) (**Figure 63 et Annexe**) et les lymphocytes B (n=3) (**Figure 64 et Annexe**) avec en plus l'identification d'interactions avec DBNL, COL1A1 qui n'atteignaient pas la significativité dans l'analyse des PBMCs totaux, mais aussi TBB5, TBB8, CAPZB (LB).
- On trouve des interactions avec NFKB 1 (PBMCs, LB, LT) et NFKB 2 (LT), TNIP2 (PBMCs, LB, LT) et TNFAIP8 (LT).
- Certaines interactions retrouvées sont attendues comme SRC2, HMHA1 (*Rho GTPase-activating protein 45*) car déjà publiées (Caselli et al., 2016).
- On peut noter l'absence d'interaction mise en évidence par notre technique avec ZAP70, comme cela aurait pu être attendu d'après les données de la littérature et nos expériences. Les raisons peuvent être liées soit aux conditions d'extraction protéique utilisées ici, soit au fait qu'il s'agisse d'interactions transitoires lors de l'activation cellulaire, soit d'un défaut de sensibilité de la technique, soit à une remise en cause d'une interaction directe entre ZAP70 et ACP1.

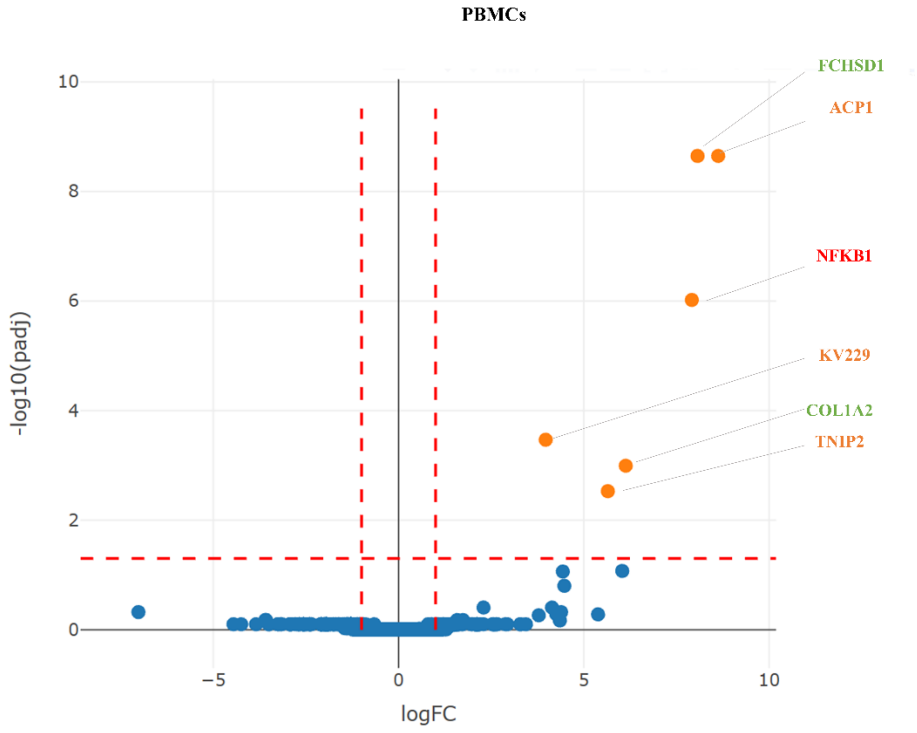


Figure 62 : Interactome d'ACP1 dans les PBMCs. Volcano plot : données à partir de 6 témoins au total.

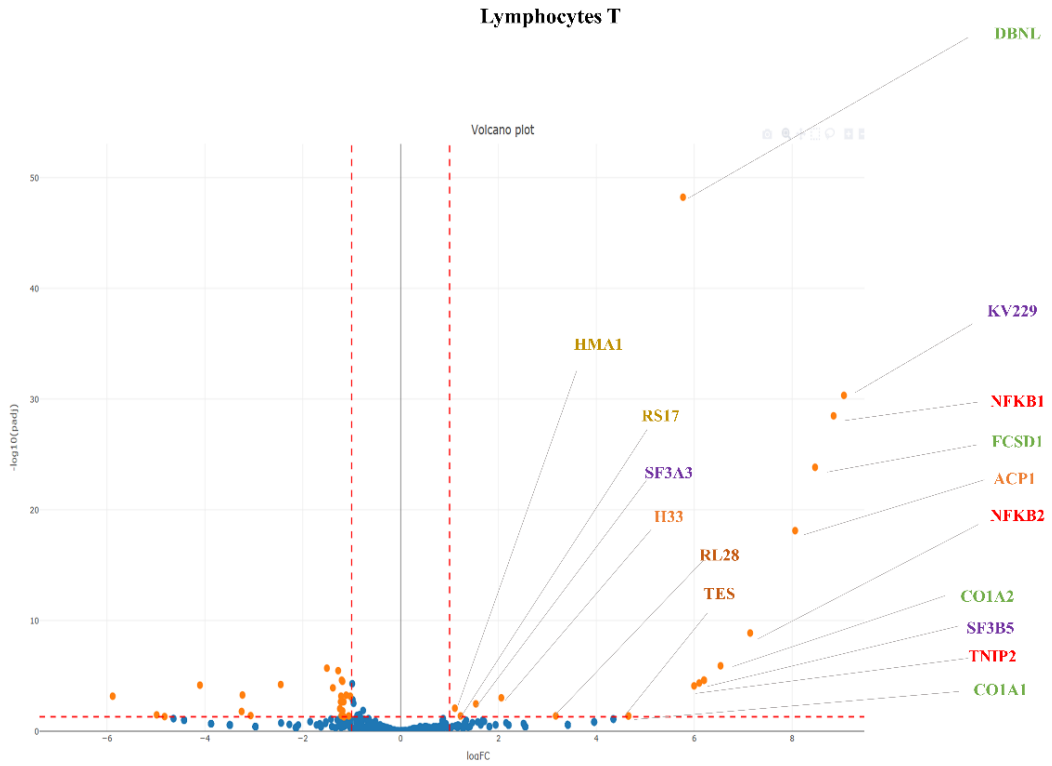


Figure 63 : Interactome d'ACP1 dans les Lymphocytes T. Volcano plot : **d**onnées à partir de 3 témoins au total.

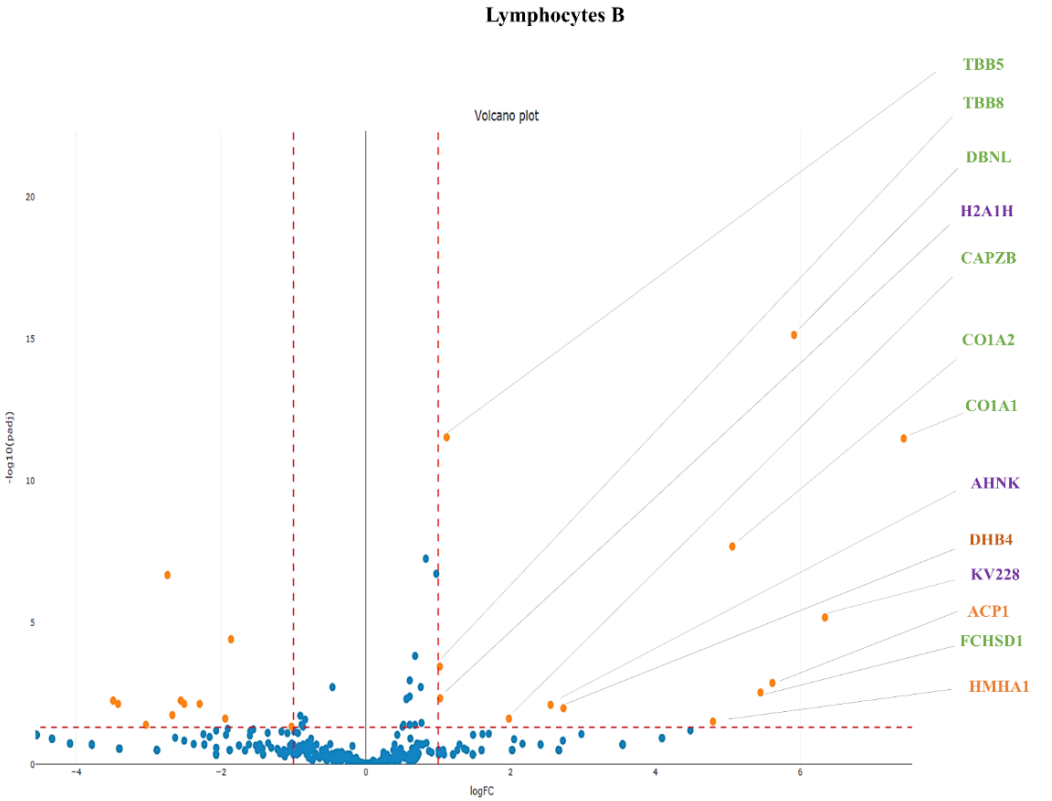


Figure 64 : Interactome d'ACP1 dans les Lymphocytes B. Volcano plot : **d**onnées à partir de 3 témoins au total.

Ainsi, l'analyse *in silico* de ces données d'interactome nous oriente vers la piste du cytosquelette d'actine. Certaines interactions observées pourraient ainsi faire le pont entre l'activation TCR-dépendante (et les interactions avec ZAP70) et la réorganisation du cytosquelette. Dans ce sens, le lien entre DBNL, LCK et ZAP70 pourrait etre une piste interessante (**Figure 65**). Les interactions avec NFKB 1 restent aussi à explorer.

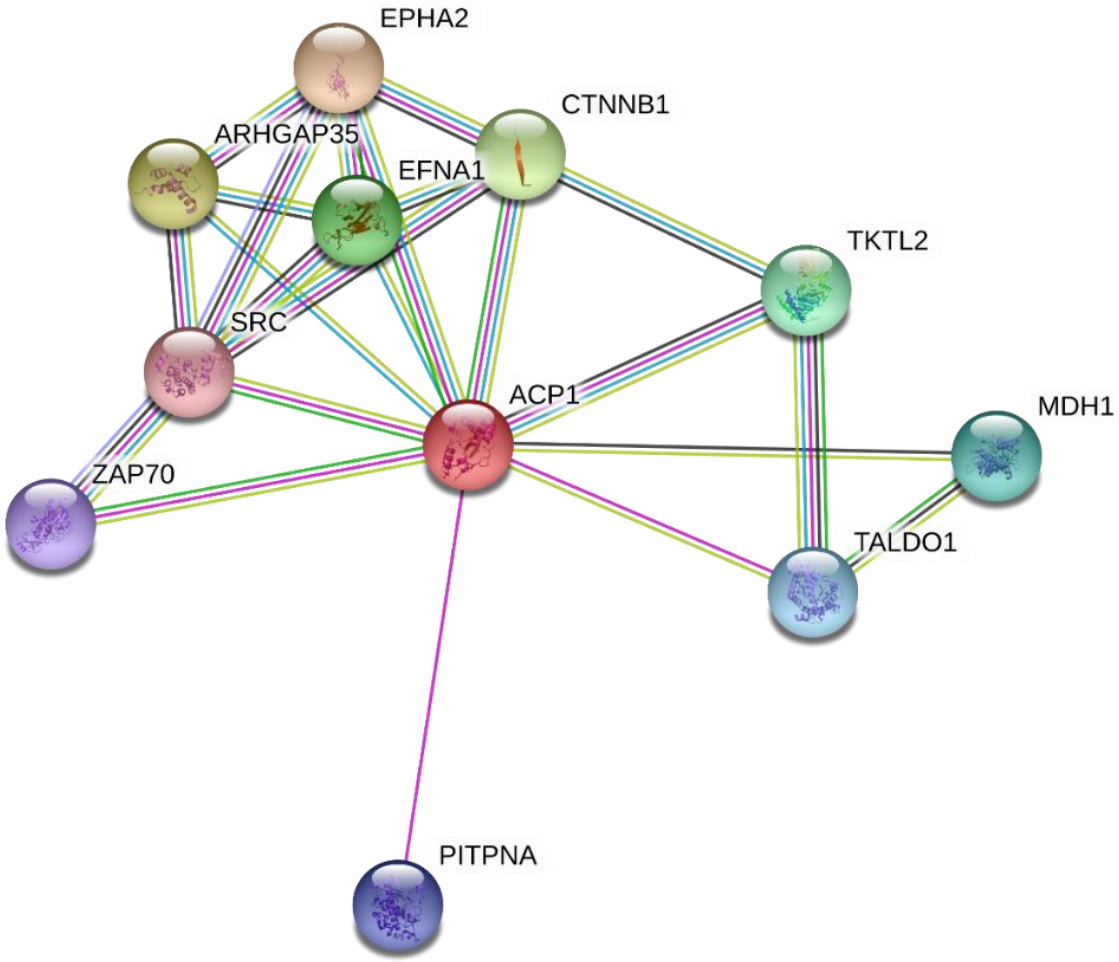


Figure 65 : interactions prédites (d'après STRING®) entre ACP1, TKTL2, ZAP70, SRC et indirectement ARHGAP35

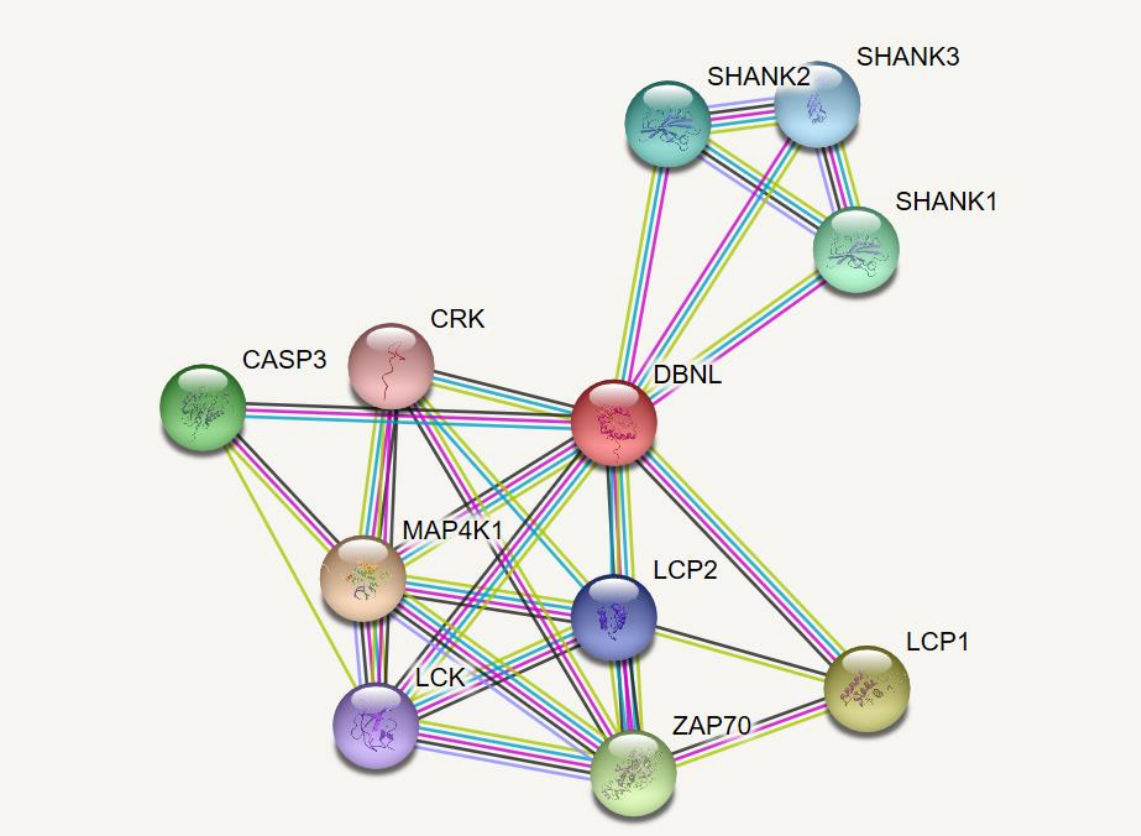


Figure 66 : interactions fortes (d'après STRING®) entre DBNL, LCK, ZAP70 et LCP1 et 2.

d. Anomalies du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire :

Un des autres substrats connus de ACP1 est la phosphoprotéine FAK qui est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (voir ***Introduction – Partie III***). Le cytosquelette intervient dans l'organisation de fonctions clées du fonctionnement lymphocytaire :

- Activation cellulaire
- Prolifération et survie cellulaire
- Migration (*homing*) et contact cellules-cellules
- Organisation de la synapse immunologique

Au cours de nos expériences sur *ACP1*, plusieurs constats nous ont permis d'évoquer des anomalies d'organisation du cytosquelette en lien avec les défauts d'ACP1. On peut citer :

- Les anomalies consatatées en culture lors de la stimulation des lymphocytes B ou T et la tentative d'immortalisation par EBV (point **II.f.**) ;

- Les anomalies observées en microscopie optique lors des cultures cellulaires de lymphocytes T CD4 triés (absence de formation de clusters et adhésion au plastique) ;
- Les gènes mis en évidence par l'analyse transcriptomique des lymphocytes B
- Les interactions protéiques issues de l'analyse de protéomique (***IV.c***)

Ces données ont été renforcées par une analyse récente en microscopie confocale.

Ces analyses d'organisation du cytosquelette pourraient constituer un point central dans l'explication du phénotype de nos patients :

- Des anomalies d'activation lymphocytaire T pourraient expliquer la lymphopénie observée.
- Des défauts de contacts intercellulaires ou de *homing* pourraient entrainer un défaut de coopération lymphocytaire T/B dans les organes lymphoïdes secondaires et expliquer les défauts de développement lymphocytaires B.
- La rupture de tolérance pourrait, elle aussi, être favorisée par des mécanismes dépendants d'anomalie du cytosquelette, comme cela est décrit de plus en plus fréquemment au cours des DIPs (voir ***Introduction – Partie II***).

V. Conclusions sur ACP1 et perspectives :

Nous avons identifié par WES dans une famille de patients (transmission AD), une nouvelle mutation potentiellement responsable d'un DIP (CID) avec auto-immunité. Cette mutation est située sur un gène codant pour une protéine ubiquitaire (ACP1) dont la fonction dans les lymphocytes T et B reste méconnue.

La mutation de nos patients conduit à une réduction de la production de l'isoforme majoritaire dans les lymphocytes T et B (*Fast*) et le mécanisme suggéré ici est celui d'une haplo-insuffisance. Nous avons pu valider l'impact de la réduction d'ACP1F dans les lymphocytes en utilisant un de ses substrats connu, le site pY292 de ZAP70 qui apparait hyperphosphorylé chez le patient muté. Par ailleurs, le phénotype semble restreint aux cellules immunitaires alors que la protéine présente une expression ubiquitaire. Cela suggère que l'isoforme *Fast* est particulièrement importante dans les lymphocytes T et qu'il existe des mécanismes de compensation du défaut d'ACP1 pour cette mutation particulière dans les autres type cellulaire (activité résiduelle de la forme *Fast* suffisante, intervention d'autres phosphatases, activité propre de la forme *Slow*). De façon intéressante, il n'existe pas de mutation complète de *ACP1* décrite à ce jour (probablement léthale) et la transcription de *ACP1* semble soumise à une régulation assez fine dans l'espèce humaine. Ainsi, les polymorphismes qui conduisent à une augmentation modérée de l'activité enzymatique de la phosphatase,

seraient protecteur de l'auto-immunité, alors que les polymorphismes liés à une activité forte pourraient favoriser la rupture de tolérance (voir *Introduction*). Malheureusement, le phénotype immunologique ne semble pas être reproduit dans les modèles murins KO publiés. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes plutôt orientés vers l'étude de lignées cellulaires humaines modifiées par Crispr/Cas9.

A ce stade, nous envisageons des expériences complémentaires pour conforter nos observations sur les points suivants :

1°) La validation du phénotype observé chez les patients mutés pour *ACP1* et de certains résultats obtenus (RNAseq, interactome) :

- Nous n'avons pas trouvé de seconde famille mutée sur ACP1 à l'heure actuelle dans les bases de données d'exome. Nous souhaitons par conséquent conforter nos résultats obtenus chez le patient III.3 en complétant nos expériences de siRNA.
- La validation des modifications d'expression de certains gènes identifiés par analyse transcriptomique (RNAseq) est en cours en qPCR sur cellules triées du patient III.3 et sur cellules primaires traitées par SiRNA.
- Expériences sur la voie NFKB: l'interactome prédit des interactions avec NFKB dans les lymphocytes T et B. Des données préliminaires de WB montrent une diminution de IKB totale dans les cellules du patient III.3 (stimulées et non stimulées) qui pourraient révèler une activation constitutive de la voie NFKB. Des expériences complémentaires sont actuellement en cours sur ce point.
- Nous disposons d'échantillons cellulaires de la patiente II.2 pour quelques expériences importantes qui permettraient de coroborer les observations les plus importantes faites chez le patient III.3

2°) Compréhension du rôle d'ACP1 dans les lymphocytes T et B :

Nous envisageons plusieurs expériences sur les cellules primaires de patients ou de témoins traités par SiRNA et sur lignées KO pour confirmer le lien entre ACP1 et le cytosquelette. En particulier :

- Des expériences d'imagerie confocale sont en cours: colocalisation du cytosquelette d'actine et d'ACP1 dans les cellules primaires (LT et LB) de témoins et études des anomalies chez le patient et dans des cellules transfectées par un siRNA de ACP1 (*en cours*).
- Etude de la polymérisation d'actine et marquage de LFA1 et de phospho-FAK en cytométrie de flux sur cellules primaires du patient et cellules de témoins transfectées (SiRNA).

- Etude de lignées tumorales lymphocytaires T (Jurkat) et B (Ramos) transformées par Crispr/Cas9 (lignées *ACP1 KO*) : prolifération, mobilité en cytométrie, étude du cytosquelette et de la synapse immunologique en microscopie confocale.
- Etude de la migration cellulaire médiée par SDF1-α (CXCL12).

Ces différentes expériences font partie du projet CEREDIH 2018 (porteur Dr Sophie Jung) et d'une étudiante de MII F.Kaebel au laboratoire débuté en décembre 2018.

ANNEXE DE LA PARTIE III

ACP1

ANNEXE I : LISTE DES 41 VARIANTS ISSUS DES FILTRES DE L'EXOME EN TRIO

EXONIC VARIANTS

Variant	Nom du gène	Référence (ensembl)	Zygotie	type de mutation	Localisation	Conséquence protéique
2_272094_C_T	ACP1	NM_004300.3	het	nonsense	exon	p.Arg59*
2_98732116_T_G	VWA3B	NM_144992.4	het	missense	exon	p.Asp66Glu
5_141325317_A_G	PCDH12	NM_016580.3	het	missense	exon	p.Ser1062Pro
1_21268808_G_C	EIF4G3	NM_001198801.1	het	missense	exon	p.Pro223Arg
10_104126258_T_A	GBF1	NM_004193.2	het	missense	exon	p.Trp809Arg
15_43075790_T_C	TTBK2	NM_173500.3	het	missense	exon	p.Asn342Asp
20_51873044_C_T	TSHZ2	NM_173485.5	het	missense	exon	p.Thr1016Met
11_102056854_C_G	YAP1	NM_001282101.1	het	missense	exon	p.Pro265Arg
2_33500919_A_C	LTBP1	NM_206943.2	het	missense	exon	p.Asn974Thr
17_35640299_A_G	ACACA	NM_198839.2	het	missense	exon	p.Ile123Thr
10_22171329_A_G	DNAJC1	NM_022365.3	het	missense	exon	p.Val287Ala
5_63665447_C_T	RNF180	NM_001113561.1	het	missense	exon	p.Arg529Cys
2_226447163_G_C	NYAP2	NM_020864.1	het	missense	exon	p.Val344Leu
2_242011044_G_A	SNED1	NM_001080437.1	het	missense	exon	p.Val1215Met
3_159986223_C_T	IFT80	NM_001190241.1	het	missense	exon	p.Arg597Gln
11_63536039_C_T	C11orf95	NM_001144936.1	het	missense	exon	p.Gly19Glu
2_133541233_G_A	NCKAP5	NM_207363.2	het	missense	exon	p.Arg1051Cys
19_15198202_C_G	OR1I1	NM_001004713.1	het	missense	exon	p.Thr109Ser
19_3594931_G_C	pCDH12	NM_201636.2	het	missense	exon	p.Pro376Arg
2_226447157_G_C	NYAP2	NM_020864.1	het	missense	exon	p.Ala342Pro
2_74709217_G_A	CCDC142/TTC31	NM_032779.3	het	missense	exon	p.Arg250Trp
11_74460056_G_A	RNF169	NM_001098638.1	het	missense	exon	p.Gly44Glu
13_96261741_C_G	DZIP1	NM_198968.3	het	missense	exon	p.Glu464Gln
2_27800454_T_C	C2orf16	NM_032266.3	het	missense	exon	p.Ser339Pro
2_173352758_G_A	ITGA6	NM_000210.3	het	synonymous	exon	p.=
19_58016677_A_G	ZNF773	NM_198542.2	het	synonymous	exon	p.=
6_31964664_G_A	C4A	NM_007293.2	het	synonymous	exon	p.=
1_16353239_C_T	CLCNKA	NM_004070.3	het	synonymous	exon	p.=
19_36211355_AAGAAG_-	KMT2B	NM_014727.2	het	In-frame	exon	p.Glu372_Glu373del
13_103510739_AGA_-	BIVM-ERCC5	NM_001204425.1	het	In-frame	exon	p.Arg670del
12_132313103_-_CGCTGCTGT	MMP17	NM_016155.4	het	In-frame	exon	p.Leu23_Pro24insLeuSerLeu
8_11058726_GCCGCCGCA_-	XKR6	NM_173683.3	het	In-frame	exon	p.Cys39_Gly41del
2_61433246_T_C	USP34	NM_014709.3	het	synonymous	exon	p.=
10_93999184_G_T	CPEB3	NM_014912.4	het	synonymous	exon	p.=
2_99412605_G_T	KIAA1211L	NM_207362.2	het	synonymous	exon	p.=

9_124076271_G_T	GSN	NM_001127663.1	het	synonymous	exon	p.=
17_26671506_T_A	TNFAIP1	NM_021137.4	het	synonymous	exon	p.=
2_130898793_T_C	CCDC74B/MED15P9	NM_207310.2	het	synonymous	exon	p.=
4_57335931_G_A	SRP72	NM_006947.3	het	synonymous	exon	p.=

INTRONIC VARIANTS

VariantID	Gene	TranscriptID	Zygosity	CodingEffect	VarLocation	pNomen
8_48701806_A_T	PRKDC	NM_006904.6	het	NA	intron	p.?

UTR VARIANTS

VariantID	Gene	TranscriptID	Zygosity	CodingEffect	VarLocation	pNomen
5_133482153_C_T	TCF7	NM_001134851.2	het	NA	3'UTR	p.?

ANNEXE II: TABLE DES PROTEINES SIGNIFICATIVEMENT ASSOCIEES AVEC ACP1 EN PROTEOMIQUE (A : PBMCs ; B : Lymphocytes T ; C : Lymphocytes B)

A

Gene name	LogFC	adjp
ACP1	8,63	2,24E-09
FCHSD1	8,07	2,24E-09
UNQ737/PRO1431		
NFKB1	7,91	9,53E-07
COL1A2	6,13	1,01E-03
COL1A1	6,04	8,42E-02
TNIP2 ABIN2 FLIP1	5,65	2,95E-03
MMP9 CLG4B	5,38	5,23E-01
TRIM21 RNF81 RO52 SSA1	4,47	1,57E-01
DBNL CMAP SH3P7	4,43	8,64E-02
PPS423		
IGLV2-11	4,39	4,75E-01
PYGL	4,35	6,76E-01
IGLV2-8	4,26	5,21E-01
RCN2 ERC55	4,14	3,92E-01
IGKV2-29	3,97	3,39E-04
MAP3K8 COT ESTF	3,78	5,44E-01
VIL1 VIL	3,44	7,91E-01
NFKB2 LYT10	3,29	7,91E-01
PYGB	3,29	7,91E-01
IST1 KIAA0174	2,94	7,91E-01
SERPINB1 ELANH2	2,88	7,91E-01
MNE1 PI2		
FCGBP	2,66	7,91E-01
RETN FIZ3 HXCP1		
RSTN	2,64	7,91E-01
UNQ407/PRO199		
TIMP1 CLGI TIMP	2,63	7,91E-01
HBB	2,59	7,91E-01
RPL5 MSTP030	2,59	7,91E-01
PFKP PFKF	2,57	7,91E-01
NCBP2 CBP20 PIG55	2,56	7,91E-01
CFAP20 BUGZ2		
C16orf80 GTL3	2,54	7,91E-01
RPL35A GIG33	2,54	7,91E-01
IGKV2-30	2,29	3,92E-01
ARHGAP45 HMHA1		
KIAA0323	2,29	7,91E-01
IGLV1-44	2,19	7,91E-01
IGKV1D-16	2,18	7,91E-01
TCERG1 CA150	2,16	7,91E-01
TAF25		
MUC1 SBEM	2,16	7,91E-01
UNQ590/PRO1160		
IGHV6-1	2,16	7,91E-01
IGHV1-45	2,15	7,91E-01
GRK6 GPRK6	2,12	7,91E-01
CHMP1A CHMP1		
KIAA0047 PCOLN3	2,12	7,91E-01
PRSM1		
SETSIP SETP18	2,12	7,91E-01
S100A4 CAPL MTS1	2,12	7,91E-01
ACTR1B CTRN2	2,12	7,91E-01
NIPSNAP2 GBA5	2,10	7,91E-01
RPS28	2,10	7,91E-01
SNAP23	2,08	7,91E-01
CHMP3 CGI149 NEDF	2,08	7,91E-01
VPS24 CGI-149		
BST2	2,08	7,91E-01
FAM133A	2,08	7,91E-01
ATAD3A	2,06	7,91E-01

B

Gene name	LogFC	adjp
DBNL CMAP SH3P7	8,35	3,66E-71
PPS423		
COL1A1	5,92	7,52E-16
ACP1	7,43	3,35E-12
FCHSD1 UNQ737/PRO1431	5,06	2,14E-08
ARHGAP45 HMHA1	6,34	6,76E-06
RPS27L	5,62	1,38E-03
NCAPG2 LUZP5	5,45	2,97E-03
PRSS3 PRSS4 TRY3 TRY4	2,55	8,13E-03
ARG1	2,73	1,07E-02
RPLP2 D11S2243E RPP2	4,79	3,16E-02
CCL5 D17S136E SCYA5	4,48	6,44E-02
ALDH16A1	2,98	8,70E-02
ARPC5 ARC16	4,09	1,20E-01
ATAD3A	4,09	1,20E-01
LINC00479 C21orf129	4,09	1,20E-01
PRED76		
GNL3 E2IG3 NS	4,09	1,20E-01
IGKV3-20	2,05	1,32E-01
SNU13 NHP2L1	2,72	1,48E-01
RBMXHNRPG RBMXP1	2,16	1,92E-01
SNRPD3	3,55	2,02E-01
TRA2A	3,55	2,02E-01
WASF2 WAVE2	3,55	2,02E-01
CSE1L CAS XPO2	3,55	2,02E-01
MAPRE2 RP1	3,55	2,02E-01
MYO5A MYH12	3,55	2,02E-01
RIT1 RIBB RIT ROC1	3,55	2,02E-01
SNRPB COD SNRPB1	3,55	2,02E-01
TFAM TCF6 TCF6L2	3,55	2,02E-01
UBA7 UBE1L UBE2	3,55	2,02E-01
DBN1 D0S117E	3,55	2,02E-01
FAM76B	3,55	2,02E-01
GOLGB1	3,55	2,02E-01
KHDRBS1 SAM68	3,55	2,02E-01
NCBP2 AS2	3,55	2,02E-01
RPL27A	3,55	2,02E-01
RPLP1 RRP1	3,55	2,02E-01
RNPS1 LDC2	3,55	2,02E-01
POLR2C A-15?E5.7	3,55	2,02E-01
SF1 ZFM1 ZNF162	2,41	2,02E-01
ANKI ANK	2,41	2,02E-01
ARPC4 ARC20	2,67	3,17E-01
BTF3 NACB OK/SW-cl.8	2,67	3,17E-01
HSPD1 HSP60	2,67	3,17E-01
CDK5RAP3 IC53 LZA	2,67	3,17E-01
COPB2	2,67	3,17E-01
DDX21	2,67	3,17E-01
DNAJA2 CPR3 HIRIP4	2,67	3,17E-01
DPYSL5 CRMP5 ULIP6	2,67	3,17E-01
IGHV1-45	2,67	3,17E-01
IGHV5-51	2,67	3,17E-01
KNG1 BDK KNG	2,67	3,17E-01
IGKV3-11	2,67	3,17E-01
LASP1 MLN50	2,67	3,17E-01
LRBA BGL CDC4L LBA	2,67	3,17E-01
MYO9B MYR5	2,67	3,17E-01
NACAP1 FKSG17	2,67	3,17E-01
NEMF SDCCAG1	2,67	3,17E-01
CMAS	2,67	3,17E-01
NFKB1	2,67	3,17E-01
NIPSNAP1	2,67	3,17E-01

Table B (Suite)	LogFC	adjp
PGAM5	2,67	3,17E-01
PICALM CALM	2,67	3,17E-01
PLEKHF1 APPD LAPF	2,67	3,17E-01
PLG	2,67	3,17E-01
PRPF19 NMP200 PRP19 SNEV	2,67	3,17E-01
RBBP4 RBAP48	2,67	3,17E-01
RBM15 OTT OTT1	2,67	3,17E-01
REV1 REVIL	2,67	3,17E-01
RPL28	2,67	3,17E-01
POLR2A POLR2	2,67	3,17E-01
EEFSEC SELB	2,67	3,17E-01
SLFN14	2,67	3,17E-01
TFCP2 LSF SEF	2,67	3,17E-01
TMA16 C4orf43	2,67	3,17E-01
LTF GIG12 LF	2,67	3,17E-01
ATP6V1A ATP6A1 ATP6V1	2,67	3,17E-01
VIM	2,67	3,17E-01
ZNF787	2,67	3,17E-01
IGKV2-29	2,67	3,17E-01
IGKV2-28	2,67	3,17E-01
COL1A2	2,67	3,17E-01
RALBP1 RLIP1 RLIP76	2,67	3,17E-01
EEF1A1 EEF1A EF1A	2,67	3,17E-01
LENG7		
AHNAK PM227	2,67	3,17E-01
COPA	2,67	3,17E-01
SLC25A1 SLC20A3	2,67	3,17E-01
HSD17B4 EDH17B4	2,67	3,17E-01
SDR8C1		
SERPINE2 PI7 PN1	2,67	3,17E-01
CROCC KIAA0445	2,67	3,17E-01
HNRNPA3 HNRPA3	2,02	3,17E-01
YWHAQ	2,02	3,17E-01
FHOD1 FHOS FHOS1	2,02	3,17E-01
GSTK1 HDCMD47P	2,02	3,17E-01
SNRPF PBSCF	2,02	3,17E-01
HSPB1 HSP27 HSP28	2,02	3,17E-01

C

Gene names	LogFC	adjp
IGKV2_29	5,77	5,97E-49
NFKB1	9,06	4,69E-31
FCHSD1 UNQ737/PRO1431	8,85	3,29E-29
ACP1	8,47	1,46E-24
PRPF19 NMP200 PRP19 SNEV	8,06	7,72E-19
COL1A2	7,14	1,36E-09
SF3B5 SF3B10	6,54	1,24E-06
IGKV2-28	6,20	2,48E-05
TNIP2 ABIN2 FLIP1	6,20	2,48E-05
COL1A1	6,10	4,44E-05
CD180 LY64 RP105	6,00	8,07E-05
TES	2,06	9,61E-04
S100A9 CAGB CFAG MRP14	4,65	4,16E-02
NCOR1 KIAA1047	4,65	4,16E-02
USH1G SANS	3,17	4,16E-02
SIK3 KIAA0999 QSK L19	4,35	8,12E-02
XRCC5 G22P2	4,35	8,12E-02
ZC3H4 C19orf7 KIAA1064	4,35	8,12E-02
CORO1B	4,35	8,12E-02
RASAL3	3,95	1,46E-01
RCN2 ERC55	3,95	1,46E-01
RPL21	3,95	1,46E-01
B2M CDABP0092 HDCMA22P	3,95	1,46E-01
CHMP2A BC2 CHMP2	3,95	1,46E-01
EEF1D EF1D	2,16	1,77E-01
MED17 ARC77 CRSP6 DRIP77	2,51	2,08E-01
DRIP80 TRAP80	2,51	2,08E-01
ATP8A2 ATPIB	2,51	2,08E-01
SEPT6 KIAA0128 SEP2	2,51	2,08E-01
TCEANC2 C1orf83	3,42	2,66E-01
GSR GLUR GRD1	3,42	2,66E-01
PXN	3,42	2,66E-01
PDCD6IP AIP1 ALIX KIAA1375	3,42	2,66E-01
RNASE4 RNS4	3,42	2,66E-01
CCT5 CCTE KIAA0098	3,42	2,66E-01
TSN	3,42	2,66E-01
TNFAIP8	3,42	2,66E-01
CAMK2B CAM2 CAMK2 CAMKB	3,42	2,66E-01
ELANE ELA2	3,42	2,66E-01
MIA2	3,42	2,66E-01
REV1 REVIL	3,42	2,66E-01
CBLN4 CBLNL1		
UNQ718/PRO1382	3,42	2,66E-01
DDX18 CPERP-D	3,42	2,66E-01
TNFAIP8L1	3,42	2,66E-01
VPS52 SACM2L	3,42	2,66E-01
MPRIP KIAA0864 MRIP RHOIP3	2,21	2,76E-01
ARPC4 ARC20	2,21	2,76E-01
GIT1	2,21	2,76E-01
CSNK2A1 CK2A1	2,20	2,76E-01
CORO2A IR10 WDR2	2,20	2,76E-01
DOCK10 KIAA0694 ZIZ3	2,54	3,81E-01
POLR2B	2,54	3,81E-01
EZR VIL2	2,54	3,81E-01
RBBP4 RBAP48	2,54	3,81E-01
IGHV3-7	2,54	3,81E-01
IGLV3-10	2,54	3,81E-01
PRNP ALTPRP PRIP PRP	2,54	3,81E-01
NSRP1 CCDC55 NSRP70	2,54	3,81E-01
PPIL1 CYPL1 CGI-124		
UNQ2425/PRO4984	2,54	3,81E-01
RFTN1 KIAA0084 MIG2	2,54	3,81E-01
ARHGAP9	2,54	3,81E-01

Table C (suite)	LogFC	adjP
ARHGEF1	2,54	3,81E-01
ARHGEF6 COOL2 KIAA0006 PIXA	2,54	3,81E-01
RBM5 H37 LUCA15	2,54	3,81E-01
SPG11 KIAA1840	2,54	3,81E-01
SUN2 FRIGG KIAA0668 RABSIP	2,54	3,81E-01
UNC84B	2,54	3,81E-01
SLC25A1 SLC20A3	2,54	3,81E-01
ABLIM1 ABLIM KIAA0059 LIMAB1	2,54	3,81E-01
ZNF207 BUGZ	2,54	3,81E-01
CHMP5 C9orf83 SNF7DC2 CGI-34	2,54	3,81E-01
HSPC177 PNAS-114 PNAS-2	2,54	3,81E-01
UQCRC2	2,54	3,81E-01
CYFIP2 KIAA1168 PIR121	2,54	3,81E-01
DYNLL1 DLC1 DNCL1 DNCLC1	2,54	3,81E-01
HDLC1	2,54	3,81E-01
HNRNPA3 HNRPA3	2,54	3,81E-01
PIN1	2,54	3,81E-01
SEC61B	2,54	3,81E-01
TUBA4B TUBA4	2,54	3,81E-01
RANBP9 RANBPM	2,54	3,81E-01
SRSF10 FUSIP1 FUSIP2 SFRS13A	2,54	3,81E-01
TASR	2,54	3,81E-01
TCEA3 TFIISH	2,54	3,81E-01
TAF10 TAF2A TAF2H TAFII30	2,54	3,81E-01
TWF2 PTK9L MSTP011	2,54	3,81E-01
ZC3HAV1 ZC3HDC2 PRO1677	2,54	3,81E-01
DBNL CMAP SH3P7 PPS423	2,54	3,81E-01
RPL28	2,54	3,81E-01
SNRPGP15	2,54	3,81E-01
DIDO1 C20orf158 DATF1		
KIAA0333	2,54	3,81E-01
RPS15A OK/SW-cl.82	2,54	3,81E-01
RPL22L1	2,54	3,81E-01
BIN2 BRAP1	2,54	3,81E-01
SCAF1 SFRS19 SRA1	2,54	3,81E-01
CHMP4B C20orf178 SHAX1	2,54	3,81E-01
PPP1CC	2,54	3,81E-01
ATAD3C	2,54	3,81E-01
H3F3A H3.3A H3F3 PP781; H3F3B H3.3B	2,54	3,81E-01

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier la rupture de tolérance au cours des déficits immunitaires primitifs pour aborder les mécanismes généraux d'auto-immunité et voir si certaines caractéristiques trouvées dans les formes monogéniques de MAIs (les DIPs) pouvaient être transposées dans les modèles multifactoriels d'auto-immunité (en l'occurrence le LES).

En réalité, la problématique et le dialogue entre ces deux visages de l'auto-immunité (monogénique ou multifactoriel) sont constants au fur et à mesure que sont trouvés de nouveaux gènes de DIPs. Ainsi, certains gènes mis en lumières dans les GWAS peuvent constituer de bons candidats pour un éventuel DIP et réciproquement, un gène impliqué dans un DIP peut aussi intervenir dans la physiopathologie des maladies auto-immunes complexes. Ce va et vient s'est accéléré de façon considérable avec les techniques actuelles de séquençage haut débit et l'identification de plusieurs nouveaux gènes par an impliqués dans des DIPs (Bousfiha et al., 2015; Meyts et al., 2016; Picard et al., 2018).

Nos résultats soulignent la complexité des processus qui régissent le maintien de la tolérance immunitaire et la diversité des voies qui mènent à l'auto-immunité. Cette diversité était déjà suggérée par les études de GWAS qui montraient un très grand nombre de gènes impliqués (jusqu'à 300) et une grande redondance entre les maladies (Cotsapas et al., 2011).

Nous avons d'abord abordé la problématique par l'étude de cohortes homogènes (ou le plus homogènes possibles) de patients atteints de DIP avec auto-immunité (DICV/CID, neutropénie, cytopénies auto-immunes), ou de maladies auto-immunes avec potentiellement un terrain génétique plus fort (début précoce, autres membres de la famille atteints, LES avec cytopénies auto-immunes/Evans). Cette approche analytique de cohortes montre encore une diversité des gènes potentiellement impliqués (que ce soit des gènes impliqués dans l'immunité innée ou adaptative).

Au sein de cette diversité, nos résultats illustrent certaines caractéristiques liés fonctionnement du système immunitaire :

- **Différentes mutations, dans des voies physiopathologiques différentes peuvent aboutir à des phénotypes proches** (dans la littérature, on peut citer les exemples de *CTLA4/LRBA*, *NFκB1*, *PIK3CD*). Dans notre travail, cela est suggéré par le fait que nous retrouvons des variants sur des gènes assez distants en terme mécanistique (*STAT1*, *CD19*, *TNFRSF13B*, *Cp*, *IRAKBP1*, *NFATC1*, *ARHGAP25*, *ARHGEF28*).
- A l'opposée, **différentes mutations sur un même gène peuvent conduire à des phénotypes différents** (ce qui est bien décrit pour *CTLA4* dans la littérature (Schwab et al., 2018)). Dans notre travail, nous pouvons citer l'exemple de la mutation gain-de-fonction de *STAT1* retrouvée dans notre série DICV/CID et neutropénie. La présentation chez notre patient est

atypique avec une hypogammaglobulinémie profonde, une lymphopénie et des infections bactériennes, des cytopénies auto-immunes et une lymphoprolifération prédominant sur les manifestations fongiques (candidose cutanéo-muqueuse de révélation secondaire). Cette mutation c.1154C>T (p.T385M) est rapporté chez 17 patients (sur 274) dans le papier de Toubiana et al. (Toubiana et al., 2016, voir data supplémentaires). On retrouve parmi ces 17 patients, une auto-immunité chez 6 patients (la plupart du temps une thyroïdite). Les cytopénies auto-immunes, l'existence d'une lymphoprolifération et le détail de l'immunophénotypage et de l'électrophorèse n'est pas disponible pour cette mutation en particulier mais la série rapportée par *Toubiana et al.* montrait une hétérogénéité des caractéristiques des patients porteurs de mutations gain-de-fonction de *STAT1* (49% de patients ayant une lymphopénie B et 28% une lymphopénie T, 3% d'hypogammaglobulinémie mais 20% d'hypergammaglobulinémie).

- Enfin, **les mêmes gènes sont à la fois retrouvés impliqués dans les MAIs systémiques, et dans les DIPs** (*CTLA4*, *BLK*, *IL10*, *NFκB1*). Dans nos cohortes, on peut citer l'exemple des variants retrouvés sur les gènes du complément, variants sur les gènes du cytosquelette, des régulateurs de l'apoptose ou de la régulation de l'expression des gènes par exemple.

Au total, lorsque l'on considère un groupe homogène de patients atteints de DIPs, on ne retrouve pas de corrélation génétique et physiopathologique unique mais **un paysage varié de possibilités** (mutation décrite monogénique, mutation délétère monogénique probable ou possible, schéma plus complexe multigénique).

Lorsque l'on fait le chemin en sens inverse et que l'on part des MAIs, on se retrouve dans une situation comparable. Nos résultats donnent le paysage global des variants génétiques rares que l'on peut retrouver dans ces maladies, mais ne permettent pas de conclure définitivement sur leur causalité (**Figure 67**).

Nous proposons ci-dessous un schéma récapitulatif de l'impact fonctionnel potentiel des variants retrouvés dans les parties I et II de ce travail de thèse :

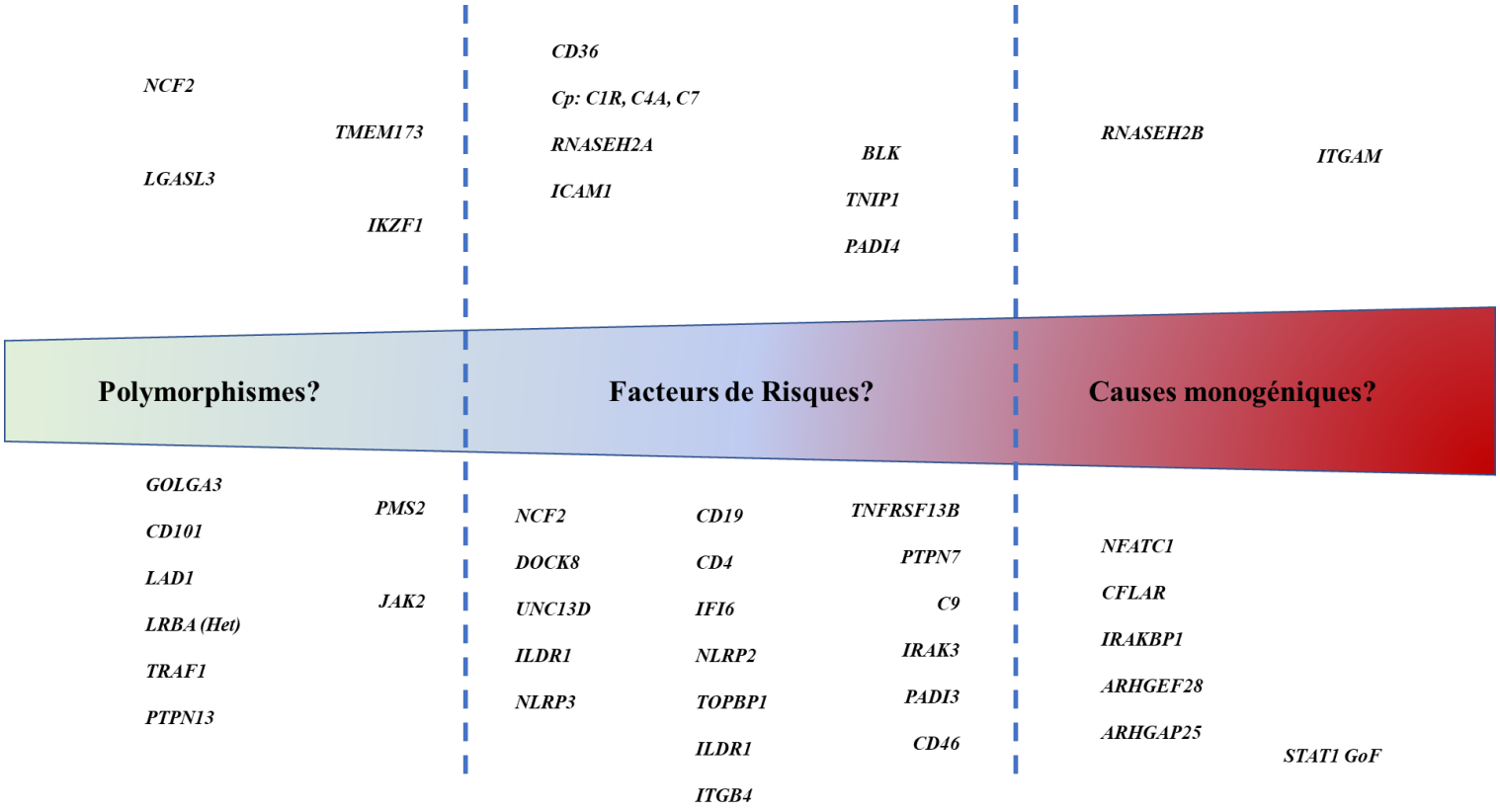


Figure 67 : représentation schématique de la contribution potentielle des variants délétères identifiés par WES et panels NGS dans notre travail de thèse (DICV/CID et Neutropénie ; LES et EVANS).

Il faut rester prudent sur l'interprétation et l'imputabilité des variants rares retrouvés par sequençage haut débit. En effet, le séquençage d'une grande quantité de gènes expose à un risque statistique de retrouver des variants rares et potentiellement délétères, y compris sur des gènes pouvant entrer en corrélation avec le phénotype clinique, et surtout pour les variants hétérozygotes (Kircher et al., 2014; MacArthur et al., 2012). Cela devient encore plus complexe lorsqu'il s'agit de schémas physiopathologiques non classiques (hypothèse multigénique ou multifactorielle par exemple). Dans ce sens, nous pensons que l'utilisation de panels (avec des gènes choisis en fonction du phénotype étudié) peut permettre de réduire le risque d'interprétation abusive d'un variant comme causal puisque l'on restreint l'analyse à un nombre limité de gènes connus ou sélectionnés comme candidats potentiels. Le risque est alors de perdre de nouveaux variants sur de nouveaux gènes. Dans le cas d'une étude de l'exome complet (et a fortiori du génome entier), le recours à des trios et à des analyses de cohortes est nécessaire pour ajouter un niveau supplémentaire de filtres. Le risque étant alors de perdre certains variants de pénétrance incomplète par l'application de filtres de transmission conventionnels.

Il existe un faisceau d'arguments qui conforte les hypothèses selon lesquelles **plusieurs variants (et donc plusieurs gènes) peuvent aboutir à un phénotype identique et/ou se combiner pour aboutir à un nombre restreint de voies physiopathologiques et de mécanismes de rupture de tolérance** :

- L'existence au sein des DIPs de **phénocopies** et de mutations touchant des voies physiopathologiques identiques : on peut citer ici les ALPS et ALPS-*like* (*FAS, FASL, CASP8, CASP10, STAT3 GOF*) et les mutations de *CTLA4/LRBA*.
- Le fait que des mutations sur des gènes différents, dans des voies physiopathologiques différentes, aboutissent à un **nombre restreint d'anomalies immuno-biologiques** : dans le DICV avec complications auto-immunes, on peut citer l'augmentation des lymphocytes B $CD21^{low}CD38^{low}$, l'augmentation des lymphocytes cTFh (et TFh1) ; la signature interféron et les anomalies lymphocytaires B dans le lupus.
- Le fait que des **modèles murins** avec de nombreux gènes différents aboutissent tous à des tableaux cliniques proches (glomérulonéphrites avec dépôts d'immuns complexes) : pour exemple, les souris MRL/lpr (Andrews et al., 1978), NZB/W F1 (Helyer and Howie, 1963), BXSB/Yaa (Murphy and Roths, 1979).

Au sein de cette diversité de voies et de mécanismes menant à l'auto-immunité, il existe des **hypothèses non germinales de régulation de l'expression des gènes** qui doivent être pris en compte lors de l'interprétation des données de séquençage :

- Le **mosaïcisme** et l'acquisition de **mutations somatiques** : Mensa-Vilaro et al. ont ainsi rapporté plusieurs exemples de DIPs causés par un mosaïcisme ou mutation somatique touchant les gènes *BTK, ELANE, IL2RG, NLRP3* ou *NOD2* (Mensa-Vilaró et al., 2018). Un tel phénomène est aussi observé au cours de certains ALPS *(FAS*) et l'une des explications physiopathologiques pourrait être l'avantage sélectif conféré aux cellules ayant acquis la mutation vis-à-vis des autres cellules, permettant le maintien et l'enrichissement d'un pool cellulaire muté (Janda et al., 2016; Rieux-Laucat, 2017).
- Des **phénomènes épigénétiques** : on peut citer l'hypométhylation lymphocytaire T et l'hyperexpression de certains gènes au cours du lupus. Ainsi, certains modèles in vivo de lupus (souris MRL/lpr) présentent une diminution de la méthylation des gènes dans les LT CD4+, associée avec une diminution du transcrit de *DNMT1* (*DNAméthyltransférase 1*). Les patients actifs présentent une activité diminuée de DNMT1 corrélée à une hypométhylation de l'ADN (Pan and Sawalha, 2009). Ces anomalies, pourraient notamment passer par un schéma physiopathologique dépendant d'un défaut de ERK dans les lymphocytes T, comme

l'atteste la diminution de l'activité DNMT1 dans les modèles *in vivo* murins (Sawalha et al., 2008). D'autres gènes tels que *MECP2*, interagissant avec les régions CpG méthylés de l'ADN ont été incriminés au cours du lupus et attestent du rôle de ces mécanismes épignétiques dans la maladie (Koelsch et al., 2013).

- Le rôle des facteurs environnementaux comme la rencontre avec des **agents infectieux** ou **la sénescence.**

Au milieu de cette diversité, que nous apprennent les modèles monogéniques de rupture de tolérance (au cours des DIPs) sur les mécanismes généraux d'auto-immunité ?

Dix à 15% des causes monogéniques des DICV/CIDs de l'adulte sont connus à l'heure actuelle (*Bogaert, D.J.A et al. 2016).* Il reste donc probablement des causes monogéniques rares à déterminer chez les malades (comme l'atteste la **Partie III.** de notre travail). Ainsi, en 2015, Itan Y et al. (Itan and Casanova, 2015a) publiaient une analyse *in silico* de gènes potentiels, sur la base d'un modèle informatique dans les DIPs qui étendait la liste de 229 à 3110 gènes potentiels.

Dans ce contexte, par une approche classique de séquençage de l'exome d'une famille atteint de DIP avec auto-immunité, nous avons mis en évidence un nouveau gène potentiellement responsable de DIP avec auto-immunité. Cependant, lorsque l'on trouve un tel variant sur un gène d'intérêt, l'étape de validation fonctionnelle reste nécessaire et peut se révéler complexe car il convient de faire le lien entre **le gène**, **le variant rare** et potentiellement délétère de ce gène **et le phénotype** observé (DIP/rupture de tolérance).

Pour le DIP, on peut essayer de reproduire in vitro ou in vivo certaines caractéristiques (prolifération, sénescence, apoptose) en transposant la mutation dans des modèles ; mais pour la rupture de tolérance, la validation peut être plus compliquée lorsque le mécanisme sous-jacent n'est pas connu. La mutation, présente dans toutes les cellules de l'individu, peut être responsable de certaines caractéristiques du fait de l'atteinte d'une lignée en particulier (lymphocytes et DIP par exemple) et d'autres traits peuvent être liés à des défauts touchant d'autres cellules (cellules de l'immunité innée par exemple). Ainsi, nos résultats ont pointé le doigt sur **l'implication de la régulation du cytosquelette** dans les mécanismes de tolérance. D'autres DIPs se caractérisent par des anomalies du cytosquelette et s'accompagnent d'auto-immunité (*WASP, DOCK8, ARHGEF1, RASGRP1, ARPC1B*). Le plus emblématique étant le syndrome de Wiskott-Aldrich dans lequel les défauts de fonctionnement du cytosquelette sont impliqués dans des défauts d'inactivation lymphocytaire et d'apoptose, des anomalies de formation de la synapse immunologique et de défaut de *homing*. Dans les défauts de *ARPC1B*, on retrouve des caractéristiques des patients atteints de syndrome de Wiskott-Aldrich (thrombopénie, hyper-IgE, eczema). Il a été montré récemment chez ces patients qu'il existait des anomalies de réorganisation du cytosquelette d'actine dans les lymphocytes T

avec des défauts d'activation et de prolifération et que les lymphocytes T stimulés de ces patients forment des lamelipodes inefficients et des synapses immunologiques défectueuses, expliquant le phénotype (CID) et peut être aussi les mécanismes de rupture de tolérance (Brigida et al.; Kuijpers et al., 2017). Dans le cas d'ACP1, il existe plusieurs interactions protéiques avec des protéines du cytosquelette (DBNL, FCHSD1, LCP2) qui pourraient faire le pont entre ACP1 et les protéines du complexe WAS/Arp2/3 et expliquer une partie des anomalies constatées.

Perspectives :

Les techniques de séquençage haut débit sont très performantes pour identifier des gènes responsables de formes monogéniques de MAIs et de DIPs. C'est par ce biais que nous avons pu identifier *ACP1* comme nouveau gène impliqué dans un phénotype de DIP avec auto-immunité.

Cependant, pour les formes plus complexes ou lorsque l'impact d'une mutation sur le phénotype est plus faible, les outils disponibles actuellement permettent difficilement de remonter le fil qui aboutit à une rupture de tolérance sur la base de variants génétiques isolées, dont le « poids » dans la contribution à un phénotype donné est difficile à estimer.

Les approches de cohorte nous semblent pertinentes pour identifier des mécanismes physiopathologiques partagés. Elles sont probablement perfectibles de différentes façons :

- En enrichissant l'analyse génétique par des **analyses de trios** (c'est-à-dire en incluant les apparentés sains et/ou malades) pour ajouter un niveau supplémentaire de filtre.
- En **augmentant l'échelle** de l'analyse par des collaborations nationales et/ou supra-nationales et en partageant les données de séquençage.
- En validant **sur le plan fonctionnel** les variants retrouvés. Cette tâche n'est pas aisée car les modes de lecture ne sont pas univoques et le point de certitude pour valider la rupture de tolérance n'est pas facile à définir. On peut néanmoins s'aider de différents modèles au laboratoire :
    - *In vitro :* avec l'aide de lignées cellulaires choisies et modifiées par Crispr/cas9 par exemple (lignées tumorales lymphocytaires T ou B).
    - *In vivo* : avec l'aide de modèles murins de DIP ou de MAI (fond génétique connu) et modifié (répression conditionnelle de l'expression de gènes, Crispr/Cas9).

Il est possible que nous puissions ainsi arriver à tester in vitro un grand nombre d'hypothèses sur des lignées cellulaires modifiées par CrisprCas9 avec les variants retrouvés dans les données de séquençages haut débit et que de telles approches permettent de valider des hypothèses multigéniques ou de mosaïcisme par

exemple (Itan and Casanova, 2015b). Néanmoins, des techniques bio-informatiques combinant plusieurs niveaux de lectures (ADN, ARN, Protéine, Epigénome, Microbiome) seront également nécessaires pour progresser sur ce terrain. De tels travaux pourraient aboutir, pour un certain nombre de situations d'auto-immunité, à une approche individualisée des phénotypes cliniques et une déclassification/reclassification des maladies qui gommerait la dichotomie entre maladies multifactorielles et maladies monogéniques auto-immunes. C'est une condition initiale pour envisager une prise en charge « ciblée » et une médecine personnalisée en pathologies auto-immunes (**Figure 68**).

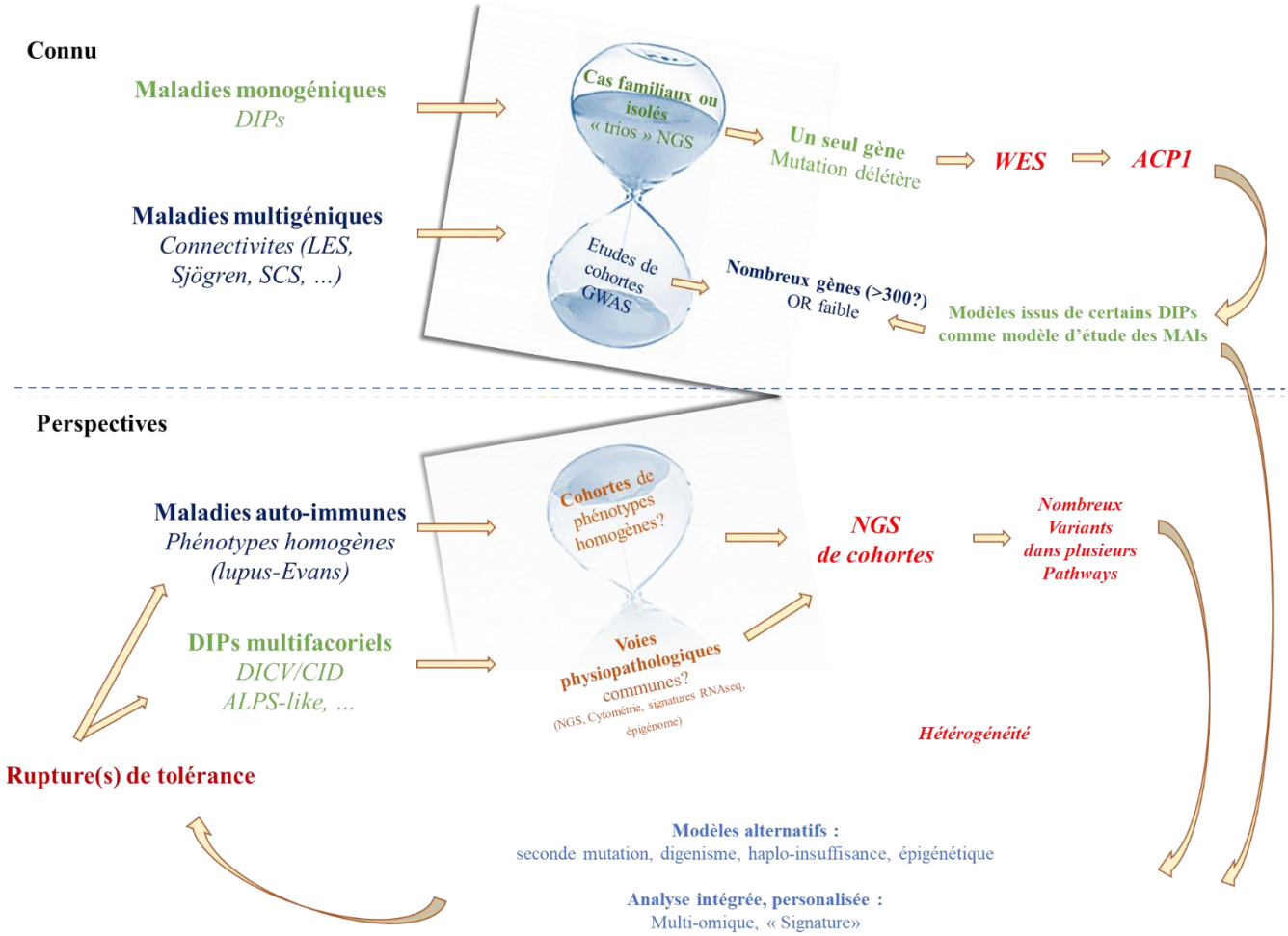


Figure 68 : Schéma récapitulatif et perspectives de l'approche génétique des mécanismes de rupture de tolérance dans les DIPs et les MAIs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdollahpour, H., Appaswamy, G., Kotlarz, D., Diestelhorst, J., Beier, R., Schaffer, A.A., Gertz, E.M., Schambach, A., Kreipe, H.H., Pfeifer, D., et al. (2012). The phenotype of human STK4 deficiency. Blood *119*, 3450–3457.

Addobbati, C., Brandão, L.A.C., Guimarães, R.L., Pancotto, J.A.T., Donadi, E.A., Crovella, S., Segat, L., and Sandrin-Garcia, P. (2013). FYB gene polymorphisms are associated with susceptibility for systemic lupus erythemathosus (SLE). Hum. Immunol. *74*, 1009–1014.

Afzali, B., Grönholm, J., Vandrovcova, J., O'Brien, C., Sun, H.-W., Vanderleyden, I., Davis, F.P., Khoder, A., Zhang, Y., Hegazy, A.N., et al. (2017). BACH2 immunodeficiency illustrates an association between super-enhancers and haploinsufficiency. Nat. Immunol. *18*, 813–823.

Akirav, E.M., Ruddle, N.H., and Herold, K.C. (2011). The role of AIRE in human autoimmune disease. Nat. Rev. Endocrinol. *7*, 25–33.

Alangari, A., Alsultan, A., Adly, N., Massaad, M.J., Kiani, I.S., Aljebreen, A., Raddaoui, E., Almomen, A.-K., Al-Muhsen, S., Geha, R.S., et al. (2012). LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *130*, 481-488.e2.

Alarcón-Riquelme, M.E., Ziegler, J.T., Molineros, J., Howard, T.D., Moreno-Estrada, A., Sánchez-Rodríguez, E., Ainsworth, H.C., Ortiz-Tello, P., Comeau, M.E., Rasmussen, A., et al. (2016). Genome-Wide Association Study in an Amerindian Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *68*, 932–943.

Alho, I., Costa, L., Bicho, M., and Coelho, C. (2016). Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase Slow Isoform Knockdown in MDA-MB-435 Cells Decreases RAW 264.7 Osteoclastic Differentiation. Anticancer Res. *36*, 2227–2232.

Alroqi, F.J., Charbonnier, L.-M., Baris, S., Kiykim, A., Chou, J., Platt, C.D., Algassim, A., Keles, S., Al Saud, B.K., Alkuraya, F.S., et al. (2018). Exaggerated follicular helper T-cell responses in patients with LRBA deficiency caused by failure of CTLA4-mediated regulation. J. Allergy Clin. Immunol. *141*, 1050-1059.e10.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. Science *298*, 1395–1401.

Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J. Exp. Med. *148*, 1198–1215.

Anolik, J.H. (2013). B cell biology: implications for treatment of systemic lupus erythematosus. Lupus *22*, 342–349.

Apelt, N., da Silva, A.P., Ferreira, J., Alho, I., Monteiro, C., Marinho, C., Teixeira, P., Sardinha, L., Laires, M.J., Mascarenhas, M.R., et al. (2009). ACP1 genotype, glutathione reductase activity, and riboflavin uptake affect cardiovascular risk in the obese. Metabolism. *58*, 1415–1423.

Arason, G.J., Jorgensen, G.H., and Ludviksson, B.R. (2010). Primary Immunodeficiency and Autoimmunity: Lessons From Human Diseases. Scand. J. Immunol. *71*, 317–328.

Aricò, M., Boggio, E., Cetica, V., Melensi, M., Orilieri, E., Clemente, N., Cappellano, G., Buttini, S., Soluri, M.F., Comi, C., et al. (2013). Variations of the UNC13D Gene in Patients with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. PLoS ONE *8*, e68045.

Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C.M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. Cell *76*, 947–958.

Au-Yeung, B.B., Deindl, S., Hsu, L.-Y., Palacios, E.H., Levin, S.E., Kuriyan, J., and Weiss, A. (2009). The structure, regulation, and function of ZAP-70. Immunol. Rev. *228*, 41–57.

Bacchelli, C., Moretti, F.A., Carmo, M., Adams, S., Stanescu, H.C., Pearce, K., Madkaikar, M., Gilmour, K.C., Nicholas, A.K., Woods, C.G., et al. (2017). Mutations in linker for activation of T cells (LAT) lead to a novel form of severe combined immunodeficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *139*, 634-642.e5.

Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y.Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., et al. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. Nature *403*, 211–216.

Bader-Meunier, B., Cavé, H., Jeremiah, N., Magerus, A., Lanzarotti, N., Rieux-Laucat, F., and Cormier-Daire, V. (2013). Are RASopathies new monogenic predisposing conditions to the development of systemic lupus erythematosus? Case report and systematic review of the literature. Semin. Arthritis Rheum. *43*, 217–219.

Banchereau, R., Hong, S., Cantarel, B., Baldwin, N., Baisch, J., Edens, M., Cepika, A.-M., Acs, P., Turner, J., Anguiano, E., et al. (2016). Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. Cell *165*, 551–565.

Barzaghi, F., Amaya Hernandez, L.C., Neven, B., Ricci, S., Kucuk, Z.Y., Bleesing, J.J., Nademi, Z., Slatter, M.A., Ulloa, E.R., Shcherbina, A., et al. (2018). Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. J. Allergy Clin. Immunol. *141*, 1036-1049.e5.

Becker-Herman, S., Meyer-Bahlburg, A., Schwartz, M.A., Jackson, S.W., Hudkins, K.L., Liu, C., Sather, B.D., Khim, S., Liggitt, D., Song, W., et al. (2011). WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. J. Exp. Med. *208*, 2033–2042.

Bentham, J., Morris, D.L., Cunninghame Graham, D.S., Pinder, C.L., Tombleson, P., Behrens, T.W., Martín, J., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Chen, L., et al. (2015). Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. *47*, 1457–1464.

Berteau, F., Rouviere, B., Delluc, A., Nau, A., Le Berre, R., Sarrabay, G., Touitou, I., and de Moreuil, C. (2018). Autosomic dominant familial Behçet disease and haploinsufficiency A20: A review of the literature. Autoimmun. Rev. *17*, 809–815.

Besnard, C., Levy, E., Aladjidi, N., Stolzenberg, M.-C., Magerus-Chatinet, A., Alibeu, O., Nitschke, P., Blanche, S., Hermine, O., Jeziorski, E., et al. (2018). Pediatric-onset Evans syndrome: Heterogeneous presentation and high frequency of monogenic disorders including LRBA and CTLA4 mutations. Clin. Immunol. *188*, 52–57.

Blobel, J., Bernadó, P., Xu, H., Jin, C., and Pons, M. (2009). Weak oligomerization of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase is conserved from mammals to bacteria. FEBS J. *276*, 4346–4357.

Bohuslav, J., Kravchenko, V.V., Parry, G.C., Erlich, J.H., Gerondakis, S., Mackman, N., and Ulevitch, R.J. (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. J. Clin. Invest. *102*, 1645–1652.

Boileau, J., Mouillot, G., Gérard, L., Carmagnat, M., Rabian, C., Oksenhendler, E., Pasquali, J.-L., and Korganow, A.-S. (2011). Autoimmunity in common variable immunodeficiency: Correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. J. Autoimmun. *36*, 25–32.

Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S33-40.

Bottini, N., Ronchetti, M.P., Gloria-Bottini, F., and Fontana, L. (1999). Malaria as a possible evolutionary cause of allergy. Allergy *54*, 188–189.

Bottini, N., Stefanini, L., Williams, S., Alonso, A., Jascur, T., Abraham, R.T., Couture, C., and Mustelin, T. (2002a). Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). J. Biol. Chem. *277*, 24220–24224.

Bottini, N., Meloni, G.F., Borgiani, P., Giorgini, A., Buzzetti, R., Pozzilli, P., Lucarelli, P., and Gloria-Bottini, F. (2002b). Genotypes of cytosolic low-molecular-weight protein-tyrosine-phosphatase correlate with age at onset of type 1 diabetes in a sex-specific manner. Metabolism. *51*, 419–422.

Bottini, N., Bottini, E., Gloria-Bottini, F., and Mustelin, T. (2002c). Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *50*, 95–104.

Bottini, N., Ammendola, M., and Gloria-Bottini, F. (2002d). ACP1 is associated with allergy. Allergy *57*, 651–652.

Bottini, N., Gloria-Bottini, F., Amante, A., Saccucci, P., and Bottini, E. (2005). Genetic Polymorphism and Th1/Th2 Orientation. Int. Arch. Allergy Immunol. *138*, 328–333.

Bouafia, A., Lofek, S., Bruneau, J., Chentout, L., Lamrini, H., Trinquand, A., Deau, M.-C., Heurtier, L., Meignin, V., Picard, C., et al. (2018). Loss of ARHGEF1 causes a human primary antibody deficiency. J. Clin. Invest.

Bousfiha, A., Jeddane, L., Al-Herz, W., Ailal, F., Casanova, J.-L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., et al. (2015). The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. J. Clin. Immunol. *35*, 727–738.

Boutboul, D., Kuehn, H.S., Van de Wyngaert, Z., Niemela, J.E., Callebaut, I., Stoddard, J., Lenoir, C., Barlogis, V., Farnarier, C., Vely, F., et al. (2018). Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. J. Clin. Invest. *128*, 3071–3087.

Brigida, I., Zoccolillo, M., and Cicalese, M.P. T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. 14.

Bryson, G.L., Massa, H., Trask, B.J., and Van Etten, R.L. (1995). Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. Genomics *30*, 133–140.

Bucciantini, M., Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, L., Stefani, M., Raugei, G., Nordlund, P., and Ramponi, G. (1999). The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. FEBS Lett. *456*, 73–78.

Burnet, M., and Fenner, F. (1951). The Production of Antibodies (2nd Edition). J. Immunol. 485–486.

Burns, S.O., Zarafov, A., and Thrasher, A.J. (2017). Primary immunodeficiencies due to abnormalities of the actin cytoskeleton: Curr. Opin. Hematol. *24*, 16–22.

Burridge, K., Sastry, S.K., and Sallee, J.L. (2006). Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases. I. Cell-matrix adhesion. J. Biol. Chem. *281*, 15593–15596.

Cairns, A.P., Crockard, A.D., and Bell, A.L. (2001). CD36-mediated apoptotic cell clearance in SLE. Lupus *10*, 656–657.

Cameron, P.U., Jones, P., Gorniak, M., Dunster, K., Paul, E., Lewin, S., Woolley, I., and Spelman, D. (2011). Splenectomy associated changes in IgM memory B cells in an adult spleen registry cohort. PloS One *6*, e23164.

Cantaert, T., Schickel, J.-N., Bannock, J.M., Ng, Y.-S., Massad, C., Oe, T., Wu, R., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., et al. (2015). Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance. Immunity *43*, 884–895.

Cantaert, T., Schickel, J.-N., Bannock, J.M., Ng, Y.-S., Massad, C., Delmotte, F.R., Yamakawa, N., Glauzy, S., Chamberlain, N., Kinnunen, T., et al. (2016). Decreased somatic hypermutation induces an impaired peripheral B cell tolerance checkpoint. J. Clin. Invest. *126*, 4289–4302.

Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pazzagli, L., Cappugi, G., and Ramponi, G. (1994). Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. J. Biol. Chem. *269*, 24878–24882.

Caselli, A., Taddei, M.L., Bini, C., Paoli, P., Camici, G., Manao, G., Cirri, P., and Ramponi, G. (2007). Low molecular weight protein tyrosine phosphatase and caveolin-1: interaction and isoenzyme-dependent regulation. Biochemistry *46*, 6383–6392.

Caselli, A., Paoli, P., Santi, A., Mugnaioni, C., Toti, A., Camici, G., and Cirri, P. (2016). Low molecular weight protein tyrosine phosphatase: Multifaceted functions of an evolutionarily conserved enzyme. Biochim. Biophys. Acta *1864*, 1339–1355.

Castigli, E., Wilson, S., Garibyan, L., Rachid, R., Bonilla, F., Schneider, L., Morra, M., Curran, J., and Geha, R. (2007). Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. Nat. Genet. *39*, 430–431.

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

Catucci, M., Castiello, M.C., Pala, F., Bosticardo, M., and Villa, A. (2012). Autoimmunity in wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. Front. Immunol. *3*, 209.

Cen, H., Leng, R.-X., Wang, W., Zhou, M., Feng, C.-C., Chen, G.-M., Li, R., Pan, H.-F., Li, X.-P., and Ye, D.-Q. (2012). Association of AFF1 rs340630 and AFF3 rs10865035 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. Immunogenetics *64*, 935–938.

Cervera, R., Khamashta, M.A., Font, J., Sebastiani, G.D., Gil, A., Lavilla, P., Mejia, J.C., Aydintug, A.O., Chwalinska-Sadowska, H., de Ramon, E., et al. (2003). Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. Medicine (Baltimore) *82*, 299–308.

Cervera, R., Doria, A., Amoura, Z., Khamashta, M., Schneider, M., Guillemin, F., Maurel, F., Garofano, A., Roset, M., Perna, A., et al. (2014). Patterns of systemic lupus erythematosus expression in Europe. Autoimmun. Rev. *13*, 621–629.

Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. Cell *71*, 649–662.

Chapel, H., Lucas, M., Lee, M., Bjorkander, J., Webster, D., Grimbacher, B., Fieschi, C., Thon, V., Abedi, M.R., and Hammarstrom, L. (2008). Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. Blood *112*, 277–286.

Chapel, H., Lucas, M., Patel, S., Lee, M., Cunningham-Rundles, C., Resnick, E., Gerard, L., and Oksenhendler, E. (2012). Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. J. Allergy Clin. Immunol. *130*, 1197–1198.

Chen, H.-Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I.-C., Lo, K.F.R., Chang, E.-Y., Maverakis, E., Yang, R.-Y., Hsu, D.K., Dustin, M.L., et al. (2009). Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 14496–14501.

Chiarugi, P., Cirri, P., Marra, F., Raugei, G., Fiaschi, T., Camici, G., Manao, G., Romanelli, R.G., and Ramponi, G. (1998). The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. J. Biol. Chem. *273*, 6776–6785.

Chiarugi, P., Taddei, M.L., Cirri, P., Talini, D., Buricchi, F., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., and Ramponi, G. (2000). Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase controls the rate and the strength of NIH-3T3 cells adhesion through its phosphorylation on tyrosine 131 or 132. J. Biol. Chem. *275*, 37619–37627.

Chiarugi, P., Taddei, M.L., Schiavone, N., Papucci, L., Giannoni, E., Fiaschi, T., Capaccioli, S., Raugei, G., and Ramponi, G. (2004). LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. Oncogene *23*, 3905–3914.

Choi, J.H., Park, D.J., Kang, J.H., Yim, Y.R., Lee, K.E., Lee, J.W., Wen, L., Kim, T.J., Park, Y.W., Lee, J.K., et al. (2015). Comparison of clinical and serological differences among juvenile-, adult-, and late-onset systemic lupus erythematosus in Korean patients. Lupus *24*, 1342–1349.

Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., and Mackay, C.R. (2004). T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 68–78.

Cirri, P., Chiarugi, P., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Cappugi, G., and Ramponi, G. (1993). The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. Eur. J. Biochem. *214*, 647–657.

Cirri, P., Caselli, A., Manao, G., Camici, G., Polidori, R., Cappugi, G., and Ramponi, G. (1995). Kinetic studies on rat liver low M(r) phosphotyrosine protein phosphatases. The activation mechanism of the isoenzyme AcP2 by cGMP. Biochim. Biophys. Acta *1243*, 129–135.

Cirri, P., Fiaschi, T., Chiarugi, P., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., and Ramponi, G. (1996). The molecular basis of the differing kinetic behavior of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoforms. J. Biol. Chem. *271*, 2604–2607.

Cirri, P., Chiarugi, P., Taddei, L., Raugei, G., Camici, G., Manao, G., and Ramponi, G. (1998). Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase Tyrosine Phosphorylation by c-Src during Platelet-derived Growth Factor-induced Mitogenesis Correlates with Its Subcellular Targeting. J. Biol. Chem. *273*, 32522–32527.

Clark, A.G., Weston, M.L., and Foster, M.H. (2013). Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. Glycobiology *23*, 893–903.

Cooper, A.R., Lill, G.R., Shaw, K., Carbonaro-Sarracino, D.A., Davila, A., Sokolic, R., Candotti, F., Pellegrini, M., and Kohn, D.B. (2017). Cytoreductive conditioning intensity predicts clonal diversity in ADA-SCID retroviral gene therapy patients. Blood *129*, 2624–2635.

Cooper, G.M., Zerr, T., Kidd, J.M., Eichler, E.E., and Nickerson, D.A. (2008). Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide SNP genotyping. Nat. Genet. *40*, 1199–1203.

Cotsapas, C., Voight, B.F., Rossin, E., Lage, K., Neale, B.M., Wallace, C., Abecasis, G.R., Barrett, J.C., Behrens, T., Cho, J., et al. (2011). Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. PLoS Genet. *7*, e1002254.

Coulter, T.I., Chandra, A., Bacon, C.M., Babar, J., Curtis, J., Screaton, N., Goodlad, J.R., Farmer, G., Steele, C.L., Leahy, T.R., et al. (2016). Clinical spectrum and features of activated PI3-kinase delta syndrome: a large patient cohort study. J. Allergy Clin. Immunol.

Crequer, A., Troeger, A., Patin, E., Ma, C.S., Picard, C., Pedergnana, V., Fieschi, C., Lim, A., Abhyankar, A., Gineau, L., et al. (2012). Human RHOH deficiency causes T cell defects and susceptibility to EV-HPV infections. J. Clin. Invest. *122*, 3239–3247.

Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). Annu. Rev. Immunol. *29*, 621–663.

Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. Immunity *41*, 529–542.

Crow, Y.J., Chase, D.S., Lowenstein Schmidt, J., Szynkiewicz, M., Forte, G.M.A., Gornall, H.L., Oojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., et al. (2015). Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in *TREX1* , *RNASEH2A* , *RNASEH2B* , *RNASEH2C* , *SAMHD1* , *ADAR* , and *IFIH1*. Am. J. Med. Genet. A. *167*, 296–312.

Cunninghame Graham, D.S., Morris, D.L., Bhangale, T.R., Criswell, L.A., Syvänen, A.-C., Rönnblom, L., Behrens, T.W., Graham, R.R., and Vyse, T.J. (2011). Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with Systemic Lupus Erythematosus. PLoS Genet. *7*, e1002341.

Cunningham-Rundles, C., and Bodian, C. (1999). Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin. Immunol. *92*, 34–48.

Cura Daball, P., Ventura Ferreira, M.S., Ammann, S., Klemann, C., Lorenz, M.R., Warthorst, U., Leahy, T.R., Conlon, N., Roche, J., Soler-Palacín, P., et al. (2018). CD57 identifies T cells with functional senescence before terminal differentiation and relative telomere shortening in patients with activated PI3 kinase delta syndrome. Immunol. Cell Biol. *96*, 1060–1071.

Cuss, A.K., Avery, D.T., Cannons, J.L., Yu, L.J., Nichols, K.E., Shaw, P.J., and Tangye, S.G. (2006). Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 1506–1516.

Davanture, S., Leignadier, J., Milani, P., Soubeyran, P., Malissen, B., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.-M., and Boyer, C. (2005). Selective defect in antigen-induced TCR internalization at the immune synapse of CD8 T cells bearing the ZAP-70(Y292F) mutation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 3140–3149.

Davis, J.P., Zhou, M.M., and Van Etten, R.L. (1994). Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase. J. Biol. Chem. *269*, 8734–8740.

Deng, D., Zhang, P., Guo, Y., Tseu, F.L., and Lim, T.O. (2014). A phase 2 trial of allogeneic human umbilical Cord derived mesenchymal stem cell for the treatment of lupus nephritis (cts.gov identifier: NCT 01539902). Lupus *23*, 488.

Deng, X.-M., Yan, S.-X., and Wei, W. (2015). IL-21 acts as a promising therapeutic target in systemic lupus erythematosus by regulating plasma cell differentiation. Cell. Mol. Immunol. *12*, 31–39.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat. Immunol. *2*, 1032–1039.

Di Cristofano, A., Kotsi, P., Peng, Y.F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K.B., and Pandolfi, P.P. (1999). Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. Science *285*, 2122–2125.

Dias, S., Silva, H., Cumano, A., and Vieira, P. (2005). Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. J. Exp. Med. *201*, 971–979.

Diogo, D., Bastarache, L., Liao, K.P., Graham, R.R., Fulton, R.S., Greenberg, J.D., Eyre, S., Bowes, J., Cui, J., Lee, A., et al. (2015). TYK2 Protein-Coding Variants Protect against Rheumatoid Arthritis and Autoimmunity, with No Evidence of Major Pleiotropic Effects on Non-Autoimmune Complex Traits. PLOS ONE *10*, e0122271.

DiPietro, D.L., and Zengerle, F.S. (1967). Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. J. Biol. Chem. *242*, 3391–3395.

Dissing, J., and Johnsen, A.H. (1992). Human red cell acid phosphatase (ACP1): the primary structure of the two pairs of isozymes encoded by the ACP1*A and ACP1*C alleles. Biochim. Biophys. Acta *1121*, 261–268.

Dobbs, K., Domínguez Conde, C., Zhang, S.-Y., Parolini, S., Audry, M., Chou, J., Haapaniemi, E., Keles, S., Bilic, I., Okada, S., et al. (2015). Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. N. Engl. J. Med. *372*, 2409–2422.

Droppelmann, C.A., Wang, J., Campos-Melo, D., Keller, B., Volkening, K., Hegele, R.A., and Strong, M.J. (2013). Detection of a novel frameshift mutation and regions with homozygosis within ARHGEF28 gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. *14*, 444–451.

Dubois, P.C.A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A.R., Adány, R., Aromaa, A., et al. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. Nat. Genet. *42*, 295–302.

Dupuis-Girod, S., Medioni, J., Haddad, E., Quartier, P., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., de Saint Basile, G., Delaunay, J., Schwarz, K., Casanova, J.-L., et al. (2003). Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. Pediatrics *111*, e622-627.

Durandy, A., Revy, P., Imai, K., and Fischer, A. (2005). Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. Immunol. Rev. *203*, 67–79.

Durandy, A., Cantaert, T., Kracker, S., and Meffre, E. (2013). Potential roles of activation-induced cytidine deaminase in promotion or prevention of autoimmunity in humans. Autoimmunity *46*, 148–156.

Dustin, M.L., and Cooper, J.A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. Nat. Immunol. *1*, 23–29.

Ehrlich, P. (1899). Croonian Lecture: On Immunity with Special Reference to Cell Life. Proc R Soc Lond 424–448.

Ehrlich, P., and Morgenroth, J. (1899). Zur Theorie der Lysinwirkung.

Ehrlich, M., Buchanan, K.L., Tsien, F., Jiang, G., Sun, B., Uicker, W., Weemaes, C.M., Smeets, D., Sperling, K., Belohradsky, B.H., et al. (2001). DNA methyltransferase 3B mutations linked to the ICF syndrome cause dysregulation of lymphogenesis genes. Hum. Mol. Genet. *10*, 2917–2931.

Elkaim, E., Neven, B., Bruneau, J., Mitsui-Sekinaka, K., Stanislas, A., Heurtier, L., Lucas, C.L., Matthews, H., Deau, M.-C., Sharapova, S., et al. (2016). Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. J. Allergy Clin. Immunol. *138*, 210-218.e9.

Elwy, M.A., Galal, Z.A., and Hasan, H.E. (2010). Immunoinflammatory markers and disease activity in systemic lupus erythematosus: something old, something new. East. Mediterr. Health J. Rev. Sante Mediterr. Orient. Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit *16*, 893–900.

Evans, B., Tishmack, P.A., Pokalsky, C., Zhang, M., and Van Etten, R.L. (1996). Site-Directed Mutagenesis, Kinetic, and Spectroscopic Studies of the P-Loop Residues in a Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase †. Biochemistry *35*, 13609–13617.

Fang, C.-M., Roy, S., Nielsen, E., Paul, M., Maul, R., Paun, A., Koentgen, F., Raval, F.M., Szomolanyi-Tsuda, E., and Pitha, P.M. (2012). Unique contribution of IRF-5-Ikaros axis to the B-cell IgG2a response. Genes Immun. *13*, 421–430.

Fernandez, I., Zeiser, R., Karsunky, H., Kambham, N., Beilhack, A., Soderstrom, K., Negrin, R.S., and Engleman, E. (2007). CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 2808–2814.

Fevang, B., Yndestad, A., Sandberg, W.J., Holm, A.M., Müller, F., Aukrust, P., and Frøland, S.S. (2007). Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation *in vivo*. Clin. Exp. Immunol. *147*, 521–525.

Fiaschi, T., Chiarugi, P., Buricchi, F., Giannoni, E., Taddei, M.L., Talini, D., Cozzi, G., Zecchi-Orlandini, S., Raugei, G., and Ramponi, G. (2001). Low Molecular Weight Protein-tyrosine Phosphatase Is Involved in Growth Inhibition during Cell Differentiation. J. Biol. Chem. *276*, 49156–49163.

Fischer, A., Provot, J., Jais, J.-P., Alcais, A., Mahlaoui, N., Adoue, D., Aladjidi, N., Amoura, Z., Arlet, P., Armari-Alla, C., et al. (2017). Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 1388-1393.e8.

Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 19396–19401.

Forbes, L.R., Vogel, T.P., Cooper, M.A., Castro-Wagner, J., Schussler, E., Weinacht, K.G., Plant, A.S., Su, H.C., Allenspach, E.J., Slatter, M., et al. (2018). Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. J. Allergy Clin. Immunol. *142*, 1665–1669.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat. Genet. *42*, 1118–1125.

Gardner, J.M., Devoss, J.J., Friedman, R.S., Wong, D.J., Tan, Y.X., Zhou, X., Johannes, K.P., Su, M.A., Chang, H.Y., Krummel, M.F., et al. (2008). Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. Science *321*, 843–847.

Gateva, V., Sandling, J.K., Hom, G., Taylor, K.E., Chung, S.A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R.C., Nordmark, G., et al. (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. *41*, 1228–1233.

Gatto, D., and Brink, R. (2010). The germinal center reaction. J. Allergy Clin. Immunol. *126*, 898–907; quiz 908–909.

Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. J. Exp. Med. *177*, 999–1008.

Gensous, N., Charrier, M., Duluc, D., Contin-Bordes, C., Truchetet, M.-E., Lazaro, E., Duffau, P., Blanco, P., and Richez, C. (2018). T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. Front. Immunol. *9*.

Giannoni, E., Chiarugi, P., Cozzi, G., Magnelli, L., Taddei, M.L., Fiaschi, T., Buricchi, F., Raugei, G., and Ramponi, G. (2003). Lymphocyte function-associated antigen-1-mediated T cell adhesion is impaired by low molecular weight phosphotyrosine phosphatase-dependent inhibition of FAK activity. J. Biol. Chem. *278*, 36763–36776.

Gies, V., Guffroy, A., and Korganow, A.-S. (2017). [Thymic B cells: not simple bystanders of T cell lymphopoiesis]. Med. Sci. MS *33*, 771–778.

Gloria-Bottini, F., Bottini, N., and Bottini, E. (2006). Effect of ACP1*C on Early Life Viability. Hum. Biol. *78*, 365–369.

Gloria-Bottini, F., Saccucci, P., Magrini, A., and Bottini, E. (2010). Is there a role of ACP1-ADA1 genetic complex in immune reaction? Association with T1D and with past malarial morbidity. Am. J. Med. Sci. *340*, 268–270.

Gloria-Bottini, F., Saccucci, P., Manca-Bitti, M.L., Rapini, N., Verrotti, A., Neri, A., Magrini, A., and Bottini, E. (2014). Type 1 diabetes mellitus. Comparison between the association with PTPN22 genotype and the association with ACP1-ADA1 joint genotype. Diabetes Res. Clin. Pract. *106*, e7-9.

Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., Rinchik, E.M., and Russell, L.B. (1991). Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 5528–5532.

Golec, D.P., Henao Caviedes, L.M., and Baldwin, T.A. (2016). RasGRP1 and RasGRP3 Are Required for Efficient Generation of Early Thymic Progenitors. J. Immunol. *197*, 1743–1753.

Gong, Q., Jin, X., Akk, A.M., Foger, N., White, M., Gong, G., Bubeck Wardenburg, J., and Chan, A.C. (2001). Requirement for tyrosine residues 315 and 319 within zeta chain-associated protein 70 for T cell development. J. Exp. Med. *194*, 507–518.

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., and Raphael, K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. Nature *334*, 676–682.

Goodnow, C.C., Cyster, J.G., Hartley, S.B., Bell, S.E., Cooke, M.P., Healy, J.I., Akkaraju, S., Rathmell, J.C., Pogue, S.L., and Shokat, K.P. (1995). Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. Adv. Immunol. *59*, 279–368.

Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature *435*, 590–597.

Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. Nat. Immunol. *11*, 681–688.

Gottrand, G., Courau, T., Thomas-Vaslin, V., Prevel, N., Vazquez, T., Ruocco, M.G., Lambrecht, B., Bellier, B., Colombo, B.M., and Klatzmann, D. (2015). Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1. Immunology *146*, 657–670.

Guffroy, A., Gies, V., Martin, M., and Korganow, A.-S. (2016). [Primary immunodeficiency and autoimmunity]. Rev. Med. Interne.

Guffroy, A., Mourot-Cottet, R., Gérard, L., Gies, V., Lagresle, C., Pouliet, A., Nitschké, P., Hanein, S., Bienvenu, B., Chanet, V., et al. (2017). Neutropenia in Patients with Common Variable Immunodeficiency: a Rare Event Associated with Severe Outcome. J. Clin. Immunol. *37*, 715–726.

Gutierrez-Arcelus, M., Rich, S.S., and Raychaudhuri, S. (2016). Autoimmune diseases — connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. Nat. Rev. Genet. *17*, 160–174.

Haddad, E. (2015). STAT3: too much may be worse than not enough! Blood *125*, 583–584.

Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. Nat. Immunol. *5*, 645–650.

Harley, J.B., Moser, K.L., Gaffney, P.M., and Behrens, T.W. (1998). The genetics of human systemic lupus erythematosus. Curr. Opin. Immunol. *10*, 690–696.

He, C.-F., Liu, Y.-S., Cheng, Y.-L., Gao, J.-P., Pan, T.-M., Han, J.-W., Quan, C., Sun, L.-D., Zheng, H.-F., Zuo, X.-B., et al. (2010). TNIP1, SLC15A4, ETS1, RasGRP3 and IKZF1 are associated with clinical features of systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. Lupus *19*, 1181–1186.

Helyer, B.J., and Howie, J.B. (1963). Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. Nature *197*, 197.

Heurtier, L., Lamrini, H., Chentout, L., Deau, M.-C., Bouafia, A., Rosain, J., Plaza, J.-M., Parisot, M., Dumont, B., Turpin, D., et al. (2017). Mutations in the adaptor-binding domain and associated linker region of p110δ cause Activated PI3K-δ Syndrome 1 (APDS1). Haematologica *102*, e278–e281.

Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T., and Narumiya, S. (2012). Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. Int. Immunol. *24*, 705–717.

Hoek, K.L., Gordy, L.E., Collins, P.L., Parekh, V.V., Aune, T.M., Joyce, S., Thomas, J.W., Van Kaer, L., and Sebzda, E. (2010). Follicular B cell trafficking within the spleen actively restricts humoral immune responses. Immunity *33*, 254–265.

Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L., and Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. Science *298*, 1241–1245.

Hom, G., Graham, R.R., Modrek, B., Taylor, K.E., Ortmann, W., Garnier, S., Lee, A.T., Chung, S.A., Ferreira, R.C., Pant, P.V.K., et al. (2008). Association of Systemic Lupus Erythematosus with *C8orf13–BLK* and *ITGAM–ITGAX*. N. Engl. J. Med. *358*, 900–909.

Hoshino, A., Okada, S., Yoshida, K., Nishida, N., Okuno, Y., Ueno, H., Yamashita, M., Okano, T., Tsumura, M., Nishimura, S., et al. (2017). Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 223–231.

Hu, S., Wen, L., Hu, X., Yin, X., Cui, Y., Yang, S., and Zhang, X. (2013). IKZF1: a critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus? Mod. Rheumatol. *23*, 205–209.

Humblet-Baron, S., Sather, B., Anover, S., Becker-Herman, S., Kasprowicz, D.J., Khim, S., Nguyen, T., Hudkins-Loya, K., Alpers, C.E., Ziegler, S.F., et al. (2007). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. J. Clin. Invest. *117*, 407–418.

Iannaccone, U., Bergamaschi, A., Magrini, A., Marino, G., Bottini, N., Lucarelli, P., Bottini, E., and Gloria-Bottini, F. (2005). Serum glucose concentration and ACP1 genotype in healthy adult subjects. Metabolism *54*, 891–894.

Ichikawa, E., Furuta, J., Kawachi, Y., Imakado, S., and Otsuka, F. (2001). Hereditary complement (C9) deficiency associated with dermatomyositis. Br. J. Dermatol. *144*, 1080–1083.

Igarashi, K., Kurosaki, T., and Roychoudhuri, R. (2017). BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. *17*, 437–450.

Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J.-I., Mizutani, S., Ochs, H.D., and Nonoyama, S. (2004). Clinical course of patients with WASP gene mutations. Blood *103*, 456–464.

Itan, Y., and Casanova, J.-L. (2015a). Novel primary immunodeficiency candidate genes predicted by the human gene connectome. Front. Immunol. *6*, 142.

Itan, Y., and Casanova, J.-L. (2015b). Can the impact of human genetic variations be predicted? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 11426–11427.

Jacobson, D.L., Gange, S.J., Rose, N.R., and Graham, N.M. (1997). Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. Clin. Immunol. Immunopathol. *84*, 223–243.

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. Immunity *42*, 1159–1170.

Jacquemin, C., Augusto, J.-F., Scherlinger, M., Gensous, N., Forcade, E., Douchet, I., Levionnois, E., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., et al. (2018). OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE. JCI Insight *3*.

Janda, A., Schwarz, K., van der Burg, M., Vach, W., Ijspeert, H., Lorenz, M.R., Elgizouli, M., Pieper, K., Fisch, P., Hagel, J., et al. (2016). Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. Blood *127*, 2193–2202.

Janssen, E., Morbach, H., Ullas, S., Bannock, J.M., Massad, C., Menard, L., Barlan, I., Lefranc, G., Su, H., Dasouki, M., et al. (2014). Dedicator of cytokinesis 8–deficient patients have a breakdown in peripheral B-cell tolerance and defective regulatory T cells. J. Allergy Clin. Immunol. *134*, 1365–1374.

Järvinen, P., and Aho, K. (1994). Twin studies in rheumatic diseases. Semin. Arthritis Rheum. *24*, 19–28.

Javierre, B.M., Fernandez, A.F., Richter, J., Al-Shahrour, F., Martin-Subero, J.I., Rodriguez-Ubreva, J., Berdasco, M., Fraga, M.F., O'Hanlon, T.P., Rider, L.G., et al. (2010). Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. Genome Res. *20*, 170–179.

Jin, B., Tao, Q., Peng, J., Soo, H.M., Wu, W., Ying, J., Fields, C.R., Delmas, A.L., Liu, X., Qiu, J., et al. (2008). DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. Hum. Mol. Genet. *17*, 690–709.

Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., et al. (2012). Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. Nat. Genet. *44*, 676–680.

Junien, C., Kaplan, J.C., Serville, F., and Lenoir, G. (1979). Triplex gene dosage effect of TPI and G3PD in a human lymphoblastoid cell line with partial trisomy 12p13 and 18p. Hum. Genet. *49*, 221–223.

Jury, E.C., Flores-Borja, F., Kalsi, H.S., Lazarus, M., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2010). Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Eur. J. Immunol. *40*, 569–578.

Kang, E.H., Moon, K.C., Lee, E.Y., Lee, Y.J., Lee, E.B., Ahn, C., and Song, Y.W. (2009). Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis. Lupus *18*, 22–28.

Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., et al. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. Nature *459*, 712–716.

Kato, M., Atsumi, T., Oku, K., Amengual, O., Nakagawa, H., Fujieda, Y., Otomo, K., Horita, T., Yasuda, S., and Koike, T. (2013). The involvement of CD36 in monocyte activation by antiphospholipid antibodies. Lupus *22*, 761–771.

Kaustio, M., Haapaniemi, E., Göös, H., Hautala, T., Park, G., Syrjänen, J., Einarsdottir, E., Sahu, B., Kilpinen, S., Rounioja, S., et al. (2017). Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 782–796.

Keenan, R.A., De Riva, A., Corleis, B., Hepburn, L., Licence, S., Winkler, T.H., and Mårtensson, I.-L. (2008). Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. Science *321*, 696–699.

Keller, B., Cseresnyes, Z., Stumpf, I., Wehr, C., Fliegauf, M., Bulashevska, A., Usadel, S., Grimbacher, B., Rizzi, M., Eibel, H., et al. (2016). Disturbed canonical nuclear factor of κ light chain signaling in B cells of patients with common variable immunodeficiency. J. Allergy Clin. Immunol.

Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M., and Atkinson, J.P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. Nature *421*, 388–392.

Kikawa, K.D., Vidale, D.R., Van Etten, R.L., and Kinch, M.S. (2002). Regulation of the EphA2 Kinase by the Low Molecular Weight Tyrosine Phosphatase Induces Transformation. J. Biol. Chem. *277*, 39274–39279.

Kim, C.J., Lee, C.-G., Jung, J.-Y., Ghosh, A., Hasan, S.N., Hwang, S.-M., Kang, H., Lee, C., Kim, G.-C., Rudra, D., et al. (2019). The Transcription Factor Ets1 Suppresses T Follicular Helper Type 2 Cell Differentiation to Halt the Onset of Systemic Lupus Erythematosus. Immunity *50*, 272.

Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O'Roak, B.J., Cooper, G.M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. Nat. Genet. *46*, 310–315.

Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., et al. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. J. Exp. Med. *207*, 299–308.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. Nat. Rev. Immunol. *9*, 833–844.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). Nat. Rev. Immunol. *14*, 377–391.

Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J. Exp. Med. *188*, 1679–1689.

Koelsch, K.A., Webb, R., Jeffries, M., Dozmorov, M.G., Frank, M.B., Guthridge, J.M., James, J.A., Wren, J.D., and Sawalha, A.H. (2013). Functional characterization of the MECP2/IRAK1 lupus risk haplotype in human T cells and a human MECP2 transgenic mouse. J. Autoimmun. *41*, 168–174.

Köhler, F., Hug, E., Eschbach, C., Meixlsperger, S., Hobeika, E., Kofer, J., Wardemann, H., and Jumaa, H. (2008). Autoreactive B Cell Receptors Mimic Autonomous Pre-B Cell Receptor Signaling and Induce Proliferation of Early B Cells. Immunity *29*, 912–921.

Koul, A., Herget, T., Klebl, B., and Ullrich, A. (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 189–202.

Krammer, P.H., Arnold, R., and Lavrik, I.N. (2007). Life and death in peripheral T cells. Nat. Rev. Immunol. *7*, 532–542.

Kräutler, N.J., Suan, D., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J.R., Chan, T.D., Sundling, C., Kaplan, W., Schofield, P., Jackson, J., et al. (2017). Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. J. Exp. Med. jem.20161533.

Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E.K., Niemela, J.E., Avery, D.T., Schickel, J.-N., Tran, D.Q., Stoddard, J., Zhang, Y., et al. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. Science *345*, 1623–1627.

Kuehn, H.S., Boisson, B., Cunningham-Rundles, C., Reichenbach, J., Stray-Pedersen, A., Gelfand, E.W., Maffucci, P., Pierce, K.R., Abbott, J.K., Voelkerding, K.V., et al. (2016). Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. N. Engl. J. Med. *374*, 1032–1043.

Kuijpers, T.W., Tool, A.T.J., van der Bijl, I., de Boer, M., van Houdt, M., de Cuyper, I.M., Roos, D., van Alphen, F., van Leeuwen, K., Cambridge, E.L., et al. (2017). Combined immunodeficiency with severe inflammation and allergy caused by ARPC1B deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 273-277.e10.

Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., et al. (2005). Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 1862–1870.

Kuwahara, M., Ise, W., Ochi, M., Suzuki, J., Kometani, K., Maruyama, S., Izumoto, M., Matsumoto, A., Takemori, N., Takemori, A., et al. (2016). Bach2–Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. Nat. Commun. *7*, 12596.

Lagresle-Peyrou, C., Luce, S., Ouchani, F., Soheili, T.S., Sadek, H., Chouteau, M., Durand, A., Pic, I., Majewski, J., Brouzes, C., et al. (2016). X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. J. Allergy Clin. Immunol.

Lamoureux, J.L., Watson, L.C., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., and Feeney, A.J. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. J. Exp. Med. *204*, 2853–2864.

Lartigue, A., Colliou, N., Calbo, S., François, A., Jacquot, S., Arnoult, C., Tron, F., Gilbert, D., and Musette, P. (2009). Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in lpr mutation-induced mouse lupus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 6207–6216.

Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. PloS One *8*, e75319.

LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. Blood *112*, 1570–1580.

Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., and Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Science *289*, 2350–2354.

Lemoine, R., Pachlopnik-Schmid, J., Farin, H.F., Bigorgne, A., Debré, M., Sepulveda, F., Héritier, S., Lemale, J., Talbotec, C., Rieux-Laucat, F., et al. (2014). Immune deficiency–related enteropathy-lymphocytopenia-alopecia syndrome results from tetratricopeptide repeat domain 7A deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *134*, 1354-1364.e6.

Lessard, C.J., Adrianto, I., Kelly, J.A., Kaufman, K.M., Grundahl, K.M., Adler, A., Williams, A.H., Gallant, C.J., Anaya, J.-M., Bae, S.-C., et al. (2011). Identification of a Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility Locus at 11p13 between PDHX and CD44 in a Multiethnic Study. Am. J. Hum. Genet. *88*, 83–91.

Li, Y., Chen, S., Li, P., Wu, Z., Li, J., Liu, B., Zhang, F., and Li, Y. (2015). Association of the IRF5 rs2070197 polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Clin. Rheumatol. *34*, 1495–1501.

Lian, L.-H., Ching, A.-S., Chong, Z.-Y., and Chua, K.-H. (2012). Complement components 2 and 7 (C2 and C7) gene polymorphisms are not major risk factors for SLE susceptibility in the Malaysian population. Rheumatol. Int. *32*, 3665–3668.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. J. Exp. Med. *194*, 127–134.

Lioger, B., Rollin, J., Vayne, C., Perret-Gallix, K., Pouplard, C., Godeau, B., Michel, M., and Gruel, Y. (2016). No impact of PTPN22, PTPRJ and ACP1 genes polymorphisms on the risk of immune thrombocytopenia in French adult patients. Thromb. Res. *144*, 76–78.

Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J.M., Marsh, R., et al. (2015). AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. Science *349*, 436–440.

Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C.M., Phadwal, K., Simon, A.K., Moutschen, M., Etzioni, A., Mory, A., et al. (2012). Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. Am. J. Hum. Genet. *90*, 986–1001.

Luo, J., Niu, X., Liu, H., Zhang, M., Chen, M., and Deng, S. (2013). Up-regulation of transcription factor Blimp1 in systemic lupus erythematosus. Mol. Immunol. *56*, 574–582.

Luo, Y., Kwon, H.-J., Montano, S., Georgiadis, M., Goebl, M.G., and Harrington, M.A. (2007). Phosphorylation of SIMPL modulates RelA-associated NF-κB-dependent transcription. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. *292*, C1013–C1023.

Ma, A., and Malynn, B.A. (2012). A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. Nat. Rev. Immunol. *12*, 774–785.

Ma, C.S., and Phan, T.G. (2017). Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. Immunology *152*, 382–387.

Ma, C.S., Wong, N., Rao, G., Avery, D.T., Torpy, J., Hambridge, T., Bustamante, J., Okada, S., Stoddard, J.L., Deenick, E.K., et al. (2015). Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. J. Allergy Clin. Immunol. *136*, 993-1006.e1.

MacArthur, D.G., Balasubramanian, S., Frankish, A., Huang, N., Morris, J., Walter, K., Jostins, L., Habegger, L., Pickrell, J.K., Montgomery, S.B., et al. (2012). A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. Science *335*, 823–828.

Magerus-Chatinet, A., Neven, B., Stolzenberg, M.-C., Daussy, C., Arkwright, P.D., Lanzarotti, N., Schaffner, C., Cluet-Dennetiere, S., Haerynck, F., Michel, G., et al. (2011). Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. J. Clin. Invest. *121*, 106–112.

Magnan, A., Di Bartolo, V., Mura, A.M., Boyer, C., Richelme, M., Lin, Y.L., Roure, A., Gillet, A., Arrieumerlou, C., Acuto, O., et al. (2001). T cell development and T cell responses in mice with mutations affecting tyrosines 292 or 315 of the ZAP-70 protein tyrosine kinase. J. Exp. Med. *194*, 491–505.

Malphettes, M., Gérard, L., Carmagnat, M., Mouillot, G., Vince, N., Boutboul, D., Bérezné, A., Nove- Josserand, R., Lemoing, V., Tetu, L., et al. (2009). Late- Onset Combined Immune Deficiency: A Subset of Common Variable Immunodeficiency with Severe T Cell Defect. Clin. Infect. Dis. *49*, 1329–1338.

Mancini, F., Rigacci, S., Berti, A., Balduini, C., and Torti, M. (2007). The low-molecular-weight phosphotyrosine phosphatase is a negative regulator of FcgammaRIIA-mediated cell activation. Blood *110*, 1871–1878.

Mao, H., Yang, W., Latour, S., Yang, J., Winter, S., Zheng, J., Ni, K., Lv, M., Liu, C., Huang, H., et al. (2018). RASGRP1 mutation in autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. J. Allergy Clin. Immunol. *142*, 595-604.e16.

Marschall, K., Hoernes, M., Bitzenhofer-Grüber, M., Jandus, P., Duppenthaler, A., Wuillemin, W.A., Rischewski, J., Boyman, O., Heininger, U., Hauser, T., et al. (2015). The Swiss National Registry for Primary Immunodeficiencies: report on the first 6 years' activity from 2008 to 2014: The Swiss National Registry for Primary Immunodeficiencies. Clin. Exp. Immunol. *182*, 45–50.

Martin, J.-E., Assassi, S., Diaz-Gallo, L.-M., Broen, J.C., Simeon, C.P., Castellvi, I., Vicente-Rabaneda, E., Fonollosa, V., Ortego-Centeno, N., González-Gay, M.A., et al. (2013). A systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus pan-meta-GWAS reveals new shared susceptibility loci. Hum. Mol. Genet. *22*, 4021–4029.

Martin, M., Guffroy, A., Argemi, X., and Martin, T. (2017). Lupus érythémateux systémique et lymphopénie : aspects cliniques et physiopathologiques. Rev. Médecine Interne *38*, 603–613.

Martinez-Gallo, M., Radigan, L., Almejún, M.B., Martínez-Pomar, N., Matamoros, N., and Cunningham-Rundles, C. (2013). TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 468–476.

Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Aire. Annu. Rev. Immunol. *27*, 287–312.

Matsushita, M., Tsuchiya, N., Oka, T., Yamane, A., and Tokunaga, K. (2000). New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Genes Immun. *1*, 428–434.

Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. Nat. Immunol. *1*, 379–385.

Meinl, E., Lengenfelder, D., Blank, N., Pirzer, R., Barata, L., and Hivroz, C. (2000). Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 3578–3583.

Mensa-Vilaró, A., Bravo García-Morato, M., de la Calle-Martin, O., Franco-Jarava, C., Martínez-Saavedra, M.T., González-Granado, L.I., González-Roca, E., Fuster, J.L., Alsina, L., Mutchinick, O.M., et al. (2018). Unexpected relevant role of gene mosaicism in patients with primary immunodeficiency diseases. J. Allergy Clin. Immunol.

Mesin, L., Ersching, J., and Victora, G.D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. Immunity *45*, 471–482.

Meyer-Bahlburg, A., Becker-Herman, S., Humblet-Baron, S., Khim, S., Weber, M., Bouma, G., Thrasher, A.J., Batista, F.D., and Rawlings, D.J. (2008). Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. Blood *112*, 4158–4169.

Meyers, G., Ng, Y.-S., Bannock, J.M., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., Kilic, S.S., Aksu, G., Debré, M., Rieux-Laucat, F., et al. (2011). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 11554–11559.

Meyts, I., Bosch, B., Bolze, A., Boisson, B., Itan, Y., Belkadi, A., Pedergnana, V., Moens, L., Picard, C., Cobat, A., et al. (2016). Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. J. Allergy Clin. Immunol. *138*, 957–969.

Milner, J.D., Vogel, T.P., Forbes, L., Ma, C.A., Stray-Pedersen, A., Niemela, J.E., Lyons, J.J., Engelhardt, K.R., Zhang, Y., Topcagic, N., et al. (2015). Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. Blood *125*, 591–599.

Modesti, A., Marzocchini, R., Raugei, G., Chiti, F., Sereni, A., Magherini, F., and Ramponi, G. (1998). Cloning, expression and characterisation of a new human low Mr phosphotyrosine protein phosphatase originating by alternative splicing. FEBS Lett. *431*, 111–115.

Morbach, H., Schickel, J.-N., Cunningham-Rundles, C., Conley, M.E., Reisli, I., Franco, J.L., and Meffre, E. (2016). CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 889-898.e6.

Morris, D.L., Sheng, Y., Zhang, Y., Wang, Y.-F., Zhu, Z., Tombleson, P., Chen, L., Cunninghame Graham, D.S., Bentham, J., Roberts, A.L., et al. (2016). Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. *48*, 940–946.

Moulding, D.A., Record, J., Malinova, D., and Thrasher, A.J. (2013). Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. Immunol. Rev. *256*, 282–299.

Mullighan, C.G., Fanning, G.C., Chapel, H.M., and Welsh, K.I. (1997). TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *159*, 6236–6241.

Murphy, E.D., and Roths, J.B. (1979). A y chromosome associated factor in strain bxsb producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. Arthritis Rheum. *22*, 1188–1194.

Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. Mol. Immunol. *41*, 687–700.

Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. Nature *429*, 566–571.

Nagata, S., and Suda, T. (1995). Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol. Today *16*, 39–43.

Napolioni, V., Murray, D.R., Comings, D.E., Peters, W.R., Gade-Andavolu, R., and MacMurray, J. (2014). Interaction between infectious diseases and personality traits: ACP1*C as a potential mediator. Infect. Genet. Evol. *26*, 267–273.

Naramura, M., Jang, I.-K., Kole, H., Huang, F., Haines, D., and Gu, H. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. Nat. Immunol. *3*, 1192–1199.

Nath, S.K., Han, S., Kim-Howard, X., Kelly, J.A., Viswanathan, P., Gilkeson, G.S., Chen, W., Zhu, C., McEver, R.P., Kimberly, R.P., et al. (2008). A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. Nat. Genet. *40*, 152–154.

Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., and Loh, D.Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. Nature *376*, 435–438.

Nehme, N.T., Schmid, J.P., Debeurme, F., André-Schmutz, I., Lim, A., Nitschke, P., Rieux-Laucat, F., Lutz, P., Picard, C., Mahlaoui, N., et al. (2012). MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. Blood *119*, 3458–3468.

Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat. Rev. Immunol. *6*, 728–740.

Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat. Rev. Immunol. *17*, 281–294.

Nemazee, D., and Weigert, M. (2000). Revising B Cell Receptors. J. Exp. Med. *191*, 1813–1818.

Neven, B., Magerus-Chatinet, A., Florkin, B., Gobert, D., Lambotte, O., De Somer, L., Lanzarotti, N., Stolzenberg, M.-C., Bader-Meunier, B., Aladjidi, N., et al. (2011). A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. Blood *118*, 4798–4807.

Nielsen, C.T., Lood, C., Østergaard, O., Iversen, L.V., Voss, A., Bengtsson, A., Jacobsen, S., and Heegaard, N.H.H. (2014). Plasma levels of galectin-3-binding protein reflect type I interferon activity and are increased in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus Sci. Med. *1*, e000026.

Niewold, T.B. (2015). Advances in lupus genetics. Curr. Opin. Rheumatol. *27*, 440–447.

Nikolov, N.P., Shimizu, M., Cleland, S., Bailey, D., Aoki, J., Strom, T., Schwartzberg, P.L., Candotti, F., and Siegel, R.M. (2010). Systemic autoimmunity and defective Fas ligand secretion in the absence of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. Blood *116*, 740–747.

Nowak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J., and Smith, J.M. (1997). Evolution of genetic redundancy. Nature *388*, 167–171.

Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. (2006). Plasmacytic Transcription Factor Blimp-1 Is Repressed by Bach2 in B Cells. J. Biol. Chem. *281*, 38226–38234.

Okada, Y., Shimane, K., Kochi, Y., Tahira, T., Suzuki, A., Higasa, K., Takahashi, A., Horita, T., Atsumi, T., Ishii, T., et al. (2012). A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus eyrthematosus in Japanese. PLoS Genet. *8*, e1002455.

Okkenhaug, K., and Vanhaesebroeck, B. (2003). PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. Nat. Rev. Immunol. *3*, 317–330.

Pahwa, R.N. (1988). New and controversial uses of intravenous gamma-globulin. Pediatr. Infect. Dis. J. *7*, S34–S36.

Pan, Y., and Sawalha, A.H. (2009). Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Transl. Res. J. Lab. Clin. Med. *153*, 4–10.

Pantelouris, E.M. (1968). Absence of Thymus in a Mouse Mutant. Nature *217*, 370–371.

Parameswaran, N., and Gupta, N. (2013). Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration. Immunol. Rev. *256*, 63–79.

Park, J., Munagala, I., Xu, H., Blankenship, D., Maffucci, P., Chaussabel, D., Banchereau, J., Pascual, V., and Cunningham-Rundles, C. (2013). Interferon Signature in the Blood in Inflammatory Common Variable Immune Deficiency. PLoS ONE *8*, e74893.

Parkes, M., Cortes, A., van Heel, D.A., and Brown, M.A. (2013). Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. Nat. Rev. Genet. *14*, 661–673.

Patel, S., and Jin, L. (2019). TMEM173 variants and potential importance to human biology and disease. Genes Immun. *20*, 82–89.

Patton, D.T., Garden, O.A., Pearce, W.P., Clough, L.E., Monk, C.R., Leung, E., Rowan, W.C., Sancho, S., Walker, L.S.K., Vanhaesebroeck, B., et al. (2006). Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 6598–6602.

Pelosi, M., Di Bartolo, V., Mounier, V., Mège, D., Pascussi, J.M., Dufour, E., Blondel, A., and Acuto, O. (1999). Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. J. Biol. Chem. *274*, 14229–14237.

Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., Chatila, T., Crow, Y.J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., et al. (2018). International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. J. Clin. Immunol. *38*, 96–128.

Poliani, P.L., Fontana, E., Roifman, C.M., and Notarangelo, L.D. (2013). ζ Chain-associated protein of 70 kDa (ZAP70) deficiency in human subjects is associated with abnormalities of thymic stromal cells: Implications for T-cell tolerance. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 597-600.e1-2.

Price, S., Shaw, P.A., Seitz, A., Joshi, G., Davis, J., Niemela, J.E., Perkins, K., Hornung, R.L., Folio, L., Rosenberg, P.S., et al. (2014). Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. Blood *123*, 1989–1999.

Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., et al. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. J. Exp. Med. *207*, 291–297.

Punwani, D., Pelz, B., Yu, J., Arva, N.C., Schafernak, K., Kondratowicz, K., Makhija, M., and Puck, J.M. (2015). Coronin-1A: immune deficiency in humans and mice. J. Clin. Immunol. *35*, 100–107.

Ramponi, G., Ruggiero, M., Raugei, G., Berti, A., Modesti, A., Degl'Innocenti, D., Magnelli, L., Pazzagli, C., Chiarugi, V.P., and Camici, G. (1992). Overexpression of a synthetic phosphotyrosine protein phosphatase gene inhibits normal and transformed cell growth. Int. J. Cancer *51*, 652–656.

Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kämpe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., and Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. Hum. Mol. Genet. *11*, 397–409.

Rao, N., Lupher, M.L., Ota, S., Reedquist, K.A., Druker, B.J., and Band, H. (2000). The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *164*, 4616–4626.

Record, J., Malinova, D., Zenner, H.L., Plagnol, V., Nowak, K., Syed, F., Bouma, G., Curtis, J., Gilmour, K., Cale, C., et al. (2015). Immunodeficiency and severe susceptibility to bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1. Blood *126*, 1527–1535.

Reiss, A.B., Wan, D.W., Anwar, K., Merrill, J.T., Wirkowski, P.A., Shah, N., Cronstein, B.N., Chan, E.S.L., and Carsons, S.E. (2009). A BRIEF COMMUNICATION: Enhanced CD36 Scavenger Receptor Expression in THP-1 Human Monocytes in the Presence of Lupus Plasma: Linking Autoimmunity and Atherosclerosis. Exp. Biol. Med. *234*, 354–360.

Resnick, E.S., Moshier, E.L., Godbold, J.H., and Cunningham-Rundles, C. (2012). Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. Blood *119*, 1650–1657.

Rieux-Laucat, F. (2017). What's up in the ALPS. Curr. Opin. Immunol. *49*, 79–86.

Rigacci, S., Rovida, E., Sbarba, P.D., and Berti, A. (2002). Low M_r Phosphotyrosine Protein Phosphatase Associates and Dephosphorylates p125 Focal Adhesion Kinase, Interfering with Cell Motility and Spreading. J. Biol. Chem. *277*, 41631–41636.

Rigacci, S., Talini, D., and Berti, A. (2003). LMW-PTP associates and dephosphorylates STAT5 interacting with its C-terminal domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *312*, 360–366.

Rodríguez-Cortez, V.C., Del Pino-Molina, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ciudad, L., Gómez-Cabrero, D., Company, C., Urquiza, J.M., Tegnér, J., Rodríguez-Gallego, C., López-Granados, E., et al. (2015). Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. Nat. Commun. *6*, 7335.

Romberg, N., Chamberlain, N., Saadoun, D., Gentile, M., Kinnunen, T., Ng, Y.S., Virdee, M., Menard, L., Cantaert, T., Morbach, H., et al. (2013). CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. J. Clin. Invest. *123*, 4283–4293.

Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., et al. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J. Exp. Med. *194*, 1639–1647.

Ruggiero, M., Pazzagli, C., Rigacci, S., Magnelli, L., Raugei, G., Berti, A., Chiarugi, V.P., Pierce, J.H., Camici, G., and Ramponi, G. (1993). Negative growth control by a novel low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase in normal and transformed cells. FEBS Lett. *326*, 294–298.

Ruiz-Larrañaga, O., Migliorini, P., Uribarri, M., Czirják, L., Alcaro, M.C., Del Amo, J., Iriondo, M., Manzano, C., Escorza-Treviño, S., and Estonba, A. (2016). Genetic association study of systemic lupus erythematosus and disease subphenotypes in European populations. Clin. Rheumatol. *35*, 1161–1168.

Sabry, A., Sheashaa, H., El-Husseini, A., El-Dahshan, K., Abdel-Rahim, M., and Elbasyouni, S.R. (2007). Intercellular adhesion molecules in systemic lupus erythematosus patients with lupus nephritis. Clin. Rheumatol. *26*, 1819–1823.

Saghiri, R., Ghashghai, N., Movaseghi, S., Poursharifi, P., Jalilfar, S., Bidhendi, M.A., Ghazizadeh, L., and Ebrahimi-Rad, M. (2012). Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern. Rheumatol. Int. *32*, 1633–1638.

Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., et al. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature *426*, 454–460.

Salzer, E., Cagdas, D., Hons, M., Mace, E.M., Garncarz, W., Petronczki, Ö.Y., Platzer, R., Pfajfer, L., Bilic, I., Ban, S.A., et al. (2016). RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. Nat. Immunol. *17*, 1352–1360.

Salzer, U., Chapel, H.M., Webster, A.D.B., Pan-Hammarström, Q., Schmitt-Graeff, A., Schlesier, M., Peter, H.H., Rockstroh, J.K., Schneider, P., Schäffer, A.A., et al. (2005). Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. Nat. Genet. *37*, 820–828.

Sansom, S.N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I.C., Deadman, M.E., Heger, A., Ponting, C.P., and Holländer, G.A. (2014). Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. Genome Res. *24*, 1918–1931.

Sari, R.A., Taysi, S., Erdem, F., Yilmaz, O., Keleş, S., Kiziltunç, A., Odabaş, A.R., and Cetinkaya, R. (2002). Correlation of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 with disease activity in systemic lupus erythematosus. Rheumatol. Int. *21*, 149–152.

Sawalha, A.H., Jeffries, M., Webb, R., Lu, Q., Gorelik, G., Ray, D., Osban, J., Knowlton, N., Johnson, K., and Richardson, B. (2008). Defective T-cell ERK signaling induces interferon-regulated gene expression and overexpression of methylation-sensitive genes similar to lupus patients. Genes Immun. *9*, 368–378.

Schickel, J.-N., Pasquali, J.-L., Soley, A., Knapp, A.-M., Decossas, M., Kern, A., Fauny, J.-D., Marcellin, L., Korganow, A.-S., Martin, T., et al. (2012). Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity: Role of Carabin in B cells and autoimmunity. EMBO Mol. Med. *4*, 1261–1275.

Schleich, K., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2013). The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC. Cell Cycle Georget. Tex *12*, 193–194.

Schober, T., Magg, T., Laschinger, M., Rohlfs, M., Linhares, N.D., Puchalka, J., Weisser, T., Fehlner, K., Mautner, J., Walz, C., et al. (2017). A human immunodeficiency syndrome caused by mutations in CARMIL2. Nat. Commun. *8*, 14209.

Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T.Z., Wing, J.B., Kennedy, A., Bulashevska, A., Petersen, B.-S., Schäffer, A.A., Grüning, B.A., et al. (2014). Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. Nat. Med. *20*, 1410–1416.

Schwab, C., Gabrysch, A., Olbrich, P., Patiño, V., Warnatz, K., Wolff, D., Hoshino, A., Kobayashi, M., Imai, K., Takagi, M., et al. (2018). Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4–insufficient subjects. J. Allergy Clin. Immunol.

Segurado, O.G., Arnaiz-Villena, A.A., Iglesias-Casarrubios, P., Martinez-Laso, J., Vicario, J.L., Fontan, G., and Lopez-Trascasa, M. (1992). Combined total deficiency of C7 and C4B with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin. Exp. Immunol. *87*, 410–414.

Seleman, M., Hoyos-Bachiloglu, R., Geha, R.S., and Chou, J. (2017). Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. Front. Immunol. *8*.

Selmi, C., Mayo, M.J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R.G., Gordon, S.C., Wright, H.I., Zweiban, B., Podda, M., et al. (2004). Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. Gastroenterology *127*, 485–492.

Shimizu, M., Nikolov, N.P., Ueno, K., Ohta, K., Siegel, R.M., Yachie, A., and Candotti, F. (2012). Development of IgA nephropathy-like glomerulonephritis associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency. Clin. Immunol. Orlando Fla *142*, 160–166.

Shimohama, S., Fujimoto, S., Taniguchi, T., Kameyama, M., and Kimura, J. (1993). Reduction of low-molecular- weight acid phosphatase activity in Alzheimer brains. Ann. Neurol. *33*, 616–621.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell *68*, 855–867.

Shirkani, A., Shahrooei, M., Azizi, G., Rokni-Zadeh, H., Abolhassani, H., Farrokhi, S., Frans, G., Bossuyt, X., and Aghamohammadi, A. (2017). Novel Mutation of ZAP-70-related Combined Immunodeficiency: First Case from the National Iranian Registry and Review of the Literature. Immunol. Invest. *46*, 70–79.

Sic, H., Speletas, M., Cornacchione, V., Seidl, M., Beibel, M., Linghu, B., Yang, F., Sevdali, E., Germenis, A.E., Oakeley, E.J., et al. (2017). An Activating Janus Kinase-3 Mutation Is Associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome. Front. Immunol. *8*.

Siggs, O.M., Miosge, L.A., Yates, A.L., Kucharska, E.M., Sheahan, D., Brdicka, T., Weiss, A., Liston, A., and Goodnow, C.C. (2007). Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. Immunity *27*, 912–926.

Silva, R.A., Palladino, M.V., Cavalheiro, R.P., Machado, D., Cruz, B.L.G., Paredes-Gamero, E.J., Gomes-Marcondes, M.C.C., Zambuzzi, W.F., Vasques, L., Nader, H.B., et al. (2015). Activation of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase in keratinocytes exposed to hyperosmotic stress. PloS One *10*, e0119020.

Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood *105*, 4390–4398.

Snapper, C.M., Zelazowski, P., Rosas, F.R., Kehry, M.R., Tian, M., Baltimore, D., and Sha, W.C. (1996). B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *156*, 183–191.

Souza, A.C.S., Azoubel, S., Queiroz, K.C.S., Peppelenbosch, M.P., and Ferreira, C.V. (2009). From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. Cell. Mol. Life Sci. *66*, 1140–1153.

Stanford, S.M., Aleshin, A.E., Zhang, V., Ardecky, R.J., Hedrick, M.P., Zou, J., Ganji, S.R., Bliss, M.R., Yamamoto, F., Bobkov, A.A., et al. (2017). Diabetes reversal by inhibition of the low-molecular-weight tyrosine phosphatase. Nat. Chem. Biol.

Stefani, M., Caselli, A., Bucciantini, M., Pazzagli, L., Dolfi, F., Camici, G., Manao, G., and Ramponi, G. (1993). Dephosphorylation of tyrosine phosphorylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes. FEBS Lett. *326*, 131–134.

Stohl, W. (2013). Future prospects in biologic therapy for systemic lupus erythematosus. Nat. Rev. Rheumatol. *9*, 705–720.

Storb, U. (1987). Transgenic mice with immunoglobulin genes. Annu. Rev. Immunol. *5*, 151–174.

Su, X.-D., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., and Nordlund, P. (1994a). The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. Nature *370*, 575–578.

Su, X.-D., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., and Nordlund, P. (1994b). The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. Nature *370*, 575–578.

Sullivan, K.E. (1998). Complement deficiency and autoimmunity. Curr. Opin. Pediatr. *10*, 600–606.

Suzuki, A., Yamaguchi, M.T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., et al. (2001). T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. Immunity *14*, 523–534.

Sweeney, C.L., Choi, U., Liu, C., Koontz, S., Ha, S.-K., and Malech, H.L. (2017). CRISPR-Mediated Knockout of *Cybb* in NSG Mice Establishes a Model of Chronic Granulomatous Disease for Human Stem-Cell Gene Therapy Transplants. Hum. Gene Ther. *28*, 565–575.

Taddei, N., Chiarugi, P., Cirri, P., Fiaschi, T., Stefani, M., Camici, G., Raugei, G., and Ramponi, G. (1994). Aspartic-129 is an essential residue in the catalytic mechanism of the low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. FEBS Lett. *350*, 328–332.

Tailor, P., Gilman, J., Williams, S., Couture, C., and Mustelin, T. (1997). Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. J. Biol. Chem. *272*, 5371–5374.

Takagi, M., Ogata, S., Ueno, H., Yoshida, K., Yeh, T., Hoshino, A., Piao, J., Yamashita, M., Nanya, M., Okano, T., et al. (2016). Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. J. Allergy Clin. Immunol.

Tang, L., Wan, P., Wang, Y., Pan, J., Wang, Y., and Chen, B. (2015). Genetic association and interaction between the IRF5 and TYK2 genes and systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *64*, 817–824.

Tangye, S.G., and Good, K.L. (2007). Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 13–19.

Teruel, M., Martin, J.-E., Ortego-Centeno, N., Jiménez-Alonso, J., Sánchez-Román, J., de Ramón, E., Gonzalez-Escribano, M.F., Pons-Estel, B.A., D'Alfonso, S., Sebastiani, G.D., et al. (2012). Novel association of acid phosphatase locus 1*C allele with systemic lupus erythematosus. Hum. Immunol. *73*, 107–110.

Thien, C.B.F., Scaife, R.M., Papadimitriou, J.M., Murphy, M.A., Bowtell, D.D.L., and Langdon, W.Y. (2003). A Mouse with a Loss-of-function Mutation in the c-Cbl TKB Domain Shows Perturbed Thymocyte Signaling without Enhancing the Activity of the ZAP-70 Tyrosine Kinase. J. Exp. Med. *197*, 503–513.

Thrasher, A.J., and Burns, S.O. (2010). WASP: a key immunological multitasker. Nat. Rev. Immunol. *10*, 182–192.

Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. J. Exp. Med. *177*, 1009–1020.

Ting, A.Y., and Endy, D. (2002). Signal transduction. Decoding NF-kappaB signaling. Science *298*, 1189–1190.

Tobon, N, G.J., Izquierdo, J.H., and As, C.A. (2013). B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity: Focus on Systemic Lupus Erythematosus.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature *302*, 575–581.

Toubiana, J., Okada, S., Hiller, J., Oleastro, M., Gomez, M.L., Becerra, J.C.A., Ouachée-Chardin, M., Fouyssac, F., Girisha, K.M., Etzioni, A., et al. (2016). Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. Blood *127*, 3154–3164.

Tsitsikov, E.N., Laouini, D., Dunn, I.F., Sannikova, T.Y., Davidson, L., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2001). TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. Immunity *15*, 647–657.

Tsokos, G.C. (2011). Systemic Lupus Erythematosus. N. Engl. J. Med. 12.

Tsokos, G.C., Lo, M.S., Costa Reis, P., and Sullivan, K.E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Nat. Rev. Rheumatol. *12*, 716–730.

Tsuboi, K.K., and Hudson, P.B. (1955). Acid phosphatase. V. The nature of inactivation and stabilization of purified human red cell phosphomonoesterase. Arch. Biochem. Biophys. *55*, 206–218.

Tuijnenburg, P., Lango Allen, H., Burns, S.O., Greene, D., Jansen, M.H., Staples, E., Stephens, J., Carss, K.J., Biasci, D., Baxendale, H., et al. (2018). Loss-of-function nuclear factor κB subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. J. Allergy Clin. Immunol. *142*, 1285–1296.

Turpin, D., Furudoi, A., Parrens, M., Blanco, P., Viallard, J.-F., and Duluc, D. (2018). Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in CVID patients with non-infectious clinical complications. Clin. Immunol. *197*, 130–138.

Turul, T., Tezcan, I., Artac, H., de Bruin-Versteeg, S., Barendregt, B.H., Reisli, I., Sanal, O., van Dongen, J.J.M., and van der Burg, M. (2009). Clinical heterogeneity can hamper the diagnosis of patients with ZAP70 deficiency. Eur. J. Pediatr. *168*, 87–93.

Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. Nat. Immunol. *16*, 142–152.

Unger, S., Seidl, M., Schmitt-Graeff, A., Böhm, J., Schrenk, K., Wehr, C., Goldacker, S., Dräger, R., Gärtner, B.C., Fisch, P., et al. (2014). Ill-defined germinal centers and severely reduced plasma cells are histological hallmarks of lymphadenopathy in patients with common variable immunodeficiency. J. Clin. Immunol. *34*, 615–626.

Unger, S., Seidl, M., van Schouwenburg, P., Rakhmanov, M., Bulashevska, A., Frede, N., Grimbacher, B., Pfeiffer, J., Schrenk, K., Munoz, L., et al. (2017). The T H 1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN-γ–associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. J. Allergy Clin. Immunol.

Uzel, G., Sampaio, E.P., Lawrence, M.G., Hsu, A.P., Hackett, M., Dorsey, M.J., Noel, R.J., Verbsky, J.W., Freeman, A.F., Janssen, E., et al. (2013). Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked-like syndrome. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 1611–1623.

Vahedi, G., Kanno, Y., Furumoto, Y., Jiang, K., Parker, S.C.J., Erdos, M.R., Davis, S.R., Roychoudhuri, R., Restifo, N.P., Gadina, M., et al. (2015). Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. Nature *520*, 558–562.

Venanzi, E.S., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The variable immunological self: Genetic variation and nongenetic noise in Aire-regulated transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 15860–15865.

Vettermann, C., and Jäck, H.-M. (2010). The pre-B cell receptor: turning autoreactivity into self-defense. Trends Immunol. *31*, 176–183.

Villarino, A.V., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2017). Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. Nat. Immunol. *18*, 374–384.

Wade, F., Quijada, P., Al-Haffar, K.M.A., Awad, S.M., Kunhi, M., Toko, H., Marashly, Q., Belhaj, K., Zahid, I., Al-Mohanna, F., et al. (2015). Deletion of low molecular weight protein tyrosine phosphatase (*Acp1*) protects against stress-induced cardiomyopathy: Deletion of *Acp1* protects against heart failure. J. Pathol. *237*, 482–494.

Wang, P., and Zheng, S.G. (2013). Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *6*, 2668–2674.

Wang, C., Ahlford, A., Järvinen, T.M., Nordmark, G., Eloranta, M.-L., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Padyukov, L., Sturfelt, G., Jönsen, A., et al. (2013). Genes identified in Asian SLE GWASs are also associated with SLE in Caucasian populations. Eur. J. Hum. Genet. *21*, 994–999.

Wang, H., Kadlecek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E.S., Hsu, L.-Y., Freedman, T.S., and Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a002279.

Wang, L., Zhao, P., Ma, L., Shan, Y., Jiang, Z., Wang, J., and Jiang, Y. (2014). Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10+ B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. *41*, 1781–1792.

Wange, R.L., Guitián, R., Isakov, N., Watts, J.D., Aebersold, R., and Samelson, L.E. (1995). Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. J. Biol. Chem. *270*, 18730–18733.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science *301*, 1374–1377.

Warnatz, K., Wehr, C., Dräger, R., Schmidt, S., Eibel, H., Schlesier, M., and Peter, H.-H. (2002). Expansion of CD19hiCD21lo/neg B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. Immunobiology *206*, 502–513.

Wehr, C., Kivioja, T., Schmitt, C., Ferry, B., Witte, T., Eren, E., Vlkova, M., Hernandez, M., Detkova, D., Bos, P.R., et al. (2008). The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Blood *111*, 77–85.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood *104*, 3647–3654.

White, I.N.H., and Butterworth, P.J. (1971). Isoenzymes of human erythrocyte acid phosphatase. Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. *229*, 193–201.

Williams, B.L., Irvin, B.J., Sutor, S.L., Chini, C.C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A.C., and Abraham, R.T. (1999). Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. EMBO J. *18*, 1832–1844.

Wo, Y.Y., Zhou, M.M., Stevis, P., Davis, J.P., Zhang, Z.Y., and Van Etten, R.L. (1992). Cloning, expression, and catalytic mechanism of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. Biochemistry *31*, 1712–1721.

Wright, J.J., Wagner, D.K., Blaese, R.M., Hagengruber, C., Waldmann, T.A., and Fleisher, T.A. (1990). Characterization of common variable immunodeficiency: identification of a subset of patients with distinctive immunophenotypic and clinical features. Blood *76*, 2046–2051.

Xiang, N., Li, X.-M., Wang, G.-S., Tao, J.-H., and Li, X.-P. (2013). Association of Fas gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Mol. Biol. Rep. *40*, 407–415.

Yang, W., Tang, H., Zhang, Y., Tang, X., Zhang, J., Sun, L., Yang, J., Cui, Y., Zhang, L., Hirankarn, N., et al. (2013). Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. Am. J. Hum. Genet. *92*, 41–51.

Yarwood, A., Huizinga, T.W.J., and Worthington, J. (2016). The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. Rheumatol. Oxf. Engl. *55*, 199–209.

Yassin, L.M., Rojas, M., Ramírez, L.A., García, L.F., and Vásquez, G. (2010). Monocyte activation by apoptotic cells removal in systemic lupus erythematosus patients. Cell. Immunol. *266*, 52–60.

Yasuda, S., Stevens, R.L., Terada, T., Takeda, M., Hashimoto, T., Fukae, J., Horita, T., Kataoka, H., Atsumi, T., and Koike, T. (2007). Defective expression of Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 4890–4900.

Yuan, Q., Li, Y., Li, J., Bian, X., Long, F., Duan, R., Ma, X., Gao, F., Gao, S., Wei, S., et al. (2018). WDFY4 Is Involved in Symptoms of Systemic Lupus Erythematosus by Modulating B Cell Fate via Noncanonical Autophagy. J. Immunol. *201*, 2570–2578.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. *201*, 703–711.

Zabell, A.P.R., Schroff, A.D., Bain, B.E., Van Etten, R.L., Wiest, O., and Stauffacher, C.V. (2006). Crystal structure of the human B-form low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase at 1.6-A resolution. J. Biol. Chem. *281*, 6520–6527.

Zambuzzi, W.F., Granjeiro, J.M., Parikh, K., Yuvaraj, S., Peppelenbosch, M.P., and Ferreira, C.V. (2008). Modulation of Src Activity by Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase During Osteoblast Differentiation. Cell. Physiol. Biochem. *22*, 497–506.

Zhang, M., Stauffacher, C.V., Lin, D., and Van Etten, R.L. (1998). Crystal structure of a human low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase. Implications for substrate specificity. J. Biol. Chem. *273*, 21714–21720.

Zhang, X., Lindwall, E., Gauthier, C., Lyman, J., Spencer, N., Alarakhia, A., Fraser, A., Ing, S., Chen, M., Webb-Detiege, T., et al. (2015). Circulating CXCR5+CD4+helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. Lupus *24*, 909–917.

Zhao, Y., Wu, L., Noh, S.J., Guan, K.-L., and Zhang, Z.-Y. (1998). Altering the Nucleophile Specificity of a Protein-tyrosine Phosphatase-catalyzed Reaction: PROBING THE FUNCTION OF THE INVARIANT GLUTAMINE RESIDUES. J. Biol. Chem. *273*, 5484–5492.

Zharkova, O., Celhar, T., Cravens, P.D., Satterthwaite, A.B., Fairhurst, A.-M., and Davis, L.S. (2017). Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. Rheumatol. Oxf. Engl. *56*, i55–i66.

Zhou, Q., Wang, H., Schwartz, D.M., Stoffels, M., Park, Y.H., Zhang, Y., Yang, D., Demirkaya, E., Takeuchi, M., Tsai, W.L., et al. (2016). Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat. Genet. *48*, 67–73.

Zuo, X.-B., Sheng, Y.-J., Hu, S.-J., Gao, J.-P., Li, Y., Tang, H.-Y., Tang, X.-F., Cheng, H., Yin, X.-Y., Wen, L.-L., et al. (2014). Variants in TNFSF4, TNFAIP3, TNIP1, BLK, SLC15A4 and UBE2L3 interact to confer risk of systemic lupus erythematosus in Chinese population. Rheumatol. Int. *34*, 459–464.

(2010). The French national registry of primary immunodeficiency diseases. Clin. Immunol. *135*, 264–272.

ANNEXES GENERALES

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amené à participer à différents travaux en lien avec les thématiques développés au laboratoire (marquage des cellules auto-réactives, immunophénotypage avancé des déficits immunitaires).

Ces travaux, principalement réalisé par Vincent Gies au cours de son doctorat dans notre unité et co-encadrés par le Pr Anne-Sophie Korganow et le Pr Pauline Soulas-Sprauel ont donné lieu à des publications auquelles je suis associé.

Je les rapporte ici en Annexe.

- **Papier 4 :**

  B cells differentiate in human thymus and express AIRE.

  J Allergy Clin Immunol. 2017

  Gies V, Guffroy A, Danion F, Billaud P, Keime C, Fauny JD, Susini S, Soley A, Martin T, Pasquali JL, Gros F, André-Schmutz I, Soulas-Sprauel P, Korganow AS

Dans ce travail, j'ai participé à la mise en œuvre des marquages de cytométrie et à l'analyse des données de RNA seq. Ces techniques ont été transposées dans d'autres projets (Partie I et III) de mon travail de thèse.

- **Papier 5** :

  Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes.

  Sci Rep. 2017

  Gies V, Wagner A, Seifert C, Guffroy A, Fauny JD, Knapp AM, Pasquali JL, Martin T, Dumortier H, Korganow AS, Soulas-Sprauel P.

Ma contribution à ce travail correspond principalement aux techniques de marquages des nucléosomes que Vincent Gies à mis au point. En parrallèle, je travaillais au marquage de la GpIIbIIIa (cible principale des auto-anticorps dans le purpura thrombopénique auto-immun). Nous voulions isoler les cellules B auto-réactives anti-plaquettes chez un patient atteint de DIP et PTI afin d'analyser leur caractéristiques immunophénotypiques et leur répertoire en biologie moléculaire. Le marquage que j'ai développé n'a pu être complètement validé car la production des anticorps monoclonaux à partir des cellules triées en cellules uniques dont les gènes constantes et variables ont été clonées, n'ont pas réagit contre la GpIIbIIIa dans le test de référence (MAIPA) à l'EFS. Cependant, les techniques que nous avons mis en œuvre ont permi de développer un marquage des cellules auto-réactives anti-nucléosomes dont la fonctionnalité a été vérifiée chez les souris lupiques. La transposition chez l'Homme de ces techniques reste encore aléatoire pour différentes raisons.

PAPIER 4

Gies V., Guffroy A., Danion F., Billaud P., Keime C., Fauny J.D., Susini S., Soley A., Martin T., Pasquali, J.L., Gros, F., André-Schmutz, I., Soulas-Sprauel, P., Korganow, A.S.

B cells differentiate in Human thymus and express AIRE.

Journal of Allergy and Clinical Immunology. *2016.*

From [a]Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, United Kingdom; [b]the Primary Immunodeficiency Group, Institute of Cellular Medicine, Newcastle upon Tyne University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom; [c]Benioff Children's Hospital, University of California San Francisco, San Francisco, Calif; [d]Pediatric Hematology-Immunology and Rheumatology Unit, Necker-Enfants Malades University Hospital, Paris, France; [e]the Department of Hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, Paris, France; [f]the Department of Pediatric Immunology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; [g]the Department of Bone Marrow Transplant, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; [h]the Center for Pediatric Hematology, Oncology, Immunology, Moscow, Russia; [i]Institut d'Hématologie et d'Oncologie pédiatrique (Hospices Civils de Lyon) et Université Claude Bernard Lyon, Lyon, France; [j]the Department of Pediatric, Hematology and Oncology, Collegium Medicum Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Toruń, Poland; and [k]the Center for Chronic Immunodeficiency, University of Freiburg Medical Center, Freiburg, Germany. E-mail: zohreh.nademi@nuth.nhs.uk.

Disclosure of potential conflict of interest: C. C. Dvorak has received board membership from Jazz Pharmaceuticals and Chimerix, Inc. S. Ehl's institution has received a grant from BMBF. He has received consultancy fees from UCB, Novimmue, and Novartis; grants from UCB; and payment for lectures from Biotest and Baxalta. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Angulo I, Vadas O, Garcon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. Science 2013;342:866-71.
2. Walsh CM, Fruman DA. Too much of a good thing: immunodeficiency due to hyperactive PI3K signalling. J Clin Invest 2014;124:3688-90.
3. Kang S, Denley A, Vanhaesebroeck B, Vogt PK. Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. Proc Natl Acad Sci 2006;103:1289-94.
4. Lucas CL, Zhang Y, Venida A, Wang Y, Hughes J, McElwee J, et al. Heterozygous splice mutation in *PIK3R1* causes human immunodeficiency with lymphoproliferation due to dominant activation of PI3K. J Exp Med 2014;211:2537-47.
5. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. Nat Immunol 2014;15:88-97.
6. Vermijlen D, Braun MY, Marchant A. Do PI3-kinase mutations drive T cells insane? Cell Mol Immunol 2014;11:320-2.
7. Deau MC, Heurtier L, Frange P, Suarez F, Bole-Feysot C, Nitschke P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the *PIK3R1* gene. J Clin Invest 2014;124:3923-8.
8. Lougaris V, Faletra F, Lanzi G, Vozzi D, Marcuzzi A, Valencic E, et al. Altered germinal center reaction and abnormal B cell peripheral maturation in PI3KR1-mutated patients presenting with HIGM-like phenotype. Clin Immunol 2015;159:33-6.
9. Petrovski S, Parrott RE, Roberts JL, Huang H, Yang J, Gorentla B, et al. Dominant splice site mutations in PIK3R1 cause hyper IgM syndrome, lymphadenopathy and short stature. J Clin Immunol 2016;36:462-71.
10. Dvorack CC, Cowan MJ. Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease. Bone Marrow Transplant 2008;41:119-26.

Available online November 12, 2016.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.040

B cells differentiate in human thymus and express AIRE



To the Editor:

It has been known for more than a decade that human thymus contains a minor contingent of B cells.[1] Some authors suggested that these B cells reflect the homing of peripheral B cells, whereas others wondered whether they could act as antigen-presenting cells (APCs). Recently, 2 important articles approached the role of thymic B cells in murine models, using transfer experiments and deficient lines (eg, autoimmune regulator [Aire] knock-out animals). They demonstrated that murine thymic B cells are potent APCs to autoreactive T cells[2] and that they can harbor different self tissue-restricted antigens (TRAs) induced by Aire expression.[3] But only little is known about the fate and function of human B cells in thymus with mostly immunochemistry data.[1] Considering this critical issue, we explored the phenotype of B cells from thymuses of young donors undergoing heart surgery (see Table E1 and the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

$CD19^+$ B cells were detected in the medulla and throughout the cortex (Fig 1, *A*), whereas IgM^+ B cells were restricted to the medulla and the cortico-medullary junction (Fig 1, *B* and *C*). B cells constituted 0.92% ± 0.23% of thymic lymphocytes (see Fig E1, *A*, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). All developmental stages (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) were represented, from pro-B cells to differentiated B cells, and mature naive B cells were largely predominant (48.53% ± 3.15%; Fig 1, *D*, and see Fig E1, *B*). Both switched $CD27^-$ and $CD27^+$ memory B cells were present (Fig 1, *D*). Further analysis of the surface immunoglobulin (sIg) expression showed that they were mainly IgG with less IgA expression. Plasmablast subset was enriched in sIgM with a low level of sIgG or sIgA (Fig 1, *E*). $CD27^+$ switched B cells are a result of antigen recognition in germinal centers or in mucosal tissues.[4] $CD27^-$ switched B cells are low mutated and have been suspected to be a reservoir of autoreactive B cells (IgG^+) or involved in the maintenance of intestinal homeostasis (IgA^+).[5] Thus, it is interesting to note that all these B-cell subsets are present in the thymus in significant proportions.

Obviously, thymic B-cell phenotype was different from bone marrow (BM) picture, with a clear predominance of precursors in the BM and of mature naive B cells in the thymus. In addition, switched memory B-cell numbers were very low in the BM, but represented around 15% of thymic B cells.

We were able to compare B-cell subpopulations in thymus, BM, and peripheral blood (PB) from a single donor (patient 1). The repartition of the different B-cell subpopulations in the BM and blood for our patient was consistent with literature data. The thymic B-cell picture was also distinct from PB, as there were more precursors and mature naive B cells in the thymus (see Fig E3, *A*, *B*, and *C* in this article's Online Repository at www.jacionline.org). These findings do not support the hypothesis of a peripheral B-cells homing.

In thymuses, immature B cells proliferated more than mature subsets (70.96% ± 4.00% vs 46.94% ± 3.05%) (Fig 2, *A*). Both the proliferation of B-cell progenitors in the thymus and their higher frequency compared with PB argue for *in situ* B-cell lymphopoiesis.

We hypothesized that thymic B cells could harbor an organ-specific function. Mature thymic B cells ($CD19^+CD10^-$) expressed higher levels of major histocompatibility class II (MHCII) molecules compared with immature B cells ($CD19^+CD10^+$) (Fig 2, *B*). CD40 expression was detected on 87.6% of mature thymic B cells, whereas being barely detectable on immature B cells (Fig 2, *C*). CD86 was not expressed on immature B cells but upregulated on 28.9% of $CD19^+CD10^-$ B cells (Fig 2, *D*). In further distinction from B cells in other organs, in the same individual, this CD86 upregulation was observed only in mature thymic B cells, but neither in immature nor in mature B cells from BM or PB (see Fig E3, *D*). In mice, the thymic B-cell licensing is driven through CD40-CD40L signaling and interaction with $CD4^+$

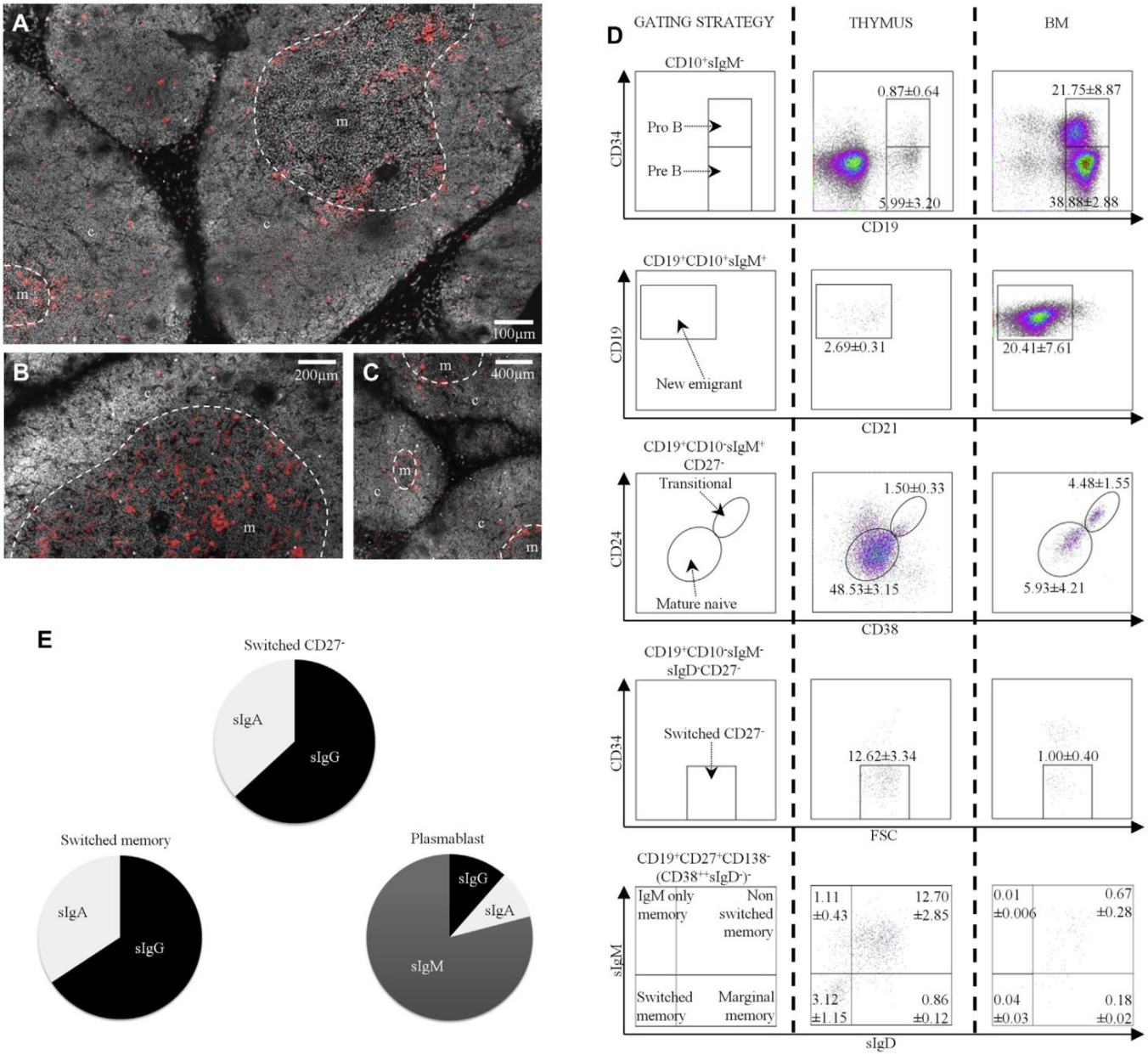


FIG 1. A-C, Thymus immunostaining with anti-CD19 (Fig 1, *A*) or anti-IgM (Fig 1, *B* and *C*) antibody (*red*). medulla (*m*); cortex (*c*); DAPI (*gray*). **D,** B-cell subsets (percentages of $CD19^+$ cells) in thymus ($n \geq 4$) and BM ($n = 3$). Antibodies mentioned on axes are applied to the population defined on the top of each plot. **E,** Isotype frequency in sIg^+ switched thymic B cells ($n = 4$). *DAPI*, 4′-6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride.

T cells.[3,6] Here, mature thymic B cells expressed MHCII molecules and CD86 concomitantly with CD40 expression, which could reflect similar mechanisms of activation. In addition, 18.8% of thymic B cells expressed CD5, with an expression restricted to $CD19^+CD10^-$ (Fig 2, *E*), similar to BM B cells, but at a lower level than in PB (see Fig E3, *E*). In mice, treatment of B2b B cell with anti-IgM and CD40 stimulation induced CD5 expression at low level.[7] A role of CD40-CD40L interaction in the activation of human thymic B cells could explain the CD5 expression on some of them.

The fact that (1) human thymic B cells are localized mainly in the medulla and at the cortico-medullary junction and (2) mature thymic B cells strongly express MHCII molecules and CD86 suggest that they could act as APCs.

These data prompted us to explore whether they could present auto-antigens to T cells, as recently demonstrated in mice.[2,3] Using immunofluorescence analysis, we detected autoimmune regulator (AIRE) protein with typical punctuate nuclear staining in thymic epithelial cells (TECs) (27.05% ± 2.07%) and also, yet with less numerous nuclear dots, in thymic B cells ($CD19^+$: 5.58% ± 1.59%, IgM^+: 6.69% ± 0.83%) (Fig 2, *F*, and see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In addition, the most predominant thymic B-cell subset ($CD27^-IgM^+$) expressed 80-fold more *AIRE* mRNA than did thymocytes (Fig 2, *G*). If relevant, AIRE expression in thymic B cells may repress or induce the expression of other genes, as the induction of TRAs expression in medullary thymic epithelial cells (mTECs).[8] Little is known about the nature of TRAs

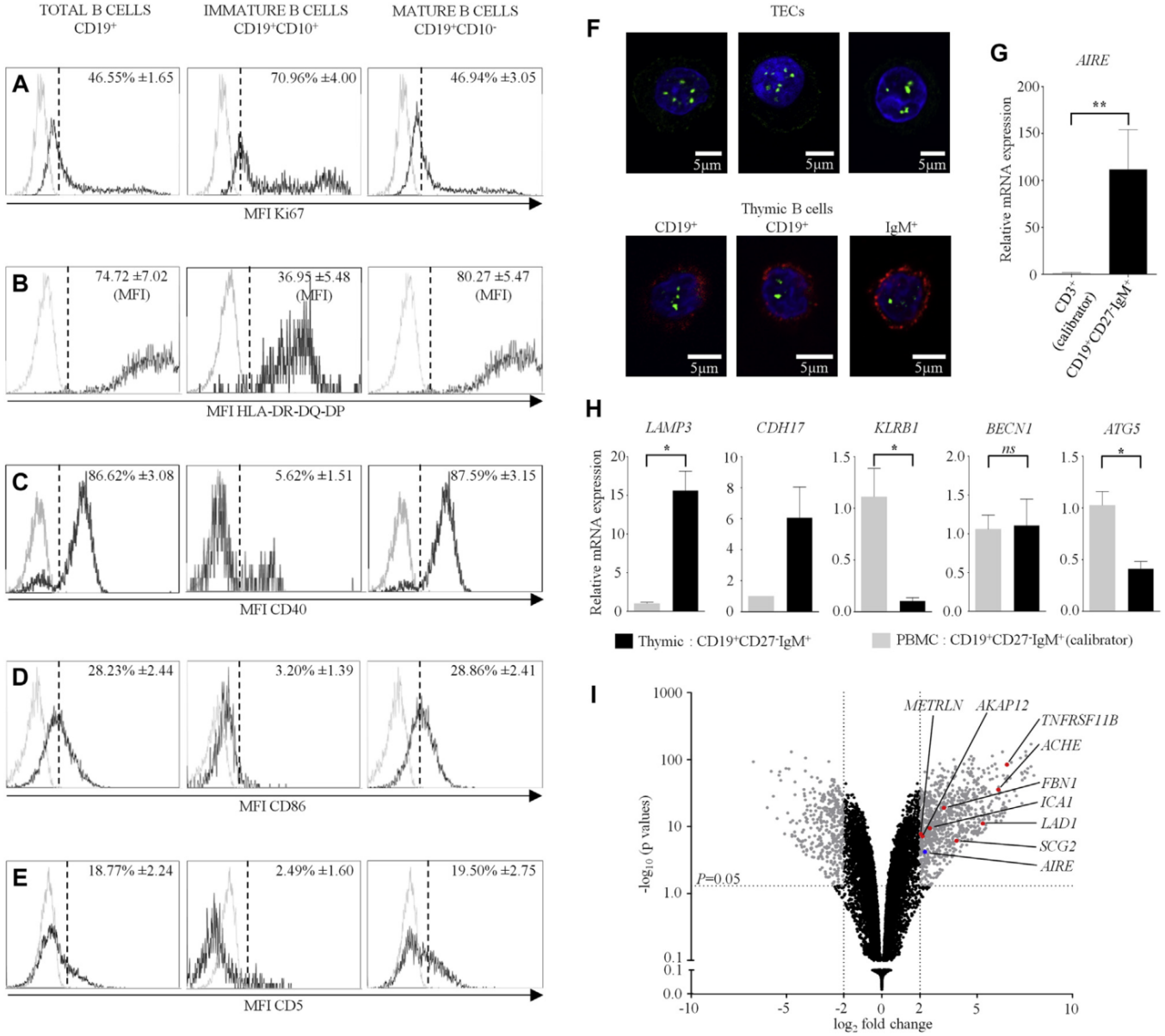


FIG 2. A-E, MFI (*black*) and isotypic controls (*gray*) on thymic B cells (n ≥ 4). **F,** AIRE protein (*green*) in TECs and in $CD19^+$ or IgM^+ (*red*) thymic B cells. **G,** *AIRE* expression in thymocytes (n = 6) and thymic B cells (n = 5). **H,** AIRE-related genes and genes involved in autophagy in thymic B cells (n = 5) compared with their peripheral counterpart (n = 4). *CDH17* remained undetectable in periphery, except for 1 sample. **I,** Graphical representation of RNA sequencing data. *AIRE* (*blue*); TRAs associated with autoimmune diseases (*red*). *MFI,* Mean fluorescence intensity. **P* < .05 and ***P* < .005.

expressed by murine thymic B cells, and there is only a very limited overlap of TRAs between mTECs and extrathymic Aire-expressing cells,[3] suggesting that thymic B cells may regulate the expression of a unique set of TRAs. Using the thymic B cells' TRAs (see the Methods section in this article's Online Repository) defined by Yamano et al,[3] we detected a significant expression of *CDH17* and *LAMP3*—representative TRAs of the intestinal tract and the lung, respectively—concomitantly with a lower expression of *KLRB1*, an Aire-repressed gene (Fig 2, *H*). We were not able to detect *GRIK2* or *SCEL* expression. We performed RNAseq analysis on sorted $CD19^+IgM^+CD27^-$ thymic B cells: this analysis confirmed our quantitative RT-PCR results including AIRE overexpression (fold change, 4.82; *P* value = 6.53×10^{-5}). Moreover, thymic B cells expressed more TRA genes than did peripheral B cells (168 TRA genes upregulated vs 48 repressed). Each TRA is expressed by only 1% to 3% of mTECs at a given time.[8] In addition, because only 5% of thymic B cells are AIRE positive, the number of TRA genes expressed by AIRE-positive thymic B cells may be even higher. Some of these TRAs have been associated with autoimmune diseases, for example, LAD1 (linear IgA dermatosis), SCG2 (autoimmune hypophysitis), ICA1 (type 1 diabetes), ACHE and AKAP12 (myasthenia gravis), or METRNL (autoimmune hepatitis) (Fig 2, *I*, and see Table E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Interestingly, some molecules of the LAMP family, being associated with the lysosomal membrane, play an essential role in autophagy.[9] This process is involved in providing endogenous self-peptides for MHCII presentation and plays a role in thymocytes selection provided by TECs.[8] We found equivalent

expression of *BECN1*—initiation of the autophagosome formation—between thymic $CD19^+CD27^-IgM^+$ and PB $CD19^+CD27^-IgM^+$, while *ATG5* expression—elongation of the autophagosomal membrane—was reproducibly lower in thymus. Similar results were found in RNAseq (not shown) and we cannot conclude at this stage about the involvement of autophagic activity in thymocyte education by B cells.

In this study, we confirm the presence of both immature and mature B cells in the thymuses of young donors. Although some B-cell progenitors are present and proliferate likely in the cortex, most B cells in the thymus are mature B cells with an APC phenotype, located to the medulla. The analysis of expression of *AIRE* and *TRA* genes support the hypothesis of their involvement in negative selection and suggest a new layer of complexity in the process of human central tolerance. Indeed, it will be of great interest to go further, but it is a challenging issue considering the low percentages of B cells in this organ. Primary immunodeficiencies affecting B cells include autoimmune manifestations in their clinical presentation. The mechanisms of this autoimmunity remain unclear and can be organ specific. In view of our results, it is reasonable to assume that in some cases central T-cell tolerance mediated by B cells could be affected.

We thank C. Herouard-Molina (IGBMC, Illkirch, France) for expert technical assistance for the whole transcriptome sequencing. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009). We thank E. Meffre (Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn) and M. Van Zelm (Department of Immunology and Pathology, Central Clinical School, Monash University, Melbourne, Australia) for helpful discussion.

Vincent Gies[a,b]
Aurélien Guffroy, MD[a,b]*
François Danion, MD[a,b]*
Philippe Billaud, MD[c]
Céline Keime, PhD[d]
Jean-Daniel Fauny, PhD[a]
Sandrine Susini, PhD[e]
Anne Soley, LT[a]
Thierry Martin, MD, PhD[a,b,f]
Jean-Louis Pasquali, MD, PhD[a,b,f]
Frédéric Gros, PhD[a,g]
Isabelle André-Schmutz, PhD[c]‡
Pauline Soulas-Sprauel, PharmD, PhD[a,b,h]‡
Anne-Sophie Korganow, MD, PhD[a,b,f]

From [a]CNRS UPR 3572 "Immunopathology and Therapeutic Chemistry"/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France; [b]the Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; [c]the Department of Cardiovascular Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; [d]IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), INSERM, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France; [e]INSERM, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France; [f]UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; [g]Faculté des Sciences de la Vie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; and [h]UFR Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France. E-mail: korganow@unistra.fr.

*These authors contributed equally to this work.

‡These authors contributed equally to this work.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. Lancet 1987;2:1488-91.
2. Perera J, Meng L, Meng F, Huang H. Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:17011-6.
3. Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, et al. Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction. Immunity 2015;42:1048-61.
4. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. Blood 2011;118:2150-8.
5. Berkowska MA, Schickel JN, Grosserichter-Wagener C, Ridder de D, Ng YS, Dongen van JJM, et al. Circulating human CD27−IgA+ memory B cells recognize bacteria with polyreactive Igs. J Immunol 2015;195:1417-26.
6. Fujihara C, Williams JA, Watanabe M, Jeon H, Sharrow SO, Hodes RJ. T cell-B cell thymic cross-talk: maintenance and function of thymic B cells requires cognate CD40-CD40 ligand interaction. J Immunol 2014;193:5534-44.
7. Wortis HH, Teutsch M, Higer M, Zheng J, Parker DC. B-cell activation by cross-linking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:3348-52.
8. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). Nat Rev Immunol 2014;14:377-91.
9. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature 2000;406:902-6.

Available online November 15, 2016.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.044

Minimally important differences and risk levels for the Composite Asthma Severity Index

To the Editor:

The Composite Asthma Severity Index (CASI) is a comprehensive severity scale combining multiple facets of asthma severity: impairment, risk, and treatment.[1] The CASI score, which was developed as a research tool for intervention studies, ranges from 0 to 20 points, with higher scores indicating higher levels of severity, and includes 5 domains: day symptoms and albuterol use, night symptoms and albuterol use, controller treatment, lung function measures, and exacerbations. This report expands on the introduction of the CASI score in Wildfire et al[1] by determining risk levels, the minimally important difference (MID), and the suggested effect size for the score. Information about CASI, including study forms and an online calculator, is available at www.asthmaseverity.org.

This report uses data from the Asthma Phenotypes in the Inner City (APIC) study to describe the relationship between CASI and the global clinician assessment of severity, establish cutoff points of the CASI score discriminating low versus medium or high asthma severity, and provide preliminary estimates of the MID and a treatment effect for the CASI. Data from the Inner City Anti-IgE Therapy for Asthma Study (ICATA), a double-blind randomized clinical trial evaluating the impact of the addition of omalizumab to guidelines-based therapy, are used to evaluate the MID and effect size developed.[2]

The *MID*,[3,4] which is defined as the smallest difference in a measure that is considered clinically meaningful, can vary depending on the context. The MID presented in this report refers to an individual's change over time. In addition, we present the difference between 2 populations as the minimal important effect size, which serves as a benchmark for a treatment effect in a study.

The APIC study[5-7] was an observational study designed to identify determinants of asthma severity. During the APIC study,

METHODS

Patients and samples

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the parents or legal wards of the patients, and the study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Strasbourg's University Hospital.

Anticoagulated venous blood from 4 healthy donors was collected and was subjected to density gradient centrifugation with LSM1077 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) to get PBMCs and remove dead cells.

Thymus glands were collected after thymectomy of infants undergoing corrective heart surgery in the Department of Pediatric Surgery (Strasbourg's University Hospital). Patients affected by diseases or receiving treatments that may alter the immunological system were excluded, namely, primary immunodeficiencies, active bacterial or viral infections, chronic viral infections, chemotherapy, or neoplasms. None of them was affected with Down syndrome or other evident dysmorphic features. Their ages ranged from 1 week to 26 weeks. The main characteristics of patients are described in Table E1. Pieces of thymuses from patient 1 were embedded in O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura, Torrance, Calif) and stored at −80°C for immunofluorescence microscopy experiments. Thymus cellular suspensions were obtained by grinding the organ on a 40-μm cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Thymic and BM cells were subjected to density gradient centrifugation with LSM1077 to get mononuclear cell suspensions and remove dead cells.

Isolation of human thymic epithelial cells

Thymus was cut into pieces of 3 mm^2 and washed 4 times in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Thymus pieces were digested in medium A (RPMI 1640, collagenase 0.12% [from *Clostridium histoliticum*, Sigma-Aldrich], DNAse I 0.1% [Sigma-Aldrich]) for 15 minutes in a warm bath at 37°C. The supernatant was stored at 4°C and the pieces of thymuses were once again incubated with medium A. This step was renewed 2 times. The 3 supernatants were pooled in the same tube and centrifugated at 1500 rpm for 5 minutes. The pellet was resuspended and incubated, with magnetic stirring, in medium B (RPMI 1640, collagenase 0.12% [from *Clostridium histoliticum*], dispase 1.2 mg/mL [StemCell Technologies, Grenoble, France], DNAse I 0.1%) for 30 minutes in a warm bath at 37° and then centrifugated at 1500 rpm for 5 minutes. The pellet was resuspended with MACS buffer (0.5% BSA, EDTA 2 mmol/L pH 8, PBS pH 7.2), incubated for 10 minutes at 4°C, and filtered through 70-μm filters. The cells were then sorted to eliminate $CD45^+$ cells (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The magnetic separation from autoMACS separator (Miltenyi Biotec) was used.

Immunofluorescence analysis of thymus sections

Sections of thymuses (6 μm) were cut from frozen samples, air dried, and fixed in acetone. Then, before each step, slides were washed 3 times using PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4), unless otherwise specified by protocol. After rehydratation in PBS, endogenous peroxidases were quenched with 0.5% H_2O_2 in PBS for 20 minutes. Endogenous biotins were blocked using Endogenous Biotin-Blocking Kit (Molecular Probes, Eugene, Ore) following the manufacturer's protocol. Sections were blocked, using Cyanine *3* tyramide signal amplification kit (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada), and labeled with biotin anti-human CD19 antibody (clone HIB19) from BD Biosciences (San Jose, Calif) or biotin anti-human IgM antibody (clone TIBI 82) from Sera-lab (West Sussex, United Kingdom) following the manufacturer protocol. Nuclei were stained with 4′-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Thymus sections were incubated with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 minutes. Coverslips were mounted in DAKO (Sigma-Aldrich) and sealed with nail polish. Images were acquired using a spinning disk confocal microscope (Zeiss Axio Observer Z1 Yokogawa spinning disk system, objective: Zeiss Plan-Apochromat 20X/0.8). No bleed-through was detected between channels. Images were stitched to get an overview of the whole tissue and were analyzed using National Institutes of Health Image J software.[E15] In thymic sections, cortico-medullary borders were distinguished by the cellular density visualized by DAPI staining.

Immunofluorescence-AIRE expression

Mononuclear thymic cell suspensions were collected in PBS, after a density gradient centrifugation with LSM1077 to remove dead cells. Unfixed cells (3×10^5) were allowed to adhere for 45 minutes at 37°C in multiwell culture slides (BD Falcon) coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). Then, before each step, slides were washed 3 times using PBS-1% BSA (Sigma-Aldrich), unless otherwise specified by protocol. The cells were blocked with PBS-1% BSA for 30 minutes at +4°C. Except for wells containing TECs, the cells were labeled with biotin anti-human CD19 antibody (clone HIB19) from BD Biosciences or biotin anti-human IgM antibody (clone TIBI 82) from Sera-lab in BSA-1% BSA for 45 minutes at room temperature followed by an incubation with streptavidine AlexaFluor 647 (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) in PBS-1% BSA for 30 minutes at +4°C. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 minutes and permeabilized with 0.05%Triton X-100 (GE Healthcare Life Sciences) in PBS-1% BSA for 30 minutes. Samples were incubated with anti-AIRE antibody (clone D-17, SantaCruz, Santa Cruz, Calif) or goat IgG (polyclonal, SouthernBiotech, Birmingham, Ala), as isotype control, in PBS-1% BSA-0.05% Triton-X at 4°C overnight. After 3 washes with PBS-1% BSA-0.05% Triton-X-100, cells were incubated with AlexaFluor 488 donkey antigoat IgG (polyclonal, Thermo Fisher Scientific) in PBS-1% BSA- 0.05% Triton-X for 1 hour at room temperature. Nuclei were then stained with DAPI (Sigma-Aldrich). Coverslips were mounted in DAKO (Sigma-Aldrich) and sealed with nail polish. Images were acquired using either a spinning disk confocal microscope (Zeiss Axio Observer Z1 Yokogawa spinning disk system, objective: Zeiss Plan-Apochromat 20X/0.8 and Plan-Apochromat 100X/1.4) or a laser scanning microscope (Zeiss Axio Observer Z1, LSM 780 confocal head, objective: Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.4). No bleed-through was detected between channels. Images were stitched to get an overview and were analyzed using National Institutes of Health Image J software.[E15]

Flow cytometry

Cell viability was assessed by incubation of cells with Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience, San Diego, Calif) following the manufacturer's protocol. BM and thymic cells were washed twice in PBE (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) and resuspended in PBE. Classical surface staining was performed in the dark for 15 minutes at 4°C. Intracellular staining was performed, for Ki67 staining, using Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent Kit (eBioscience) following the manufacturer's protocol. For PB, BM, and thymic B cells of the same individual (patient 1), the staining was performed using OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter, Fullerton, Calif) according to manufacturer protocol. The cells were washed twice in PBE buffer and analyzed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). Living cells were identified by forward scatter and side scatter gating. Isotypic controls were performed. Data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter) with "logicle" compensation.[E16]

For the analysis of protein expression level, the geometric mean fluorescence intensity was used. And considering the low numbers of B cells in the thymus, we roughly separated immature and mature B cells on the basis of their CD10 expression.

A comprehensive list of antibodies used for this experiment includes the following: CD19 APC-AlexaFluor700 (clone J3-119) purchased from Beckman Coulter; Ki67 FITC (clone B56), CD3 PC-Cy7 or APC (clone UCHT1), CD5 FITC (clone UCHT2), CD10 PerCP-Cy5.5 (clone HI10a), CD24 FITC or PE (clone ML5), CD27 PE or APC (clone M-T271), CD34 PC7 (clone 581), CD38 PE-CF594 or PC-Cy7 (clone HIT2), CD40 FITC (clone 5C3), CD86 FITC (clone 2331 [FUN-1]), CD138 AlexaFluor647 (clone MI15), HLA DR/DQ/DP FITC (clone Tu39), IgD PerCP-Cy5.5 (clone IA6-2), IgD FITC (clone IA6-2), IgM FITC (G20-127), and IgM PE-CF594 (G20-127) purchased from BD Biosciences; CD5-APC-AlexaFluor750 (clone BL1a) purchased from Beckman Coulter; and IgG PE-Vio770 (clone IS11-3B2.2.3), IgA PerCP-Vio700 (clone IS11-8E10), and IgE PE (clone MB10-5C4) purchased from Miltenyi Biotec.

Classification of TRAs

As previously described, a protein coding gene was defined as coding for a TRA if its mRNA expression was above 5 times the median (the median expression over all tissues) in fewer than 5 tissues.[E17] Each of the following group was considered as a single tissue: (1) all nervous central tissues, (2) colon and small intestine, and (3) all testis tissues. Fetal tissues were excluded from the analysis. In addition, a gene was excluded from the TRAs list if its expression was above 5 times the median in the B-cell lineage ($CD19^+$ B cells or B lymphoblast). Identification of TRAs was performed using the Human U133A/GNF1H Gene Atlas public database[E18] at www.biogps.org.[E19,E20]

According to the list of genes that are induced/repressed in murine B cells, published by Yamano et al,[E21] the following human genes were selected as AIRE-related genes for quantitative real-time RT-PCR analysis: *SCEL*, *GRIK2*, *LAMP3*, and *CDH17* for AIRE-induced genes and *KLRB1* for AIRE-repressed genes.

Quantitative real-time RT-PCR analysis

$CD3^+CD19^-$ and $CD3^-CD19^+CD27^-IgM^+$ populations were sorted (FACSAria II, BD Biosciences) from thymic mononuclear cell suspensions of infants undergoing corrective heart surgery, and $CD3^-CD19^+CD27^-IgM^+$ were also sorted from PBMCs of healthy donors. Cell viability was assessed with DAPI (Sigma-Aldrich). Purity was controlled after sort (see Fig E4). RNA was isolated using RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, Calif) following the manufacturer's protocol, including a DNase digest. Reverse transcription was done using High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif) following the manufacturer's protocol, and was performed on a T100 Thermal cycler (BioRad, Hercules, Calif). Preamplification of 10 ng of cDNA was performed, with TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems) on a T100 Thermal cycler (Biorad). Quantitative real-time PCR reactions were performed on a StepOnePlus realtime thermal cycler (Applied Biosystems) using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. Assays were plated in triplicate. Thermal cycling conditions were set at 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, then 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Relative expression levels were calculated with the comparative Ct method using the mean of the Ct between *GAPDH* and *C1orf43* for normalization.[E22] $CD3^+$ thymic cells or $CD19^+CD27^-IgM^+$ from PBMCs were used as calibrator samples. The following list of TaqMan probes (Applied Biosystems) was used: *GAPDH* (Hs02758991_g1), C1orf43 (Hs00367486_m1), *AIRE* (Hs00230829_m1), *KLRB1* (Hs00174469_m1), *CDH17* (Hs00900408_m1), *GRIK2* (Hs00222637_m1), *LAMP3* (Hs00180880_m1), *SCEL* (Hs01557103_m1), *BECN1* (Hs00186838_m1), *ATG5* (Hs00355492_m1).

Whole transcriptome sequencing (RNA-seq)

$CD3^-CD19^+CD27^-IgM^+$ populations were sorted (FACSAria II, BD Biosciences) from thymic mononuclear cell suspensions of infants undergoing corrective heart surgery (n = 4) and from PBMCs of healthy donors (n = 4). Cell viability was assessed with DAPI (Sigma-Aldrich). Purity was controlled after sort (see Fig E4). RNA was isolated using RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol, including a DNase digest. Sample quality was assessed using Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif). Transcriptome libraries preparation and sequencing were performed in the sequencing facility of the IGBMC (Strasbourg, France) using Illumina sequencing platform (Illumina, San Diego, Calif). Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the hg38 assembly of the human genome using Tophat v2.0.14[E23] and the bowtie v2.1.0 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1[E24] and gene annotations from Ensembl release 83. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber.[E25] Comparison between thymic B cells and peripheral B-cell gene expression was performed using the method proposed by Love et al[E26] implemented in the DESeq2 Bioconductor library (v1.6.3). Adjustment for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg[E27] method. In human thymic B cells, 912 genes were induced (168 were TRAs) and 364 genes were repressed (48 were TRAs) (read normalized and divided by gene length in kb >50; fold-change >4; P value adjusted for multiple testing <.05).

Statistical analysis

Statistical comparison between groups was carried out using nonparametric 2-tailed Mann-Whitney test. A P value of less than .05 was considered significant. All data were presented as mean ± SEM. Tests were applied using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, Calif).

REFERENCES

E1. Real A, Gilbert N, Hauser B, Kennedy N, Shand A, Gillett H, et al. Characterisation of osteoprotegerin autoantibodies in coeliac disease. Calcif Tissue Int 2015;97:125-33.

E2. Riches PL, McRorie E, Fraser WD, Determann C, van't Hof R, Ralston SH. Osteoporosis associated with neutralizing autoantibodies against osteoprotegerin. N Engl J Med 2009;361:1459-65.

E3. Mappouras DG, Philippou G, Haralambous S, Tzartos SJ, Balafas A, Souvatzoglou A, et al. Antibodies to acetylcholinesterase cross-reacting with thyroglobulin in myasthenia gravis and Graves's disease. Clin Exp Immunol 1995;100:336-43.

E4. Tang J, Yuan J, Hao H. Anti-acetylcholinesterase antibody in myasthenic syndrome. Chin Med J (Engl) 1997;110:698-700.

E5. Phillips TM, Manz HJ, Smith FA, Jaffe HA, Cohan SL. The detection of anticholinesterase antibodies in myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci 1981;377:360-71.

E6. Provenzano C, Marino M, Scuderi F, Evoli A, Bartoccioni E. Anti-acetylcholinesterase antibodies associate with ocular myasthenia gravis. J Neuroimmunol 2010;218:102-6.

E7. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. J Invest Dermatol 1996;106:734-8.

E8. Smith CJ, Bensing S, Burns C, Robinson PJ, Kasperlik-Zaluska AA, Scott RJ, et al. Identification of TPIT and other novel autoantigens in lymphocytic hypophysitis; immunoscreening of a pituitary cDNA library and development of immunoprecipitation assays. Eur J Endocrinol 2012;166:391-8.

E9. Tan FK, Arnett FC, Antohi S, Saito S, Mirarchi A, Spiera H, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. J Immunol 1999;163:1066-72.

E10. Arnett FC, Tan FK, Uziel Y, Laxer RM, Krafchik BR, Antohi S, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin 1, in patients with localized scleroderma. Arthritis Rheum 1999;42:2656-9.

E11. Pietropaolo M, Castaño L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, Martin S, et al. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69): molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. J Clin Invest 1993;92:359-71.

E12. Gordon T, Grove B, Loftus JC, O'Toole T, McMillan R, Lindstrom J, et al. Molecular cloning and preliminary characterization of a novel cytoplasmic antigen recognized by myasthenia gravis sera. J Clin Invest 1992;90:992-9.

E13. Sasaki H, Kunimatsu M, Fujii Y, Yamakawa Y, Fukai I, Kiriyama M, et al. Autoantibody to gravin is expressed more strongly in younger and nonthymomatous patients with myasthenia gravis. Surg Today 2001;31:1036-7.

E14. Zingaretti C, Arigò M, Cardaci A, Moro M, Crosti M, Sinisi A, et al. Identification of new autoantigens by protein array indicates a role for IL4 neutralization in autoimmune hepatitis. Mol Cell Proteomics 2012;11:1885-97.

E15. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012;9:671-5.

E16. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, et al. Modern flow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med 2007;27:453-68, v.

E17. Pinto S, Michel C, Schmidt-Glenewinkel H, Harder N, Rohr K, Wild S, et al. Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:E3497-505.

E18. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:6062-7.

E19. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. Genome Biol 2009;10:R130.

E20. Wu C, MacLeod I, Su AI. BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information. Nucleic Acids Res 2013;41:D561-5.

E

E

E

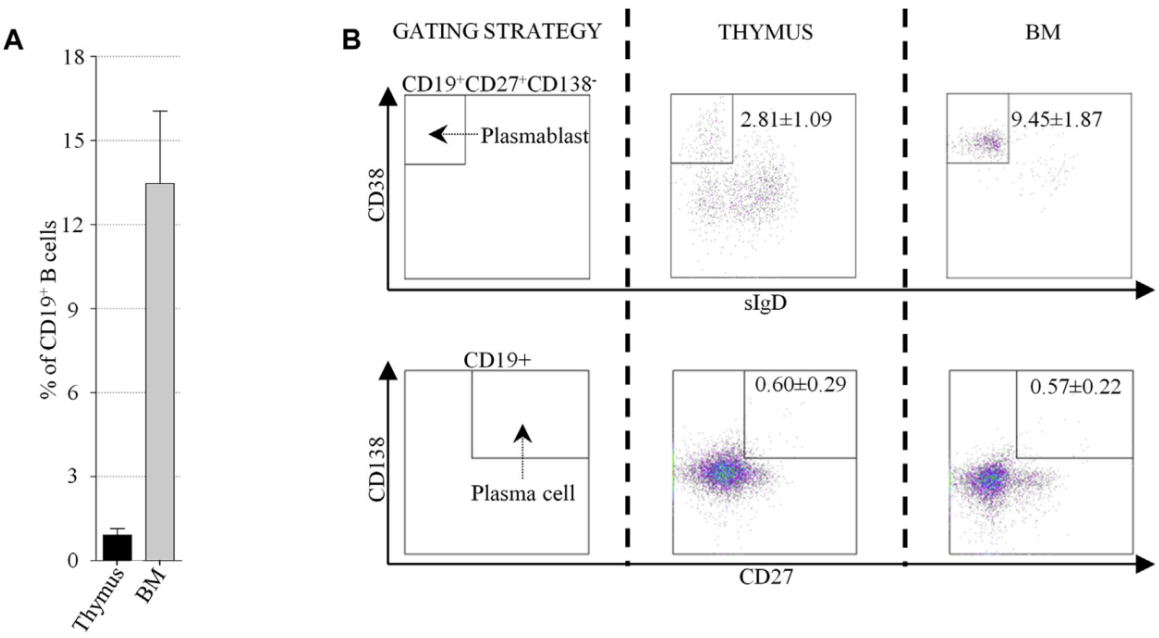


FIG E1. A, Flow cytometry analysis, in the lymphoid gate, of thymic (n = 5) and BM (n = 3) $CD19^+$ B cells **B,** Flow cytometry analysis of the different B-cells subsets (indicated as a percentage of total $CD19^+$ cells) in thymus ($n \geq 4$) compared with BM (n = 3). Antibodies mentioned on the axes are applied to the population defined on the top of each plot.

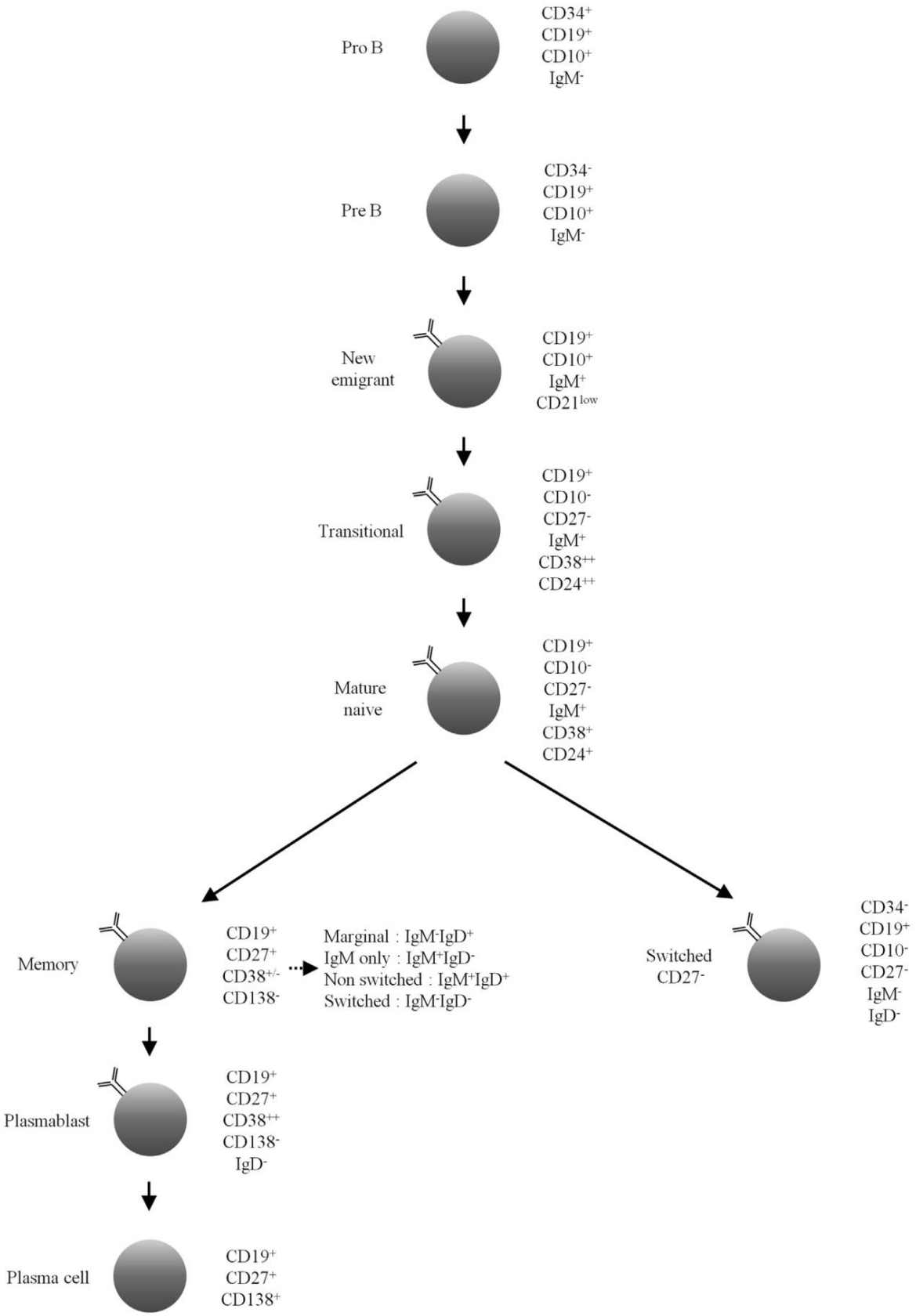


FIG E2. B-cell ontogeny and markers used for B-cell subsets gating strategy.

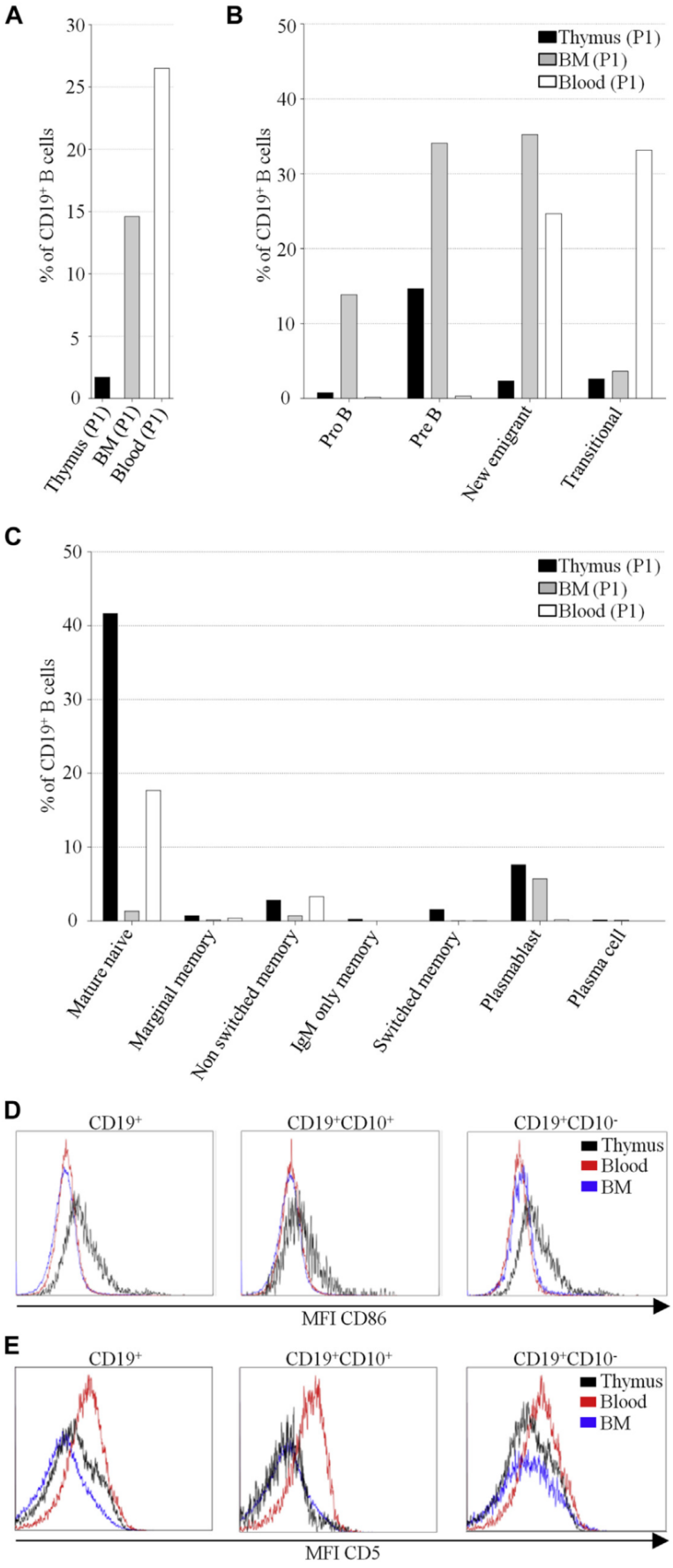


FIG E3. A, Flow cytometry analysis of $CD19^+$ B cells in thymus, BM, and PB of P1. **B** and **C,** Frequency of immature B cells (Fig E3, *B*) and mature B cells (Fig E3, *C*) in P1. **D** and **E,** The panels represent, respectively, B cells' MFI of CD86 (Fig E3, *D*) and CD5 (Fig E3, *E*) in PB *(red)*, BM *(blue)*, and thymus *(black)* for P1. *MFI*, Mean fluorescence intensity; P1, patient 1.

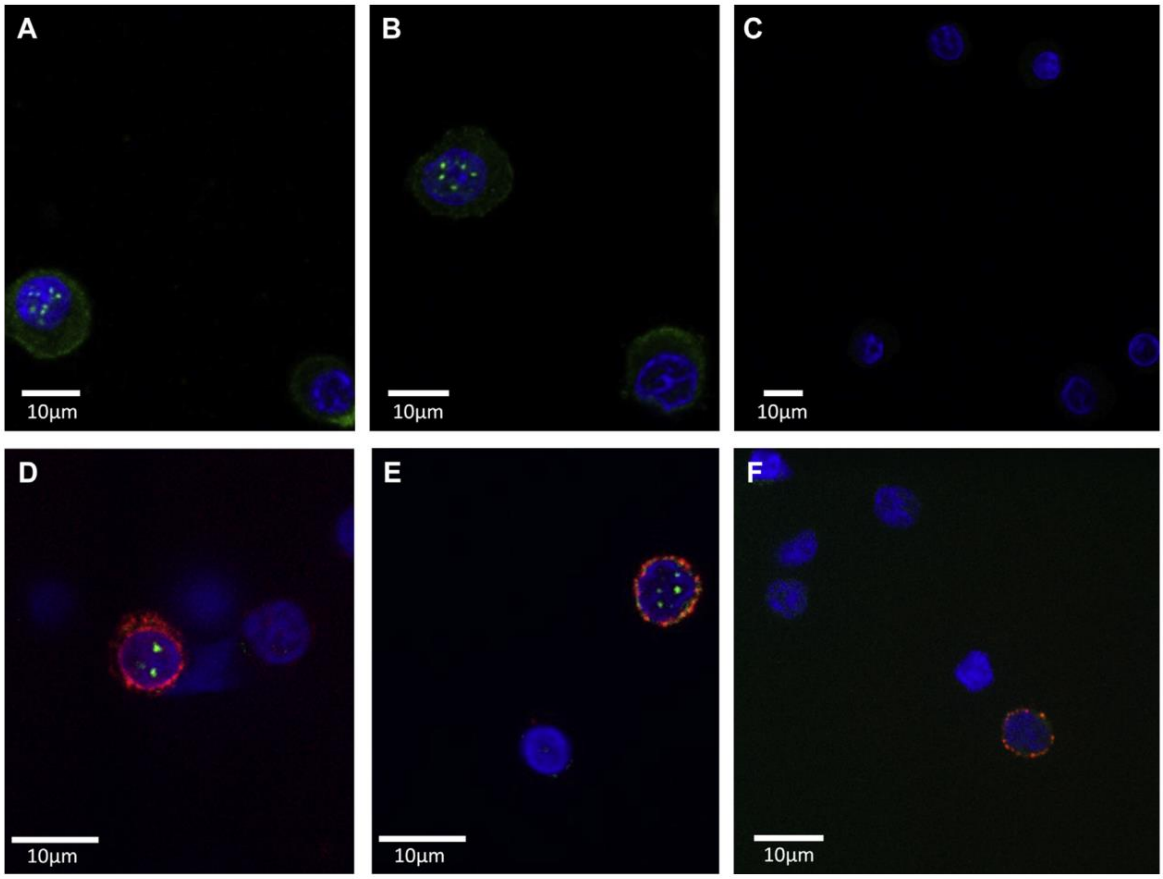


FIG E4. A-C, Representative immunostaining of AIRE protein (Fig E4, *A* and *B*; *green*) compared with isotype control (Fig E4, *C*) in TECs. **D-F,** Representative immunostaining of AIRE protein (Fig E4, *D* and *E*; *green*) compared with isotype control (Fig E4, *F*) in IgM^+ *(red)* thymic B cells.

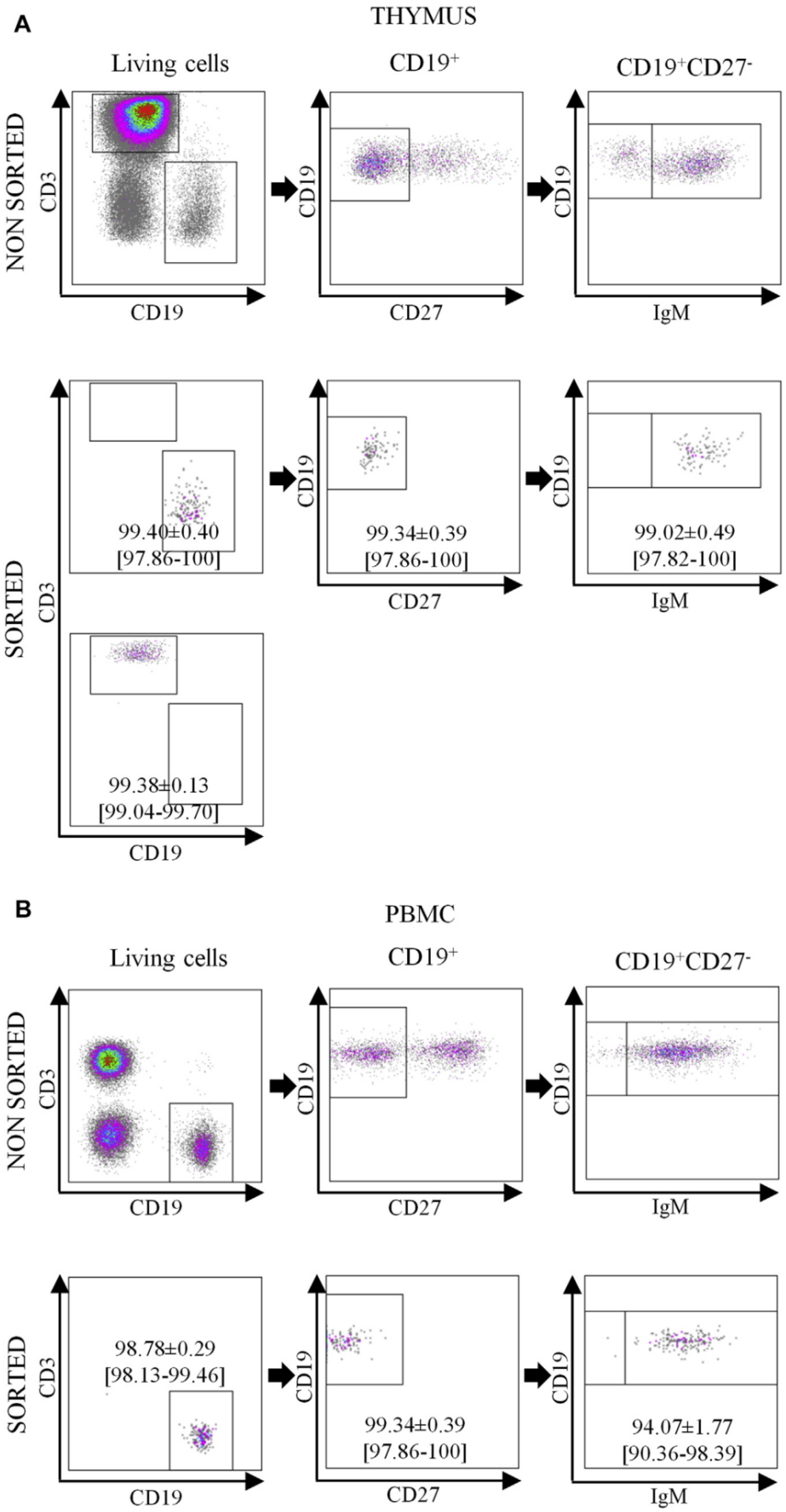


FIG E5. Gating strategy and purity of sorted samples. Values are shown as mean ± SEM [*minimum and maximum values*] of the percentages of total viable sorted cells in the gates. **A,** Thymuses (n = 5). **B,** PBMC samples (n = 4). Fig E5, *A* and *B*, Antibodies mentioned on the axes are applied to the population defined on the top of each plot.

TABLE E1. Clinical features of the subjects included in the study*

Patients	Sex	Age (wk)	Cause of surgery
P1	Male	1	Tricuspid atresia
P2	Male	2	TGV
P3	Female	26	Tetralogy of Fallot
P4	Male	2	TGV
P5	Female	14	IAC-IVC
P6	Male	1	TAPVR
P7	Female	1	TGA + IVC
P8	Male	3	DORV
P9	Male	3	Shone's syndrome
P10	Male	1	PAIVS

DORV, Double outlet right ventricle; *IAC*, interatrial communication; *IVC*, interventricular communication; *PAIVS*, pulmonary atresia with intact ventricular septum; *TAPVR*, total anomalous pulmonary venous return; *TGV*, transposition of great vessels.

*Thymuses from patient 1 (P1) to P8 were collected. For P1, PB and BM were also available. For P9 and P10, only BM was available.

TABLE E2. List of TRAs expressed in thymic B cells compared with peripheral B cells

Gene symbol	Gene name	Fold change	Adjusted *P* value
NPTX1	Neuronal pentraxin I	202.07	1.27×10^{-74}
DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	181.53	1.89×10^{-67}
UBE2QL1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family-like 1	123.92	8.16×10^{-35}
TNFRSF11B*[E1,E2]	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (Aliases OPG; Osteoprotegerin)	94.80	1.19×10^{-84}
IGSF3	Immunoglobulin superfamily, member 3	92.19	1.36×10^{-29}
SYNDIG1	Synapse differentiation inducing 1	91.32	5.48×10^{-19}
KCNMA1	Potassium channel, calcium-activated large conductance subfamily M alpha, member 1	89.42	2.68×10^{-52}
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	88.05	3.81×10^{-20}
TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	82.93	7.59×10^{-15}
KCNK12	Potassium channel, two pore domain subfamily K, member 12	80.36	2.98×10^{-131}
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	72.09	2.48×10^{-34}
ACHE*[E3-E6]	Acetylcholinesterase (Yt blood group)	69.23	2.82×10^{-36}
EGR2	Early growth response 2	55.72	6.00×10^{-114}
GFPT2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	49.48	1.09×10^{-14}
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	49.33	1.57×10^{-13}
GABRA5	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5	47.82	7.57×10^{-16}
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	43.38	3.38×10^{-38}
RAMP1	Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1	41.44	9.93×10^{-10}
RGS16	Regulator of G-protein signaling 16	41.37	4.51×10^{-64}
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	39.82	9.23×10^{-19}
LAD1*[E7]	Ladinin 1	39.33	7.92×10^{-12}
LHX2	LIM homeobox 2	38.80	1.65×10^{-35}
MYO7A	Myosin VIIA	37.03	2.87×10^{-15}
HR	Hair growth associated	34.18	1.40×10^{-09}
GATA3	GATA-binding protein 3	31.83	6.44×10^{-29}
ANLN	Anillin actin-binding protein	31.18	1.59×10^{-08}
ATXN1	Ataxin 1	30.76	1.04×10^{-47}
RGS13	Regulator of G-protein signaling 13	30.48	2.78×10^{-16}
RBMS3	RNA-binding motif, single-stranded interacting protein 3	29.81	4.10×10^{-28}
THY1	Thy-1 cell surface antigen	28.94	3.27×10^{-12}
SMAD7	SMAD family member 7	27.28	1.69×10^{-74}
PCDHGC3	Protocadherin gamma subfamily C, 3	22.86	5.24×10^{-45}
TULP2	Tubby like protein 2	21.17	3.40×10^{-26}
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	20.89	3.55×10^{-28}
CDHR1	Cadherin-related family member 1	20.71	1.20×10^{-21}
OCA2	Oculocutaneous albinism II	20.42	7.53×10^{-07}
BCAR3	Breast cancer antiestrogen resistance 3	19.93	9.25×10^{-87}
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	19.39	4.46×10^{-10}
DBNDD2	Dysbindin (dystrobrevin-binding protein 1) domain containing 2	18.91	2.50×10^{-29}
VDR	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D_3) receptor	18.68	2.87×10^{-25}
MUC12	Mucin 12, cell surface associated	18.00	2.91×10^{-10}
PTMS	Parathymosin	17.50	5.45×10^{-14}
MERTK	MER proto-oncogene, tyrosine kinase	16.29	3.57×10^{-12}
ETV5	ets variant 5	15.90	3.97×10^{-20}
SCG2*[E8]	Secretogranin II	15.07	7.38×10^{-07}
LAMP3	Lysosomal-associated membrane protein 3	14.17	2.56×10^{-17}
WLS	wntless Wnt ligand secretion mediator	13.81	3.43×10^{-06}
BCAS1	Breast carcinoma amplified sequence 1	13.77	1.71×10^{-25}
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	13.72	1.08×10^{-13}
KLF10	Kruppel-like factor 10	13.52	4.46×10^{-53}
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	13.10	2.93×10^{-07}
BHLHE40	Basic helix-loop-helix family, member e40	12.76	5.82×10^{-26}
IL6	Interleukin 6	12.70	2.93×10^{-27}
NINJ1	Ninjurin 1	12.68	2.05×10^{-20}
ZBED2	Zinc finger, BED-type containing 2	12.41	2.20×10^{-16}
H1F0	H1 histone family, member 0	12.33	1.81×10^{-11}
LRRC32	Leucine rich repeat containing 32	12.30	6.94×10^{-12}
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	12.07	3.68×10^{-24}
SIRPA	Signal-regulatory protein alpha	11.83	1.41×10^{-17}
SPRY2	Sprouty RTK signaling antagonist 2	11.30	7.51×10^{-17}
SCAMP5	Secretory carrier membrane protein 5	11.27	6.88×10^{-08}
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	11.13	5.45×10^{-09}

(Continued)

TABLE E2. *(Continued)*

Gene symbol	Gene name	Fold change	Adjusted *P* value
RRAD	Ras-related associated with diabetes	10.52	7.78×10^{-09}
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	10.42	3.57×10^{-11}
SLC2A3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	10.22	8.67×10^{-55}
MBOAT2	Membrane bound *O*-acyltransferase domain containing 2	10.10	6.92×10^{-28}
CETP	Cholesteryl ester transfer protein, plasma	9.99	1.98×10^{-12}
DHRS9	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	9.93	7.19×10^{-21}
FBN1*[E9,E10]	Fibrillin 1	9.56	1.10×10^{-19}
HACD1	3-Hydroxyacyl-CoA dehydratase 1	9.21	2.17×10^{-08}
PTPRM	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	8.78	1.86×10^{-07}
TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	8.62	4.83×10^{-49}
ARHGEF40	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 40	8.41	9.60×10^{-12}
LDLRAD4	Low-density lipoprotein receptor class A domain containing 4	8.30	9.87×10^{-48}
HMOX1	Heme oxygenase 1	8.22	3.07×10^{-22}
MARC2	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	8.14	4.44×10^{-17}
NGFRAP1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	8.13	1.18×10^{-05}
KLK1	Kallikrein 1	7.79	1.59×10^{-15}
DFNB31	Deafness, autosomal-recessive 31	7.78	4.56×10^{-33}
MFSD2A	Major facilitator superfamily domain containing 2A	7.72	2.20×10^{-21}
QPCT	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	7.52	8.13×10^{-10}
NMRK2	Nicotinamide riboside kinase 2	7.52	8.93×10^{-03}
HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B′)	7.50	1.99×10^{-03}
ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	7.47	1.03×10^{-16}
GPR137B	G protein–coupled receptor 137B	7.45	3.16×10^{-35}
SYT11	Synaptotagmin XI	7.18	1.31×10^{-15}
CYBRD1	Cytochrome b reductase 1	7.14	1.13×10^{-10}
MLF1	Myeloid leukemia factor 1	7.07	9.02×10^{-04}
TPM2	Tropomyosin 2 (beta)	7.03	5.02×10^{-19}
GDPD5	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	7.02	5.31×10^{-12}
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	6.95	1.41×10^{-04}
PLSCR1	Phospholipid scramblase 1	6.94	5.12×10^{-24}
GPER1	G protein–coupled estrogen receptor 1	6.93	2.49×10^{-13}
GCAT	Glycine C-acetyltransferase	6.89	1.01×10^{-09}
EGR3	Early growth response 3	6.86	2.35×10^{-15}
GTSF1L	Gametocyte specific factor 1-like	6.75	1.86×10^{-12}
SYNGR3	Synaptogyrin 3	6.66	1.01×10^{-25}
B3GALNT1	Beta-1,3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group)	6.63	3.54×10^{-11}
ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1	6.52	1.72×10^{-08}
AGAP9	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 9	6.51	3.13×10^{-12}
SEPT5	Septin 5	6.50	1.92×10^{-05}
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	6.34	4.19×10^{-04}
RRAGD	Ras-related GTP binding D	6.22	5.42×10^{-06}
JAG2	Jagged 2	6.21	3.71×10^{-06}
ATF5	Activating transcription factor 5	6.06	3.47×10^{-23}
CDH17	Cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	6.00	1.27×10^{-5}
PSRC1	Proline/serine-rich coiled-coil 1	5.97	1.84×10^{-02}
ATRNL1	Attractin-like 1	5.90	3.08×10^{-06}
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	5.88	2.01×10^{-08}
C3orf14	Chromosome 3 open reading frame 14	5.86	3.25×10^{-07}
MYADM	Myeloid-associated differentiation marker	5.86	8.25×10^{-15}
SEMA4C	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C	5.85	2.30×10^{-12}
ACOT7	Acyl-CoA thioesterase 7	5.73	1.33×10^{-12}
ICA1*[E11]	Islet cell autoantigen 1, 69kDa	5.72	3.30×10^{-10}
SSTR2	Somatostatin receptor 2	5.64	1.19×10^{-11}
PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	5.59	5.32×10^{-22}
SLC35D2	Solute carrier family 35 (UDP-GlcNAc/UDP-glucose transporter), member D2	5.55	5.05×10^{-24}
C1orf216	Chromosome 1 open reading frame 216	5.50	4.62×10^{-21}
ZMIZ1	Zinc finger, MIZ-type containing 1	5.49	9.73×10^{-54}
PER1	Period circadian clock 1	5.43	2.24×10^{-10}
LRP8	Low-density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	5.41	6.15×10^{-15}
FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	5.38	9.01×10^{-08}
TIE1	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	5.35	5.38×10^{-07}
WDR62	WD repeat domain 62	5.33	2.73×10^{-09}

(Continued)

TABLE E2. *(Continued)*

Gene symbol	Gene name	Fold change	Adjusted *P* value
SMIM24	Small integral membrane protein 24	5.29	2.67×10^{-05}
ROR1	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	5.11	1.08×10^{-20}
INPP1	Inositol polyphosphate-1-phosphatase	5.06	3.31×10^{-18}
GBP2	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	5.03	9.60×10^{-26}
HLX	H2.0-like homeobox	4.99	1.35×10^{-16}
CYB5R2	Cytochrome b5 reductase 2	4.93	4.08×10^{-09}
TMEM132A	Transmembrane protein 132A	4.92	1.79×10^{-21}
LPIN1	Lipin 1	4.80	1.00×10^{-27}
CSRNP1	Cysteine-serine-rich nuclear protein 1	4.75	4.98×10^{-24}
PLXNB1	Plexin B1	4.74	5.54×10^{-05}
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor	4.74	3.73×10^{-08}
MS4A4A	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	4.72	2.31×10^{-04}
MMP14	Matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	4.69	6.63×10^{-04}
ANK2	Ankyrin 2, neuronal	4.62	7.80×10^{-04}
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	4.59	2.30×10^{-27}
RTN2	Reticulon 2	4.59	6.66×10^{-05}
CYP2J2	Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	4.59	2.71×10^{-09}
EPS8L1	EPS8-like 1	4.57	6.50×10^{-04}
SCN1B	Sodium channel, voltage gated, type I beta subunit	4.53	6.70×10^{-06}
ZYX	Zyxin	4.53	1.03×10^{-24}
TUBA1C	Tubulin, alpha 1c	4.52	1.14×10^{-06}
SPHK1	Sphingosine kinase 1	4.49	4.47×10^{-05}
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus	4.46	3.05×10^{-03}
TLN2	Talin 2	4.43	5.89×10^{-05}
CIT	Citron rho-interacting serine/threonine kinase	4.41	5.57×10^{-03}
AKAP12*[E12,E13]	A kinase (PRKA) anchor protein 12	4.40	7.01×10^{-08}
NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)	4.38	5.71×10^{-10}
PDE9A	Phosphodiesterase 9A	4.36	6.26×10^{-07}
NET1	Neuroepithelial cell transforming 1	4.32	2.17×10^{-14}
CISH	Cytokine inducible SH2-containing protein	4.28	4.96×10^{-11}
ABCG1	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 1	4.27	2.57×10^{-30}
NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2	4.26	8.94×10^{-08}
PAK6	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6	4.24	4.01×10^{-06}
IZUMO4	IZUMO family member 4	4.22	6.26×10^{-15}
CALHM2	Calcium homeostasis modulator 2	4.20	4.17×10^{-10}
ZDHHC11	Zinc finger, DHHC-type containing 11	4.20	2.63×10^{-03}
LRRC36	Leucine rich repeat containing 36	4.20	1.15×10^{-16}
MS4A14	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14	4.20	3.88×10^{-13}
FAM101B	Family with sequence similarity 101, member B	4.16	4.65×10^{-06}
ESR1	Estrogen receptor 1	4.16	7.03×10^{-08}
METRNL*[E14]	Meteorin, glial cell differentiation regulator-like	4.13	1.92×10^{-08}
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	4.10	2.91×10^{-02}
SH2D2A	SH2 domain containing 2A	4.09	1.79×10^{-04}
PTP4A3	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	4.03	6.07×10^{-10}

*Proteins described as potential autoantigens associated with human autoimmune diseases.

PAPIER 5

Gies V., Wagner A., Seifert C., Guffroy A., Fauny J.D., Knapp A.M., Pasquali J.L., Martin T., Dumortier H., Korganow A.S., Soulas-Sprauel P.

Identification of autoreactives B cells with labeled nucleosomes.

Scientific Reports. *2017.*

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes

Vincent Gies[1,2], Alain Wagner[3], Cécile Seifert[1], Aurélien Guffroy[1,2], Jean-D. Fauny[1], Anne-M. Knapp[1], Jean-L. Pasquali[1,2,4], Thierry Martin[1,2,4], Hélène Dumortier[1], Anne-S. Korganow[1,2,4] & Pauline Soulas-Sprauel[1,2,5]

Received: 10 October 2016
Accepted: 28 February 2017
Published online: 04 April 2017

The pathogenesis of autoimmune diseases has not been completely elucidated yet, and only a few specific treatments have been developed so far. In autoimmune diseases mediated by pathogenic autoantibodies, such as systemic lupus erythematosus, the specific detection and analysis of autoreactive B cells is crucial for a better understanding of the physiopathology. Biological characterization of these cells may help to define new therapeutic targets. Very few techniques allowing the precise detection of autoreactive B cells have been described so far. Herein we propose a new flow cytometry technique for specific detection of anti-nucleosome B cells, which secrete autoantibodies in systemic lupus erythematosus, using labeled nucleosomes. We produced different fluorochrome-labeled nucleosomes, characterized them, and finally tested them in flow cytometry. Nucleosomes labeled via the cysteines present in H3 histone specifically bind to autoreactive B cells in the anti-DNA transgenic B6.56R mice model. The present work validates the use of fluorochrome-labeled nucleosomes via cysteines to identify anti-nucleosome B cells and offers new opportunities for the description of autoreactive B cell phenotype.

Many autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), are characterized by the presence of B cells that are directed against self antigens (i.e. autoreactive B cells) and produce autoantibodies (autoAbs)[1]. In these autoimmune diseases mediated by pathogenic autoAbs, the specific detection and analysis of autoreactive B cells is a key point to understand the physiopathology of the disease. The phenotypic analysis of these cells by flow cytometry would potentially lead to the description of new specific markers of autoreactive B cells. In addition it could give interesting information about the biological abnormalities which characterize these cells, and may help to find new therapeutic targets.

In healthy individuals, tolerance mechanisms prevent the development and the activation of auto-reactive B cells, but these mechanisms are deficient in autoimmune diseases. Indeed SLE – a prototypic autoantibody-mediated autoimmune disease – is characterized by a loss of tolerance to nuclear antigens, due to a deficient clearance of apoptotic cells[2,3]. Nuclear antigen recognition leads to an abnormal auto-reactive immune response, in which B cells play a central role with the production of pathogenic autoAbs, as anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) or anti-nucleosome antibodies[4–7]. Anti-nucleosome antibodies are part of a large family of antibodies directed against epitopes of histones, dsDNA or conformational epitopes created by the interactions between dsDNA and histones[8]. They may precede the clinical development of SLE up to 10 years[4], and as anti-DNA antibodies, they are SLE-specific and associated with the disease activity[9]. These autoantibodies form immune complexes within blood vessels and kidneys leading to chronic inflammation, and thus play a critical role in the pathogenesis[6,10–12]. However the exact phenotype of B cells producing these autoAbs in SLE remains unknown.

Very few techniques allowing the detection of antigen-specific autoreactive B cells using flow cytometry have been described in the literature[13–18]. In SLE, some studies used small linear peptide sequences[14,16], limiting the number of autoepitopes (protein sequences recognized by autoreactive B cells) and therefore resulting in

[1]CNRS UPR 3572 "Immunopathology and Therapeutic Chemistry"/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France. [2]Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. [3]Laboratory of Functional ChemoSystems, CNRS-University of Strasbourg UMR 7199/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67400, Illkirch, France. [4]UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. [5]UFR Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S. (email: pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr)

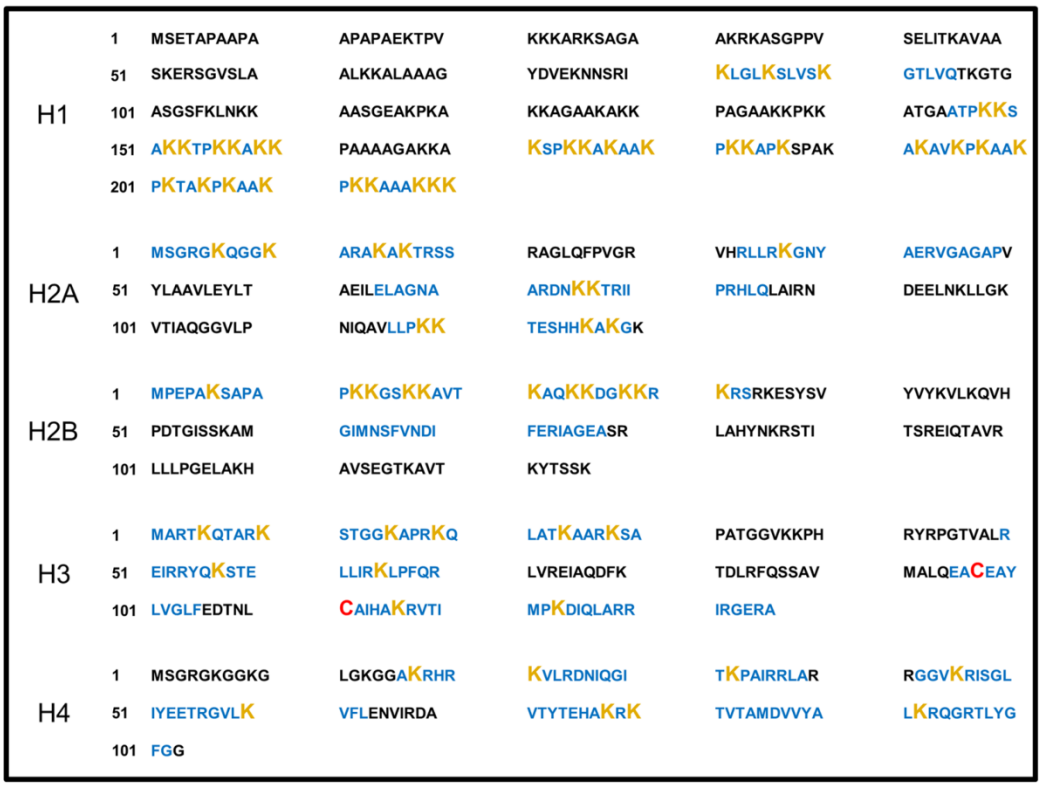


Figure 1. Protein sequences of histones. Protein sequences of histone regions which are exposed at the surface (*blue*). Lysine bearing free amine group (*orange*); Cysteine (*Red*).

the isolation of only a small fraction of the pathogenic autoreactive B cells. In addition, other studies used an anti-idiotype antibody called 9G4 to label and characterize autoreactive B cells from SLE patients[15,19–21]. However 9G4 recognizes B cell antigen receptors (BCRs) on many autoreactive B cells, and also on other unrelated targets that are not linked to the pathogenesis of the disease, such as N-acetyl-lactosamine determinants of blood group antigens or CD45 surface protein[22–24], limiting results interpretation. In order to develop a technique for the detection of autoreactive B cells by flow cytometry in SLE, we chose the nucleosome – the basic unit of chromatin – as an autoantigen. Nucleosome is composed of 146 DNA base pairs wrapped around two copies of histones H2A, H2B, H3 and H4 (the core histones)[25,26]. Free circulating DNA is usually not found in SLE patient, but rather exists in the form of circulating nucleosomes[27], suggesting that the nucleosome is both the driving immunogen and the target of anti-dsDNA antibodies. The nucleosome, the major autoantigen in SLE[28–30], possesses multiple autoepitopes, including DNA. Therefore, the use of labeled nucleosomes could be more adapted to the isolation of a large spectrum of representative pathogenic B cells than the use of a linear peptide that can only isolate a small fraction of autoreactive B cells.

The aim of this study was to produce and characterize fluorochrome-labeled nucleosomes, and finally test them for the detection of anti-nucleosome B cells. Cysteine-labeled nucleosomes display a suitable fluorescence and can specifically bind to autoreactive B cells in the anti-DNA transgenic B6.56R mice model. In addition, the use of antibodies blocking the BCR inhibited this labeling, arguing for a BCR selective binding of the labeled nucleosomes. Thus, the present work opens up the use of cysteine labeled nucleosomes to identify and characterize anti-nucleosome B cells for a better understanding of SLE physiopathology.

Results and Discussion

Nucleosome labeling and characterization. In order to develop a new flow cytometric method to detect autoreactive B cells, we chose the nucleosome as an autoantigen. Nucleosomes were isolated from L1210 or HEK293 cell line (referred as "native nucleosomes") and labeled. As free amino groups are abundant at the major epitope sites of nucleosomes (Fig. 1), strategies using lysine labeling were excluded, to avoid a blocking of major epitopes and a potential loss of recognition by autoreactive B cells. We performed a cysteine-labeling of the histone H3 – the only one among the core histones to possess this amino-acid – with a AlexaFluor 488 maleimide (referred as "cysteine nucleosomes") (Fig. 1). High salt concentration was used to increase thiols availability to the maleimide[31,32], followed by a desalting dialysis to allow gradual reassembly of the nucleosome[33,34].

Samples were extensively dialyzed after nucleosome isolation and labeling, to ensure the removal of small proteins and free reagent (Supplementary Fig. S1). DNA analysis on 1.2% agarose gel, after proteinase K digestion, showed the presence of a 150 bp band, corresponding to mononucleosomes (Fig. 2a). Separation and characterization of proteins – based on polyacrylamide gel electrophoresis – highlighted the presence of the histone

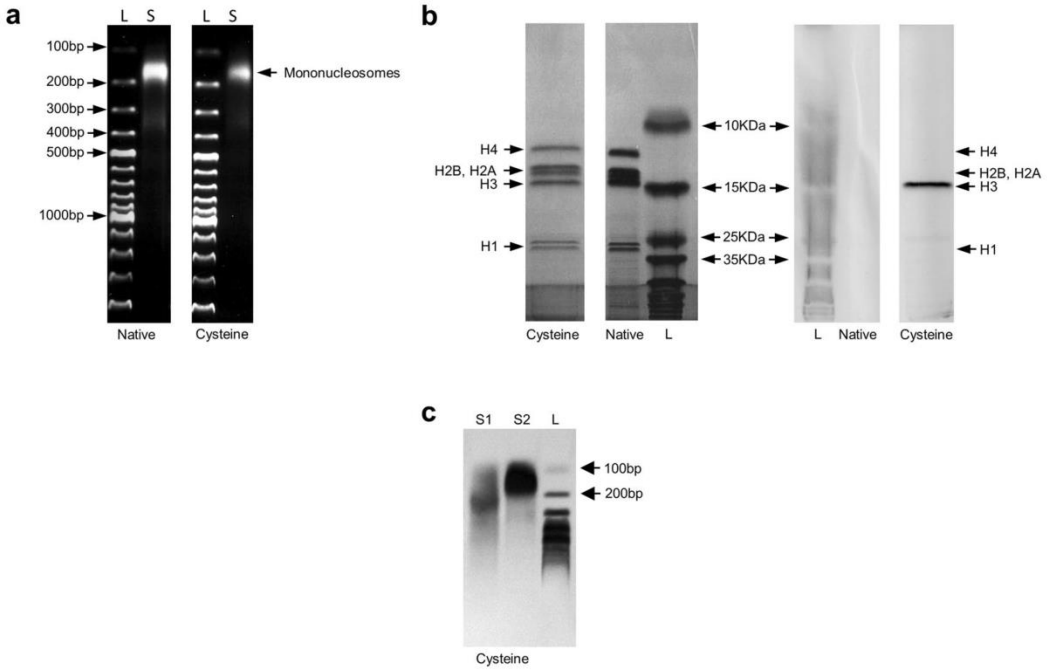


Figure 2. Characterization of native and labeled nucleosomes (cropped gel). (**a**) Analysis of nucleosome DNA content (500 ng of DNA) by agarose gel (1.2%) after proteinase K digestion. L: ladder; S: sample. (**b**) Analysis of nucleosome proteins (equivalent to 1.5 µg of DNA) by SDS/PAGE (18%) after Coomassie Blue staining (*left*) or under UV light before Coomassie Blue staining (*right*). Native: native nucleosome; Cysteine: cysteine nucleosome. (**c**) Analysis of cysteine nucleosome DNA content (500 ng of DNA) by agarose gel (1.2%) before (S1) or after (S2) proteinase K digestion. L: ladder; S: sample. The non-cropped images of the gels are presented in Supplementary Fig. S3.

octamer, composed of the four histones H2A, H2B, H3, H4, and histone H1, which is a linker between the histones octamer and the DNA[35]. The purity of the samples was high considering the almost complete absence of other bands (Fig. 2b, left). Exposition of the polyacrylamide gel to UltraViolet, before Coomassie Blue staining, allowed the detection of the AlexaFluor 488 in the nucleosomes. The labeling was specific to H3, the only histone containing cysteines. Labeled H3 displayed a strong fluorescence (Fig. 2b, right) that was confirmed by flow cytometry analysis (Supplementary Fig. S2). In addition, the integrity of cysteine nucleosome was evaluated by separation on 1.2% agarose gel. Cysteine nucleosomes ran much slower than the DNA they contain, which migrated to 150 bp after proteinase K digestion[36–38], confirming that cysteine nucleosomes were intact (Fig. 2c).

Effective nucleosome-autoAbs interaction after nucleosome labeling. An ELISA technique was used to test whether anti-nucleosome autoAbs recognized such labeled nucleosomes. A less effective antigen-antibody interaction could occur if the labeling leads to nonaccessible epitopes or a conformational change of the histone octamer. Plates were coated with native or cysteine nucleosomes, then incubated with serum containing anti-nucleosome IgG and IgM. For this purpose, we used sera from B6.56R mice (56R mice on C57BL/6 background), i.e. transgenic mice whose B cells express autoreactive BCRs and produce autoAbs directed against dsDNA, ssDNA and histones/DNA complexes[39,40]. Therefore, serum-derived antibodies from B6.56R mice recognize largely DNA and their ability, through that recognition, to bind nucleosomes was compared to serum-derived antibodies from control C57BL/6 mice. Native nucleosomes were highly recognized by IgM (Fig. 3a) or IgG (Fig. 3b) autoAbs from B6.56R mice, unlike immuglobulins from control mice. As expected, the labeling of nucleosomes did not change the binding capacity of IgM (Fig. 3a) or IgG (Fig. 3b) from B6.56 R. To assess the antigenic composition and how these labeled nucleosomes would react with autoantibodies against histones, we used an anti-H4 antibody specific for the amino-terminal sequence of histone H4 – a surface exposed region (Fig. 1). The anti-H4 antibody reacted with labeled nucleosomes, in a dose-dependent manner (Fig. 3c). Therefore, cysteine nucleosomes appeared as good candidates for a flow cytometry use.

Detection of anti-nucleosome B cells by flow cytometry using labeled nucleosomes. The autoreactive 56R heavy chain knock-in mice model is a very useful and well-described model in order to study how tolerance against an ubiquitous antigen takes place[41,42]. When combined with endogenous light chain, the 56R transgene – a mutated form of the anti-DNA 3H9 transgenic heavy chain – forms a BCR with increased affinity and specificity for dsDNA, ssDNA and histones/DNA complexes[39,40]. The detection of autoreactive B cells in this model is based on the identification of cells carrying the transgene by PCR, or by flow cytometry using anti-haplotype antibodies: anti-IgM^a antibody binds to BCR expressing the "a" haplotype, which corresponds to the 56R transgenic heavy chain that potentially recognizes the autoantigens, and anti-IgM^b antibody binds to

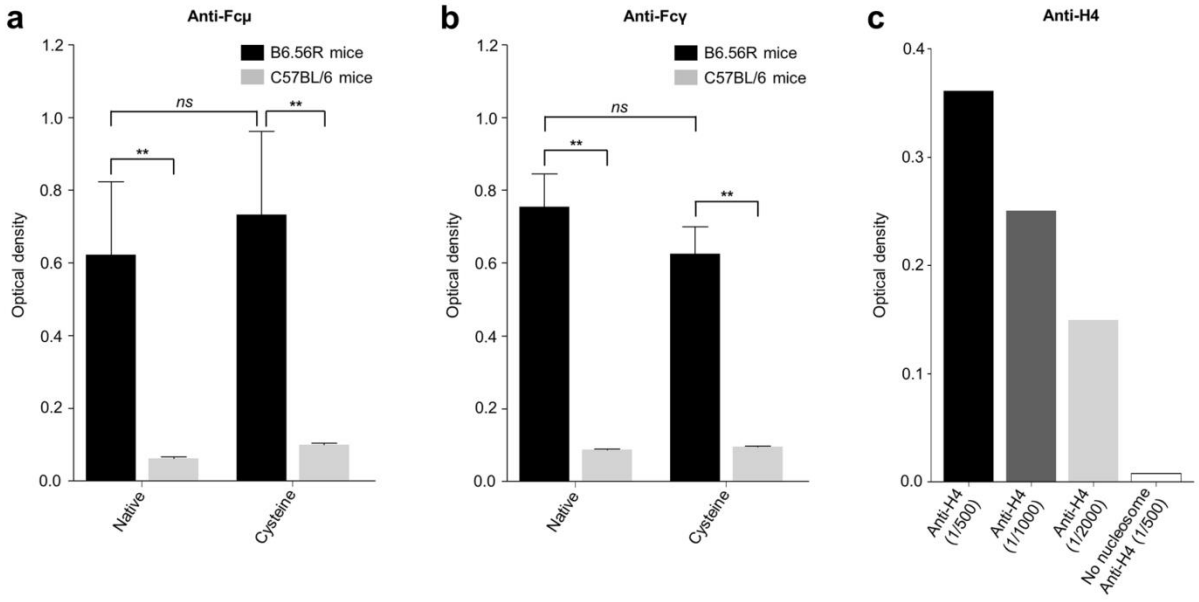


Figure 3. Recognition of labeled nucleosomes by antibodies from B6.56R and control (C57BL/6) mice. Serum-derived IgM (**a**) or IgG (**b**) from B6.56R mice (*black*; n = 5) and C57BL/6 mice (*grey*; n = 5) were tested by indirect ELISA against nucleosomes. The histograms represent the optical density (mean ± SEM) obtained with labeled or native nucleosomes. (**c**) The reactivity of an anti-H4 antibody (1/500, 1/1000 and 1/2000 dilutions) was tested by indirect ELISA against cysteine nucleosomes. A negative control without nucleosome was added (white bar). Statistical comparison was carried out using nonparametric two-tailed Mann-Whitney test. Native: native nucleosome; Cysteine: cysteine nucleosome. $^{**}P < 0.005$.

BCR expressing the "b" haplotype, i.e. the endogenous heavy chains[42]. As shown in Fig. 4a, most B cells in B6.56R mice expressed the transgene, with a majority of $B220^+$ B cell expressing IgM^a (75.20% ± 1.95) compared to IgM^b (8.82% ± 0.69), while C57BL/6 mice did not express the transgenic allele and therefore had only IgM^b B cells (96.16% ± 0.09).

In B6.56R mice, B cells expressing the 56R transgene partially escape tolerance mechanisms and produce auto-Abs in the periphery[43–45]. However, due to editing of the variable regions or to the possibility to pair with particular light chains, only a fraction (36%) of spontaneous hybridomas from B6.56R mice really bind the autoantigen[46]. Consequently the identification of the heavy chain using only anti-IgM^a labeling is not the best way to determine the phenotype of autoreactive B cells. The co-staining with labeled nucleosomes could, however, resolve this issue.

Indeed, a significant proportion of B cells from B6.56R mice recognized cysteine nucleosomes, while only a few B cells from C57BL/6 mice were labeled (17.40% ± 1.46 vs. 1.51% ± 0.19) (Fig. 4b). In contrast, T cells did not bind cysteine nucleosomes (Fig. 4c) both in B6.56R mice (0.54% ± 0.16) and in C57BL/6 mice (0.28% ± 0.02). Microscopy analysis confirmed the absence of nucleosomes' labeling on B cells from control mice and a nucleosome punctuate membrane staining on a fraction of B cells in B6.56R mice (Supplementary Fig. S4a,b). In addition, this staining was highly specific to IgM^{a+} B cells, with only few IgM^{b+} B cells being labeled in B6.56R mice (21.19% ± 1.78 in IgM^{a+} B cell population, vs. 2.38% ± 0.27 in IgM^{b+} B cell population) (Fig. 4d), confirming that the labeling was selective of transgenic IgM^{a+} B cells.

To demonstrate that the staining with nucleosomes on IgM^{a+} B cells was BCR-specific, B cells were incubated with an anti-mouse Fab antibody before labeling with nucleosomes. This antibody binds to the BCR (containing two Fab fragments), leading to steric hindrance[47] and partial BCR internalization[48,49], and thereby prevents antigen recognition. Pre-incubation with an anti-Fab antibody highly inhibited nucleosome binding on B cells from B6.56R mice (17.40% ± 1.46 without anti-Fab vs. 3.76% ± 0.68 with anti-Fab antibodies). In contrast, we did not detect any significant inhibition on B cells from C57BL/6 mice (1.51% ± 0.19 without anti-Fab vs 0.98% ± 0.07 with anti-Fab antibodies) (Fig. 5). In addition, BCR clusters containing nucleosomes could be identified after B cell activation (Supplementary Fig. S4c). Together, these data confirmed that cysteine nucleosomes bind to IgM^{a+} B cells in a BCR specific manner.

To extend our results, we performed an ELISA test using sera from BW mice, a mouse strain that spontaneously develop lupus-like disease[50], and BALB/c mice as control. As expected, only BW mice sera reacted with native or cysteine nucleosomes. Similar results were obtained with serum from SLE patients and nucleosomes extracted from HEK293 cells, a human cell line (Fig. 6). A preliminary flow cytometry experiment on B cells from BW mice and one SLE patient showed a detectable staining with cysteine nucleosomes (Fig. 7). Altogether, these data showed that cysteine labeled nucleosome could be used to explore the phenotype of anti-nucleosome autoreactive B cells.

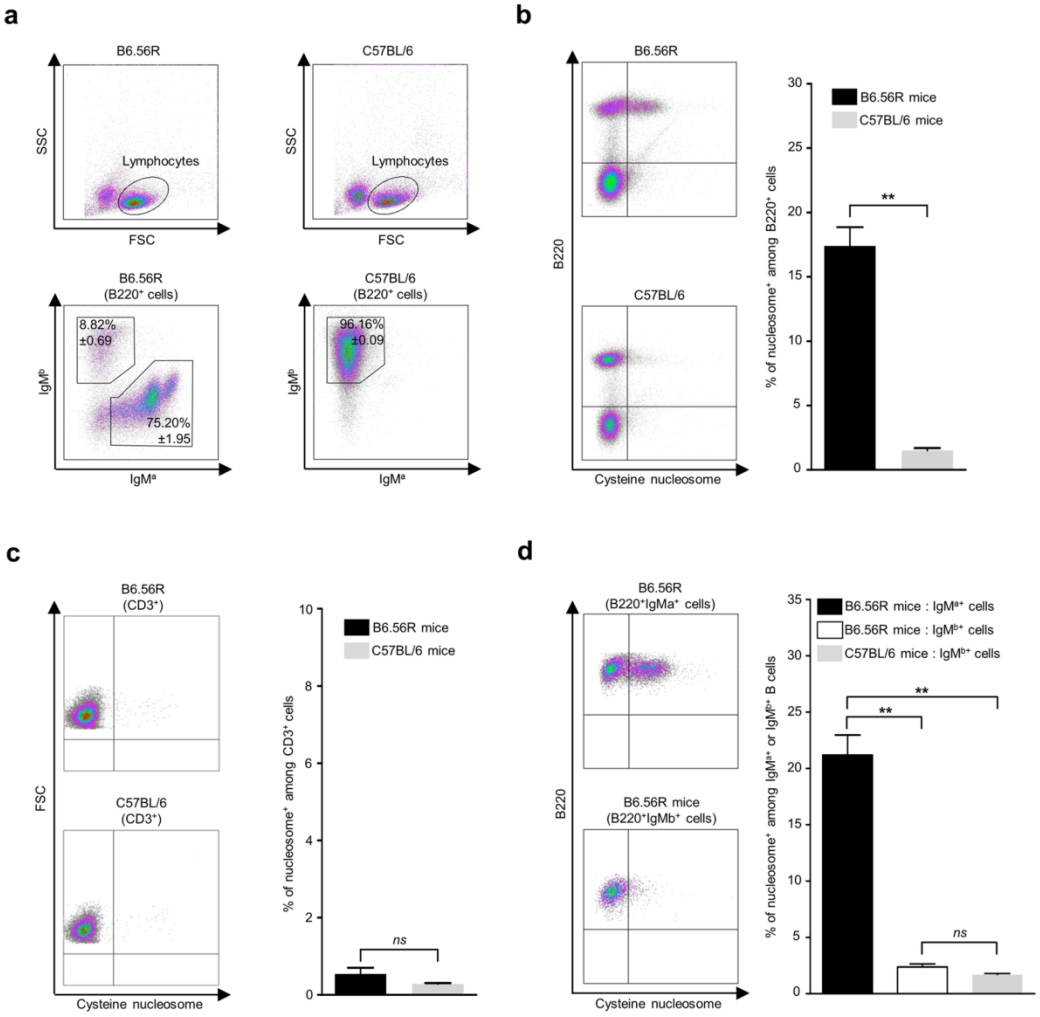


Figure 4. Cysteine nucleosome selectively stained the B cells carrying the transgenic heavy chain, from B6.56R mice. (**a**) Plots of cysteine nucleosomes loaded lymphocytes (upper diagrams) and flow cytometry analysis of IgM^{a+} or IgM^{b+} splenic B cells subsets (lower diagrams; percentage of $B220^+$ cells in the lymphocyte gate) in B6.56R mice compared to C57BL/6 mice. (**b**, *left*) Representative plots of splenic $B220^+$ B cells staining with labeled nucleosomes, in B6.56R mice and C57BL/6 mice. (**b**, *right*) Frequency of splenic cysteine nucleosome positive B cells (percentage among $B220^+$ cells) in B6.56R mice (*black*) and C57BL/6 mice (*grey*). (**c**, *left*) Representative plots of $CD3^+$ T cells staining with cysteine nucleosomes, in B6.56R mice and C57BL/6 mice. (**c**, *right*) Frequency of splenic cysteine nucleosome positive T cells (percentage among $CD3^+$ cells) in B6.56R mice (*black*) and C57BL/6 mice (*grey*). (**d**, *left*) Representative plots of splenic $IgM^{b+}B220^+$ or $IgM^{a+}B220^+$ B cells staining with labeled nucleosomes, in B6.56R mice. (**d**, *right*) Frequency of cysteine nucleosome positive B cells (percentage among $IgM^{b+}B220^+$ or $IgM^{a+}B220^+$ cells) in B6.56R mice (*black*: IgM^a; *white*: IgM^b) compared to $IgM^{b+}B220^+$ cells from C57BL/6 mice (*grey*). Mean ± SEM for 5 mice. Statistical comparison was carried out using nonparametric two-tailed Mann-Whitney test. $^{**}P < 0.005$.

Conclusion

The development of autoreactive B cells is tightly regulated in healthy individuals. A breakdown in tolerance mechanisms may result in the emergence of autoreactive B cells and the production of pathogenic autoAbs, leading to autoimmune disease development. In order to better characterize autoreactive B cells in SLE – a prototypic autoantibody-mediated autoimmune disease – we chose the main autoantigen responsible for pathogenic autoantibody production: the nucleosome. Different strategies were tested to set up a flow cytometry labeling protocol of autoreactive B cells with fluorescent nucleosomes. (i) One approach used nucleosomes labeled via EdU (5-ethynyl-2′-deoxyuridine), a nucleoside analog of thymidine, that is incorporated into DNA during active DNA synthesis[51] and detected with a click reaction ("Huisgen's reaction" or 1–3 dipolar cycloaddition)[52]. As copper, which is known to be toxic and cause protein alterations and DNA cleavages[53,54], is required for the click reaction to proceed, we stop using this method (data not shown). (ii) As a second approach, we produced nucleosomes coupled to the green fluorescent protein (GFP) by transducing HEK293T cells with a lentivirus allowing the expression of GFP fused to the C-terminal part of histone H2B. However these nucleosomes displayed a low

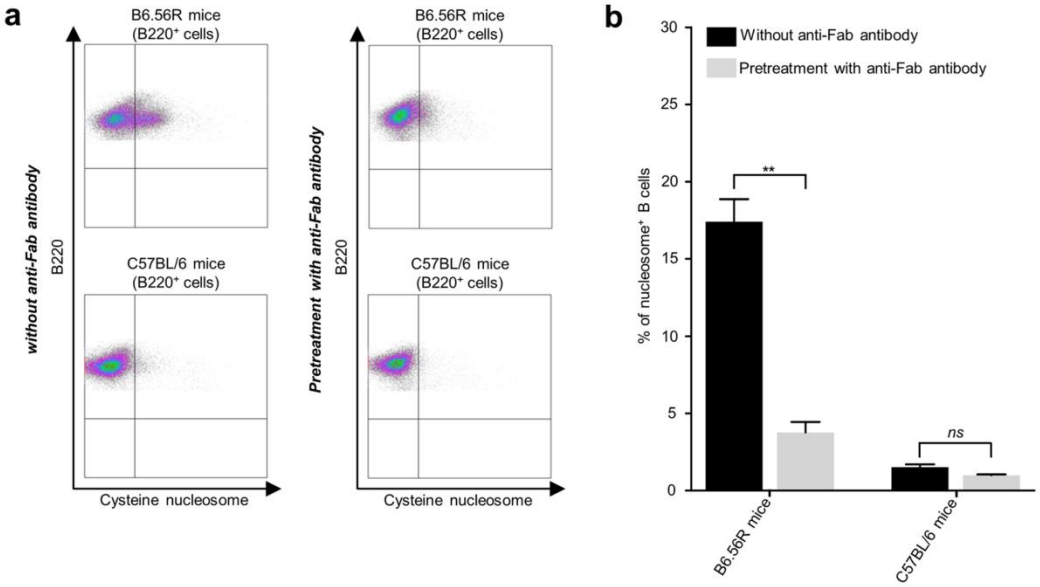


Figure 5. Cysteine nucleosome staining on IgM^{a+} B cells from B6.56R mice is BCR-specific. (**a**) Representative plots of splenic B220^{+} cells staining with labeled nucleosomes, without (*left*) or with (*right*) pretreatment with an anti-Fab antibody, in B6.56R mice compared to C57BL/6 mice. (**b**) Frequency of cysteine nucleosome^{+} B220^{+} cells (percentage among B220^{+} cells; mean ± SEM; n = 5), with (*grey*) or without (*black*) pretreatment with an anti-Fab antibody, in B6.56R mice compared to C57BL/6 mice. Statistical comparison was carried out using nonparametric two-tailed Mann-Whitney test. $^{**}P < 0.005$.

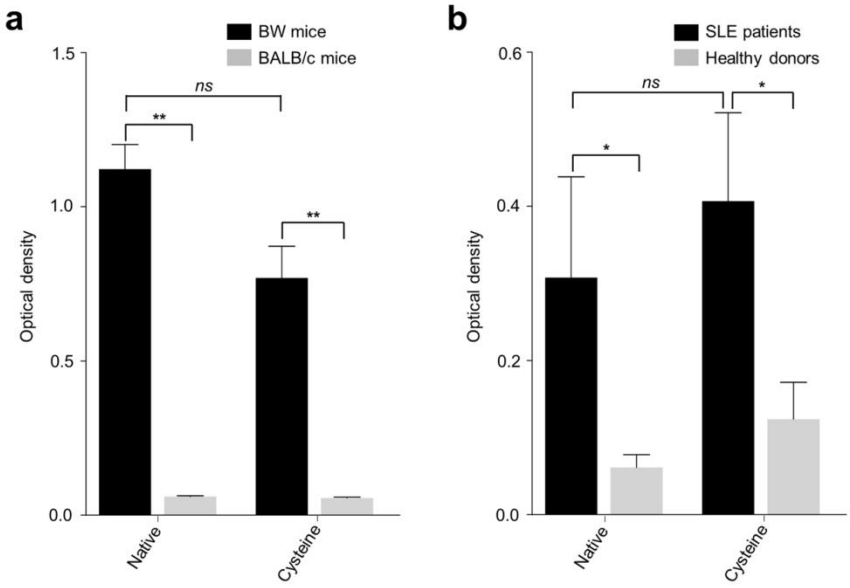


Figure 6. Recognition of labeled nucleosomes by antibodies from BW mice, BALB/c mice, SLE patients and healthy donors. (**a**) IgG from BW mice (*black*; n = 5) and BALB/c mice (*grey*; n = 5) sera were tested against nucleosomes in an indirect ELISA test. Nucleosomes were isolated from L1210 murine cell line (**b**) IgG from SLE patients (*black*; n = 5) and healthy donors (*grey*; n = 5) sera were tested against nucleosomes in an indirect ELISA test. Nucleosomes were isolated from HEK293 human cell line (**b**). Statistical comparison was carried out using nonparametric two-tailed Mann-Whitney test. Native: native nucleosome; Cysteine: cysteine nucleosome. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$.

fluorescent intensity, not sufficient to clearly detect the autoreactive B cells (data not shown). (iii) Finally, the labeling of cysteines with AlexaFluor 488 appeared to be adapted for the study of autoreactive B cells in B6.56R mice, with a suitable fluorescence for flow cytometry use and a BCR-specific labeling.

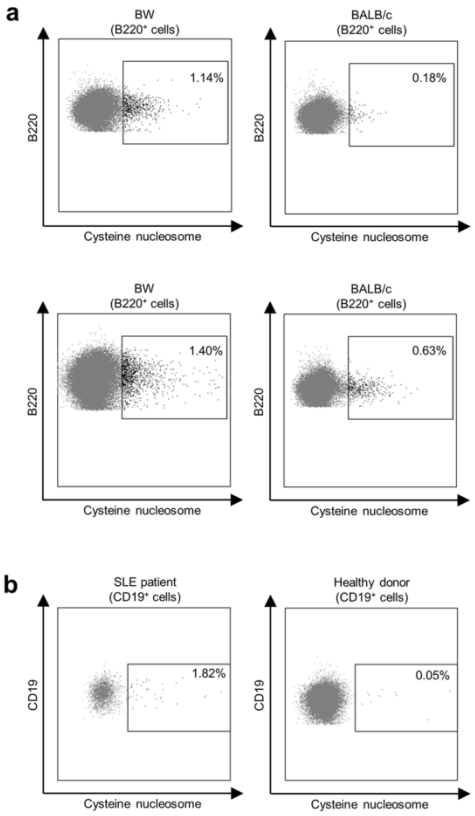


Figure 7. (**a**) Plots of nucleosome staining in splenic B220^{+} B cells in BW mice compared to BALB/c mice. (**b**) Plots of nucleosome staining in CD19^{+} B cells from SLE patient and healthy donor.

56R mice allowed great progress in understanding the mechanisms of B cell tolerance[39,42,46,55–57]. However, the study of tolerance in these mice was limited as autoreactive B cells could not be finely individualized. In fact, the description of the behaviour of IgM^{a+} cells in these animals compared to IgM^{b+} cells did not take into account the editing process of the light chain able to modify the BCR specificity. The technique described herein allowed us to identify such potentially pathogenic B cells, and could be used to further characterize the breakdown of B cell tolerance in this model, based on the anti-nucleosome activity of autoreactive B cells.

In addition, this technique could be used for the detection of autoreactive B cells in BW mice lupus nephritis models, and in SLE patients. Cysteine nucleosomes were well recognized by BW or human autoAbs, and a preliminary flow cytometric experiment showed a detectable staining on B cells from BW mice and SLE patient, although, as expected[14,16], the number of stained cells was low. Various improvements of this technique are still conceivable, such as the use of sorted B cells and labeled nucleosomes derived from apoptotic cells. Indeed, the immunogenicity of apoptotic nucleosomes is more important, and sera from SLE patients display an higher reactivity with apoptosis-specific chromatin modifications[58–62]. Adaptation and application of this new technique in humans would be of great interest to determine the phenotypic difference of anti-nucleosome B cells between quiescent (in inactive phase) and active SLE patients, and healthy subjects. This will undoubtedly lead to a better understanding of SLE physiopathology and to a potential effective therapeutic targeting of the pathogenic autoreactive cells, which remains a real challenge for the moment.

Materials and Methods

Patients and samples. 5 patients with the diagnosis of SLE were selected for sera analysis. All SLE patients fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE[63]. Only patients with no treatment, or hydroxychloroquine, or steroids less than 20 mg per day and without immunosuppressive treatments in the previous 6 months, at the time of diagnosis, were included. The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki declaration. Informed consent was obtained from the parents or legal wards of the patients and the study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Strasbourg's University Hospital.

Mice. 47 to 51 weeks-old proteinuric female (NZBxNZW)F1 mice (also known as BW mice) or control BALB/c mice, and 7 to 9 weeks-old C57BL/6 (carrying Igh-b, i.e. the "b" allotype of heavy chain constant region) or B6.56R (carrying Igh-a, i.e. the "a" allotype of heavy chain constant region) mice were bred and maintained in the I.B.M.C. (Cellular and Molecular Biological Institute) animal facility (approved by the French Veterinary

Services, #F67–482–2). B6.56R transgenic mice were genotyped by PCR amplification of tail DNA, as previously described[45]. All experiments were carried out in accordance with the European Community guidelines on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/UE), and approved by the Regional Ethics Committee of Strasbourg (CREMEAS).

Nucleosome isolation. L1210 cells (murine cell line) or HEK293 cells (human cell line) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 100U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin. $1 * 10^9$ L1210 cells were used to produce one batch of purified nucleosomes. Before use, 100 µL of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) was added in buffers A to D. Cells were centrifuged (5 min, 400 g), then washed 2 times in 10 mL of buffer A (0.015 M TrisHCl pH 7.4, 0.015 M NaCl, 0.060 M KCl, 0.005 M $MgCl_2$). After centrifugation (5 min, 400 g) the cells were washed in 10 mL of buffer B (0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.001 M KCl; 0,0015 M $MgCl_2$), and finally were resuspended in 10 mL of buffer B. Cells were grinded on ice for 5 minutes. 10 mL of buffer A was added prior to centrifugation (10 min, 1000 g) and the pellet was washed in 10 mL of buffer A. After centrifugation (10 min, 1000 g) the pellet was suspended in 10 mL of buffer C (0.015 M Tris-HCl pH 7.4, 0.015 M NaCl, KCl 0.060 M, 0.005 M $MgCl_2$, 0.001 M $CaCl_2$) and the absorbance was measured (260 nm, dilution 1:100 in 0.1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) solution). 0.1 unit of micrococcal nuclease (Sigma-Aldrich) per absorbance unit was added in order to lyse free DNA. The samples were incubated 20 min at 37 °C, then 500 µL of 200 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added. After centrifugation (10 min, 1500 g, +4 °C), the pellet was resuspended in 10 ml of buffer D (0.001 M Tris-HCl pH 7.4, 0.001 M EDTA pH 7.4). The solution was incubated 30 min on ice with regular shaking. After centrifugation (10 min, 1500 g, +4 °C), the supernatant – which contained the nucleosomes – was collected and dialysed (20 kDa MWCO) against 500 mL of buffer D in two successive steps at +4 °C, one for 2 hours, then overnight with fresh buffer. The DNA concentration was measured (dilution 1:100 in 0.1% (v/v) SDS solution). The samples were stored at −20 °C and referred as "native nucleosome". All experiments were with L1210 cells derived nucleosomes, unless otherwise specified.

Nucleosome cysteine labeling. 200 µL of native nucleosome were gently mixed with 250 µL of buffer (10 mM Tris-HCl, 0.7 mM EDTA, 3.6 M NaCl). 5-fold molar excess of AlexaFluor488 C_5-maleimide (Molecular Probes) was added and the mixture was incubated for 3 hours in the dark, at room temperature. After that, successive dialyses against solutions of decreasing ionic force was carried out following a modified protocol from Oudet P. *et al.*[33]. The solution was dialysed (3.5 kDa MWCO) in the dark at +4 °C against 500 mL of solution containing 10 mM Tris-HCl, 0.7 mM EDTA and decreasing NaCl concentration: 2 M for 2 hours, 1.5 M for 12 hours, 1 M for 24 hours, 0.75 M for 12 hours, 0.5 M for 24 hours, 0.4 M for 12 hours and a last dialysis with a new MWCO (20 kDa MWCO) against 0.4 M of NaCl for 12 hours. The DNA concentration was measured (dilution 1:100 in 0.1% (v/v) SDS solution). The samples were stored at −20 °C and referred as "cysteine nucleosome".

Gel characterization. 200 ng of DNA from each samples were digested with 500 ng of proteinase K and was visualized after electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel. For SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), 1.5 µg of DNA from each samples were denaturated by heating at 105 °C for 5 min in SDS reducing buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (v/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, 25% (v/v) glycerol and 0.01% (v/v) bromophenol blue). The samples were resolved using 18.0% separating gel with a 5% stacking gel. SDS-PAGE gels were then stained with Coomassie Blue.

ELISA. 96 well plates were incubated with 100 µl of nucleosome solution (DNA final concentration: 1 µg/mL) per well (L1210 cell-derived nucleosomes for mice, HEK293 cell-derived nucleosomes for humans), at 37 °C overnight. Plates were washed 3 times with PBS/0.05% (v/v) Tween (Sigma-Aldrich) and saturated with PBS/0.05% (v/v) Tween/1% (w/v) bovine serum albumine (BSA) for 1 hour at 37 °C. The plates were washed 3 times with PBS/0.05% (v/v) Tween, then 100 µL of serum (dilutions 1/500) or 100 µL of anti-H4 antibody (clone S.99.5; Thermo Fisher Scientific) were incubated for 1 hour at 37 °C. The plates were washed 3 times with PBS/0.05% (v/v) Tween, and 50 µL of an anti-human Fcγ antibody coupled to peroxidase (dilution 1/20000; polyclonal; JacksonImmuno), 50 µL of an anti-mouse Fcγ antibody coupled to peroxidase (dilution 1/10000; polyclonal; JacksonImmuno), or 50 µL of an anti-mouse Fcμ antibody coupled to peroxidase (dilution 1/10000; polyclonal; JacksonImmuno) were added, depending on the experiment. The plates were washed 3 times with PBS-/0.05% (v/v) Tween and revealed with 50 µL of TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine), for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with 50 µL of HCl (1 M), before reading at 450 nm using MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific).

Flow Cytometry. A suspension of murine splenocytes was obtained by grinding the spleen of mice on a 40 µm cell strainer. Red blood cells were lysed using ammonium-chloride-potassium lysis buffer (NH_4Cl 0.15 M, $KHCO_3$ 10.0 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.4). Cells were washed twice in PBS.

Anticoagulated venous blood from patients and healthy donors was collected and was subjected to density gradient centrifugation to get peripheral blood mononuclear cells. Cells were washed twice in PBS.

Cell viability was assessed by incubation with Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience) following the manufacturer's protocol. Cells were washed twice in PBE (PBS, 0.5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA) and resuspended in PBE in order to have $10 * 10^6$ cells per mL. $0.5 * 10^6$ cells were dispensed into each tube. Some tubes, were incubated with 50 µL of anti-mouse IgG Fab antibodies (dilution 1/25; polyclonal; Bethyl Laboratories) for 40 min at 37 °C and washed twice with PBE. All subsequent steps are done in PBE buffer on ice, unless otherwise specified by protocol. 50 µL of labeled nucleosomes (2 µg of DNA/mL; L1210 cells derived nucleosomes for mice, HEK293 cells derived nucleosomes for humans) were added and incubated for 20 min in the dark at 4 °C. The cells were washed twice in PBE/0.1% (v/v) Tween and classical surface staining was performed in the dark for 15 min at

4 °C. When biotin conjugated antibody was used, the cells were washed twice and streptavidine was added and incubated for 15 min in the dark at 4 °C. The cells were washed twice and analysed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). A comprehensive list of antibodies used for this experiment includes: anti-mouse IgM^a-biotin (clone DS-1), anti-mouse IgM^b PE (clone AF6-78), anti-mouse CD3 PerCp-Cy5.5 (clone 145-2C11), anti-mouse B220 PE-CF594 or APC (clone RA3-6B2), anti-human CD19 APC (clone HIB19), and Streptavidin APC were purchased from BD Biosciences. Data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter) with "logicle" compensation[64]. Fluorescence minus one (FMO) controls[64] were used to make the distinction between cell populations that are positive for nucleosome staining and the ones that are negative.

Protein sequences. Protein sequences of nucleosome core particle were defined using UniProt database (www.uniprot.org)[65]. Data used to define histone regions exposed at the surface of the nucleosome derived from previously published papers[8,66–68]. Histone H1 (Uniprot entry: P10412-1); Histone H2A (Uniprot entry: P0C0S8); Histone H2B (Uniprot entry: P62807); Histone H3 (Uniprot entry: P68431); Histone H4 (Uniprot entry: P62805).

Statistics. Statistical comparison between groups was carried out using nonparametric two-tailed Mann-Whitney test using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). All data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). A p-value less than 0.05 was considered as significant.

References

1. Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2110–2121 (2011).
2. Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 280–289 (2010).
3. Jacobi, A. M. & Diamond, B. Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **202**, 341–344 (2005).
4. Arbuckle, M. R. *et al*. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1526–1533 (2003).
5. Dörner, T., Giesecke, C. & Lipsky, P. E. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res. Ther.* **13**, 243 (2011).
6. van der Vlag, J. & Berden, J. H. M. Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies. *Semin. Nephrol.* **31**, 376–389 (2011).
7. Sanz, I. Rationale for B cell targeting in SLE. *Semin. Immunopathol.* **36**, 365–375 (2014).
8. Stemmer, C., Briand, J. P. & Muller, S. Mapping of linear histone regions exposed at the surface of the nucleosome in solution. *J. Mol. Biol.* **273**, 52–60 (1997).
9. Bizzaro, N., Villalta, D., Giavarina, D. & Tozzoli, R. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 97–106 (2012).
10. Winfield, J. B., Faiferman, I. & Koffler, D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* **59**, 90–96 (1977).
11. Hahn, B. H. Antibodies to DNA. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1359–1368 (1998).
12. van Bruggen, M. C. *et al*. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **12**, 57–66 (1997).
13. Garabatos, N. *et al*. *In vivo* detection of peripherin-specific autoreactive B cells during type 1 diabetes pathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 3080–3090 (2014).
14. Hamilton, J. A. *et al*. General Approach for Tetramer-Based Identification of Autoantigen-Reactive B Cells: Characterization of La- and snRNP-Reactive B Cells in Autoimmune BXD2 Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 5022–5034 (2015).
15. Cappione, A. 3rd *et al*. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **115**, 3205–3216 (2005).
16. Zhang, J. *et al*. Identification of DNA-reactive B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Methods* **338**, 79–84 (2008).
17. Kerkman, P. F. *et al*. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1170–1176 (2016).
18. Malkiel, S. *et al*. Checkpoints for Autoreactive B Cells in the Peripheral Blood of Lupus Patients Assessed by Flow Cytometry. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 2210–2220 (2016).
19. Richardson, C. *et al*. Molecular Basis of 9G4 B Cell Autoreactivity in Human Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Author Choice* **191**, 4926–4939 (2013).
20. Jenks, S. A. *et al*. 9G4+ autoantibodies are an important source of apoptotic cell reactivity associated with high levels of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **65**, 3165–3175 (2013).
21. Pugh-Bernard, A. E. *et al*. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J. Clin. Invest.* **108**, 1061–1070 (2001).
22. Cappione, A. J., Pugh-Bernard, A. E., Anolik, J. H. & Sanz, I. Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. *J. Immunol.* **172**, 4298–4307 (2004).
23. Silberstein, L. E., George, A., Durdik, J. M. & Kipps, T. J. The V4-34 encoded anti-i autoantibodies recognize a large subset of human and mouse B-cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* **22**, 126–138 (1996).
24. Cambridge, G. *et al*. Expression of the Inherently Autoreactive Idiotope 9G4 on Autoantibodies to Citrullinated Peptides and on Rheumatoid Factors in Patients with Early and Established Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* **9** (2014).
25. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
26. McGhee, J. D. & Felsenfeld, G. Nucleosome Structure. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1115–1156 (1980).
27. Rumore, P. M. & Steinman, C. R. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J. Clin. Invest.* **86**, 69–74 (1990).
28. Amoura, Z., Koutouzov, S. & Piette, J. C. The role of nucleosomes in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **12**, 369–373 (2000).
29. Amoura, Z., Piette, J. C., Bach, J. F. & Koutouzov, S. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum.* **42**, 833–843 (1999).
30. Muller, S., Dieker, J., Tincani, A. & Meroni, P. L. Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* **17**, 431–436 (2008).
31. Wong, N. T. & Candido, E. P. Histone H3 thiol reactivity as a probe of nucleosome structure. *J. Biol. Chem.* **253**, 8263–8268 (1978).
32. Daban, J. R. & Cantor, C. R. Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles. *J. Mol. Biol.* **156**, 749–769 (1982).
33. Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281–300 (1975).

34. Hizume, K. *et al.* Chromatin reconstitution: development of a salt-dialysis method monitored by nano-technology. *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 405–413 (2002).
35. Vignali, M. & Workman, J. L. Location and function of linker histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 1025–1028 (1998).
36. Schnitzler, G. R. Isolation of histones and nucleosome cores from mammalian cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 21, Unit 21.5 (2001).
37. Bowler, C. *et al.* Chromatin techniques for plant cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **39**, 776–789 (2004).
38. Kotani, H. & Kmiec, E. B. Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1949–1955 (1994).
39. Kishi, Y. *et al.* Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/ribonucleoprotein B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 7811–7816 (2012).
40. Liu, Y. *et al.* Lupus susceptibility genes may breach tolerance to DNA by impairing receptor editing of nuclear antigen-reactive B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 1340–1352 (2007).
41. Radic, M. Z. *et al.* Residues that mediate DNA binding of autoimmune antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **150**, 4966–4977 (1993).
42. Li, H., Jiang, Y., Prak, E. L., Radic, M. & Weigert, M. Editors and editing of anti-DNA receptors. *Immunity* **15**, 947–957 (2001).
43. Gay, D., Saunders, T., Camper, S. & Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**, 999–1008 (1993).
44. Chen, C. *et al.* Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 1970–1982 (1994).
45. Erikson, J. *et al.* Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* **349**, 331–334 (1991).
46. Sekiguchi, D. R. *et al.* Development and selection of edited B cells in B6.56R mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 6879–6887 (2006).
47. Lieby, P. *et al.* The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood* **97**, 3820–3828 (2001).
48. Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W. & Coggeshall, K. M. B Cell Antigen Receptor Endocytosis and Antigen Presentation to T Cells Require Vav and Dynamin. *J. Biol. Chem.* **284**, 24088–24097 (2009).
49. Song, W., Cho, H., Cheng, P. & Pierce, S. K. Entry of B cell antigen receptor and antigen into class II peptide-loading compartment is independent of receptor cross-linking. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 4255–4263 (1995).
50. Helyer, B. J. & Howie, J. B. Renal Disease associated with Positive Lupus Erythematosus Tests in a Crossbred Strain of Mice. *Nature* **197**, 197–197 (1963).
51. Buck, S. B. *et al.* Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2′-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2′-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* **44**, 927–929 (2008).
52. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **40**, 2004–2021 (2001).
53. Cervantes-Cervantes, M. P., Calderón-Salinas, J. V., Albores, A. & Muñoz-Sánchez, J. L. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biol. Trace Elem. Res.* **103**, 229–248 (2005).
54. Requena, J. R., Chao, C.-C., Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 69–74 (2001).
55. Yunk, L., Meng, W., Cohen, P. L., Eisenberg, R. A. & Luning Prak, E. T. Antibodies in a heavy chain knock-in mouse exhibit characteristics of early heavy chain rearrangement. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 452–461 (2009).
56. Chen, C. *et al.* The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* **373**, 252–255 (1995).
57. Li, Y., Li, H. & Weigert, M. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* **195**, 181–188 (2002).
58. Dieker, J. *et al.* Autoantibodies against Modified Histone Peptides in SLE Patients Are Associated with Disease Activity and Lupus Nephritis. *PLOS ONE* **11**, e0165373 (2016).
59. Dieker, J. W. *et al.* Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **56**, 1921–1933 (2007).
60. van Bavel, C. C. *et al.* Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 201–207 (2011).
61. van Bavel, C. C. *et al.* Apoptosis-associated acetylation on histone H2B is an epitope for lupus autoantibodies. *Mol. Immunol.* **47**, 511–516 (2009).
62. Liu, C. L. *et al.* Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R25 (2012).
63. Tan, E. M. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25**, 1271–1277 (1982).
64. Tung, J. W. *et al.* Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin. Lab. Med.* **27**, 453–468, v (2007).
65. Consortium, T. U. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**, D204–D212 (2015).
66. Muller, S., Himmelspach, K. & Van Regenmortel, M. H. Immunochemical localization of the C-terminal hexapeptide of histone H3 at the surface of chromatin subunits. *EMBO J.* **1**, 421–425 (1982).
67. Lu, L., Kaliyaperumal, A., Boumpas, D. T. & Datta, S. K. Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. *J. Clin. Invest.* **104**, 345–355 (1999).
68. Stemmer, C., Briand, J. P. & Muller, S. Mapping of linear epitopes of human histone H1 recognized by rabbit anti-H1/H5 antisera and antibodies from autoimmune patients. *Mol. Immunol.* **31**, 1037–1046 (1994).

Acknowledgements

This research was supported by the ANR program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-EQPX-022) and by grants from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (API 2012 HUS No. 5543). We thank Guilhem Chaubet (Laboratory of Functional ChemoSystems, CNRS-University of Strasbourg UMR 7199/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg) for his English review of the manuscript.

Author Contributions

V.G., A.W., J.L.P., T.M., H.D., A.S.K. and P.S.S. designed the research. V.G., C.S., A.G., J.D.F. and A.M.K. performed the research. V.G., A.W., C.S., A.G., J.D.F., A.M.K., J.L.P., T.M., H.D., A.S.K. and P.S.S. analysed the data. V.G., A.W., J.L.P., H.D., A.S.K. and P.S.S. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-00664-0

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Université de Strasbourg

Aurélien GUFFROY

ETUDE DES MECANISMES DE RUPTURE DE TOLERANCE LYMPHOCYTAIRE AU COURS DES DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS DE L'ADULTE AVEC MANIFESTATIONS AUTO-IMMUNES

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Résumé

L'association entre déficits immunitaires primitifs (DIPs) et manifestations auto-immunes peut sembler paradoxale lorsque l'on aborde les DIPs comme des défauts d'immunité opposés à l'auto-immunité vue comme excès d'immunité adaptative à l'encontre du soi. Néanmoins, loin de se résumer à un simple défaut d'une ou plusieurs composantes du système immunitaire qui prédispose aux infections par divers agents pathogènes, les DIPs sont fréquemment associés à une auto-immunité; parfois révélatrice. Ainsi, les données épidémiologiques issues de registres ou de larges séries de patients atteints de DIPs s'accordent sur une prévalence globale de 25 à 30% de complications auto-immunes (au premier rang desquelles figurent les cytopénies auto-immunes).

Différentes hypothèses sont avancées pour rendre compte de l'auto-immunité dans les DIPs. On peut citer : 1°) une perturbation profonde de l'homéostasie lymphocytaire, en particulier dans les déficits immunitaires combinés sévères (CID) avec lymphopénies T et B ; 2°) des défauts intrinsèques des lymphocytes B permettant une rupture de tolérance précoce des LB auto réactifs ; 3°) un comportement aberrant des LT (défaut de maturation, excès d'activation) ; 4°) une absence de lymphocytes T ou de B régulateurs ; 5°) une production inappropriée de certaines cytokines pro-inflammatoires comme dans les interféronopathies. Ces hypothèses concernent surtout les DIPs pédiatriques sévères.

Mon travail de thèse explore la rupture de tolérance immunitaire adaptative au cours des DIPs de l'adulte par différentes approches. Nous nous sommes en particulier attachés au plus fréquent, le DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable), déficit immunitaire humoral pas toujours bien défini sur le plan génétique et physiopathologique qui constitue un défi thérapeutique lorsqu'il est compliqué d'une auto-immunité nécessitant un traitement immunosuppresseur.

Résumé en anglais

The association between primary immune deficiency (PID) and autoimmunity may seem paradoxical when PID is considered only as an immune response defect against pathogens and autoimmunity only as an excess of immunity. Nevertheless, far from being simple immune defects increasing the risk of infections, DIPs are frequently associated with autoimmunity. Even more, autoimmunes manifestations can sometimes reveal a PID. Thus, epidemiological data from registers or large series of patients with PIDs agree on an overall prevalence of 25 to 30% of autoimmune complications (with auto-immune cytopenias as first causes).

Several hypotheses have been proposed with different underlying mechanisms to explain the tolerance breakdown in PIDs. We can cite : 1°) a severe disturbance of lymphocyte homeostasis, for example in severe combined immunodeficiencies ; 2°) an impaired B-cell developpement with early-stage defects of tolerance ; 3°) a dysregulation of T cells (developpement or activation impairments) ; 4°) a dysfunction of T-reg (or B-reg) ; 5°) an excess of production of proinflammatory cytokines. These hypotheses are especially true for early-onset PIDs (in infancy).

In this work (PhD), we explore the mechanisms of tolerance breakdown involved in adults PIDs. We use several approaches to describe the pathways leading to autoimmunity, focusing on the most common PID in adult : CVID (common variable immunodeficiency). This syndrome is not well defined on the genetic and physiopathological level. It is still a therapeutic challenge when complicated by autoimmunity (requiring immunosuppressive therapy).