Identification de causes génétiques du syndrome d'Evans pédiatrique

Eva Lévy

▶ **To cite this version:**

Eva Lévy. Identification de causes génétiques du syndrome d'Evans pédiatrique. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB017 . tel-01589054

HAL Id: tel-01589054
https://theses.hal.science/tel-01589054

Submitted on 18 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Laboratoire Immuno-génétique des maladies auto-immunes pédiatriques
UMR1163, Institut Imagine (Paris)

Identification de causes génétiques du syndrome d'Evans pédiatrique

Par Éva Lévy

Thèse de doctorat de Science de la vie et de la santé, spécialité Immunologie

Présentée et soutenue publiquement le 11 mai 2016

Devant un jury composé de :

M. le Pr. Guy Gorochov	Rapporteur
Mme le Pr. Isabelle Meyts	Examinatrice
M. le Pr. Marc Michel	Rapporteur
M. le Pr. Pierre Quartier-dit-Maire	Directeur de thèse
M. le Dr. Frédéric Rieux-Laucat	Directeur du laboratoire

Remerciements

Je remercie chaleureusement les professeurs Guy Gorochov et Marc Michel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'apporter ainsi leur expertise aux discussions suscitées par les résultats présentés.

Au professeur Isabelle Meyts, merci d'avoir accepté d'être examinatrice dans ce jury, et de venir de loin pour la soutenance. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance ainsi que de mon admiration.

Un grand merci à Pierre Quartier-dit-Maire qui a accepté d'encadrer cette thèse malgré une charge de travail déjà importante auprès des patients. Tes conseils et remarques ont toujours apporté un éclairage différent sur mon travail, un changement de perspective ouvrant souvent la porte à de nouvelles solutions.

A Frédéric Rieux-Laucat, qui m'a accueilli dans son équipe depuis la fin de mon internat et m'a fait confiance depuis presque 5 ans en me proposant ce projet qu'il souhaitait développer dans son équipe. J'espère que le débroussaillage que j'ai pu effectuer favorisera l'émergence de belles découvertes dans les années à venir. Merci de m'avoir laissé suivre mon chemin et mon rythme, d'avoir accepté mes initiatives ; et merci pour l'aide et le soutien que tu m'as apporté.

Je remercie tous les membres de la FRL-team : Marie-Claude, qui m'a formée au début et toujours aidée. Avec toi, je me suis souvent sentie "comme à la maison" ! Aude, souriante et disponible, Fabienne et Bénédicte, toujours de bon conseil. Nina et Nadia, en thèse sur la même période me laissent de nombreux souvenirs, au labo ou ailleurs.

Je souhaite remercier également tous les stagiaires passés au labo et ayant de près ou de plus loin contribué à ce travail : Sheldon premier étudiant que j'ai eu l'opportunité de former, Agnese qui a vu le démarrage du travail sur LRBA, Müge, belle fleur qui j'espère prendra confiance, Charlotte, sa vivacité et nos pauses cafés, Alexandra, Pedro, Myrian...

Cher François Huetz, merci de m'avoir permis de voir le Master 2 IA de l'autre côté de la barrière, et, grâce à cette position d'"enseignement", d'apprendre énormément ! Je te suis très reconnaissante de m'avoir recrutée 2 ans de suite et j'espère avoir été à la hauteur.

Il ya aussi toute l'équipe du CEDI : Capucine, Chantal, Corine, Monique, Aminata, Stéphanie, Virginie, Nathalie, Catherine, les internes et plus récemment Jacinta, Ambre et Barik. C'est là que cette aventure a commencé.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'équipe de la plateforme de génomique. Christine, Aurore, Solenn, Mélanie, Olivier et Mohammed, votre bonne humeur, votre passion et votre disponibilité, sans parler des chocolat d'Aurore un 24 décembre et des grenades de Mohammed, m'ont bien souvent permis de garder le sourire et la motivation.

Et que dire des "informaticiens", au sens très large ? Que ce soient Jérôme et son sideman Eric, Nicolas qui, en plus d'être devenu un ami, a permis à mes projets de base de données de voir le jour, Vincent qui donné de son temps pour la création du site web YR2I, ou encore les Cécile, Marc, Patrick – notamment au temps de polyweb v.1 –, Frédéric... vous avez toujours été à l'écoute et réactifs face à mes questions de béotienne qui rêve de s'y connaitre un peu. Un grand merci, admiratif et peut-être un peu envieux parfois...

Merci également à Mériem, Raphaëlle et Nicolas, grâce à vous j'ai découvert la microscopie confocale, mélange de machines complexes, d'images colorées, et de calculs, le tout saupoudré de petits scripts pour l'analyse. J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité et votre gentillesse, y compris en cas d'urgence !

La YR2I team a grandement contribué à ma survie dans le nouvel environnement Imagine et pendant la fin de la thèse : Laure, Maéva, Chiara, Sandrine, Christelle, Lucie, Sophia, Flavia, Rémy, les Julien, Hicham, Joël, Moussab, Laurent, Jean, Anthony, Antoine, Ludovic, les anciens et les nouveaux, c'est un plaisir de monter ces projets ensemble. J'espère que les équipes futures continuerons dans cette lancée.

Un merci tout particulier à Malika et Rachida. Vous faites plus que votre maximum pour nous rendre la vie plus facile matériellement. Mais cela ne s'arrête pas là, votre humanité et votre gentillesse sont précieuses. Une énorme bise à chacune.

A la "grande famille" d'Imagine : Marine, Céline, Florine, Anaïs, Vincent, Claire, Aurélie et tous ceux du 3^{e} étage, les ex-U768, en particulier Marie-Thérèse, Mathieu, Corinne, Gaël et Shabi ; Fabienne et Bernadette du 2^{e}. Merci à vous tous qui m'avez tout à tour soutenue, écoutée (y compris au violon), motivée, supportée, conseillée, nourrie ou juste souri dans les couloirs.

Il y a aussi les amis, en particulier Aurélie, Florence et Mathilde avec qui j'ai beaucoup parlé de mon travail et qui m'ont toujours écoutée et conseillée avec beaucoup de bienveillance.

La famille avec toutes ses pièces rapportées, montées, jointes et copies de moins en moins cachées ;-)

Les musiciens, en particulier l'équipe d'Unis-sons et l'accordéoniste du métro Duroc, dont les airs m'ont souvent donné un coup de pouce pour démarrer mes journées à Imagine.

Un matheux mantais m'a aimantée. Maintenant je monte les multiples marches de Montmartre pour mon plus grand bonheur !

Résumé

Le syndrome d'Evans est défini par l'existence concomitante ou séquentielle de cytopénies auto-immunes, le plus souvent, anémie hémolytique et thrombopénie immunologique. Chez l'enfant, il peut être secondaire à une infection, une maladie auto-immune systémique ou un déficit immunitaire primitif. Alternativement, chez une grande partie des patients, l'étiologie n'est pas clairement identifiée. Les patients atteints de syndrome d'Evans présentent parfois d'autres atteintes, telles une auto-immunité d'organe, une lymphoprolifération bénigne ou un déficit immunitaire.

L'objectif de ce travail était d'identifier des causes génétiques chez des enfants présentant un syndrome d'Evans sans étiologie sous-jacente identifiée. Nous avons centré notre étude sur des formes sévères à début pédiatrique en faisant l'hypothèse qu'une maladie monogénique serait plus fréquente dans ce groupe de patients. Nous avons mis à profit les technologies de séquençage haut débit « nouvelle génération » (NGS) pour réaliser et analyser le séquençage de l'exome de patients et de certains de leurs apparentés afin de mettre en évidence des gènes candidats potentiels.

Ce travail a permis l'identification de 4 gènes candidats : *LRBA*, *CTLA-4*, *STAT3* (mutations gain de fonction) et *IκBα*. L'implication des 3 premiers gènes dans de nouvelles maladies monogéniques où l'auto-immunité est au premier plan a été confirmée par d'autres équipes au cours de ce travail.

Pour chacun de ces gènes, nous avons poursuivi 2 objectifs complémentaires : d'une part, tenter de valider l'implication des gènes identifiés dans la maladie des patients. Nous avons pour cela utilisé des approches et techniques variées : biochimie et protéomique afin d'identifier des partenaires protéiques, microscopie confocale pour localiser les protéines et leurs interactions, tests cellulaires *in vitro* pour mettre en évidence un défaut fonctionnel, marquages en cytométrie en flux pour identifier des modifications dans les sous-populations lymphocytaires. D'autre part, nous avons recherché d'autres mutations de ces gènes chez des patients de phénotype clinique similaire. Nous avons ainsi constitué et exploré 3 cohortes de patients présentant des mutations de *LRBA*, *CTLA-4* ou *STAT3*.

Nous avons rassemblé une cohorte de 18 patients porteurs d'une mutation de *LRBA*, répartis dans 11 familles. Cela nous a permis de préciser et d'étendre le spectre clinique de cette maladie de découverte récente, avec en particulier des atteintes articulaires sévères s'associant à un diabète précoce, ou des entéropathies. Nous avons identifié 15 nouvelles mutations de transmission autosomique récessive dans le gène *LRBA*, codant une protéine de fonction inconnue dont l'absence entraine une maladie principalement caractérisée par une poly-auto-immunité. Nous avons identifié 29 partenaires protéiques

potentiels de LRBA et précisé la localisation de LRBA dans les différents compartiments cellulaires. Nous avons également établi une cohorte de 12 patients dans 10 familles présentant un déficit en CTLA-4 par haplo-insuffisance. Au delà de la mise en évidence de 9 nouvelles mutations, nous avons décrit une famille où la variation est transmise de façon autosomique récessive.
Dans les déficits en LRBA et CTLA-4, nous avons mis en évidence une diminution du pourcentage de lymphocytes T régulateurs parmi les PBMC et une diminution de l'expression de CTLA-4 dans les lymphocytes T activés. Ceci corrobore l'interaction entre ces 2 protéines décrite en parallèle par une autre équipe. Nous avons montré que les spectres cliniques des déficits en LRBA et CTLA-4, fortement chevauchant dans les premières descriptions publiées, pourraient se différencier, malgré l'implication des lymphocytes T régulateurs dans ces 2 maladies. Ainsi, les atteintes auto-immunes d'organes et la lymphoprolifération sont plus fréquentes dans le déficit en LRBA tandis que la granulomatose et l'hypogammaglobulinémie sont plus souvent présentes dans le déficit en CTLA-4. Ces résultats suggèrent l'existence de facteurs modificateurs, potentiellement génétiques, restant à identifier.

Nous avons également mis en évidence au sein de notre cohorte de patients présentant un syndrome d'Evans, 5 patients avec des mutations gain de fonction de *STAT3*, répartis dans 5 familles. 3 des mutations présentées ont été décrites par d'autres groupes au cours de notre travail et sont apparues *de novo* chez les patients. La validation fonctionnelle de la quatrième est en cours. La dernière est de transmission autosomique récessive et pourrait mettre en évidence un nouveau mode de transmission de cette maladie.

Partant donc du syndrome d'Evans, nous avons été amenés à explorer les bases physiopathologiques de différents déficits immunitaires primitifs où l'auto-immunité est au premier plan. Nous avons mis en évidence une origine monogénique chez une proportion importante des patients étudiés. Cela a d'ors et déjà permis d'adapter le traitement de certains d'entre eux. Au delà de l'importance de ces découvertes pour les patients, ce travail suggère qu'une ou deux mutations d'un seul gène peuvent suffire à expliquer des maladies auto-immunes complexes. La compréhension fine des mécanismes à l'œuvre permettra d'identifier de nouveaux points de contrôle de la tolérance au soi.

Mots-clés : syndrome d'Evans, anémie hémolytique auto-immune, purpura thrombopénique immunologique, auto-immunité, maladie génétique, séquençage de l'exome, LRBA, CTLA-4, STAT3 gain de fonction, lymphocytes T régulateurs, pédiatrie, déficit immunitaire.

Abstract

Evans syndrome is defined by the occurence of autoimmune cytopenias, either at the same time or sequential, mainly autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenia. In children, it may be secondary to infections, systemic autoimmune disease, or primary immune deficiency, though in most patients, its etiology isn't obvious. Patients affected with Evans syndrome can also present other features, such as autoimmunity toward a particular organ, benign lymphoproliferation or immunodeficiency.

The main goal of this work was to identify genetic causes in children presenting an Evans syndrome without a known underlying etiology. We focused our study on severe, early onset forms of the disease, with the hypothesis that a monogenic disease would be more frequent in this group of patients. Taking advantage of high throughput "Next Generation" sequencing (NGS) techniques, we sequenced and analyzed exome from patients and their relatives in search for adequate candidate genes.

We identified 4 candidate genes: *LRBA*, *CTLA-4*, *STAT3* (gain-of-function mutations), and *NFKBA*. Implication of the first 3 genes in new monogenic diseases with autoimmunity as a key feature was also confirmed by others during the course of this work.

For each gene, we pursued 2 complementary goals: First, we sought to validate the implication of the gene in the patients' disease. To do so, we used various techniques and approaches: biochemistry and proteomics to identify protein partners, confocal microscopy to localize proteins and interactions, *in vitro* cellular assays to bring to light functional defect, flow cytometry to identify changes in lymphocytes subpopulations. We also looked for other mutations of each gene in patients with a similar clinical presentation. Hence we created and explored 3 cohorts of patients presenting with mutations of *LRBA*, *CTLA-4* or *STAT3*.

We constituted a cohort of 18 patients with *LRBA* mutations within 11 families. We then were able to precise and extend the clinical spectrum of this recently described disease. In particular, we observed patients with severe chronic arthritis associated with diabetes mellitus or enteropathies. We identified 15 new mutations of autosomal recessive transmission in the *LRBA* gene, coding a protein of unknown function, which absence is responsible for a disease mainly characterized by autoimmune features. We identified 29 candidate protein partners of LRBA and precized LRBA localisation in cell compartiments. We also established a cohort of 12 patients within 10 families presenting CTLA-4 haploinsufficiency. Beyond describing 9 new mutations, we report a family with autosomal recessive transmission.
In LRBA and CTLA-4 deficiencies, we showed a decrease of regulatory T lymphocyte subset proportion among PBMC and a decrease of CTLA-4 expression in activated T cells. These results support the interaction between these 2 proteins, described concurrently by another team. We showed that the clinical spectra of these 2 diseases, although widely overlapping in first published reports, could be different despite a role of regulatory T cells in both. Hence, organ-specific autoimmunity and lymphoproliferation are

more frequent in LRBA deficiency whereas granuloma and hypogammaglobulinemia are more present in CTLA-4 deficiency. Theses results suggests a role of genetic modifyers, which remain to identify.

Among our cohort of patients with Evans syndrome, we also identified 5 patients within 5 families presenting gain-of-function mutations of *STAT3*. 3 of those mutations were reported by others during our work and appeared *de novo* in our patients. Functional validation of the 4th one is in progress. The last mutation follows a recessive transmission and could exemplify a new transmission modality of this disease.

With Evans syndrome as a starting point, we explored pathophysiological basis of several primary immune deficiencies where autoimmunity is at the foreground. We showed a monogenic origin of the disease in a significant proportion of the patients studied. This already lead to adapting treatment for some patients. Beyond the value of these findings for patients management, this work suggests that one or 2 mutations in a single gene can suffice to explain complex autoimmune diseases. Fine understanding of pathological mechanisms will open the way to identifying new check-points in immune tolerance.

Keywords: Evans syndrome, autoimmune hemolytic anemia, immune thrombocytopenia, autoimmunity, genetic disease, exome sequencing, LRBA, CTLA-4, STAT3 gain-of-function, regulatory T lymphocytes, pediatrics, immune deficiency.

Table des matières

Résumés **5**

Abréviations **17**

Introduction **21**
1.1 La tolérance immunitaire et ses défauts monogéniques 22
1.1.1 Tolérance centrale 25
1.1.1.1 Déficit en AIRE : APS1 26
1.1.2 Tolérance périphérique 26
1.1.3 Tolérance immune et apoptose 27
1.1.3.1 Défaut d'apoptose et ALPS 28
1.1.3.2 Autres DIP avec lymphoprolifération bénigne 28
1.1.4 Rôle des T régulateurs 29
1.1.4.1 Déficit en FOXP3 : Syndrome IPEX 31
1.1.4.2 Déficit en CD25 32
1.1.5 Modulation des T régulateurs : CTLA-4 33
1.1.6 LPS-responsive Beige-like anchor protein (LRBA) 37
1.1.6.1 Déficit en LRBA 37
1.1.6.2 Gène, variants d'épissage et mutations 38
1.1.6.3 Structure protéique 40
1.1.6.4 La famille BEACH en pathologie humaine 42
1.1.6.5 LRBA : résumé 45
1.1.7 Mutations gain de fonction de STAT3 46
1.2 Définition biologique du syndrome d'Evans 50
1.2.1 Anémie hémolytique auto-immune 50
1.2.2 Thrombopénie immunologique 53
1.2.3 Neutropénie auto-immune 55
1.2.4 Syndrome d'Evans 56
1.2.5 Syndrome d'Evans secondaire 56
1.3 Syndrome d'Evans : revue des séries publiées 59
1.3.1 Principales séries publiées 59
1.3.2 Epidémiologie 60
1.3.3 Présentation inititale 62
1.3.4 Traitements 64
1.3.5 Évolution et mortalité 67
1.3.6 Syndrome d'Evans secondaires 69
1.3.7 Physiopathologie 71

1.4 Objectifs et méthodologie 72

Matériels et méthodes **75**
2.1 Patients et familles 75
2.2 Conservation des prélèvements 75
2.3 Biologie moléculaire 76
2.3.1 Extraction d'ADN 76
2.3.1.1 Extraction en phénol/chloroforme 76
2.3.1.2 Extraction sur colonnes - Kit Qiagen 77
2.3.2 Extraction d'ARN, obtention d'ADNc 77
2.3.2.1 Extraction de l'ARN 77
2.3.2.2 Rétrotranscription 77
2.3.3 Qualité des acides nucléiques 77
2.3.4 Séquençage haut débit 78
2.3.4.1 Exome 78
2.3.4.2 Panel ciblé 78
2.3.5 Séquençage Sanger 78
2.3.5.1 Réaction de polymérisation en chaine (PCR) 79
2.3.5.2 Réaction de séquence 79
2.4 Culture cellulaire 80
2.4.1 Lymphocytes T activés 80
2.4.2 Autres lignées 80
2.5 Tests fonctionnels 81
2.5.1 Tests d'apoptose 81
2.5.1.1 J0 - Induction de l'apoptose 81
2.5.1.2 J1 à J7 - Mesure de l'apoptose 81
2.5.2 Exploration de la voie NF-κB 82
2.5.2.1 Activation des cellules 82
2.5.2.2 Mesure des cytokines par ELISA 82
2.5.3 Activation de STAT3 83
2.5.3.1 Etude de la phosphorylation de STAT3 83
2.5.3.2 Etude de la transcription de SOCS3 83
2.5.4 Formation de la synapse immunologique 84
2.6 Marquages par cytométrie en flux 84
2.6.1 Principe 84
2.6.2 Marquage Treg 84
2.6.3 Marquage CTLA-4 84
2.7 Western blotting 85
2.8 Microscopie confocale 85
2.8.1 Préparation des cellules 85
2.8.2 Acquisition et analyse des images 86
2.9 Protéomique 86
2.9.1 Immuno-précipitation 86
2.9.2 Spectrométrie de masse 87

Résultats **89**
3.1 Séquençage d'exome . . . 90
3.2 Déficit en LRBA . . . 95
3.2.1 Cohorte LRBA : clinique et mutations . . . 95
3.2.2 Partenaires protéiques de LRBA . . . 101
3.2.3 Localisation sub-cellulaire de LRBA . . . 104
3.2.4 LRBA : étude de l'apoptose . . . 109
3.2.5 Article 1 . . . 111
3.3 Défaut en CTLA-4 . . . 129
3.3.1 Cohorte CTLA-4 : clinique et mutations . . . 129
3.3.2 CTLA-4 : exploration des familles 1 et 2 . . . 132
3.3.3 LRBA et CTLA-4 : anomalies partagées . . . 135
3.4 Mutations gain de fonction de STAT3 . . . 137
3.4.1 Cohorte STAT3 : clinique et mutations . . . 138
3.4.2 STAT3 gain de fonction avec mutation homozygote . . . 139
3.5 Mutation homozygote de IκBα . . . 141
3.5.1 Présentation de la famille 5 . . . 146
3.5.2 Ségrégation familiale et impact transcriptionnel . . . 146
3.5.3 Expression protéique de IκBα . . . 148
3.5.4 Étude globale de l'activation de la voie NF-κB . . . 149
3.5.5 Impact de la mutation sur l'apoptose . . . 150
3.6 Résultats complémentaires . . . 152
3.6.1 Famille 6 . . . 152
3.6.2 Famille 7 . . . 153
3.6.3 Famille 8 . . . 154
3.6.4 Famille 9 . . . 155
3.6.5 Famille 11 . . . 156
3.6.6 Famille 12 . . . 156
3.6.7 Famille 13 . . . 157
3.6.8 Famille 14 . . . 157
3.7 A propos de la cohorte de patients . . . 158
3.7.1 Article 2 . . . 159

Discussion et perspectives **181**
4.1 Séquençage et analyse d'exome . . . 182
4.2 Déficit en LRBA . . . 185
4.3 Défaut de CTLA-4 . . . 191
4.4 STAT3 gain de fonction . . . 194
4.5 Mutation homozygote d'IκBα . . . 196
4.6 Cohorte, approches et résultats . . . 197
4.7 Existe-t-il un syndrome d'Evans primaire ? . . . 199
4.8 Mécanismes physiopathologiques . . . 200

Conclusions **203**

Annexes **205**
Tableaux 205
Article 3 211
Figures 229

Références **235**

Liste des tableaux

1.2 Maladies auto-immunes monogénéiques . . . 24
1.3 Famille BEACH : protéines et maladies . . . 44
1.4 Allo-antigènes neutrophiles humains . . . 55
1.5 Syndrome d'Evans : critères biologiques . . . 56
1.6 Syndrome d'Evans : séries rapportées . . . 61
1.7 Syndrome d'Evans : clinique . . . 63
1.8 Syndrome d'Evans : traitements . . . 66
1.9 Syndrome d'Evans : suivi et évolution . . . 68
1.10 Syndrome d'Evans secondaire : étiologies . . . 70
2.11 PCR : mélange réactionnel . . . 79
2.12 Programme PCR . . . 79
2.13 Réaction de séquence : mélange réactionnel . . . 80
2.14 Programme réaction de séquence . . . 80
2.15 Activateurs de la voie NF-κB . . . 82
2.16 Dilutions pour les ELISA . . . 83
2.17 Microscopie confocale : anticorps . . . 86
3.18 Séquençage d'exome : familles . . . 94
3.19 Tableau récapitulatif des mutations de *LRBA* identifiées . . . 98
3.20 Patients LRBA : atteintes cliniques . . . 99
3.21 LRBA : 29 partenaires identifiés dans les B-EBV . . . 103
3.22 LRBA et la synapse immunologique : quantification . . . 109
3.23 Tableau récapitulatif des mutations de *CTLA-4* identifiées . . . 131
3.24 Patients CTLA-4 : atteintes cliniques . . . 132
3.25 Variations de *NFKBIA* – Famille 5 . . . 147
5.26 Amorces . . . 210

Table des figures

1.1 Mécanismes régulant la survie des lymphocytes auto-réactifs 23
1.2 Treg : mécanismes d'action 30
1.3 CTLA-4 : gène et variants d'épissage 34
1.4 Action inhibitrice de CTLA-4 : modèle traditionnel 34
1.5 Action inhibitrice de CTLA-4 : nouveaux mécanismes 35
1.6 LRBA : gène et mutations 39
1.7 Famille BEACH : domaines protéiques 41
1.8 STAT3 : mécanismes de signalisation Jak/STAT 47
1.9 STAT3 : domaines protéiques et mutations 48
1.10 Hémoglobine : valeurs normales 50
1.11 Plaquettes : valeurs normales 53
3.12 Stratégie de filtrage des variants exomiques 91
3.13 Familles LRBA 97
3.14 Schéma des mutations de *LRBA* identifiées 100
3.15 Filtrage des données IP/MS 101
3.16 Localisation sub-cellulaire de LRBA 106
3.17 LRBA : co-localisation avec CTLA-4, MVP et la perforine ? 107
3.18 LRBA et la synapse immunologique 108
3.19 LRBA : étude de l'apoptose 110
3.20 Familles CTLA-4 130
3.21 Schéma des mutations de *CTLA-4* identifiées 133
3.22 Famille CTLA-4 1 : variant d'épissage 134
3.23 Expression protéique de CTLA-4 : WB 135
3.24 Marquage des lymphocytes T régulateurs 136
3.25 Marquage CTLA-4 137
3.26 Familles STAT3 gain de fonction 138
3.27 Schéma des mutations de *STAT3* identifiées 138
3.28 Etude de la phosphorylation de STAT3 141
3.29 Etude de l'expression de *SOCS3* 142
3.30 Voie NF-κB 144
3.31 Voie NF-κB 145
3.32 Séquences de l'exon 6 de *NFKBIA* – Famille 5 147
3.33 Structure d'IκBα 148
3.34 WB IκBα - Famille 5 148
3.35 Activation de la voie NF-κB - étude globale par ELISA 149
3.36 Tests d'apoptose 150
5.37 Protéines partenaires de LRBA 231
5.38 LRBA : contrôle de l'anticorps pour IF 232

5.39 pSTAT3 : stratégie de fenêtrage 233
5.40 Etude de la phosphorylation de STAT3 234

Abréviations

AA	Acide aminé
AD	Autosomique dominant
AD-HIES	Autosomal dominant hyper-IgE syndrome
ADN	Acide désoxyribonucléique
AAc	Auto-anticorps
Ac	Anticorps
ACAD	Activated cell autonomous death
Ag	Antigène
AICD	Activation-induced cell death ou mort cellulaire post-activation
AIRE	Autoimmune regulator
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
APECED	Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy
APS1	Autoimmune polyglandular syndrome 1
AR	Autosomique récessif
ARN	Acide ribonucléique
BCL	B-cell lymphoma
BCR	B-cell receptor
BEACH	Beige and Chediak-Higashi
B-EBV	lymphocytes B immortalisés par l'EBV
bp	base pair ou paire de bases
BSA	Bovine serum albumin
CASP	Caspase
CCDS	Consensus coding sequence
CD	Cluster de différenciation
CDS	Coding sequence
CHAI	CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration
CLR	C-type lectin receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
cpm	Coups par minute
CR3	Complement receptor 3
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CVID	Common variable immune deficiency
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DICV	Déficit immunitaire commun variable
DIP	Déficit immunitaire primitif
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DUF	Domain of unknown function ou domaine de fonction inconnue
EBV	Epstein-Barr virus ou virus d'Epstein-Barr
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EEA1	Early endosome antigen 1 ou antigène des endosomes précoces, 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EVS	Exome Variant Server
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FASLG	FAS ligand
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXP3	Forkhead box P3
FYVE	Domaine protéique nommé d'après les 4 protéines dans lesquelles il a été initialement décrit : Fab 1, YOTB, Vac 1, EEA1
G6PD	Glucose 6 phosphate déshydrogénase
GFP	Green fluorescent protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR related ou protéine associée au TNF récepteur, induite par les gluco-corticoïdes
gof	Gain of function ou gain de fonction
GRAM domain	Domaine trouvé dans les glycosyltransférases, activateurs de GTPase Rab-like et les myotubularines
GTP	Guanosine tri-phosphate
GWAS	Genome-wide association study
Hb	Hémoglobine
HNA	Human neutrophil alloantigen
HRP	Horseradish peroxydase
IDO	Indolamine 2,3 dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgIV	Immunoglobulines par voie intraveineuse
IKK	IκB kinase
IκBα	protéine codée par le gène *NFKBIA*
IL	Interleukine
IL2Rα	Chaine α du récepteur de l'interleukine 2
IP	Immuno-précipitation
IPEX	Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked

JAK	Janus kinase
JMML	Juvenile myelomonocytic leukemia
kDa	kiloDalton, unité de poids moléculaire
KO	Knock-out, concernant un modèle murin
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LB	Lymphocyte B
LDH	Lactate deshydrogénase
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LRBA	Lipopolysaccharide-responsive, Beige-like anchor protein
LYST	Lysosomal trafficking regulator
MAC-1	Macrophage antigen 1
MAI	Maladie auto-immune
MAIPA	Monoclonal antibody immobilization of platelet-antigen assay
MAIGA	monoclonal antibodies immobilization of granulocyte-antigen assay
MMF	Mycophénolate mofétil
MS	Mass spectrometry ou spectrométrie de masse
MVP	Major vault protein
NBEA	Neurobeachin ou neurobeachine
NBEAL	Neurobeachin-like
NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
NSMAF	Neutral sphingomyelinase activation-associated factor
nTreg	Lymphocyte T régulateur naturel
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PARP4	Poly (ADP-ribose) polymerase 4
PBS	Phosphate buffered saline ou solution saline tamponnée par le phosphate
PD1	Programmed cell death 1
PE	Phycoérythrine
PE-Cy7	Phycoérythrine-cyanine 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PHD	Plant homeodomain
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PMA	Phorbol myristate acetate ou acétate myristate de phorbol
PP2A	Protein phosphatase 2A
PRR	Pattern recognition receptor

pSTAT5b	STAT5b phosphorylée
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-recepto type 11
pTreg	Lymphocyte T régulateur périphérique
qsp	Quantité suffisante pour
RALD	RAS-associated lymphoproliferative disease
RIG	Retinoic acid inducible gene
RLR	RIG-I-like receptor
rpm	rotations par minute
RT-PCR	Real-time PCR ou PCR en temps réel
SAPL	Syndrome des anti-phospholipides
SCID	Severe combined immunodeficiency
SE	Syndrome d'Evans
SH3, domaine	Src homology 3 domain
SHP2	Src homology 2 protein, aussi appelée PTPN11
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT5b	Signal transducer and activator of transcription 5
SVF	Sérum de Veau Fetal
TAD	Test d'agglutination direct
TAI	Test d'agglutination indirect
TCR	T-cell receptor
TEMRA	T effector memory CD45RA$^+$ cell
TGFβ	Transforming growth factor β
TI	Thrombopénie immunologique
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFRSF6	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, ou FAS
Treg	Lymphpocytes T régulateurs
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
WAS	Wiskott Aldrich Syndrome ou syndrome de Wiskott-Aldrich
WASp	Wiskott Aldrich Syndrome protein ou proteine du syndrome de Wiskott-Aldrich
WB	Western blot
WES	Whole exome sequencing ou séquençage de l'ensemble de l'exome
WDFY4	WD and FYVE zinc finger domain containing protein 4
WIP	WASp-interacting protein
YVKM	Motif protéique tyrosine, valine, lysine, méthionine

Introduction

Le système immunitaire permet le maintien de l'intégrité de l'organisme face aux attaques externes par des micro-organismes pathogènes. Il détecte également les menaces internes comme les cellules cancéreuses. Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement de ce système qui prend alors pour cible les constituants normaux de l'organisme. Si la plupart sont multifactorielles, il existe quelques syndromes auto-immuns monogéniques. Ils touchent principalement des gènes impliqués dans le développement, la sélection et la régulation en périphérie des lymphocytes T. Leur description a permis d'identifier les principaux points de contrôle de la tolérance immunitaire : les rôles d'*AIRE*, *FOXP3*, *CD25*, *FAS*, *STAT3*, *CTLA-4* et *LRBA seront ainsi détaillés.*

Le syndrome d'Evans, fil conducteur de ce travail, se caractérise par la destruction auto-immune des cellules sanguines, le plus souvent les globules rouges et les plaquettes. Il s'agit d'une maladie rare et chronique, avec des périodes de rémission et des rechutes. Sa morbidité est importante. Nous ferons état des connaissances sur ce syndrome, de sa définition aux maladies auxquelles il peut être associé (syndrome d'Evans secondaire).

Une revue des séries de patients rapportées dans la littérature permettra de mettre en lumière les particularités de l'enfant ainsi que les questions, notamment étiologiques et physiopathologiques, en suspens.

L'objectif de ce travail est l'identification de défauts génétiques du système immunitaire associés au syndrome d'Evans primaire de l'enfant par une approche associant étude de l'exome et caractérisation de sous-populations lymphocytaires des patients et études fonctionnelles. Nous verrons qu'il existe effectivement des gènes responsables de syndrome d'Evans pédiatrique. Pour l'ensemble de la cohorte étudiée nous résumerons les gènes candidats mis en évidence. Nous présenterons en détail nos travaux sur les déficits en LRBA, CTLA-4 et STAT3. Nous montrerons comment l'ensemble de ces résultats peuvent modifier la recherche de déficits immunitaires primitifs chez l'enfant et la prise en charge diagnostique et thérapeutique du syndrome d'Evans pédiatrique et pourquoi ces travaux contribuent à notre compréhension de la tolérance immune.

1.1 Points de contrôle de la tolérance immune et syndromes auto-immuns monogéniques

Le système immunitaire a la faculté de produire de multiples récepteurs capables de détecter et de neutraliser toute substance chimique pénétrant l'organisme. Inévitablement, certains de ces récepteurs reconnaissent des composants propres à notre organisme. Les mécanismes cellulaires ont évolué en conséquence pour contrôler l'activité de ces récepteurs et permettre la tolérance immunitaire.

Le système immunitaire inné, en général en première ligne, reconnait des motifs moléculaires très conservés associés aux pathogènes (ou PAMPs pour pathogen associated molecular patterns) ou aux cellules abimées (ou DAMPs pour danger associated molecular patterns) par l'intermédiaire de récepteurs invariants ou PRR (pour pattern recognition receptors). Plusieurs familles de récepteurs sont décrites, notamment les TLR (Toll-like receptors) et les CLR (C-type lectin receptors), transmembranaires, et les NLR (NOD-like receptors) et les RLR (Retinoic acid inducible gene-I-like receptors), intracellulaires. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules du système immunitaire inné, comme les cellules dendritiques et les macrophages mais également par d'autres cellules non professionnelles. L'activation du système inné conduit à l'inflammation et à la mise en place de la réponse immunitaire acquise. Lorsque ces récepteurs rencontrent des ligands endogènes, en particulier les acides nucléiques, suite à un défaut de compartimentalisation ou de destruction par les enzymes appropriées, cela peut conduire à l'apparition d'auto-immunité et accroitre l'inflammation [1].

Le système immunitaire adaptatif comprend les lymphocytes T et B. Ils présentent à leur surface des récepteurs ayant subi des modifications somatiques qui leur apportent une variabilité et une spécificité antigéniques accrues. Compte-tenu de la nature aléatoire des réarrangements géniques à l'origine de la grande diversité de ces récepteurs, des cellules T et B capables de reconnaitre des auto-antigènes sont générées. En parallèle, il existe des mécanismes de contrôle permettant de limiter la présence ou l'action des cellules auto-réactives (Figure 1.1).

Le développement des lymphocytes T et B passe par différents points de contrôle régulant le nombre de cellules auto-réactives présentes en périphérie. Les stratégies employées pour la restriction du répertoire B incluent l'édition du récepteur des cellules B (BCR), où les chaines lourdes des immunoglobulines subissent des réarrangements géniques ; les cellules B peuvent également devenir anergiques et ne plus répondre efficacement si leur BCR reconnait un auto-antigène. Ces mécanismes limitent drastiquement le nombre de cellules pré-B évoluant vers le stade de cellules B immatures dans la moelle osseuse hématopoïétique. Puis les lymphocytes B immatures subissent des réarrangements des chaines légères, réduisant encore leur auto-réactivité. Enfin, la modulation des signaux de survie ou l'induction de programmes pro-apoptotiques empêche l'évolution des B immatures auto-réactifs en cellules B matures [3].

Les cellules T en développement sont exposées aux peptides associés avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules épithéliales du cortex thymique. Seules les cellules T possédant une affinité suffisante pour les complexes

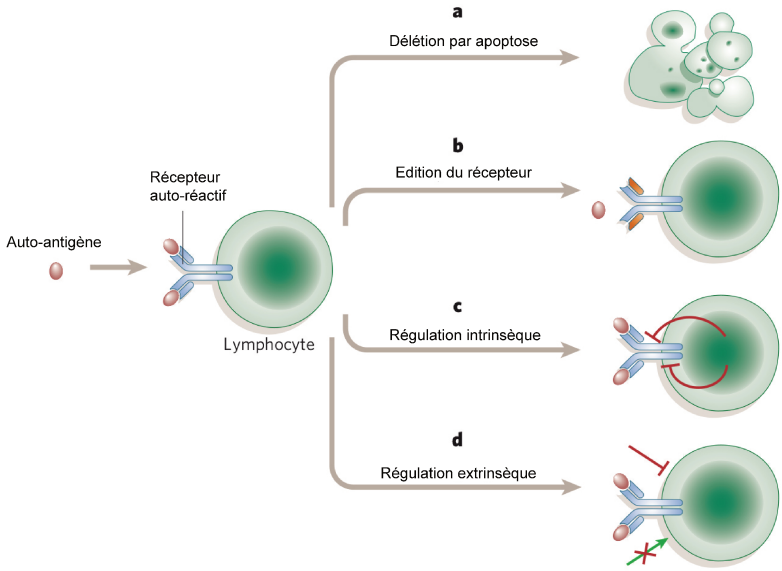


FIGURE 1.1 – **Quatre stratégies cellulaires sont utilisées pour contrôler les récepteurs auto-réactifs à différents moments de la différentiation T et B. a**, la cellule est supprimée via l'induction de la mort cellulaire (apoptose). **b**, le récepteur est modifié pour être moins auto-réactif (editing/édition). **c**, des changements intrinsèques, biochimiques ou dans l'expression des gènes atténuent la capacité du récepteur auto-réactif à activer la cellule. **d**, la capacité des cellules auto-réactives ou de l'anticorps à induire l'auto-immunité est limitée par la destruction extrinsèque active de la cellule ou la limitation d'accès aux facteurs indispensables – facteurs de croissance, co-stimuli et médiateurs de l'inflammation. D'après Goodnow *et al.* [2].

CMH-peptide sont sélectionnées positivement. Elles poursuivent leur maturation dans la médulla thymique où elles subissent la sélection négative. Les cellules se liant avec une forte affinité aux auto-antigènes meurent ou deviennent des cellules T régulatrices exprimant le facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3). Les cellules T régulatrices FOXP3$^+$ sont à l'origine du mécanisme de tolérance principal en périphérie [4]. La régulation des signaux indispensables à la survie des cellules comme les cytokines et la balance entre signaux de co-stimulation et signaux inhibiteurs sont également impliqués dans le contrôle des cellules T auto-réactives [2] (Figure 1.1).

Les ruptures de tolérance immune permettant la survie et l'activation de lymphocytes auto-réactifs entrainent l'apparition de maladies auto-immunes. Ces maladies touchent environ 5% de la population et sont généralement considérées comme multi-factorielles. Elles sont classiquement séparées en maladies systémiques – au rang desquelles on trouve le lupus érythémateux disséminé ou la sclérodermie systémique – et en maladies spécifiques d'organe comme le diabète de type I, la sclérose en plaques ou le syndrome de Sjögren. Les syndromes auto-immuns d'origine monogénique sont rares et leur étude a été fondamentale pour notre compréhension de l'homéostasie du système immunitaire et de la tolérance immune. Ils partagent des caractéristiques communes à d'autres manifestations auto-immunes, plus fréquentes, suggérant que l'apparition d'auto-immunité non syndromique puisse être liée à des mutations de moindre impact dans les mêmes gènes ou dans les mêmes voies fonctionnelles. Les principaux syndromes auto-immuns monogéniques sont présentés succinctement dans le tableau 1.2, page 24.

Gène	Mode de transmission	Maladie	Mécanisme et/ou population cellulaire touchée	Tolérance
AIRE	AR	APECED	Sélection négative des thymocytes	Centrale
FOXP3	XR	IPEX		
CD25	AR	IPEX-like	Lymphocytes T régulateurs	Périphérique
CTLA-4	AD	CHAI		
LRBA	AR	CVID8		
STAT3	AD, gain de fonction	STAT3 GOF	Lymphocytes T régulateurs	
STAT5b			Activation accrue des voies	Périphérique
STAT1	AD, gain de fonction		de signalisation intracellulaires	
FAS	AD et/ou somatique	ALPS-FAS, sFAS		
FASLG	AD	ALPS-FASLG	Lymphocytes T activés	Périphérique
CASP10	AD		Contraction de la réponse immunitaire	Apoptose médiée par FAS
NRAS	somatique	RALD		
KRAS	somatique		Lymphocytes T	Périphérique

Tableau 1.2 – **Déficits immunitaires primitifs où l'auto-immunité est le symptôme principal.** La plupart des mécanismes de tolérance connus le sont grâce aux défauts génétiques entrainant une rupture de cette tolérance et l'apparition d'une maladie où l'auto-immunité est au premier plan. Ces points de contrôle de la tolérance sont centraux ou périphériques et concernent tous la régulation des lymphocytes T. Le mode de transmission de ces maladies est variable : autosomique récessif (AR), récessif lié à l'X (XR), autosomique dominante (AD). AIRE auto-immune regulator ; APECED autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy ; FOXP3 forkhead box P3 ; IPEX immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked ; CTLA-4 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ; CHAI CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration ; LRBA lipopolysaccharide-responsive, Beige-like anchor protein ; CVID common variable immune deficiency ; STAT signal transducer and activator of transcription ; GOF gain of function ; ALPS autoimmune lymphoproliferative syndrome ; FASLG fas ligand ; CASP10 caspase 10 ; RALD RAS-associated lymphoproliferative disease.

1.1.1 Tolérance centrale

Au cours du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, un des premiers points de contrôle vérifie la capacité de la chaine μ issue du réarrangement des chaines lourdes des Ig à former un pré-BCR fonctionnel en se liant à une chaine légère de substitution $\lambda 5$ associée à un domaine $V_{préB}$. Si ce pré-BCR est capable de s'associer avec des molécules chargées négativement à la surface de la cellule stromale, un signal de prolifération est induit et une exclusion allélique se met en place [5]. La majorité des pré-B n'expriment pas un pré-BCR fonctionnel et entrent en apoptose. Il est possible qu'à ce stade le pré-BCR soit également testé pour sa réactivité vis-à-vis d'auto-antigènes mais le type de ces antigènes et l'influence de leur présentation sur le destin de la cellule pré-B ne sont pas totalement élucidés. Puis l'expression du pré-BCR s'arrête et a lieu le réarrangement des chaines légères. Les réarrangements secondaires κ et λ des 2 allèles sont possibles jusqu'à l'expression d'un BCR fonctionnel et non auto-réactif. En conséquence, les cellules B immatures peuvent exprimer plusieurs chaines légères dont certaines auto-réactives ou poly-réactives. L'édition de la chaine lourde est également possible à ce stade. Si elle ne permet pas d'aboutir à une cellule non-auto-réactive, celle-ci sera détruite. A l'issue de la sélection négative, environ 15% des cellules B immatures produites sortent de la moelle osseuse vers la périphérie, dont certaines sont auto-réactives [6].

Le thymus est l'organe lymphoïde primaire qui participe au développement et à la différenciation spécifique des lymphocytes T. Les progéniteurs lymphoïdes précoces en provenance de la moelle osseuse colonisent le cortex thymique et maturent en suivant plusieurs stades de différenciation avant de quitter le thymus pour la périphérie.

Les progéniteurs thymiques précoces perdent progressivement leur pluripotence en exprimant différents facteurs de transcription et les gènes nécessaires à l'expression du complexe pré-TCR (T cell receptor). Ils deviennent des thymocytes double-négatifs, n'exprimant ni CD4 ni CD8 et s'engagent dans la voie de différenciation T. A ce stade, les cellules qui donneront naissance aux lymphocytes T$\alpha\beta$ subissent la β-sélection, qui teste la capacité du complexe pré-TCR à transmettre un signal. Ce complexe est constitué d'une une chaine pré-TCRα invariante, d'une chaine β déjà réarrangée et d'un CD3. Les thymocytes double-négatifs peuvent alternativement rejoindre le lignage $\gamma\delta$ s'ils expriment un complexe TCR fonctionnel comprenant les chaines γ et δ réarrangées. Vient ensuite pour les cellules $\alpha\beta$ le stade double-positif où les thymocytes expriment à leur surface à la fois les molécules CD4 et CD8. Les thymocytes double-positifs réarrangent le gène du TCRα et subissent la sélection positive dans le cortex thymique. Les cellules présentant à leur surface un TCR d'avidité suffisante pour les complexes CMH-peptides échappent à l'apoptose. Les thymocytes ainsi sélectionnés transitent vers la médulla thymique et subissent la sélection négative : les cellules ayant une trop forte affinité pour les auto-antigènes meurent par apoptose. On parle aussi de délétion centrale. Les cellules de faible affinité pour l'antigène survivent et le processus de différentiation thymique se termine avec la répression de l'expression de CD4 ou de CD8 et l'évolution du thymocyte en une cellule simple-positive CD4, "helper" restreinte par le CMH de classe II ou une cellule CD8 cytotoxique restreinte par le CMH-I [7]. Certaines cellules ayant une affinité forte pour les auto-antigènes expriment d'autres facteurs de transcription, parmi lesquels FOXP3, acquièrent des capacités inhibitrices et deviennent T régulatrices.

1.1.1.1 Défaut de sélection négative dans le thymus : APS1

Le gène *AIRE* (pour autoimmune regulator) est principalement exprimé dans le thymus et agit comme facteur de transcription. Il induit l'expression ectopique par les cellules épithéliales de la medulla thymique d'antigènes spécifiques d'autres tissus. Ces antigènes tissulaires, associés aux molécules du CMH-I ou II, sont présentés aux cellules T en développement au cours de la sélection négative [8, 9]. Les détails des mécanismes permettant à AIRE de contrôler cette expression ectopique d'antigènes tissulaires sont encore à l'étude. Il s'agirait d'un facteur de transcription atypique, faisant partie d'un complexe multi-protéique de plus de 670kDa capable de se lier à certaines régions de la chromatine afin de les activer et de faciliter leur transcription [10].

Ce processus est indispensable à l'établissement d'une tolérance immunitaire ; les individus présentant un défaut du gène *AIRE* sont atteints de poly-endocrinopathie auto-immune de type 1 (ou APS-1, anciennement APECED), syndrome décrit initialement en 1929 par Thorpe et Handley. Ils développent précocement au moins 2 des atteintes suivantes : hypo-parathyroïdie auto-immune, insuffisance surrénale (ou maladie d'Addison), candidose cutanéo-muqueuse. De nombreuses autres atteintes auto-immunes d'organe peuvent également être observées, notamment diabète de type 1, thyroïdite, hépatite, vitiligo, gastrite. Le lien entre cette maladie de transmission autosomique récessive et le gène *AIRE* a été établi en 1997 [11, 12]. Plusieurs auto-anticorps dirigés contre des cytokines sont fréquemment retrouvés et participent à la pathologie [13, 14].

Récemment, des mutations autosomiques dominantes ont été identifiées dans le domaine PHD1 de *AIRE* et seraient responsables d'un tableau incomplet d'APS-1, moins sévère et d'apparition plus tardive [15]. Les atteintes auto-immunes d'organes sont moins spécifiques : anémie, déficit en vitamine B12, vitiligo. De plus, certains de ces variants dominants négatifs de *AIRE* ont été identifiés dans la population générale à très faible fréquence (3 pour 1667). Ceci suggère que des variants rares dans des gènes clés peuvent être impliqués dans des formes plus communes d'auto-immunité.

1.1.2 Tolérance périphérique

Les lymphocytes B immatures sortis de la moelle osseuse se dirigent vers la rate par chimio-attraction. Les cytokines CXCR5 et CCR7 sont essentielles à l'organisation folliculaire B dans cet organe. Un point de contrôle de la tolérance en périphérie, qui entrainerait l'anergie ou l'apoptose des B auto-réactifs lors de leur rencontre avec l'antigène existe probablement à ce niveau. Après stimulation antigénique, les B non auto-réactifs forment les centres germinatifs en coopération avec les lymphocytes T « follicular helper ». Dans la zone sombre du centre germinatif, stimulés par l'antigène, ils prolifèrent. Ils y subissent également la commutation isotypique ainsi qu'une maturation d'affinité par hypermutation somatique, et se différencient en lymphocytes B mémoires et plasmocytes. Au niveau de la zone claire, les cellules dendritiques folliculaires présentant les antigènes sélectionnent les lymphocytes B les plus affins. Une étape de sélection négative des lymphocytes auto-réactifs issus des mécanismes de maturation pourrait également avoir lieu afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes [6].

Malgré la sélection négative dans le thymus, des cellules T avec une affinité faible à modérée pour des auto-antigènes rejoignent la périphérie. Des mécanismes de tolérance périphérique sont donc nécessaires à la fois pour contrôler les cellules T matures auto-réactives et pour encadrer la lymphoprolifération au cours de la réponse immunitaire.

La liaison en périphérie du lymphocyte T naïf à un complexe CMH-peptide spécifique de son TCR n'est pas suffisante pour entrainer son activation optimale. Des signaux secondaires sont requis. Ils ne sont pas spécifiques de l'antigène et peuvent être transmis par des facteurs solubles comme l'IL-2 ou par la liaison à des molécules de co-stimulation également exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Le second signal canonique est fourni par la liaison du CD28, constitutivement présent à la surface de la majorité des lymphocytes T, avec les molécules CD80 et CD86 exprimées par les CPA professionnelles (constitutivement sur les cellules dendritiques et après activation sur les lymphocytes B et les macrophages). Il permet une activation effective du lymphocyte et l'amplification de la réponse immunitaire.

En l'absence de signaux de co-stimulation le lymphocyte ne s'active pas et devient anergique. Ce mécanisme de tolérance prévient l'activation des lymphocytes auto-réactifs rencontrant leur antigène spécifique en périphérie en dehors de tout contexte inflammatoire ou infectieux.

Il existe un autre récepteur capable de se lier à CD80 et CD86 et ayant un rôle inhibiteur : CTLA-4. Son expression et ses fonctions qui seront décrites plus en détail dans la section consacrée au déficit en CTLA-4 (voir 1.1.5, page 33) participent également au maintien de la tolérance périphérique.

La délétion clonale des lymphocytes T par l'induction de la mort cellulaire via le récepteur de mort FAS et les fonctions inhibitrices des lymphocytes T régulateurs, autres mécanismes de la tolérance périphérique pour lesquels des déficits génétiques spécifiques ont été décrits chez l'homme, seront décrits successivement (respectivement section 1.1.3, page 27 et section 1.2, page 30).

1.1.3 Contraction de la réponse immunitaire et défauts d'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est l'un des mécanismes clés du contrôle de la prolifération cellulaire en général. On décrit classiquement 2 voies de déclenchement de l'apoptose : la voie intrinsèque ou mitochondriale lorsque les signaux déclenchant sont d'origine intracellulaire ; la voie extrinsèque lorsque les signaux de mort sont transmis à la cellule par l'intermédiaire de récepteurs de surface comme FAS.

L'apoptose est essentielle à différents niveaux de la mise en place de la tolérance immune, notamment lors du développement et des sélections positive et négative des lymphocytes T et ultérieurement, au niveau des lymphocytes matures. Lors d'une stimulation chronique, répétée des lymphocytes T par un antigène, qui peut être auto-réactif, l'apoptose est induite par l'activation (AICD) et dépendante de FAS. Lors de la phase de contraction, suite à l'élimination de l'antigène l'ayant déclenchée, la mort autonome

des cellules activées (ou activated cell autonomous death, ACAD) permet de diminuer la taille du pool de lymphocytes et de terminer la réponse immune. Ces 2 processus sont des mécanismes majeurs de prévention d'une prolifération cellulaire persistante ou incontrôlée. Des défauts génétiques de ces voies ont été découverts, impliquant les protéines FAS, FASLG, certaines caspases, des protéines RAS. Ils sont succinctement décrits ci-dessous.

1.1.3.1 Défaut d'induction de l'apoptose : l'ALPS

Un défaut de l'apoptose dépendante de la voie FAS-FAS ligand entraine un syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ou ALPS). Celui-ci est caractérisé par l'apparition précoce d'un syndrome tumoral bénin (adénopathies et splénomégalie), une hypergammaglobulinémie, une susceptibilité accrue aux lymphomes et des manifestations auto-immunes. Ces dernières concernent 70% des patients et touchent principalement les lignées hématopoïétiques : anémie hémolytique, thrombopénie, et neutropénie auto-immunes d'intensité variable sont observées [16]. Biologiquement, les patients présentent une augmentation de l'IL-10, du FAS ligand et de la vitamine B12 dans le plasma ainsi que l'accumulation d'une sous-population lymphocytaire particulière, TCR$\alpha\beta$ $CD4^-CD8^-$ ou lymphocytes double-négatifs [17, 18, 19]. Des tests fonctionnels *in vitro* peuvent montrer une résistance à l'apoptose des lymphocytes T.

L'ALPS est génétiquement hétérogène avec des mutations germinales hétérozygotes ou homozygotes dans les gènes *TNFRSF6* (encodant la protéine FAS) [20, 21] et *FASLG* [22, 23]. Des mutations somatiques de *TNFRSF6*, présentes dans des cellules d'origine hématopoïétiques sont également responsables de la maladie [24]. De plus, on observe chez certains patients l'association d'une mutation germinale et d'une mutation somatique de *FAS* [25].

Les autres maladies monogéniques avec défauts d'apoptose ont été initialement considérées comme similaires à l'ALPS. Une classification établie en 2010 précise les critères diagnostiques et les différentes catégories d'ALPS et de pathologies associées [26].

1.1.3.2 Autres déficits immunitaires primitifs avec lymphoprolifération bénigne

Après liaison du récepteur FAS et de son ligand, un complexe multi-moléculaire se forme. Il comprend le récepteur FAS trimérisé, FADD et CASPASE 8. Sa formation est nécessaire à l'activation par clivages successifs des différentes caspases jusqu'aux caspases effectrices. Des mutations de *CASPASE 8* sont responsables d'un syndrome lymphoprolifératif et de défauts d'apoptose. Les patients présentent aussi une susceptibilité accrue aux infections, absente dans l'ALPS. Leurs lymphocytes ont un défaut de prolifération en lien avec le rôle de CASPASE 8 dans l'activation de la prolifération par la voie NF-κB en aval du TCR [27]. Ce syndrome a été dénommé CEDS (pour caspase 8 deficiency state) [28]. Il a été également rapporté dans 2 familles seulement, des patients présentant un ALPS associé à une mutation de *CASP10* [29].

Enfin, des mutations somatiques de *NRAS* ou *KRAS* sont responsables d'une maladie appelée RAS-associated lymphoproliferative disease (ou RALD). Les patients présentent là encore une lymphoprolifération bénigne est des défauts d'apoptose, notam-

ment d'ACAD. De plus, ils développent des hémopathies malignes touchant la lignée myéloïde, non observées dans l'ALPS et à rapprocher des leucémies myélo-monocytaires juvéniles [30, 31].

De façon similaire, un syndrome lymphoprolifératif B associé au lupus a été décrit en 2013 en relation avec un déficit en PRKCD [32, 33, 34]. Des mutations autosomiques dominantes de *PIK3CD* et de *PIK3R1*, codant respectivement la sous-unité catalytique p110δ et la sous-unité régulatrice p85α de la phosphoinositide-3 kinase sont également à l'origine d'un déficit immunitaire principalement humoral [35, 36]. Enfin, des mutations autosomiques dominantes de *CARD11* entrainent une activation constitutive de la voie NF-κB à l'origine d'un syndrome lymphoprolifératif polyclonal B [37].

L'ALPS est le seul syndrome auto-immun dans lequel l'association d'une mutation germinale sur l'un des allèles et d'une mutation somatique sur l'autre allèle conduit à l'apparition de la maladie. Ce mécanisme explique en partie la variabilité clinique observée entre les individus porteurs de mutations hétérozygotes identiques : de façon analogue à la théorie « 2-hits » de Knudson concernant le développement des cancers, l'accumulation d'évènements génétiques confère alors un avantage sélectif aux cellules mutées [25]. Ceci démontre que des mutations somatiques peuvent conduire à l'apparition de maladies auto-immunes et propose une explication pour la pénétrance familiale incomplète observée dans les maladies auto-immunes.

1.1.4 Rôle des T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population lymphocytaire importante qui supprime la réponse immune aux auto-antigènes et contrôle les réponses excessives après stimulation antigénique [38]. Plusieurs sous-populations de Treg ont été décrites, parmi lesquelles les Treg naturels (nTreg) exprimant le facteur de transcription FOXP3, les Tregs périphériques ou induits (pTreg), les cellules T régulatrices FOXP3$^-$ de type I (Tr1) et les Treg CD8$^+$.

Les Treg naturels sont les mieux caractérisés. Ils sont issus de cellules T d'affinité importante pour les auto-antigènes dans le thymus. Chez l'homme, ils expriment les marqueurs CD4$^+$CD25^{hi}CD127^{lo}FOXP3$^+$ [39, 40]. Plusieurs mécanismes suppressifs des Treg sont proposés, parmi lesquels la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [41], l'IL-35 [42] ou le TGFβ [43]. Ces cellules régulatrices sont, comme les effectrices, dépendantes de cytokines pour leur survie ; elles peuvent consommer les différentes cytokines activatrices présentes dans le milieu et induire l'apoptose des cellules effectrices par ce sevrage en cytokines [44]. Les Treg sont aussi capables de détruire les T effecteurs par des mécanismes impliquant le enzymes perforine et granzyme B [45]. Elles peuvent transduire des signaux négatifs tels que l'inhibition de la production d'IL-2 ou de la prolifération des cellules T par l'augmentation des niveaux intra-cellulaires d'AMPc à travers des jonctions communicantes (gap junctions) [46]. Les Tregs induisent également la production d'indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) par les cellules dendritiques et inhibent la prolifération des cellules T en diminuant la disponibilité du tryptophane [47]. CTLA-4 est fortement exprimé à la surface des Treg et contribue à leur action inhibitrice (voir 1.1.5,

page 33), notamment par compétition avec les ligands des récepteurs de co-stimulation pour la signalisation des T effecteurs [48]. L'ensemble de ces mécanismes est représenté sur le schéma 1.2, page 30. Au delà de leurs fonctions de contrôle des lymphocytes T auto-réactifs, les Treg semblent avoir un rôle important dans l'établissement et le maintien de la tolérance des lymphocytes B [49].

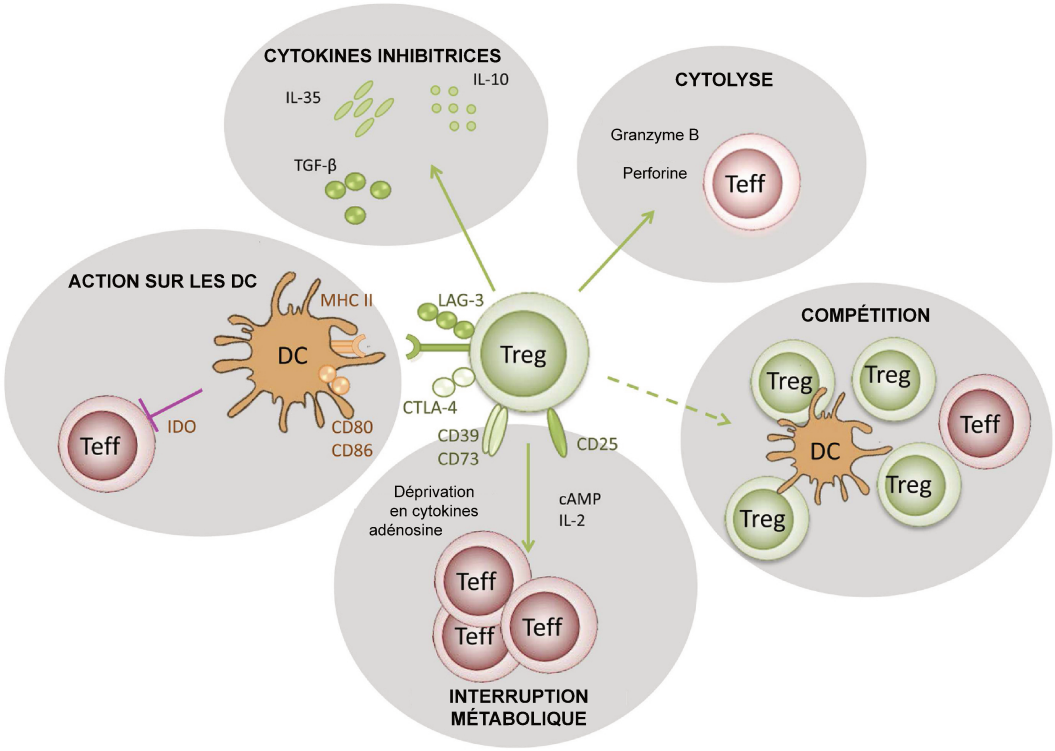


FIGURE 1.2 – **Mécanismes d'action putatifs utilisés par les Treg.** (1) Action sur les DC – modulation de l'activité des cellules présentatrices d'antigène par l'engagement des co-récepteurs stimulateurs à leur surface par les Treg, ce qui diminue ou abolit les signaux aux cellules T naïves et effectrices ; (2) Interruption métabolique – inclut le sevrage en cytokines, l'inhibition par l'intermédiaire de l'AMPc et l'immunosuppression par l'intermédiaire du récepteur de l'adénosine ; (3) Compétition – pour les cytokines indispensables comme l'IL-2 ou par interruption directe de l'engagement des cellules effectrices avec les CPA ; (4) Production de cytokines inhibitrices – dont l'IL-10, l'IL-35 et le TGFβ. D'après Caridade *et al.* [50].

Les Treg périphériques se développent en périphérie à partir de cellules T naïves et résident préférentiellement dans les muqueuses cutanées et digestives. Les mécanismes d'apparition de cette sous-population en réponse à des auto-antigènes ou à des antigènes extérieurs, parmi lesquels les Ag d'origine alimentaire et les bactéries commensales, ne sont pas clairs. La génération des pTreg semble être favorisée par l'exposition à doses faibles de peptides se liant avec une forte affinité aux lymphocytes T dont ces cellules dérivent [51]. Les nTreg se différencient des pTreg par l'expression d'Helios, un facteur de transcription appartenant à la famille Ikaros [52].

La sous-population Tr1 est induite en périphérie et n'exprime pas FOXP3. Ces cellules produisent beaucoup d'IL-10 et de TGFβ et peu d'IL-2. Leurs fonctions suppressives s'exercent prioritairement par l'intermédiaire des cytokines anti-inflammatoires produites (en premier lieu IL-10 et TGFβ), mais également par contact cellulaire via des récepteurs

comme CTLA-4 et PD1, par interruption métabolique ou encore par cytolyse à l'aide des granzymes et perforines [53]. Les cellules Tr1 se différencient des autres sous-populations de Treg par la co-expression à leur surface des marqueurs CD49b et LAG-3 [54].

Par ailleurs, les cellules T $CD4^+$ exprimant FOXP3 en périphérie peuvent être différenciées phénotypiquement en Treg quiescents $CD25^+CD45RA^+FOXP3^{lo}$, Treg activés $CD25^+CD45RA^-FOXP3^{hi}$ et cellules non suppressives non Treg $CD25^+CD45RA^-FOXP3^{lo}$ [55]. Le CD15s ou Sialyl $Lewis^X$ a été récemment identifié comme marqueur permettant de différencier efficacement les cellules Treg effectrices $FOXP3^+$ des cellules $FOXP3^+$ non régulatrices [56].

A côté des Treg $CD4^+$, des Treg $CD8^+$ avec des fonctions inhibitrices ont également été décrits. Les Treg $CD8^+$ peuvent se développer dans le thymus ou être induits en périphérie. Le sous-groupe naturel inclut les cellules $CD8^+CD25^+$CTLA-$4^+GITR^+FOXP3^+$. Le sous-groupe induit est défini par la présence des marqueurs $CD8^+CD103^+$ et pour partie CTLA-$4^+GITR^+FOXP3^+$. Il peut être induit par des peptides viraux ou par l'association de l'IL-4 et du TGFβ. Les mécanismes de suppression des Treg $CD8^+$ sont variés : utilisation de cytokines, contacts cellulaires, induction indirecte de Treg $CD4^+$ via les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), cytotoxicité directe [57].

Plusieurs maladies monogéniques avec auto-immunité affectent les lymphocytes T régulateurs. Certaines entrainent des défauts limités à cette population, comme les mutations de *FOXP3*, *CD25*ou encore *CTLA-4*. Lorsque des protéines comme LRBA, STAT3, STAT1, STAT5b, STIM1 ou encore WASP sont anormales, cela retentit secondairement sur les T régulateurs. Ainsi, le déficit en ITCH, lié à des mutations du gène *ITCH* ou *AIP4* codant une E3 ubiquitin ligase a été décrit en 2010. Les patients présentent une dysmorphie faciale, un retard de développement et de croissance et une dérégulation immune avec auto-immunité, en particulier pneumopathie interstitielle chronique, thyroïdite, diabète de type 1, entéropathie et hépatite. ITCH catalyse le transfert d'ubiquitine sur plusieurs protéines de signalisation (PLCγ1, la protéine kinase Cθ, NOTCH), ce qui peut conduire à une modification de leur fonction ou à une dégradation de ces protéines. L'absence d'ITCH affecte l'anergie des cellules T et l'expression de FOXP3. La souris itchy, dépourvue de cette protéine, présente un tableau inflammatoire et une lymphoprolifération majeure et meurt précocément [58, 59, 60, 61].

1.1.4.1 Défaut de développement des T régulateurs : le syndrome IPEX

FOXP3 est le principal facteur de transcription nécessaire pour le développement des Treg et pour leurs fonctions suppressives [62, 63, 64]. Le rôle non redondant de FOXP3 dans le maintien de la tolérance est mis en évidence dans le syndrome IPEX (dérèglement immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, lié à l'X), une maladie auto-immune multi-systémique liée à des mutations de *FOXP3* [65, 66]. Seuls les garçons sont malades, le plus souvent dès les premiers mois de vie, et les atteintes les plus fréquentes sont la diarrhée sévère, révélatrice de l'entéropathie auto-immune, le diabète de type 1 et la dermatite. Des cytopénies auto-immunes, une thyroïdite, une atteinte hépatique, une atteinte rénale et une augmentation des IgA ou des IgE sont également observées [67].

La découverte des bases moléculaires de ce syndrome a permis d'identifier les cellules Treg FOXP3$^+$ comme acteurs clés de la régulation de la tolérance périphérique. La protéine FOXP3 peut se lier à plus de 700 promoteurs différents sur l'ADN et agir soit en tant que répresseur soit en tant qu'activateur, en fonction du promoteur auquel elle se lie [68]. Parmi les gènes régulés positivement, on citera : *CD25* et *CTLA-4*. Au niveau de l'ADN, FOXP3 interagit aussi avec un réseau d'autres facteurs de transcription qui favorisent son action [69, 70]. FOXP3 peut également se dimériser au niveau du domaine swap. Il forme ainsi un complexe tertiaire comprenant 2 exemplaires de FOXP3 et le facteur de transcription NFAT1 et rapprochant 2 molécules d'ADN. Des mutations au niveau ce domaine de dimérisation n'altèrent pas la capacité de liaison à l'ADN de FOXP3 mais entrainent une perte des fonctions suppressives des Treg et un tableau clinique d'IPEX [71, 72].

1.1.4.2 Déficit en CD25

L'IL-2 est une cytokine essentielle pour la survie, la prolifération et la différentiation des cellules T. Elle favorise également la mort cellulaire induite via FAS par la stimulation répétée du TCR (ou activation-induced cell death, AICD), mécanisme aussi utile à la tolérance immune [73]. De plus, l'IL-2 est nécessaire à la survie et à la fonction des lymphocytes T regulateurs.

Le récepteur de haute affinité à l'IL-2 est composé de 3 chaines : α (CD25), β (CD122) et γ (CD132, commune aux interleukines 2, 4, 7, 9, 15 et 21). Les chaines β et γ forment également un récepteur de moindre affinité, exprimé constitutivement sur les lymphocytes T alors que le récepteur de haute affinité est restreint aux Treg, aux T matures activés et à certaines étapes du développement thymique des T. En aval, la signalisation passe principalement par JAK1 et JAK3 puis les molécules STAT3 et STAT5.

Bien que les Treg ne produisent pas d'IL-2, ils expriment fortement CD25 (et les autres sous-unités du récepteur de haute affinité), ce qui leur permet d'être les premiers à répondre à cette cytokine. En conséquence, le déficit en CD25 induit un syndrome auto-immun proche du syndrome IPEX – et souvent appelé IPEX-like – associant l'apparition précoce d'une entéropathie, d'un eczéma, d'un diabète de type 1et d'une prolifération lymphocytaire infiltrant les organes et d'infectons chroniques au CMV et à l'EBV. Ces patients n'expriment pas CD25 à la surface des cellules. Leurs lymphocytes T CD4$^+$ sont moins nombreux et présentent un défaut de prolifération *in vitro* en réponse aux mitogènes et au CD3. Ils montrent également une absence d'expression du CD1 et une augmentation d'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 dans les thymocytes ce qui fait supposer un rôle de CD25 dans la sélection négative thymique [74]. En revanche, le pourcentage de cellules T CD4$^+$ circulantes FOXP3$^+$CTLA4$^+$GITR$^+$ Helios$^+$CD127^{low} est normal. Cependant, la proportion de Treg, définis dans ce cas par la déméthylation du promoteur de FOXP3 spécifique des Treg, est inférieure à celle observée chez les contrôles. Les fonctions inhibitrices de ces cellules n'ont pas été évaluées par manque de marqueurs de surface capables de les définir précisément *ex vivo*. Chez les patients déficients en CD25, le seuil d'activation en réponse à l'IL-2, via le récepteur composé seulement des chaines β et γ, est plus élevé que chez les individus sains. Ces cellules T ne répondent pas à une stimulation par le TCR *ex vivo* mais l'apport exogène d'IL-2 à forte dose ou d'IL-15 restaure partiellement la prolifération [75]. Les réponses cellulaires T spécifiques d'un an-

tigène sont aussi affectées, *in vivo* et *ex vivo*. Cependant, même en l'absence de CD25, les cellules $CD4^+FOXP3^+$ répondent mieux à l'IL-2 que les cellules $CD8^+$ ou $CD4^+FOXP3^-$. Par ailleurs, les patients déficients en CD25 présentent des concentrations sériques élevées en cytokines et des voies STAT5 et STAT3 activées. Cela pourrait expliquer la capacité des T à proliférer de façon polyclonale *in vivo* [76].

Les différences physiopathologiques observées entre le déficit en FOXP3 et le déficit en CD25 sont donc liées à l'importance de cette chaine pour les Treg mais aussi les T effecteurs. En revanche, les tableaux cliniques sont très similaires.

1.1.5 Modulation des T régulateurs : CTLA-4

L'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques, (CTLA-4 pour cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, aussi appelé CD152) est une glycoprotéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines. Ce récepteur peut se lier avec les molécules de co-stimulation CD80 (ou B7.1) et CD86 (ou B7.2) exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène et entrer en compétition avec CD28 pour ces ligands. Bien que de structure similaire à CD28, CTLA-4 exerce des fonctions opposées, inhibitrices, et a une plus grande affinité pour CD80 et CD86. Il est exprimé de façon constitutive à la surface des lymphocytes T régulateurs. Dans les T effecteurs au repos, il est séquestré dans des vésicules associées à l'appareil de Golgi. Lors de l'activation via le TCR et les co-récepteurs, notamment CD28, CTLA-4 est exprimé à la surface de la cellule par transcription *de novo* et par envoi à la membrane cellulaire des protéines CTLA-4 déjà produites [77]. Ainsi, lors de la réponse immunitaire, les lymphocytes T activés induisent l'expression de CTLA-4, qui, via l'interaction avec ses ligands, facilite la terminaison de la réponse immunitaire.

CTLA-4 comprend un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Il existe des variants d'épissage codant différentes isoformes (voir figure 1.3 page 34). La forme liée à la membrane est un homodimère où les 2 molécules sont le plus souvent reliées par un pont disulfure en position 122 [78] ; la forme soluble est monomérique. Le domaine intracellulaire est similaire à celui de CD28 : il ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais contient un motif YVKM (tyrosine, valine, lysine, méthionine), capable de se lier à PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PP2A (protein phosphatase 2A) et PTPN11 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 ou SHP2), ainsi qu'un motif riche en proline capable de se lier aux domaines SH3 d'autres protéines. CTLA-4 subit un cycle de transport permanent : une fois amené à la surface de la cellule, l'endocytose de CTLA-4 se produit très rapidement dans des vésicules recouvertes de clathrine, par l'intermédiaire du motif YVKM. Il passe alors par des endosomes de recyclage (recycling endosomes) pour être majoritairement renvoyé à la membrane ou dégradé dans des lysosomes. L'activation des cellules augmente le renouvellement de CTLA-4 à la membrane plasmique mais pas sa stabilité [79].

Les mécanismes précis par lesquels CTLA-4agit restent controversés et sont représentés dans les figures suivantes (figure 1.4 page 34 et 1.5 page 35). Classiquement, lors de sa liaison avec CD80 et CD86, CTLA-4 réduit la disponibilité de ces co-récepteurs pour la liaison activatrice avec CD28. C'est un mécanisme de compétition, extrinsèque.

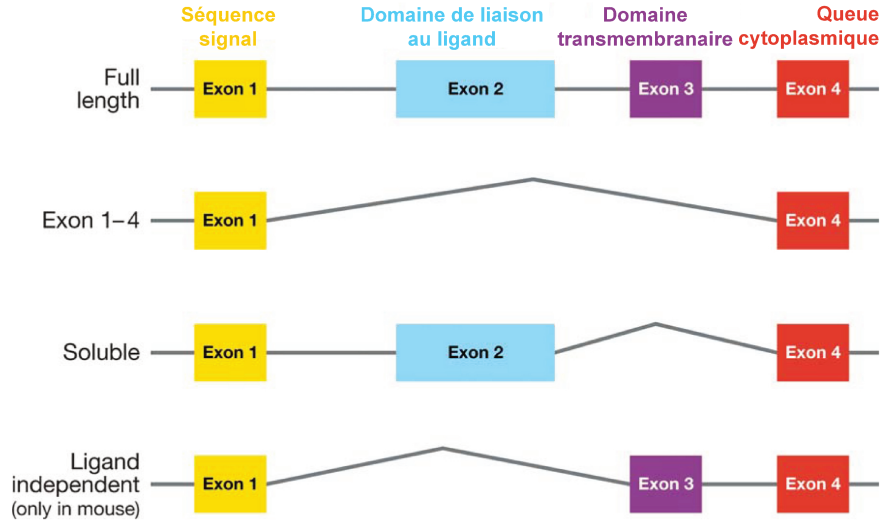


FIGURE 1.3 – **Le gène *CTLA-4* et ses différents variants d'épissage.** Le gène *CTLA-4* contient 4 exons qui peuvent donner naissance à 4 variants d'épissage différents. Chaque exon code pour un domaine de la protéine comme précisé en haut de la figure. Les formes « full lengh » (longueur totale), exon 1-4 et CTLA-4 soluble sont exprimées chez l'homme tandis que la souris exprime une forme additionnelle, le CTLA-4 « ligand-independent », sans le domaine de liaison au ligand. D'après Teft *et al.* [80].

CTLA-4 agit aussi de façon intrinsèque en transmettant des signaux via le motif YVKM de son domaine intra-cytoplasmique, qui entrainent une cascade inhibitrice par l'intermédiaire notamment de SHP2 et PP2A [80]. Des travaux plus récents suggèrent que CTLA-4 pourrait également agir de façon extrinsèque en réduisant la disponibilité des molécules CD80 et CD86 par transendocytose [81]. L'expression de CTLA-4 à la surface des cellules activées réduit le temps de contact entre cellule T et CPA, en s'opposant au signal stop constitué par la liaison du complexe CMH-peptide à un TCR spécifique (reverse stop signal) [82]. CTLA-4 pourrait aussi moduler la motilité cellulaire et la signalisation par l'intermédiaire de PI3K [83].

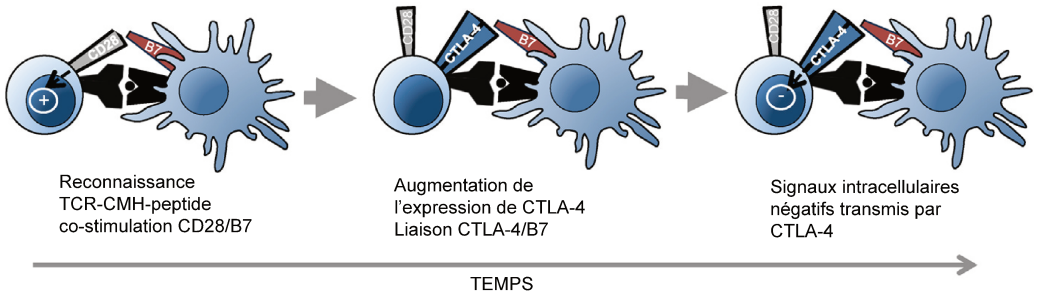


FIGURE 1.4 – **Le modèle traditionnel de co-inhibition par CTLA-4.** La reconnaissance par un TCR du complexe CMH-peptide spécifique induit la costimulation CD28/B7. Après une brève période d'activation, CTLA-4 est exprimé à la surface de la cellule T et interrompt la liaison CD28/B7. CTLA-4 transmet également des signaux intracellulaires limitant l'activation de la cellule T. D'après Krummey *et al.* [84].

Tous ces mécanismes peuvent faire intervenir le CTLA-4 exprimé sur les T activés. Le CTLA-4 exprimé à la surface des Treg ne peut agir que de façon extrinsèque – certains auteurs utilisent également le terme de « non-autonome » ou « cell non-autonomous ».

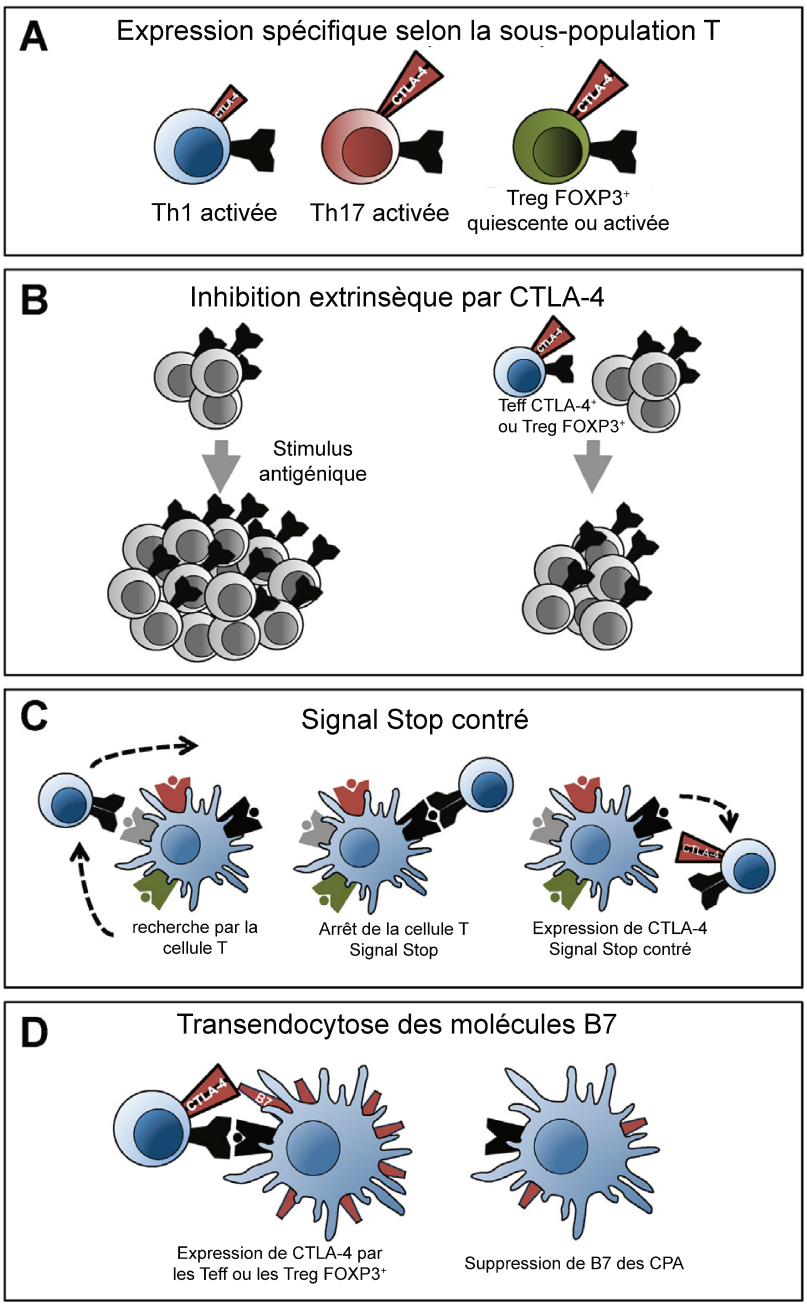


FIGURE 1.5 – **Nouveaux mécansmes d'action de CTLA-4.** **(A)** les niveaux d'expression de CTLA-4 sont différents sur les cellules Th1, Th17 et Treg FOXP3$^+$. **(B)** CTLA-4 exprimé sur les cellules T agit de façon extrinsèque pour limiter la prolifération des autres cellules T (cell non-autonomous). **(C)** Les cellules T scannent continuellement des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et des complexes CMH-peptide. Lors de la liaison au complexe CMH-peptide, nommé ici signal stop, les cellules T arrêtent ce mouvement de recherche. La présence de CTLA-4 pouvant empêcher cet arrêt est dénommée signal stop contré (reverse stop signal). **(D)** CTLA-4 peut supprimer l'expression des molécules B7 sur les CPA par transendocytose. D'après Krummey *et al.* [84].

Certains mécanismes d'action supplémentaires sont décrits chez la souris : Les Tregs induisent par la signalisation CTLA-4/B7 dans les cellules dendritiques la production d'indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), une enzyme catabolisant le tryptophane. La dégradation de cet acide aminé en kynurénine semble nécessaire à l'action tolérogène de

CTLA-4 [47]. Dans un modèle murin KO conditionnel, l'absence de CTLA-4 sur les Treg entraine un défaut de régulation des molécules CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques et conduit à une maladie lymphoproliférative et auto-immune fatale [85, 48]. Enfin, la densité importante de CTLA-4 à la surface des Treg augmente encore la compétition pour l'accès aux molécules B7.

Des études de liaison ont identifié *CTLA-4* ou plus récemment certains SNP (single nucleotide polymorphism, polymorphisme d'une base) dans le gène comme associé à un risque accru de diabète de type 1 [86, 87], d'hypothyroïdie auto-immune, de maladie de Basedow [88, 89], de polyarthrite rhumatoïde [90, 91] et de maladie cœliaque [92]. Il s'agit pour la plupart de polymorphismes non codants dont l'impact fonctionnel reste à clarifier.

En 1995, Waterhouse *et al.* ont créé et étudié une souris CTLA-4 KO. Elle présente une lymphoprolifération T infiltrant les organes lymphoïdes secondaires et de nombreux autres organes. Ces souris CTLA-4 KO meurent après 3 à 4 semaines de vie. Dans ce modèle, les cellules T prolifèrent de façon incontrôlée mais restent sensibles à l'apoptose, mettant en évidence le rôle de CTLA-4 dans la régulation d'activation des lymphocytes T [93].

Des mutations germinales hétérozygotes de CTLA-4, décrites en 2014 par Kuehn *et al.*, Schubert *et al.* et Zeissig *et al.*, sont associées à un syndrome auto-immun par haplo-insuffisance. Les patients présentent des cytopénies auto-immunes et une lymphoprolifération dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes tels que les poumons, le tube digestif et le cerveau. Ils présentent également une perte progressive des cellules B circulantes avec hypogammaglobulinémie et une augmentation relative de la sous-population $CD21^{low}$, associée à l'auto-immunité [94, 95, 96]. Les mutations entrainent une diminution de l'expression de CTLA-4 à la surface des Treg, y compris après activation. De même, si la proportion de Treg $FOXP3^{+}CD127^{low}CD45RO^{+}Helios^{+}$ est normale, les marqueurs FOXP3 et CD25 sont moins exprimés. Les fonctions inhibitrices des Treg sont défectueuses ainsi que la liaison et la transendocytose des ligands de CTLA-4, CD80 et CD86. Ces défauts concernent à la fois les individus mutés malades et les individus mutés asymptomatiques [94, 95]. Cela suggère que des facteurs additionnels, génétiques, épigénétiques ou environnementaux sont nécessaires à l'expression de la maladie.

Une protéine de fusion soluble CTLA-4-Ig, l'abatacept, mimant l'action de CTLA-4 a été développée. Elle combine le domaine extracellulaire de CTLA-4 avec le fragment Fc des IgG1 humaines et peut ainsi se lier à CD80 et CD86. Elle fait actuellement partie de l'arsenal thérapeutique après échec de plusieurs lignes de traitement dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (en association avec le méthotrexate), du psoriasis et de l'arthrite juvénile idiopathique [97]. Suite à la découverte des mutations hétérozygotes de CTLA-4, elle a été utilisée pour traiter ces patients ainsi que des patients présentant un déficit en LRBA, cliniquement et fonctionnellement proche. Ce traitement semble permettre une amélioration clinique, biologique et radiologique des patients [98].

1.1.6 LPS-responsive Beige-like anchor protein (LRBA)

LRBA (pour LPS-responsive Beige-like anchor protein) est une protéine appartenant à la famille BEACH (pour Beige and Chediak-Higashi), d'après le nom du domaine caractéristique de cette famille. *Beige* est le nom du modèle murin de la maladie de Chediak-Higashi, déficit immunitaire lié à des mutations de *LYST*, premier gène identifié dans cette famille (voir 1.1.6.4, page 42). *LRBA* a été identifié en 1996 grâce à un système de « piège à gène » (gene-trapping). Il faisait partie du petit nombre de gènes dont la transcription et la traduction varient suite à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) dans des lignées B [99].

1.1.6.1 Déficit en LRBA

Depuis 2012, LRBA est impliquée dans un déficit immunitaire où l'auto-immunité est au premier plan. Les 10 patients initialement décrits présentent pour la plupart des cytopénies auto-immunes, des infections respiratoires récurrentes et une atteinte digestive caractérisée par une atrophie villositaire associée à une infiltration lymphocytaire. Il s'y associe de façon inconstante des atteintes inflammatoires cérébrales, pulmonaires, cutanées ou articulaires. Enfin, une atteinte auto-immune thyroïdienne est présente chez 1 patient et un déficit en hormone de croissance dans une autre famille. Sur le plan biologique, une hypogammaglobulinémie est fréquente avec un défaut de la sous-population B mémoire commutée ($CD19^+CD27^+IgM^-$)[100, 101, 102]. En 2014, les contours de cette pathologie ont été étendus : 3 groupes ont successivement rapporté des patients présentant un syndrome IPEX-like, un syndrome ALPS (avec augmentation du pourcentage de lymphocytes T double-négatifs et du FAS ligand sérique) ou une maladie inflammatoire intestinale en lien avec des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites dans le gène *LRBA* [103, 104, 105]. Le spectre clinique de cette maladie est donc très large, comprenant des atteintes liées à la dérégulation immune touchant 95% des patients (cytopénies, diabète de type 1, maladie intestinale, thyroïdite, atteinte pulmonaire infiltrative), une lymphoprolifération (86%), une susceptibilité aux infections touchant principalement l'appareil respiratoire (71%) et souvent une hypogammaglobulinémie (57%). Un quart des patients rapportés présente également des difficultés de croissance [106]. Ce tableau clinique est très superposable à celui des patients présentant un déficit en CTLA-4 ou une mutation gain de fonction de *STAT3*, suggérant des mécanismes communs.

Sur le plan fonctionnel, des lignées B immortalisées par l'EBV (B-EBV) et des T activés semblent montrer une sensibilité accrue à l'apoptose induite par la déprivation en cytokines *in vitro* [100, 105]. Les cellules B des patients montrent également un défaut d'activation et un développement des plasmocytes diminué. De plus, l'étude de l'autophagie dans des cellules B et des B-EBV de patients a mis en évidence une diminution de l'induction de l'autophagie associée à une accumulation d'autophagosomes et des zones dévolues à l'appareil de Golgi, suggérant un défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes ou un défaut fonctionnel de ces derniers [100]. Le déficit en LRBA affecte aussi les T régulateurs : la proportion de Treg $CD4^+FOXP3^+$ dans le sang est diminuée ainsi que l'expression des marqueurs CD25, FOXP3, CTLA-4 et Helios sans que l'induction de l'expression de FOXP3 soit touchée. De plus, la fonction suppressive des Treg $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ est diminuée alors que leur sécrétion d'IL-10 est augmentée. Cela modifie également la répartition des populations T naïves et mémoires en faveur

des T mémoires qui représentent une proportion anormalement élevée des T CD4 et CD8 périphériques. Les cellules T effectrices des patients subissent un renouvellement plus important (apoptose et prolifération augmentées) [103].

Dernièrement, Lo *et al.* ont constaté que des patients présentant un déficit en LRBA s'amélioraient sous traitement par la protéine de fusion CTLA-4-Ig (abatacept). Ils ont mis en évidence par co-immunoprécipitation une interaction entre plusieurs domaines de LRBA (domaine de liaison à la lectine concanavaline A-like, domaine d'homologie à la pleckstrine, domaine BEACH, voir 1.1.6.3 et figure 1.7 pour la description et la localisation des domaines) et le motif YVKM de CTLA-4. Des études de co-localisation placent une partie du pool de ces 2 protéines ensemble dans les endosomes de recyclage et les vésicules du réseau trans-golgien. Ainsi, LRBA pourrait réguler la dégradation lysosomale de CTLA-4, l'absence de LRBA laissant la place libre pour la liaison d'AP-1 avec CTLA-4, conduisant à la dégradation de ce dernier. Un traitement par la chloroquine, inhibant la dégradation lysosomale, augmente les niveaux intracellulaires de CTLA-4 [98].

La chloroquine pourrait donc constituer une nouvelle option thérapeutique pour les patients déficients en LRBA qui, à ce jour et selon la gravité des symptômes, sont traités par greffe de cellules souches hématopoïétiques [107] ou par différents traitements immuno-modulateurs dont l'abatacept (3 patients rapportés). Les immunoglobulines sont également utilisées.

1.1.6.2 Gène, variants d'épissage et mutations

Sur le plan génétique, le déficit en LRBA est une maladie autosomique récessive. La plupart des patients présentent des mutations aboutissant à une perte d'expression complete de la protéine. Ont ainsi été décrites principalement de grandes délétions, des insertions et délétions entrainant un codon stop précoce par décalage du cadre de lecture et des substitution d'une base responsable de l'apparition d'un stop immédiat. Les mutations rapportées dans la littérature sont visibles sur la figure 1.6, page 39. On peut observer que les mutations décrites sont réparties sur tout le gène.

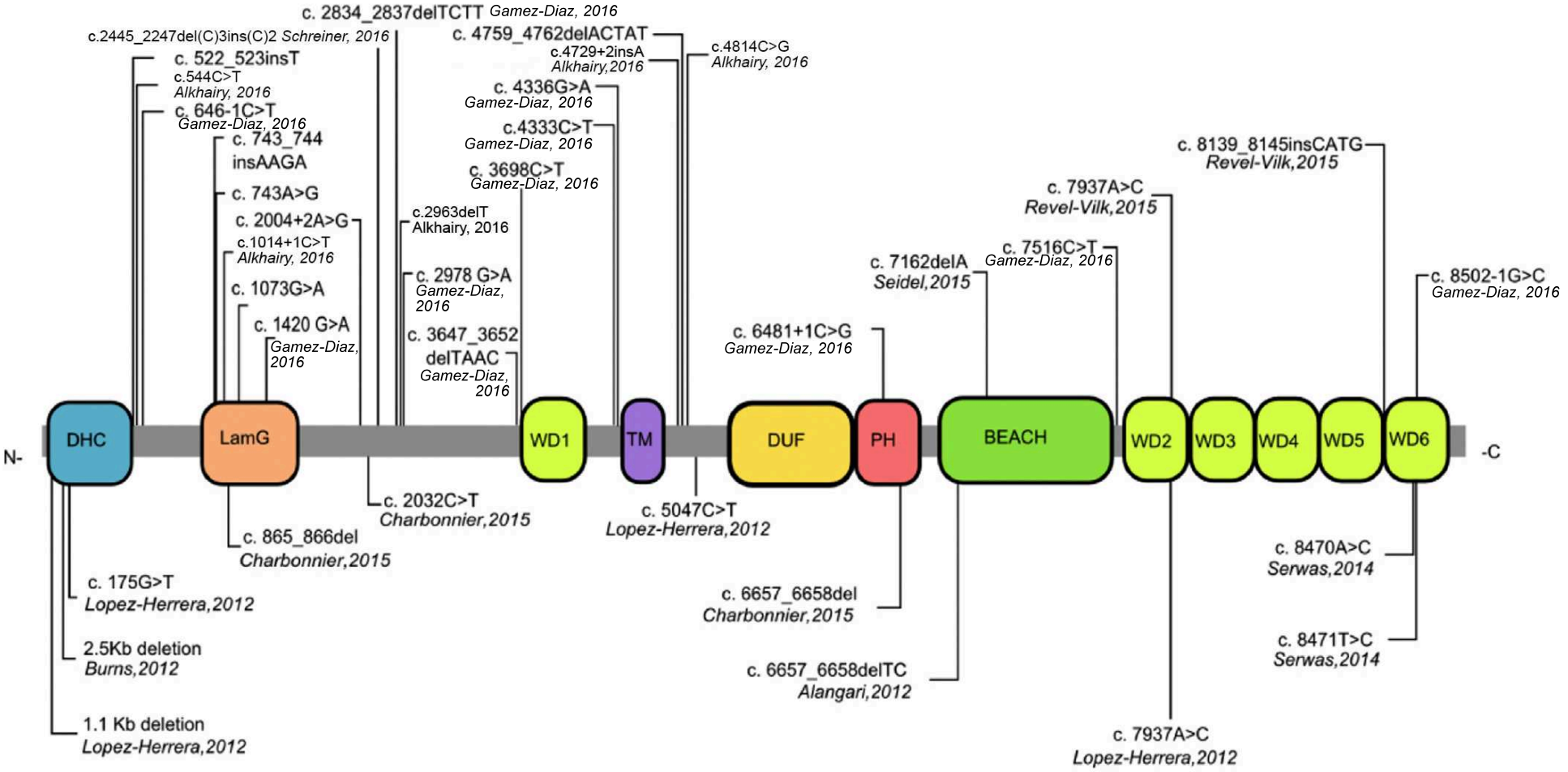


FIGURE 1.6 – **Représentation schématique de LRBA et des mutations décrites.** Les différents domaines de la protéine LRBA sont représentés : DHC domaine cytochrome c di-hème, LamG domaine laminine G, WD 1 à 6 domaines de répétitions WD, TM domaine transmembranaire, DUF domaine de fonction inconnue, PH domaine d'homologie à la pleckstrine BEACH, domaine Beige and Chediak-Higashi. Les mutations sont identifiées par la nomenclature sur la séquence codante du transcrit CCDS58928 et par les articles dans lesquelles elles ont été décrites. D'après Gamez-Diaz *et al.* [106].

Le gène *LRBA* possède 59 exons. Il est situé sur le bras long du chromosome 4, sur le brin antisens et s'étend sur environ 751 000 bp. 13 transcrits sont décrits dont 6 coderaient pour des protéines, les 2 plus longs seulement étant validés dans plusieurs bases de données (CCDS58928 et CCDS3773, codant respectivement pour une protéine de 2851 et 2863AA). Les différences entre ces 2 transcrits sont l'existence d'un petit exon (33 bp, exon 39 dans CCDS3773) et de 3 bp à la jonction des exons 54 et 55 du transcrit le plus long (CCDS3773).

Une particularité des gènes de la famille BEACH est la présence d'autres gènes ou pseudogènes nichés dans les introns. Selon les gènes, leur nombre varie de 0 à 4. Le gène *MAB21L2* est ainsi niché dans le gène *LRBA*, avec 5 éléments régulateurs conservés, localisés de part et d'autre, dans les portions introniques voisines de *LRBA*. Ces éléments non codants liés au gène niché semblent expliquer son expression tissulaire sans avoir d'effet évident sur la régulation de LRBA [108]. La présence de ce gène pourrait participer à la maladie lorsque les mutations observées modifient également le gène niché. Les éléments régulateurs propres à LRBA n'ont pas été étudiés à ce jour.

1.1.6.3 Structure protéique

Les protéines de la famille BEACH sont formées d'une seule chaine d'acides aminés, de très grande taille, de 200 à plus de 400kDa (sauf NSMAF). Elles présentent plusieurs domaines bien identifiés, dont certains sont partagés par la quasi-totalité des membres de la famille. Ils sont représentés sur la figure 1.7, page 41.

Le principal domaine est le domaine BEACH (pour Beige et Chediak-Higashi) d'environ 280 acides aminés (AA), dont la présence définit l'appartenance à cette famille de protéines et lui donne son nom. Il est très conservé entre les différentes protéines chez l'homme et leurs orthologues. Il est le plus souvent situé dans la moitié C-terminale de la protéine sans être totalement à la fin. Les études de cristallisation ont mis en évidence que le le domaine BEACH avait un repliement de son squelette inconnu à l'époque, avec des segments hydrophobiques trop courts pour être appelés feuillets β [109].

Le domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH), constitué d'environ 100 AA, est présent dans LRBA et dans la plupart des protéines de la famille. Il situé juste avant le domaine BEACH. Si la séquence des AA est peu conservée, elle reproduit la structure tridimensionnelle caractéristique. Il pourrait interagir avec le domaine BEACH et former une poche ou surface d'interaction avec un autre partenaire protéique, mais ne permettrait pas la liaison aux phospholipides [110].

La combinaison de plusieurs motifs WD40 d'environ 40 à 60 AA, souvent terminés par un dipeptide tryptophane (W) - acide aspartique (D), constitue un domaine protéique WD, en forme d'hélice β dont la stabilité dépend du nombre de répétitions du motif (4 à 7, instable, 8 à 16, structure stable). LRBA en possède 6. Les protéines avec des motifs WD40 sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la plus importante est le trafic vésiculaire. Ces protéines pourraient coordonner l'assemblage de complexes multimoléculaires dans lesquels les domaines WD serviraient de soutien pour des interactions protéiques hétéromériques. Les domaines PH et WD sont souvent présents dans les mêmes protéines ou se lient l'un à l'autre. La spécificité des protéines avec répétitions WD dépend des séquences situées hors des répétitions elles-mêmes [111].

Les domaines de liaison aux lectines de type concanavaline A se lient aux sucres et sont présents dans des protéines de structures et de fonctions variées. Dans la famille BEACH, ce domaine pourrait se lier aux oligosaccharides associés au trafic et au tri protéique le long des voies de sécrétion, en relation avec la machinerie de fusion vésiculaire [112].

Le domaine DUF1088 (pour « domain of unknown function », domaine de fonction inconnue) est uniquement présent dans LRBA et NBEA, signant une proximité phylogénétique et peut-être une fonction partagée seulement par ces 2 protéines. De même, les domaines FYVE (domaine protéique capable de se lier au phosphatidylinositol-3-phosphate – PI3P– et nommé d'après les 4 protéines dans lesquelles il a été initialement décrit : Fab 1, YOTB, Vac 1, EEA1) et GRAM (domaine trouvé dans les glycosyltransférases, activateurs de GTPase Rab-like et les myotubularines) sont chacun présents dans une autre protéine de la famille BEACH mais absents de LRBA et pourraient contribuer à des fonctions particulières. Enfin, LRBA possède aussi un domaine transmembranaire ainsi que des répétitions Armadillo, domaines d'environ 40 acides aminés formant chacun une structure à 2 hélices α repliée en forme d'épingle à cheveux.

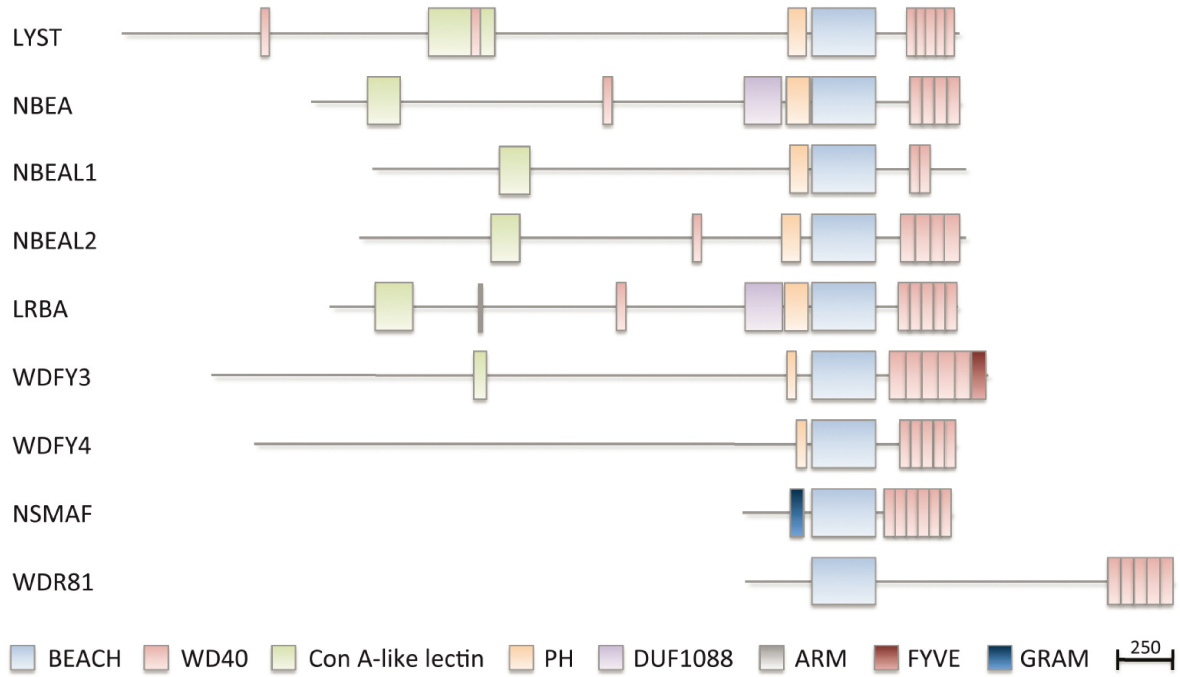


FIGURE 1.7 – **Schéma des domaines protéiques identifiés dans les protéines de la famille BEACH chez l'homme.** Le domaine BEACH est aligné pour les 9 protéines et le schéma est à l'échelle, la barre représentnat 250 acides aminés. A noter la similitude dans le nombre et la position des domaines de répétitions WD40 et des domaines PH qui encadrent le domaine BEACH dans 7 des 9 protéines. Les autres domaines identifiés incluent les domaines lectine de type Concanavaline A (Con A-like lectin), un domaine de fonction inconnue (DUF1088), un domaine FYVE, un domaine GRAM, un domaine de répétitions armadillo (ARM). D'après Cullinane *et al.* [113].

LRBA possède 11 sérines pouvant être phosphorylées et un site potentiel d'acétylation, identifiés par différentes approches protéomiques [114, 115, 116, 117].

1.1.6.4 La famille BEACH : autres membres et pathologies humaines

79 orthologues et 8 paralogues de LRBA ont été identifiés. Chez l'homme, parmi les 9 membres de la famille, 7 ont été impliqués dans des pathologies humaines (Figure 1.3 page 44). Ces maladies affectent en priorité le cerveau (NBEA, NBEAL1, WDR81) et les lignées sanguines (LYST, NBEA, NBEAL2, LRBA). Pour les deux derniers membres (NSMAF et WDFY3), des modèles animaux montrent des anomalies immunologiques et neurologiques [113].

LYST et le syndrome de Chediak-Higashi LYST est la première protéine de la famille BEACH identifiée chez l'homme. Elle est mutée dans le syndrome de Chediak-Higashi, une maladie rare, de transmission autosomique récessive qui entraine un déficit immunitaire, une hypopigmentation de la peau et des cheveux, une tendance hémorragique et des anomalies neurologiques. Les symptômes immunologiques sont caractérisés par des infections récurrentes et une lymphohistiocytose hémophagocytaire souvent fatale dans la première décade. La caractéristique pathognomonique est la présence dans de nombreux types cellulaires – en particulier les plaquettes – de granulations cytoplasmiques géantes possédant des marqueurs des compartiments endosomal et lysosomal. Les cellules T et NK présentent un défaut d'activité cytotoxique. Récemment Sepulveda *et al.* ont montré que LYST est impliquée dans le trafic des effecteurs nécessaires à l'exocytose des granules cytotoxiques [118]. Pourtant, sa fonction n'est pas totalement élucidée.

NBEA, autisme, plaquettes et myélome La neurobeachine (NBEA) fut initialement appelée BCL8 par similitude de séquence avec BCL6 [119]. Elle est impliquée dans l'autisme où des remaniements hétérozygotes importants du gène et parfois des gènes adjacents sont observés (translocations, grandes délétions) [120]. Les plaquettes de ces patients présentent des granules denses de morphologie anormale et spécifiquement vus dans les formes d'autisme liées à des mutations de NBEA [121]. Localisé sur un site fragile du chromosome 13, *NBEA* est aussi impliqué chez l'homme dans le myélome multiple avec des délétions somatiques et des translocations associées à un mauvais pronostic [122], mais le partenaire récurrent des translocations, *PVT1*, serait le plus en cause. De plus, les études montrent une expression variable de NBEA avec des niveaux élevés dans le cerveau et dans certains myélomes multiples, y compris lorsqu'un allèle du gène est délété [123]. Enfin, une analyse ciblé des SNP de la neurobeachine a mis en évidence une association de 2 SNP avec l'indice de masse corporelle, bien que ce locus ne soit pas identifié lors des études d'association à l'échelle du génome (GWAS, genome-wide association study) [124].

NBEAL1 et cancers NBEAL1 (pour neurobeachin-like 1) est exprimée de façon large mais non ubiquitaire ; des hauts niveaux d'expression sont présents dans le cerveau, les reins, la prostate et les testicules. Comme LRBA, NBEAL1 est surexprimée dans les gliomes et certains autres types de cancer [125].

NBEAL2 et le syndrome des plaquettes grises 3 équipes ont rapporté simultanément le lien entre mutations du gène *NBEAL2* (pour neurobeachin-like 2), transcripts anormaux et syndrome des plaquettes grises [126, 127, 128]. Cette maladie autosomique récessive associe des hémorragies de sévérité variable avec la présence de plaquettes augmentées de taille et dépourvues de granules α, de même que les mégacaryocytes. Parmi les

15 transcrits de ce gène, les mégacaryocytes et les plaquettes expriment une combinaison spécifique de 4 d'entre eux. Des modélisations prédisent l'interaction de NBEAL2 avec 2 autres protéines BEACH, LYST et WDFY3 mais cela n'a pas été confirmé *in vitro* [126].

WDFY4 et lupus Plusieurs SNP de WDFY4, dont un entrainant une substitution d'AA, ont été associé au lupus dans des études à l'échelle du génome [129, 130]. L'un d'entre eux entraine une diminution de la transcription de *WDFY4* confirmée *in vitro* [131]. Ces résultats, établis sur des populations asiatiques, n'ont pas été reproduits sur d'autres populations à ce jour.

WDR81 et CAMRQ WDR81 a été associée, par cartographie des régions homozygotes dans une famille consanguine à un syndrome récessif rare associant des anomalies de la marche, un retard mental et une hypoplasie cérébelleuse (syndrome CAMRQ pour cerebellar hypoplasia, mental retardation, quadrupedal walking). Ce syndrome est associé à des mutations d'autres gènes avec quelques variations cliniques [132].

NSMAF Il n'y a pas de pathologie humaine associée à NSMAF (pour neutral sphingomyelinase activation-associated factor) à ce jour. Néanmoins, le modèle murin KO présente un déficit immunitaire modéré avec une diminution de l'expression des gènes induits par le TNFα, notamment l'IL-6, et une mauvaise réponse à l'albumine sérique bovine (BSA) [133]. De plus, des fibroblastes humains exprimant un mutant dominant négatif de NSMAF montrent une diminution de l'apoptose induite par le TNFα [134]. Contrairement à LRBA, NSMAF n'est pas sensible à la stimulation par le LPS.

WDFY3 De même, *WDFY3* n'est pas relié à une maladie chez l'homme, mais son orthologue *blue cheese* est responsable d'une neurodégénérescence chez la drosophile par accumulation d'aggrégats de protéines ubiquitinylées insolubles dans les cellules du système nerveux central. Cela entraine une apoptose accrue des neurones avec l'âge et une réduction de la durée de vie des mouches [135]. Chez l'homme, WDFY3 est ubiquitaire, peut se lier au PI3P et est nécessaire à la dégradation sélective par macro-autophagie des aggrégats protéiques. WDFY3 interagit avec p62, qui marque les cargos protéiques à dégrader et Atg5, composant des auto-phagosomes ; il agirait donc comme protéine support permettant leur rapprochement [136, 137].

Protéine	Maladie	Génétique associée	Symptômes immunologiques	Autres symptômes	Références
LRBA	CIVD8	mutations AR germinales	Oui		[100, 102, 101, 103, 98]
	Cancer du sein	Surexpression de LRBA	Non		[138, 139]
	Cancer de la prostate	Surexpression de LRBA	Non		[125]
LYST	Syndrome de Chediak-Higashi	mutations AR germinales	Oui	Neuro, hémato, cutané	
NBEA	Autisme	Mutations hétérozygotes	Non	Neuro	[120]
	Formation des plaquettes	Mutations hétérozygotes	Non		[121]
	Obésité	Association avec des SNP	Non		[124]
	Myélome	Déletions somatiques, association avec des SNP, expression variable	Oui		[122]
NBEAL1	Gliome	Surexpression de *NBEAL1*	Non	Neuro, hémato	[125]
NBEAL2	Syndrome des plaquettes grises	mutations AR germinales	Non	Myélofibrose, splénomégalie	[126, 127, 128]
WDFY4	Lupus systémique	Association avec des SNP	Oui		[129, 130, 131]
WDR81	CAMRQ	Mutations AR germinales	Non	Neuro	

Tableau 1.3 – **Maladies humaines associées aux protéines de la famille BEACH.** AR autosomal récessif, SNP single nucleotide polymorphism, neuro neurologiques, hémato hématologiques, CAMRQ cerebellar ataxia, mental retardation, quadrupedal walking syndrome.

LRBA : étude des orthologues Dans des lignées cellulaires B murines, Wang *et al.* ont étudié la localisation de *lba* fusionné avec la GFP en réponse à une stimulation au LPS. Par microscopie confocale et électronique, ils ont localisé leur protéine de fusion dans le cytoplasme au niveau de nombreuses vésicules : Golgi, lysosomes, réticulum endoplasmique, membrane plasmique et vésicules d'endocytose [140]. Chez Caenorhabditis elegans, de Souza *et al.* ont mis en évidence que SEL-2, un homologue de LRBA et de la neurobeachine, régulerait négativement la voie lin-12/Notch et agirait sur le trafic endosomal des cellules épithéliales polarisées [141].

LRBA et cancer Enfin chez l'homme, à côté du déficit en LRBA largement décrit plus haut, Wang *et al.* ont montré que LRBA était surexprimée dans un grand nombre de cancers, et pourrait jouer un rôle dans la voie de signalisation de l'EGFR et faciliter la croissance tumorale [125]. Des analyses multivariées de profils d'expression en qPCR dans les carcinomes mammaires canalaires invasifs ont identifié LRBA avec d'autres gènes comme un marqueur de mortalité et de récurrence. LRBA est surexprimée dans les cancers du sein, de façon plus importante chez les hommes que chez les femmes [139, 138]. Le lien avec la positivité des tumeurs au récepteurs aux œstrogènes est discuté [142].

1.1.6.5 LRBA : résumé

L'étude des protéines de la famille BEACH et des maladies dans lesquelles elles sont impliquées permet de dégager plusieurs tendances :

- Les protéines BEACH interviennent dans le trafic vésiculaire intracellulaire, en particulier la fission et la fusion de différentes vésicules du système endo-lysosomal ;
- Elles pourraient servir de protéines de support pour la formation de complexes multi-moléculaires ;
- Elles sont également impliquées dans l'apoptose et l'autophagie ;
- 4 maladies impliquent le système immunitaire avec un phénotype de déficit immunitaire ou d'auto-immunité ;
- 2 maladies touchent la formation des granules plaquettaires : LYST est impliquée dans la formation des granules δ contenant des activateurs plaquettaires et NBEA des granules α contenant des facteurs de la coagulation ;
- Pour toutes les maladies impliquant des protéines de la famille BEACH, la corrélation entre le gène, sa fonction physiologique ainsi que l'origine fonctionnelle des symptômes n'est pas totalement élucidée.

Concernant spécifiquement *LRBA*, des mutations sont impliquées dans un déficit immunitaire monogénique de transmission autosomique récessif et de pénétrance complète bien que les symptômes présentés varient d'un patient à l'autre, y compris au sein d'une même famille. 37 mutations sont décrites à ce jour, réparties sur tout le gène, 36 entrainent une protéine absente ou indétectable. De nombreuses incertitudes persistent quant à la localisation intra-cellulaire de LRBA, sa fonction et ses partenaires.

1.1.7 Hyperactivation d'un facteur de transcription : mutations gain de fonction de STAT3

STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) est un facteur de transcription de la famille STAT. Il est recruté et activé par les JAK (Janus kinases) en réponse à la liaison d'une cytokine à son récepteur. Activés par phosphorylation, les STAT se dimérisent et migrent vers le noyau où ils régulent l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la différentiation, la migration, l'inflammation et l'apoptose. Classiquement activé en réponse à l'IL-6, STAT3 agit en aval de plusieurs récepteurs dont la famille gp130, les récepteurs avec chaine γ commune et d'autres familles de récepteurs des cytokines (IL-10, IL-12, IL-23), les récepteurs des interférons de type I et II et des récepteurs tyrosine kinase comme le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (ou EGF pour epidermal growth factor) [143]. STAT3 est impliqué dans différents processus, notamment le développement, l'angiogénèse, le cancer, l'immunité, la réparation cutanée. Ses fonctions sont très variées et dépendent du stimuli, du récepteur et des kinases en amont, du type cellulaire mais aussi du type d'interactions en aval. En effet, en dehors du schéma canonique d'homodimérisation et d'activation directe de la transcription de l'ADN, des fonctions non-classiques de STAT3 sont décrites : action de formes non phosphorylées ou subissant d'autres modifications post-traductionnelles, induction d'ARN non codants et de micro-ARN, liaison à l'ADN sans induire de transcription, formation d'hétéro-dimères, de tétramères et intégration dans des complexes multimoléculaires de signalisation. Tous ces modes d'action sont communs aux différentes molécules STAT (figure 1.8, page 47 et [144]).

STAT3 est impliqué dans plusieurs maladies humaines. La figure 1.9, page 48 représente l'ensemble des variations génétiques répertoriées dans ces maladies. Des mutations germinales hétérozygotes de *STAT3* entrainant une perte de sa fonction sont responsables d'un déficit immunitaire primitif caractérisé par des infections récurrentes cutanées et pulmonaires à staphylocoque et streptocoque et une candidose cutanéo-muqueuse chronique. Les patients ont également des difficultés à contrôler les infections par les virus du groupe herpès. Biologiquement, les patients présentent un déficit en Th17 et une augmentation importante des IgE circulantes. A côté de ces manifestations immunologiques, les patients atteints du syndrome hyper-IgE autosomique dominant (AD-HIES ou encore syndrome de Job) peuvent également présenter des anomalies osseuses et dentaires, vasculaires et élastiques. Ces mutations sont majoritairement localisées dans le domaine de liaison à l'ADN, le domaine SH2 et le domaine transactivateur [145, 146].

Par ailleurs, des mutations somatiques de *STAT3* entrainant un gain de fonction (gain of function, gof) sont mises en évidence dans au moins 30 à 40% des leucémies à grands lymphocytes à grains. Elles sont principalement situées dans le domaine SH2 [147, 148].

Plus récemment, des mutations germinales de *STAT3* responsables d'un gain de fonction ont été associées à un syndrome auto-immun d'apparition précoce. Les cytopénies auto-immunes y sont au premier plan, présentes chez 74% des patients. Elles sont souvent accompagnées de lymphoprolifération (68%) et d'autres atteintes auto-immunes d'organe : entéropathie (47%), atteinte cutanée (42%), diabète de type 1 (32%), atteinte pulmonaire interstitielle (26%), atteinte thyroïdienne (16%), hépatite ou encore arthrite

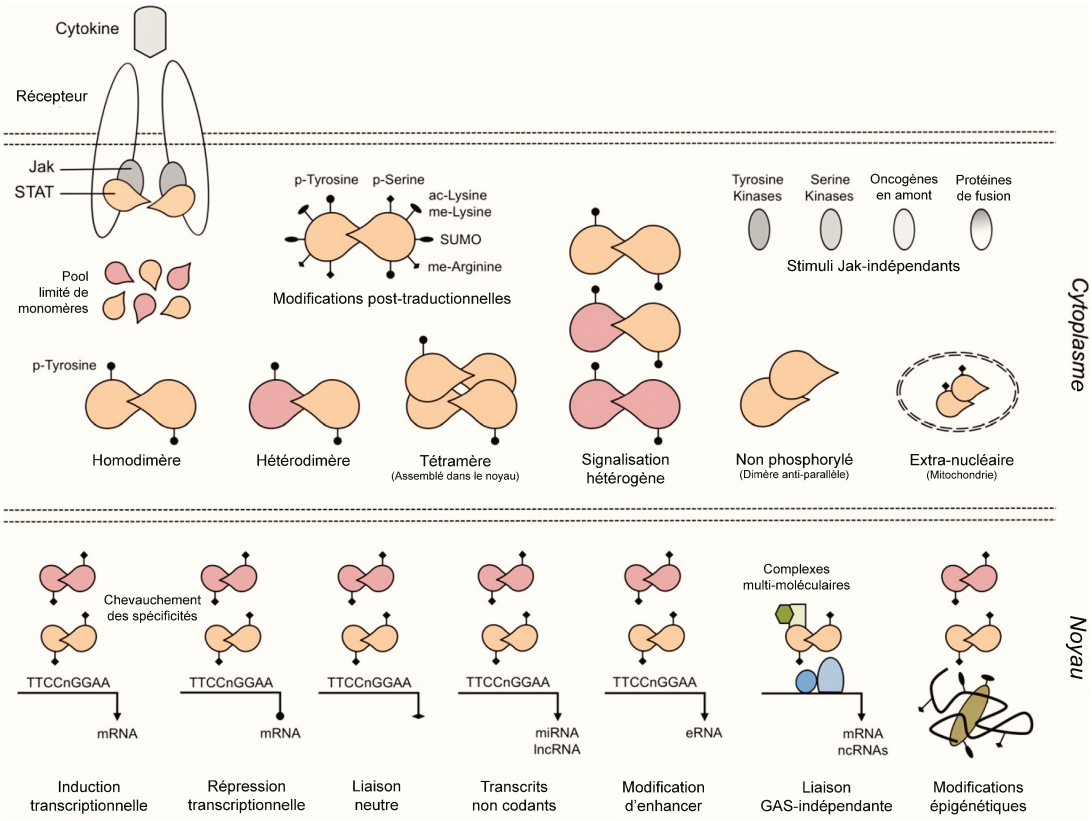


FIGURE 1.8 – **Mécanismes de signalisation Jak/STAT.** La voie de signalisation Jak/STAT canonique commence avec l'association des cytokines et de leurs récepteurs membranaires. Cela rapproche les Jak, entrainant leur auto-phosphorylation et celle des extrémités cytoplasmiques des récepteurs, créant ainsi les sites d'attache nécessaires pour les monomères STAT latents. L'action consécutive à la phosphorylation de STAT sur les tyrosines (p-Tyr STAT) est l'évènement majeur : dimérisation, translocation, liaison à l'ADN et induction des gènes cibles. Des déviations non-canoniques de ce modèle doivent être envisagées. Premièrement, la p-Tyr peut se produire de facont indépendante de la voie Jak et n'est pas forcément nécessaire pour certaines actions. Des modifications post-traductionnelles additionnelles peuvent aussi influencer les STAT. Ensuite, bien que chaque couple cytokine/récepteur soit généralement spécifique d'une molécule STAT, la plupart se lient avec plus d'un membre de la famille (signalisation hétérogène), conduisant à la formation d'homodimères mais aussi d'hétérodimères et de tétramères. Ces complexes migrent dans le noyau où ils se lient à l'ADN via des séquences consensus GAS et par l'intermédiaire de mécanismes indépendants de GAS, conduisant à l'induction, la répression ou la liaison sans effet aux cibles codantes ou non, et font souvent partie d'un complexe multi-moléculaire. En raison de l'affinité partagée aux motifs GAS, différentes STAT peuvent se lier aux mêmes sites cibles (chevauchement de spécificités). Elles peuvent aussi se lier et favoriser la modification des enhancers et réguler l'état épigénétique des gènes cibles. enfin, des fonctions extracellulaires sont de plus en plus mises en évidence, en particulier dans la mitochondrie. D'après Villarino *et al.* [144].

auto-immunes. Les patients sont souvent de petite taille (63%) et présentent des infections récurrentes et/ou graves (58%), en particulier respiratoires sans qu'une susceptibilité spécifique à un ou plusieurs germes n'ait été mise en évidence à ce jour. En dépit de la présence de mutations somatiques gain de fonction de *STAT3* dans les leucémies à LGL, un risque accru de maladies malignes chez ces patients n'est pas prouvé. Il est à noter qu'il s'agit de patients jeunes et par conséquent susceptibles de développer ces maladies dans l'avenir. Une hypogammaglobulinémie (50%) et une lymphopénie sont courantes chez ces patients. Certains présentent également une éosinophilie et des auto-anticorps en relation avec le ou les organes atteints. Si la plupart des mutations rapportées à ce jour

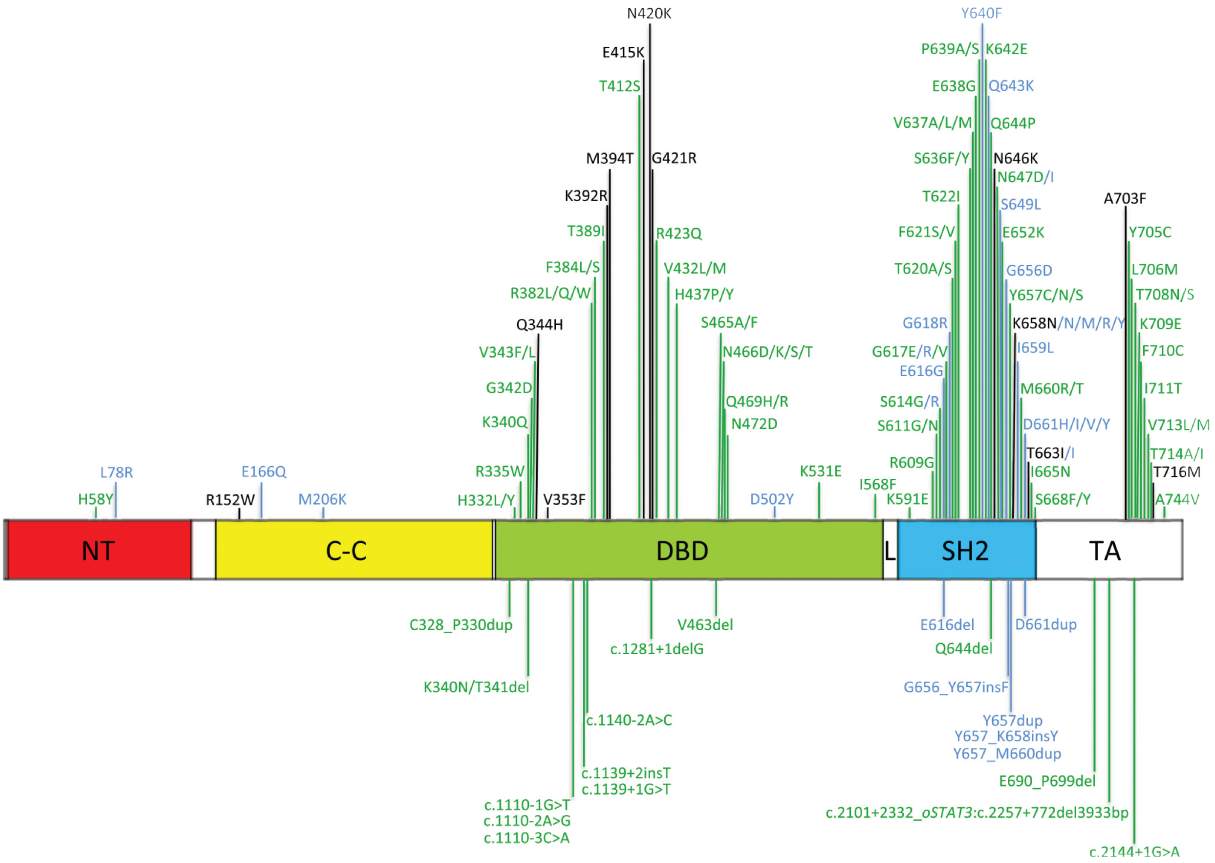


FIGURE 1.9 – **Schéma de la protéine STAT3 localisant les différentes variations décrites comme conduisant à une pathologie chez l'homme.** STAT3 est divisée en 6 domaines : le domaine N-terminal (NT), le domaine coil-coil (C-C), le domaine de laison à l'ADN (DBD), le domaine lien ou « linker » (LK), le domaine d'homology à SRC de type 2 (SH2) et le domaine de transactivation (TA). Les mutations représentées au dessus de la figure sont des mutations faux-sens, notées par le changement d'acide aminé tandis que les mutations représentées en dessous du schéma sont des délétions, des duplication ou des changements introniques notés selon la nomenclature nucléotidique. Les mutations perte de fonction trouvées dans le syndrome hyper-IgE sont en vert, les mutations gain de fonction (gof) germinales sont en noir et les mutations gof somatiques décrites dans les cancers dont les leucémies à LGL sont en bleu. Les mutations somatiques associées aux cancers sont concentrées dans le domaine SH2 tandis que les mutations germinales gof se répartissent dans toute la protéine. La plupart des mutations perte de fonction sont situées dans le domaine DBD (42%) et le domaine SH2 (40%), dans lequel on trouve également le plus grand nombre de variations unique au niveau d'un hot spot. Les variations perte de fonction dont la fréquence est la plus élevée, représentant les variations les plus fréquentes chez les patients sont les mutations R382Q/W et V637M. Les mutations introniques encadrant l'exon 12 dans le domaine DBD (en c.1110 et c.1139) entrainent une déletion de ce court exon, D371_G380. La mutation du domaine TA c.2101+2332_*oSTAT3* :c.2257+772del3933bp entraine la perte des exons 22 et 23 qui sont simplement remplacés par une lysine. D'après Vogel *et al.* [143].

sont *de novo* (74%) la pénétrance des mutations héritées est partielle, certains individus porteurs étant cliniquement sains. Les mutations gain de fonction sont concentrées dans les domaines de liaison à l'ADN, SH2 et transactivateur [149, 150, 151].

Les mutations gain de fonction de *STAT3* diminuent l'activation de STAT1 et STAT5 en réponse aux cytokines et sont associées à une diminution du nombre de T régulateurs en périphérie ainsi qu'à une diminution de l'expression de CD25. Le défaut de signalisation STAT5 observé pourrait contribuer au défaut des Treg en affectant la signalisation

indispensable à la survie des Treg [149, 151].

De façon intéressante, des mutations conduisant à des syndromes complexes avec susceptibilité infectieuse et auto-immunité ont été identifiées dans ces gènes partenaires : le gain de fonction de STAT1 entraine un syndrome IPEX-like et conduit à l'hyperphosphorylation de STAT1 en réponse aux cytokines comme l'IFNγ sans anomalie évidente du nombre ou de la fonction des T régulateurs [152, 153, 154] ; le déficit en STAT5b entraine un retard de croissance, un déficit immunitaire avec auto-immunité et une atteinte pulmonaire lymphoprolifération. Le nombre de cellules T régulatrices est diminué [155, 156, 157, 158]. Si l'auto-immunité est bien présente dans ces 2 déficits, les cytopénies auto-immunes ne sont pas au premier plan.

La compréhension actuelle du mécanismes de dérégulation de STAT3 dans les maladies humaines est partielle. Ainsi certaines mutations autosomiques dominantes par perte de fonction sont associées à une diminution de la phosphorylation de STAT3 [159], les mutations somatiques gain de fonction sont associées à une phosphorylation constitutive et une augmentation de l'activité transcriptionnelle [148], tandis que les mutations germinales gain de fonction ne montrent pas d'augmentation du niveau basal de phosphorylation mais une augmentation de l'activité transcriptionnelle[149, 151]. De façon surprenante, des changements d'acides aminés voisins peuvent conduire soit à un gain soit à une perte de fonction, ce qui suggère une régulation fine de cette protéine.

1.2 Définition biologique du syndrome d'Evans

Décrit pour la première fois en 1951 [160], le syndrome d'Evans (SE) se caractérise par une bicytopénie auto-immune, classiquement une anémie hémolytique auto-immune et une thrombopénie auto-immune. Les cytopénies peuvent être concomitantes ou séquentielles et peuvent inclure une neutropénie. Il s'agit d'une maladie chronique rare avec des périodes de rémission et une morbidité importante. Dans cette deuxième partie nous présenterons les différentes cytopénies, leur définition, leur mise en évidence et leurs étiologies respectives.

1.2.1 Anémie hémolytique auto-immune

Anémie

L'anémie se définit biologiquement comme la diminution de la masse d'hémoglobine circulante, évaluée en pratique par la mesure du taux d'hémoglobine (Hb). Les valeurs normales observées varient avec l'âge, le sexe et l'origine ethnique ; Chez l'adulte, on considère classiquement comme normales des valeurs comprises entre 140 et 180g/L chez l'homme et entre 120 et 160g/L chez la femme. Une étude récente sur un échantillon d'environ 33 000 adultes français sains permet de revoir ces chiffres à la baisse et de les stratifier selon l'âge avec, dans la population étudiée, des valeurs pour l'homme de 16 à 69 ans entre 134 et 167g/L et pour la femme aux mêmes âges entre 115 et 151g/L [161]. Les valeurs normales chez l'enfant, de la naissance à l'âge adulte ont été récemment étudiées par Zierk *et al.* sur une cohorte de 32 000 personnes avec une moyenne de 167 000 échantillons et sont représentées figure 1.10, page 50 [162].

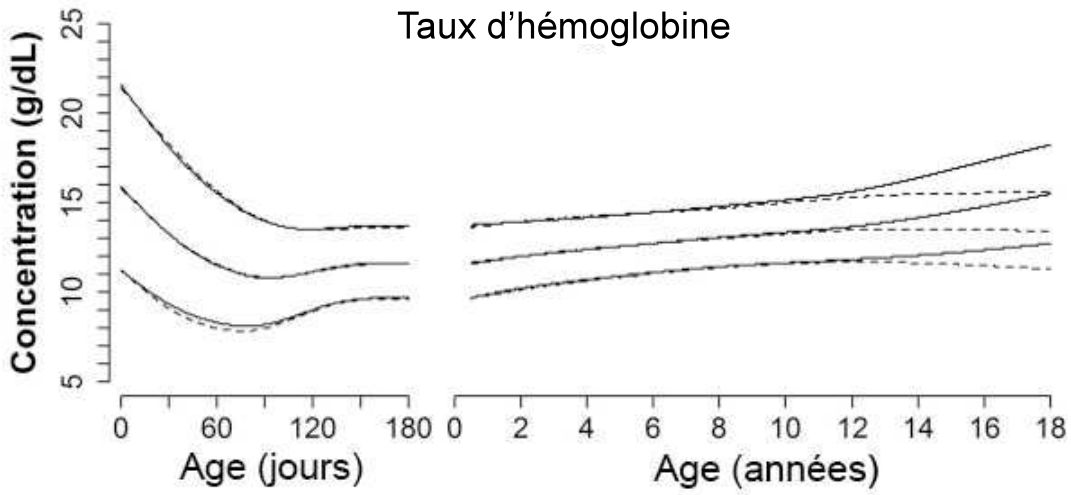


FIGURE 1.10 – **Taux d'hémoglobine stratifié selon l'âge et le sexe.** Les courbes hautes, médianes et basses représentent réciproquement les 97,5e, 50e et 2,5e percentiles. Les lignes continues représentent les valeurs chez l'homme, les pointillés les valeurs chez la femme. D'après Zierk *et al.* [162].

En cas de valeur anormale du taux d'hémoglobine, et après avoir éliminé les « fausses anémies » par hémodilution (par exemple, physiologique en fin de grossesse), les autres paramètres de l'hémogramme vont permettre d'orienter vers l'origine de l'anémie : on

distingue ainsi les anémies centrales des anémies périphériques. Dans ces dernières, la production des hématies n'est pas en cause. La moelle osseuse hématopoïétique essaye de compenser la perte des globules rouges. L'anémie est dite « régénérative » ce qui se traduit par une numération des réticulocytes circulants élevée ($>150.10^9$/L). Parmi les anémies périphériques, on distingue les hémorragies aiguës, les régénérations après une anémie centrale et les hémolyses.

Anémie hémolytique

L'hémolyse se définit par la destruction des hématies avant la fin de leur durée de vie habituelle (120 jours). Biologiquement, elle se traduit par une augmentation de la LDH et/ou de la bilirubine libre, reflétant le catabolisme de l'hémoglobine, et une haptoglobine basse, voire effondrée. L'hémolyse peut être d'origine corpusculaire, liée à la fragilité du globule rouge en raison d'une anomalie de sa membrane (sphérocytose, elliptocytose), d'une anomalie de son système enzymatique (déficit en G6PD ou en pyruvate kinase) ou encore d'une anomalie de l'hémoglobine (drépanocytose, thalassémies). Ces causes sont rares et en général il s'agit de maladies constitutionnelles. Lorsque la cause de l'hémolyse est extra-corpusculaire, le contexte clinique et des examens biologiques orientés vont permettre de distinguer :

- une origine infectieuse, nécessitant une prise en charge urgente, comme le paludisme et les septicémies ;
- une origine mécanique, comme les micro-angiopathies thrombotiques, mise en évidence par la présence de schizocytes sur le frottis sanguin ;
- une origine toxique : venins de serpent, champignons vénéneux, intoxication au plomb...
- un origine médicamenteuse, liée à la formation de complexes antigène-anticorps suite à la sensibilisation par un médicament, aussi appelées immuno-allergiques ;
- enfin, les hémolyses immunes, mises en évidence par un test de Coombs direct positif, et comprenant les hémolyses allo-immunes (post-transfusionnelles et maladie hémolytique du nouveau-né) et les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) où le test d'agglutination direct (TAD) met en évidence des anticorps dirigés contre des antigènes de la membrane érythrocytaire.

Anémies hémolytiques auto-immunes

Biologiquement, les AHAI sont donc classiquement des anémies macrocytaires, normochromes, régénératives. Ce dernier critère peut manquer si l'on est au tout début de l'anémie ou si les anticorps sont dirigés contre des antigènes également présents sur les précurseurs érythrocytaires plus ou moins précoces ou encore si une autre cause d'anémie, le plus souvent par carence, s'associe à l'AHAI. L'activation médullaire nécessaire à la régénération de la lignée rouge peut entrainer l'augmentation des autres lignées sanguines, leucocytes et plaquettes. Le frottis sanguin permet d'étudier la morphologie des globules rouges et montre une anisocytose associée à une polychromatophilie en raison de la présence des réticulocytes. Peut s'y ajouter la présence de sphérocytes du fait de la déformation *in vitro* des hématies sensibilisées par les auto-anticorps. Les marqueurs d'hémolyse (bilirubine libre, LDH, haptoglobine) ont une sensibilité élevée, de 80 à 95%. La mise en évidence des auto-anticorps, le plus souvent par positivité du test de Coombs direct est indispensable pour poser le diagnostic. Ce test d'agglutination semi-quantitatif

a une sensibilité proche de 100% et une spécificité d'environ 95%. Il permet de détecter la présence d'IgG et de molécules C_3d du complément fixés à la surface des hématies du patient. Il est pris en défaut en cas d'IgM ou A ou d'auto-anticorps de faible affinité ou en faible concentration. Dans ce cas il est possible d'utiliser d'autres tests (ELISA, recherche d'anticorps sériques par un test de Coombs indirect ou plus rarement élution) [163].

La classification des AHAI dépend essentiellement des caractéristiques des auto-anticorps : isotype, température optimale d'activité hémolytique, cibles antigéniques, siège de l'hémolyse permettent de définir des AHAI à anticorps « chauds », à anticorps « froids » ou « mixtes ». Les anticorps froids ont une action optimale à 4°C et sont actifs en dessous de 30°C. On parle aussi d'agglutinines froides. Ils sont presque exclusivement de type IgM et activent la lyse des globules rouges par l'intermédiaire du complément. On distingue les formes post-infectieuses, aiguës et transitoires, de la maladie des agglutinines froides, chronique, représentant 10 à 20% des AHAI de l'adulte. Très rare, l'hémoglobinurie paroxystique *a frigore* est également une AHAI à anticorps froids. Les anticorps chauds sont eux actifs de façon optimale entre 35 et 40°C, le plus souvent de type IgG et dirigés contre des antigènes du système Rhésus. L'hémolyse est intra-tissulaire, le plus souvent splénique. Les AHAI à anticorps chauds représentent 60 à 80% de l'ensemble des AHAI [163].

La destruction des érythrocytes dans les AHAI associe 2 mécanismes : d'une part une cytotoxicité dépendante des anticorps (ou ADCC pour antibody dependant cell cytotoxicity), et d'autre part une phagocytose des globules rouges par les cellules du système réticulo-endothélial. Celle-ci est parfois incomplète, la portion restante devenant alors un sphérocyte rigide qui est secondairement détruit dans la rate. Dans les deux cas, cela implique les cellules macrophagiques qui se lient au globule rouge sensibilisé (c'est-à-dire recouvert d'anticorps et de molécules du complément) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Les facteurs modulant l'hémolyse sont dépendants de l'antigène cible (sa densité, son expression et l'âge du patient), des anticorps (isotype, spécificité, quantité, amplitude thermique, capacité à se lier aux macrophages tissulaires) et de la fixation du complément à la surface des globules rouges. Ainsi les IgG activent peu la voie classique du complément mais sont très bien reconnus par les récepteurs du fragment Fc des différentes cellules phagocytaires. Ils seront donc majoritairement responsables d'une hémolyse extra-vasculaire, notamment dans la rate. A l'inverse, les IgM peuvent induire une hémolyse intra-vasculaire par activation rapide du complément mais cela atteint rarement un niveau cliniquement détectable en raison des molécules régulatrices exprimées à la surface des globules rouges. Dans les AHAI avec IgM l'hémolyse est finalement souvent extra-vasculaire, notamment au niveau du foie en raison des molécules C3 associées aux IgM à la surface des globules rouges et des récepteurs du complément abondamment présents sur les cellules de Küppfer [164, 165].

L'incidence des AHAI est de 1 à 3 nouveaux cas pour 100 000 par an, avec une légère prédominance féminine [165]. Chez l'adulte, environ la moitié des AHAI à anticorps chauds sont secondaires et il est indispensable de rechercher une hémopathie ou une autre tumeur, une infection, une maladie auto-immune ou inflammatoire sous-jacente ou un effet secondaire d'un médicament avant de conclure à une AHAI idiopathique [163].

1.2.2 Thrombopénie immunologique

Thrombopénie

Comme pour l'anémie, la thrombopénie est définie biologiquement par une diminution du nombre de plaquettes sanguines par rapport à la normale. Ces valeurs varient en fonction de l'âge et du sexe mais de façon moins importante que le taux d'hémoglobine (voir figure 1.11, page 53). Suite à l'étude d'une cohorte prospective de patients présentant une numération plaquettaire comprise entre 100 et 150.10^9/L [166], le groupe de travail international réuni en 2007 recommande le seuil diagnostique de 100.10^9/L [167]. Afin de s'assurer du diagnostic il faut en premier lieu réaliser un frottis sanguin confirmant la rareté des plaquettes et l'absence d'agrégats plaquettaires, artéfact lié à l'EDTA *in vitro* et pouvant fausser la numération. Dans ce dernier cas, le taux de plaquettes doit être contrôlé sur un prélèvement réalisé sur tube citraté.

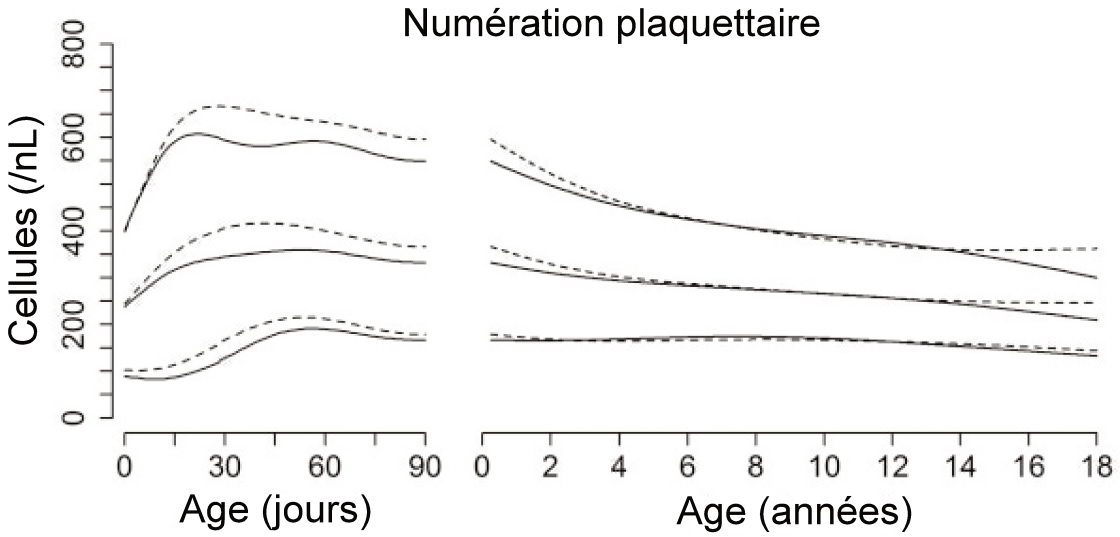


FIGURE 1.11 – **Numérations plaquettaires stratifiées selon l'âge et le sexe.** Les courbes hautes, médianes et basses représentent réciproquement les 97,5e, 50e et 2,5e percentiles. Les lignes continues représentent les valeurs chez l'homme, les pointillés les valeurs chez la femme. D'après Zierk *et al.* [162].

Après avoir évalué le risque hémorragique (syndrome hémorragique clinique, profondeur de la thrombopénie), il est nécessaire de rechercher le mécanisme de la thrombopénie. L'examen clinique, l'hémogramme, le frottis sanguin et le myélogramme vont permettre d'orienter vers une étiologie et faire la distinction entre origine centrale ou périphérique. Dans le premier cas, on observe sur le myélogramme un appauvrissement en mégacaryocytes isolé ou associé à des anomalies des autres lignées ou encore la présence de cellules anormales. Les principales causes sont l'aplasie médullaire (idiopathique, toxique, médicamenteuse), les carences (vitamine B12, folates), un envahissement tumoral de la moelle, un syndrome myélodysplasique, un syndrome d'activation macrophagique ou encore une thrombopathie acquise ou constitutionnelle.

Parmi les thrombopénies périphériques, dans lesquelles le myélogramme montre une richesse normale en mégacaryocytes, on distingue 4 types d'étiologies : la séquestration splénique ou thrombopénie par anomalie de distribution plaquettaire, une perte ou une

dilution des plaquettes lors des hémorragies et des transfusions de concentrés érythrocytaires seuls, une consommation excessive des plaquettes par activation de la coagulation (coagulation intra-vasculaire disséminée ou micro-angiopathie thrombotique) ou leur destruction excessive par un mécanisme immunologique.

Caractéristiques des thrombopénies immunologiques

Comme les anémies hémolytiques auto-immunes, les thrombopénies immunologiques (TI) sont donc périphériques, par destruction des plaquettes sensibilisées. La mise en évidence d'anticorps anti-plaquettaires confirme le diagnostic mais elle est plus difficile et souvent le diagnostic est posé par élimination des autres causes de thrombopénie. Le test de Dixon est l'équivalent plaquettaire du test direct à l'anti-globuline et peut détecter les anticorps fixées à la surface plaquettaire. Il est sensible mais peu spécifique, le test pouvant activer les plaquettes et faire apparaitre en surface des Ig préalablement pinocytées par les mégacaryocytes normaux et stockées dans les granules α. Le test indirect existe aussi mais est rarement positif. Le MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet-antigen assay ou test d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-plaquettes) présente une meilleure spécificité et permet d'identifier dans le même temps la cible moléculaire de l'anticorps.

La classification adoptée par le groupe de travail international en 2007 distingue les thrombocytopénies immunologiques primaires et secondaires. Ces dernières incluent les causes infectieuses et médicamenteuses, les thrombocytopénies dans le cadre d'une maladie auto-immune, d'un cancer ou d'un déficit immunitaire primitif, les thrombopénies allo-immunes (post-transfusionnelle ou materno-fœtale) et toute autre TI non primaire [167]. Ces causes secondaires doivent être exclues avant de conclure à une thrombocytopénie immunologique primaire.

Le groupe de travail international propose aussi de classer les thrombopénies immunologiques selon 3 phases d'évolution d'intérêt pronostique et pour la prise en charge thérapeutique : récemment diagnostiquées (moins de 3 mois), persistantes (entre 3 et 12 mois) ou chroniques (au delà de 12 mois).

La spécificité du répertoire des auto-anticorps est hétérogène et classiquement on identifie des auto-anticorps dirigés contre des cibles antigéniques plaquettaires multiples, strictement plaquettaires ou non. Ainsi dans les thrombopénies secondaires liées aux médicaments, les anticorps peuvent également être dirigés contre un complexe plaquette-médicament ou contre un antigène de surface de la plaquette modifié par l'action du médicament [168]. La perte de tolérance des cellules B pourrait parfois être liée à la production importante de CD40L (ou CD154, molécule indispensable à l'activation des lymphocytes B et donc à la production d'anticorps) par les plaquettes elles-mêmes. Les immunoglobulines anti-plaquettaires présentent des associations chaine lourde-chaine légère restreintes, suggérant la perte de tolérance initiale d'une cellule B unique puis la diversification des spécificités antigéniques par hypermutations somatiques. Une fois liés aux plaquettes, les anticorps favorisent leur phagocytose via les récepteurs aux fragments Fc, principalement dans la rate. Comme pour les globules rouges, les anticorps peuvent également fixer le complément, ce qui induit un renforcement de l'opsonisation des plaquettes ou leur lyse par l'activation de la voie classique. A côté de ces mécanismes

humoraux, des mécanismes cellulaires impliquant les cellules T $CD8^+$ et les cellules NK sont également en cause dans la thrombopénie immunologique [169].

L'incidence de la thrombopénie immunologique est difficile à estimer, en raison des différentes définitions et méthodologies. Chez l'adulte, elle serait de 3,3 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes ; chez l'enfant, de 2,2 à 5,3 cas pour 100 000 personnes par an dont 0,5 chroniques [170]. Le sex-ratio varie selon les études et la population considérée.

1.2.3 Neutropénie auto-immune

De la même façon que pour les autres cytopénies auto-immunes, on définit les neutropénies auto-immunes par la diminution des polynucléaires neutrophiles circulants en deçà de $1{,}5.10^9$/L (pour les personnes de plus de 1 an) associé à la présence d'auto-anticorps spécifiques. Les neutropénies auto-immunes peuvent être centrales ou périphériques, en fonction de la cible antigénique et des mécanismes impliqués. Plus l'antigène reconnu est exprimé sur un progéniteur précoce, plus la neutropénie sera profonde. En revanche, il n'y a pas de corrélation directe entre le taux d'auto-anticorps et la profondeur de la neutropénie. Les anticorps anti-neutrophiles sont dirigés contre des glycoprotéines de surface. 7 cibles antigéniques sont décrites, classées en 5 catégories, d'après la nomenclature établie en 1998 (voir tableau 1.4, page 55). HNA-1 (pour human neutrophil alloantigen) et HNA-2 sont les principales molécules immunogènes à la surface des neutrophiles. HNA-1 (ou CD16b) est situé sur le récepteur IIIb au fragment Fcγ, présentant une faible affinité aux IgG1 et IgG3 et se liant aux IgG polymériques.

Catégorie	Antigène	Glycoprotéine	CD	Ancien nom
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	CD16	NA1
	HNA-1b	FcγRIIIb	CD16	NA2
	HNA-1c	FcγRIIIb	CD16	SH
HNA-2	HNA-2a	NB1 glycoprotéine (gp50-64)	CD177	NB1
HNA-3	HNA-3a	inconnue (gp70-95)		5b
HNA-4	HNA-4a	MAC-1, CR3, intégrine $\alpha_M\beta_2$	CD11b	MART
HNA-5	HNA-5a	LFA-1, intégrine $\alpha_L\beta_2$	CD11a	OND

Tableau 1.4 – **Classification des anticorps anti-neutrophiles.** D'après Bux *et al.* [171]

La détection des anticorps anti-neutrophiles peut se faire par immuno-fluorescence indirecte avec détection par cytométrie en flux, par test d'agglutination indirect, moins sensible sauf pour les anticorps anti-HNA-3a, ou par test d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-granulocytes (MAIGA), ce dernier test permettant la confirmation de la spécificité antigénique [172].

Comme pour les autres cytopénies, les neutropénies immunologiques peuvent être classées en aiguës (moins de 3 mois) ou chroniques, primaires ou secondaires, constitutionnelles ou acquises. Les étiologies des neutropénies secondaires sont proches de celles

des autres lignées : hémopathies malignes, cancers solides, maladies auto-immunes, déficits immunitaires primitifs, infections, médicaments peuvent être en cause. La profondeur de la neutropénie permet de définir la sévérité, en raison du risque d'infections associé : sévère en dessous de $0{,}5.10^9$ neutrophiles par litre, modérée entre 0,5 et 1,0 et légère entre 1,0 et 1,5. Lorsqu'il y a moins de $0{,}1.10^9$/L neutrophiles, on parle d'agranulocytose. Si l'on exclut les neutropénies bénignes fréquemment rencontrées dans les populations d'origine africaine, la prévalence des neutropénies modérées à sévères, immunologiques ou non, est inférieure à 1% [173].

1.2.4 Syndrome d'Evans

Nous avons vu que les causes de cytopénies sont nombreuses. Lors de l'évocation initiale par R. Evans *et al.* de mécanismes immunologiques communs aux thrombopénies dites idiopathiques à l'époque et aux anémies hémolytiques, tous les tests biologiques n'étaient pas encore disponibles [160]. Aujourd'hui, le syndrome d'Evans est donc défini biologiquement par la présence d'au moins deux cytopénies, de façon concomitante ou séquentielle. Les principaux examens biologiques permettant l'affirmation de la cytopénie, et si possible de son caractère immunologique, ainsi que l'exclusion des autres causes sont résumés dans le tableau 1.5, page 56.

	AHAI	TI	NAI
Définition de la cytopénie	Anémie : Hb<110g/L et réticulocytes >150.10^9/L et bilirubine libre ↑ et/ou LDH ↑ et/ou haptoglobine ↓	Thrombopénie : Plaquettes <100.10^9/L à 2 reprises	Neutropénie : PNN <$1{,}5.10^9$/L à 2 reprises
Recherche d'auto-immunité	TAD (Coombs) + TAI	TAD (Dixon) MAIPA	IF, TAI MAIGA
Autres examens pour diagnostic différentiel	Frottis sanguin, hémogramme complet, Myélogramme	Frottis sanguin, hémogramme complet, Myélogramme	Frottis sanguin, hémogramme complet, Myélogramme

Tableau 1.5 – **Diagnostic biologique du syndrome d'Evans : critères principaux.** AHAI anémie hémolytique auto-immune, TI thrombopénie immunologique, NAI neutropénie auto-immune, Hb hémoglobine, LDH lactate déshydrogénase, TAD test d'agglutination direct, TAI test d'agglutination indirect, IF immuno-fluorescence, PNN polynucléaires neutrophiles.

1.2.5 Syndrome d'Evans secondaire : étiologies des bicytopénies auto-immunes

Si le bilan clinico-biologique à la découverte d'une bicytopénie doit éliminer les causes non immunologiques et rechercher des auto-anticorps avant de conclure au diagnostic de syndrome d'Evans, il s'efforce également de rechercher une cause sous-jacente.

Infections

De nombreuses infections virales peuvent entrainer des cytopénies immunologiques. On cite classiquement certains virus du groupe *Herpes viridiæ* comme l'EBV et le CMV. Lors de l'infection à VIH, les cytopénies font partie des formes symptomatiques dites mineures, sans entrainer de manifestations cliniques et régressent lors de la mise sous traitement antirétroviral. D'autres infections comme la rubéole, l'hépatite C chronique ou l'infection à parvovirus B19 peuvent également s'accompagner de cytopénies auto-immunes.

Cancers

Dans les hémopathies malignes, des cytopénies auto-immunes peuvent s'ajouter aux autres symptômes, en particulier dans les hémopathies lymphoïdes chroniques de l'adulte : lymphomes malins non hodgkiniens et maladie de Hodgkin, leucémie à grands lymphocytes à grains, leucémie lymphoïde chronique. Cela est observé aussi dans certains cancers solides, notamment de l'ovaire, du colon ou du pancréas.

Maladies poly-auto-immunes

De façon assez évidente, certaines maladies auto-immunes s'accompagnent de cytopénies. Il peut s'agir de maladies systémiques comme le syndrome de Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde ou le syndrome des anti-phospholipides, et de maladies auto-immunes d'organe comme la maladie de Basedow, la rectocolite hémorragique ou la cirrhose biliaire primitive. Les cytopénies auto-immunes font également partie intégrante des critères diagnostiques de l'American College of Rheumatology pour le lupus érythémateux systémique.

Déficits immunitaires primitifs

Nous avons décrit dans la première partie de cette introduction la plupart des déficits immunitaires primitifs où l'auto-immunité est au premier plan : APS1, IPEX, ALPS, CHAI, CVID8, STAT3 GOF, notamment. Dans nombre d'autres déficits immunitaires primitifs, des cytopénies auto-immunes peuvent se manifester et font partie intégrante de la maladie bien que n'étant pas forcément au premier plan.

Ainsi, le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est lié à des mutations hémizygotes du gène *WAS* situé sur le chromosome X. Il se caractérise par une microthrombopénie, un eczéma et des infections récurrentes. C'est donc aussi une cause constitutionnelle de thrombopénie. Dans cette maladie, les anomalies morphologiques des plaquettes et le déficit immunitaire favorisent une auto-immunité anti-plaquettaire. Jusqu'à 70% des patients présentent également d'autres manifestations auto-immunes (dont anémie et neutropénie) [174]. En plus des défauts des lymphocytes B et T conventionnels, les Treg $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ présentent également un défaut fonctionnel. La protéine WAS est en effet requise pour la formation de la synapse entre T régulateurs et T effecteurs [175].

De même, dans les déficits immunitaires combinés (abbrégé CID en anglais), la différenciation des lymphocytes T est altérée et une présentation initiale auto-immune est possible. C'est le cas dans certains défauts de la recombinaison VDJ comme les déficit

en RAG1, RAG2 et Artemis, en particulier lors de mutations hypomorphes. Certains défauts de molécules de la voie classique du complément (C1q, C1r, C1s, C4 ou C2) peuvent induire un lupus. Des défauts d'apoptose des neutrophiles comme dans la granulomatose septique chronique peuvent également s'accompagner de cytopénies auto-immunes. Tokgoz *et al.* ont rapporté une famille avec un déficit en CD3γ et une poly-autoimmunité incluant un syndrome d'Evans [176].

Déficit en TPP2 Récemment, Stepensky *et al.* ont décrit 1 frère et 1 sœur présentant un syndrome d'Evans précoce, une susceptibilité aux infections virales et une leucopénie progressive associés à une mutation homozygote de la trypeptidyl-peptidase II (TPP2), décalant le cadre de lecture et entrainant une absence de protéine. Cette exopeptidase est impliquée dans la dégradation peptidique en aval du protéasome. Les cellules des patients et des souris déficientes présentent un phénotype de sénescence non restreint au système immunitaire, un défaut de prolifération et une sensibilité accrue à l'AICD des lymphocytes, une proportion accrue de lymphocytes T CD8$^+$ effecteurs mémoires et TEMRA ainsi qu'une augmentation de l'expression du CMH-I [177].

La mise en évidence d'une étiologie sous-jacente au syndrome d'Evans ne concerne qu'une faible proportion des patients. Pour ces patients, le syndrome d'Evans est considéré comme secondaire. Les patients présentant des symptômes associés au syndrome d'Evans sans pour autant atteindre un diagnostic syndromique formellement identifié sont suspects d'une étiologie secondaire, qui reste à préciser. Enfin, certains patients présentent un syndrome d'Evans isolé ou primaire.

1.3 Syndrome d'Evans : revue des séries publiées

Lorsque l'on s'intéresse à la fréquence du syndrome d'Evans dans la population, le peu de séries rapportées dans la littérature, chez l'enfant comme chez l'adulte, s'accordent sur la rareté. En revanche, les études étant pour la plupart rétrospectives, une estimation chiffrée est difficile. Terrell *et al.* ont revu l'ensemble des données concernant les thrombopénies immunologiques de l'enfant et estimé leur incidence de 2 à 5 cas pour 100 000 personnes par an [170]. En reprenant les séries des années 50 et 60, la fréquence des Evans dans la population ayant initialement présenté une cytopénie (AHAI ou TI) est estimée entre 0,8 et 3,9% [178, 179]. De même, Michel *et al.* estiment que 5% des patients présentant une thrombopénie immunologique ont ensuite évolué vers un syndrome d'Evans [180].

La littérature concernant le syndrome d'Evans est essentiellement constituée de cas cliniques rapportés en lien avec d'autres pathologies ou symptômes. Nous détaillerons les caractéristiques des patients présentant un syndrome d'Evans en nous appuyant sur les quelques séries publiées. Le travail présenté ici ayant porté sur des populations pédiatriques, nous nous efforcerons de mettre en valeur les spécificités de l'enfant dans le cadre de cette affection.

1.3.1 Présentation des principales séries publiées

Depuis la série initiale de Robert Evans *et al.* en 1951 jusqu'aux études très récentes de Aladjidi *et al.* et Al Ghaithi *et al.* en 2015 et 2016, une douzaine de séries colligent des patients avec un syndrome d'Evans. Les caractéristiques principales de ces études et des patients rapportés sont résumées dans le tableau 1.6, page 61. Compte-tenu de l'évolution des connaissances scientifiques et des pratiques médicales, ces séries sont hétérogènes. Elles le sont également par les choix et points de vue de leurs auteurs. En raison du caractère hétérogène des données, certains aspects du syndrome d'Evans ne seront pas évoqués, notamment, les signes cliniques associées aux cytopénies, l'évaluation de leur gravité et de l'urgence de la prise en charge ; les complications du syndrome et des traitements. D'autres le seront sur une partie seulement de ces 12 études.

Outre les études ciblant spécifiquement le syndrome d'Evans chez l'enfant ou chez l'adulte, nous avons également inclus l'article de Michel *et al.* en 2004 concernant les patients présentant une thrombopénie immunologique et un déficit immunitaire commun variable (DICV). En effet, sur 21 patients inclus, 7 présentaient également une AHAI et 5 une NAI, soit 10 patients présentant un syndrome d'Evans [181]. Quand cela était possible, les données rapportées dans les tableaux suivants ne prennent en compte que ces 10 patients. (Dans le cas contraire, cela est précisé en légende.) Trois patients présentant un test de Coombs direct positif sans anémie n'ont pas été inclus dans les tableaux. L'article de Teachey *et al.* rapportant des patients, enfants au moment du diagnostic de SE, dont certains étaient adultes au moment de l'étude est incluse dans ces tableaux [182]. L'article de Pegels *et al.* concerne 53 patients présentant un syndrome d'Evans qui sont étudiés biologiquement à la recherche d'auto-anticorps anti-plaquettaires et anti-granulocytes [183].

En l'absence de description de la clinique initiale, de l'évolution et du traitement des patients, nous n'avons pas inclus cette étude.

1.3.2 Données épidémiologiques

Au total, ces 12 études rassemblent 369 patients, 102 adultes et 267 enfants. Cette population comprend 186 hommes pour 157 femmes (voir tableau 1.6, page 61). La distinction entre syndrome d'Evans primaire ou cytopénies auto-immunes secondaires n'est pas faite dans toutes les études. Certaines études excluent d'emblée les patients présentant une étiologie des cytopénies au diagnostic des anomalies hématologiques [184, 185, 182]. D'autres incluent dans l'étude tous les patients présentant une bicytopénie auto-immune et distinguent les étiologies connues lors de l'apparition des cytopénies de celles révélées par l'enquête étiologique consécutive au diagnostic hématologique [186]. Aladjidi *et al.* établissent 3 catégories entre SE secondaires associés à un déficit immunitaire primitif génétiquement caractérisé ou à un lupus, SE primaires sans aucune autre manifestation immunologique associée, les patients restants constituant un groupe dit « unclassified », comprenant une grande proportion des patients (93 patients sur 156, intégrés au groupe « syndrome d'Evans primaire » dans le tableau ci-dessous) [187]. Enfin, d'autres études évoquent des pathologies sous-jacentes pouvant être à l'origine du syndrome d'Evans sans pour autant classer clairement en cytopénies secondaires [160].

Particularités de l'enfant

Chez les enfants, on note une nette prédominance masculine, avec un sex ratio proche de 3 : 2 (146 garçons pour 95 filles). Au contraire, chez les adultes, le sex ratio est proche de 2 : 3 (40 hommes pour 62 femmes).

Compte-tenu des disparités d'inclusion et de catégorisation des cytopénies secondaires et des syndrome d'Evans primaires dans les différentes études, il n'est pas possible d'en déduire si l'une ou l'autre de ces catégories est plus fréquente chez l'enfant.

Lorsque l'on s'intéresse aux maladies auto-immunes pédiatriques, la question de l'origine génétique se pose fréquemment. De fait, l'étude de formes pédiatriques de pathologies auto-immunes, comme par exemple le lupus, a mis en évidence que plus le début de la maladie est précoce et plus élevée est la chance que l'origine soit monogénique. Aussi, certaines études ont évalué de façon plus ou moins systématique l'existence d'une consanguinité. On dénombre ainsi 16 enfants dont les parents étaient apparentés au 2^{e} degré (cousins germains) sur 215 évalués [185, 187, 186].

1er auteur	Année	Type	Nombre de centres	Population	Sexe	Patients (I)	Patients (I+II)	Suivi médian (années)
Evans [160]	1951	rétrospective	1	Adultes*	6M/8F	14*	14*	ND
Pui [178]	1980	rétrospective	1	Enfants	4M/3F	7	11	4,8
Wang [188]	1988	prospective	1	Enfants	ND	ND	10	7
Ng [189]	1992	rétrospective	1	Adultes	2M/10F	ND	12	4,5
Mathew [190]	1997	rétrospective	21	Enfants	22M/20F	ND	42	3
Savaşan [184]	1997	rétrospective	1	Enfants	10M/1F	11	11	8
Michel [181]	2004	rétrospective	5	Adultes	6M/4F	NA	10	18
Blouin [185]	2005	rétrospective	32	Enfants	20M/16F	36	36	4
Teachey [182]	2005	rétrospective	1	Enfants†	ND	12†	12	ND
Michel [180]	2009	rétrospective	8	Adultes	27M/41F	34	68	4,8
Aladjidi [187]	2015	prospective	26	Enfants	92M/64F	140	156	6,8
Al Ghaithi [186]	2016	rétrospective	3	Enfants	17M/6F	4**	23	5

Tableau 1.6 – **Syndrome d'Evans : principales caractéristiques des séries publiées.** I syndrome d'Evans primaire ; I+II syndrome d'Evans primaire et secondaire, nombre total de patients ; ND non documenté. *Dans la série initiale de R. Evans, 14 cas présentent une cytopénie cliniquement parlante associée au minimum à une deuxième cytopénie biologiquement prouvée – thrombopénie ou test d'agglutination direct des hématies positif. Parmi ces 14 cas, l'un est concommitant avec une tuberculose splénique, dont le rôle étiologique est évoqué, 2 patients ont présenté des cytopénies dès l'enfance (âge de début 3 et 7 ans). †Teachey *et al.* incluent des patients enfants au moment du diagnostic, pour certains devenus adultes au moment de l'inclusion. Ils excluent les cytopénies secondaires à l'inclusion puis mettent en évidence 6 patients avec des symptômes d'ALPS. **Al Ghaithi *et al.* distinguent entre les patients avec une étiologie sous-jacente lors de la consultation hématologique et après les explorations des cytopénies immunologiques. Le chiffre indiqué dans ce tableau correspond aux étiologies sous-jacentes déjà connues lors de l'apparition des cytopénies.

1.3.3 Présentation initiale

La séquence d'apparition des cytopénies est rapportée dans 8 études (6 pédiatriques et 2 adultes, voir tableau 1.7, page 63). Sur 355 patients évalués, l'AHAI est initiale pour 78 d'entre eux (soit 22%), la TI pour 114 (soit 32%). La situation la plus fréquente est l'apparition concomitante des 2 cytopénies (159 patients concernés soit 45%). Concernant les neutropénies, les associations et la séquence temporelle sont en général moins détaillées. Néanmoins, chez 1% des patients, l'épisode initial associait une neutropénie et au moins une autre cytopénie. Au cours du suivi, 25% des patients étudiés ont présenté une neutropénie (soit 89 patients).

La question des autres symptômes et maladies précédant, accompagnant ou suivant l'apparition des cytopénies sera discuté dans la section 1.3.6, page 69.

Particularités de l'enfant

Lorsque l'on regarde le premier épisode de cytopénies (AHAI, TI ou AHAI et TI) la répartition des enfants diffère peu de celles des adultes : 23, 34 et 42% chez l'enfant vs 19, 26 et 55% chez l'adulte pour l'AHAI en premier, la TI en premier ou la bicytopénie d'emblée, respectivement.

Etude	Nombre de patients	1res cytopénies : AHAI	TI	AHAI + TI	NAI + TI	TI + NAI + AHAI	Autres cytopénies
Pui [178]	7	2 (29%)	1 (14%)	4 (57%)			NAI (4*)
Ng [189]	12	4 (33%)	1 (8%)	7 (58%)			NAI (0)
Mathew [190]	42	10 (24%)	14 (33%)	12 (29%)		6 (14%)	NAI (4*)
Savaşan [184]	11	0	4 (36%)	2 (18%)	5 (45%)†		NAI (1)
Blouin [185]	36	10 (28%)	14 (39%)	12 (33%)			NAI (10**)
Michel [180]	68	11 (16%)	20 (29%)	37 (54%)			NAI (10*)
Aladjidi [187]	156	39 (25%)	46 (29%)	71 (46%)			NAI (30+2*)
Al Ghaithi [186]	23	2 (9%)	9 (39%)	3 (13%)	4 (17%)	5 (22%)	NAI (8), AHAI (5), TI (2)

Tableau 1.7 – **Séries rapportées de syndrome d'Evans : description clinique.** AHAI anémie hémolytique auto-immune, TI thrombopénie immunologique, NAI neutropénie auto-immune, AI autre : autre atteinte auto-immune, DICV déficit immunitaire commun variable, LP lymphoprolifération, hypoγglob. hypogammaglobulinémie, ND non détaillé. †Dans l'étude de Savaşan, tous les patients présentaient une TI au diagnostic. Les auteurs ne précisent pas si parmi les 5 patients ayant présenté une neutropénie au diagnostic certains présentaient aussi une anémie. *Dans les études d'Aladjidi *et al.* , Michel *et al.* , Pui *et al.* et Mathew *et al.* , respectivement 2, 10, 4 et 4 patients présentaient également une NAI au diagnostic. **Dans l'étude de Blouin *et al.* , il n'est pas précisé si la neutropénie était présente au diagnostic ou pendant l'évolution.

1.3.4 Traitements

Il n'y a pas de recommandations internationales récentes sur la prise en charge thérapeutique du syndrome d'Evans. La conférence de consensus concernant la prise en charge des PTI aigus de l'enfant par la HAS en 2007 recommande un traitement uniquement en cas de signes hémorragiques et/ou d'un taux de plaquettes inférieur à 10.10^9/L ou pour couvrir un geste chirurgical. Les traitements recommandés sont les corticoïdes, les immunoglobulines par voie intraveineuse (IgIV). L'association de ces 2 thérapeutiques et des transfusions de plaquettes sont à mettre en place en cas de signes hémorragiques sévères ou prolongés. Plus récemment, Lo *et al.* proposent également ces 2 thérapeutiques en première ligne dans les thrombopénies immunologiques avec symptômes hémorragiques modérés à sévères [169]. Concernant l'AHAI, la société française d'hématologie a édité un référentiel en 2009. En plus du traitement symptomatique en cas de mauvaise tolérance, elle recommande les corticoïdes en première intention. Le danazol peut permettre une épargne cortisonique en cas de dépendance ; la splénectomie et les traitements immunosuppresseurs sont envisagés en cas de corticorésistance.

Dans les séries publiées, résumées dans le tableau 1.8, page 66, on observe une évolution dans le temps des traitements utilisés, liée notamment à leur développement : avant la disponibilité des corticoïdes (première autorisation de mise sur le marché américaine pour la polyarthrite rhumatoïde dans les années 1950) et des IgIV (commercialisées initialement en Suisse en 1984), la splénectomie est le seul traitement rapporté [160]. Actuellement, les corticoïdes par voie générale et les immunoglobulines intraveineuses, associés ou non, semblent constituer la première ligne privilégiée. La splénectomie était le traitement historique et reste utilisée aujourd'hui en cas de persistance des cytopénies sévères ou chroniques. Le traitement par anticorps monoclonaux anti-CD20, approuvé aux États-Unis en 1997 est utilisé dans des cas cortico-dépendants ou rechutants ou sévères et il semble en être de même pour les autres immunosuppresseurs. En pratique, ces indications des immunosuppresseurs n'ont pas fait l'objet d'essais thérapeutiques randomisés en aveugle chez l'enfant et les informations concernant leur efficacité et leur tolérance sont rares. Le choix de la molécule se fera donc plutôt en fonction des symptômes associés : autres atteintes auto-immunes et leur localisation, notamment. Les autres traitements sont plus anecdotiques. L'utilisation des agonistes du récepteur de la thrombopoïétine dans le traitement des thrombopénies immunologiques pédiatriques n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Enfin, la greffe de moelle osseuse est parfois le dernier recours en cas de syndrome d'Evans avec des manifestations cliniques sévères, notamment hémorragiques, réfractaires aux autres thérapeutiques disponibles.

Particularités de l'enfant

Si l'on compare les trois études les plus récentes, les IgIV sont plus utilisées chez l'enfant que chez l'adulte (87% pour Al ghaithi *et al.* vs 48% chez Michel *et al.*). Chez l'enfant, elles sont utilisées en première intention, ce qui n'est pas la pratique observée chez l'adulte. A l'opposé, le recours à la splénectomie est moins fréquent chez l'enfant et concerne 7,8% des patients rapportés par Aladjidi *et al.* et Al Ghaiti *et al.* (14 patients sur un total de 179) et 28% des adultes colligés par Michel *et al.* Il semble que les anti-CD20 soient un peu plus utilisés chez l'enfant, avec 23% des enfants et 16% des adultes concernés. Concernant les autres immuno-suppresseurs, les pourcentages d'utilisation sont

comparables (azathioprine 9,5 vs 8,8% ; ciclosporine 6,1 vs 5,8% chez les enfants et chez les adultes respectivement). Le cyclophosphamide n'est pas utilisé chez l'enfant dans ces études ; le mycophénolate est un peu plus utilisé chez l'enfant (5,6% vs 2,9 % chez les adultes) [180, 187, 186].

Etude	Patients	Corticoïdes	IgIV	Splenectomie	anti-CD20	Immuno-suppresseurs	Autres
Evans [160]	14	NA	NA	13	NA	NA	ND
Pui [178]	7	6	NA	5	NA	CTX (1), vincristine (1)	-
Ng [189]	12	11	1	3	NA	-	danazol (1)
Mathew [190]	42	++	++	15	-	AZA, CsA, CTX vincristine	- danazol plasmaphérèse
Savaşan [184]	11	+	+	+	-	AZA, CsA, CTX	-
Blouin [185]	36	35	32	9	6	14 : AZA (8), CsA (6) CTX (5), 6MP (1) vinblastine (2)	HCQ (5), COL (1) danazol (3), Ac anti-Rh (2) plasmaphérèse (4), GMO (1)
Michel [180]	68	68	33	19	11	CTX (10+4)*, AZA (6), vinca-alcaloïdes (7), CsA (4), MMF (2)	danazol (23) HCQ (8) dapsone (2)
Aladjidi [187]	156	++	++	13	34	AZA (16), CsA (10), MMF (3)	ND
Al Ghaithi [186]	23	15	20	1	8	MMF (7), AZA (1), CsA (1)	Ac anti-Rh (4), HCQ (1)

Tableau 1.8 – **Syndrome d'Evans : traitements.** IgIV immunoglobulines intra-veineuses, IS immuno-suppresseur, NA non applicable, ND non documenté, AZA azathioprine, CsA ciclosporine A, CTX cyclophosphamide, 6MP 6-mercaptopurine, GMO greffe de moelle osseuse, Ac anti-Rh anticorps anti-Rhésus, HCQ hydroxychloroquine, COL colchicine, MMF mycophénolate-mofétil. *10 patients ont reçu le CTX pour le syndrome d'Evans et 4 pour d'autres raisons : lupus (3), lymphome (1). Certains articles mentionnent des traitements donnés à certains (+) ou à la plupart (++) des patients de l'étude sans que le nombre de patients concernés soit communiqué.

1.3.5 Évolution, réponse aux traitements et mortalité

Les principaux paramètres de suivi disponibles dans la plupart des études publiées sont repris dans le tableau 1.9, page 68.

Un des moyens rétrospectifs pour évaluer l'évolution de la maladie est de quantifier les traitements administrés. Avec la diversification de l'arsenal thérapeutique au cours du temps, on observe une augmentation logique du nombre de lignes de traitement. Si elles détaillent les traitements utilisés, les études les plus récentes ne précisent pas forcément le nombre de traitements successifs reçus par chaque patient. Aladjidi *et al.* rapportent ainsi que 47% des patients ont reçu entre 3 et 8 lignes de traitement [187]. De la même façon pour les adultes, Michel *et al.* décrivent l'utilisation d'un ou plusieurs traitement de seconde ligne pour 73% de leur cohorte [180]. Les enfants de la série d'Al Ghaithi *et al.* ont reçu de 0 à 6 traitements différents pour la thrombopénie, de 0 à 5 traitements visant l'AHAI (déjà reçu pour la thrombopénie) et 1 à 2 traitements dans le cadre de la neutropénie (G-CSF, antibiothérapie prophylactique) [186]. Ce recours à des traitements multiples pour une proportion importante des patients reflète ainsi le caractère chronique du syndrome d'Evans.

Les critères utilisés pour quantifier la réponse au traitement des patients sont variables selon les études. Certaines séries prennent en compte la valeur absolue des taux d'hémoglobine et de plaquettes (avec définition éventuelle de seuils de réponse), d'autres leur variation (doublement ou non). D'autres se réfèrent à la clinique ou à la nécessité du maintien d'un traitement. Malgré l'utilisation des termes communs de « réponse » ou « rémission », « partielle » ou « complète », en l'absence de critères consensuels, il est difficile de comparer les différentes études.

Enfin, toutes les études sauf une rapportent des décès au cours du suivi. En cumulant les données, cela représente 46 décès sur 389 patients, soit une mortalité globale de 12%. Parmi les causes, certaines sont facilement reliables au syndrome d'Evans, notamment les hémorragies cérébrales en cas de thrombopénie, d'autres résultent de l'étiologie des cytopénies (notamment dans les hémopathies malignes). Le décès peut également être en lien avec les effets secondaires des traitements, en particulier les infections chez les patients traités par immunosuppresseurs ou splénectomisés. Enfin, il est parfois sans relation avec le syndrome d'Evans. La preuve de la causalité n'est donc que très rarement évidente.

Etude	Nombre de patients	Age début symptômes (années)	durée entre cytopénies (années)	Durée suivi (années)	Nombre de lignes de traitement	Statut en fin d'étude				
						RC	RP	Refr.	DCD	ND
Evans [160]	14	ND	ND	ND	1	3	5	1	2	3
Pui [178]	7	5,5	1, 3	4,8	1 à 2	3	4	0	0	0
Wang [188]	10	40,5	ND	ND	ND	ND	ND	2	3	5
Ng [189]	12	**24,8**	ND	5,5*	1 à 2	4	3	0	4	1
Mathew [190]	42	7,7	ND	3	5	14	5**	20**	3	0
Savaşan [184]	11	5,5	ND	8,0	ND	4	3	0	4	0
Michel [181]	10	18	ND	18	3	4	6†	0	2†	0
Blouin [185]	36	4	0,6	4	3	18	3	15	3	0
Michel [180]	68	**52**	**4,2**#	**4,8**	ND	60	ND‡	8	16	0
Aladjidi [187]	156	5,4	2,4#	6,5	ND	105	36	ND	15	0
Al Ghaithi [186]	23	**5,9**	2,75#	5	ND	3	18	ND	2	0

Tableau 1.9 – **Syndrome d'Evans : suivi et évolution.** Les valeurs indiquées sont les médianes, sauf nombres en gras : moyennes. ND non documenté ou non calculable ou non dissociable ; RC rémission complète avec ou sans traitement en cours ; RP rémission partielle, persistance d'au moins une cytopénie, sans préjuger du retentissement clinique ; Réfr. réfractaire ; DCD décédé au cours du suivi, quelle que soit la cause du décès ; ND non documenté. *La médiane du suivi est calculée sur seulement 8 patients, 3 autres étant décédés au cours de la prise en charge initiale et 1 dernier perdu de vue. **Les réponses sont classées en "maladie persistante sans traitement" => RP et "maladie active sous traitement" => Réfr. †les 2 patients décédés étaient en rémission partielle lors de leur décès. # il s'agit ici du délai d'apparition entre les cytopénies uniquement lorsqu'elles sont séquentielles. ‡Michel *et al.* distinguent les patients sous traitement (38) et sans traitement (22).

1.3.6 Symptômes concomitants ou syndrome d'Evans secondaire ?

Le tableau 1.10 page 70 tente de synthétiser l'ensemble des autres symptômes et maladies développés par les patients pendant la durée du suivi des études. Sur un total de 224 patients pour lesquels ces données sont disponibles en détail, 28% ont présenté des symptômes auto-immuns (63 patients), 18% une lymphoprolifération (41 patients), 3% une hémopathie maligne (7 patients), 20% un déficit immunitaire plus ou moins important (soit 45 patients), 11% des infections (25 patients) et 3% d'autres symptômes (7 patients).

Les patients ayant pour certains présenté plusieurs de ces symptômes et maladies, il est difficile d'évaluer la proportion de cytopénies auto-immunes secondaires, en dehors des diagnostics cliniques bien codifiés (lupus, hémopathie maligne) ou des déficits immunitaires génétiquement identifiés (ALPS, TACI) ce qui représente 17% des patients (soit 39 patients). De même, les maladies ou symptômes pour lesquels on peut suspecter une simple co-occurence sont peu nombreux. En ce qui concernent les infections, en dehors d'un patient ayant présenté une infection chronique par le VHC, les 24 autres patients ont présenté des épisodes infectieux aigus concomitant ou précédant de peu l'apparition ou la réapparition des cytopénies. On peut donc à ce titre les considérer comme des facteurs déclenchants de l'épisode. Ainsi, dans la série de Pui *et al.*, 3 patients on présenté des infections bactériennes (otite, pneumonie et cellulite péri-orbitaire) et 3 autres des épisodes digestifs avec fièvre évoquant une gastro-entérite dans les jours précédents ou au début des cytopénies. Ce cas se pose aussi pour 18 patients rapportés dans l'étude d'Aladjidi *et al.*

L'ensemble des symptômes présentés par les patients rapportés n'est pas intégralement reporté dans le tableau ci-contre. Notamment, Aladjidi *et al.* évoquent l'existence de manifestations immunologiques cliniques et biologiques à type d'auto-immunité, d'hypogammaglobulinémie et de lymphoprolifération pour 60% des patients sans en détailler la répartition et sans discuter leur implication étiologique [187]. Ces 93 patients ne sont pas pris en compte dans les pourcentages et valeurs absolues énumérés ci-dessus.

Particularités de l'enfant

Chez l'enfant, dans les séries étudiées, il n'y a pas de cancers rapportés (hématologiques ou autres). A l'inverse, la lymphoprolifération bénigne n'est décrite que dans les études pédiatriques, avec 41 patients concernés sur 144 soit 28%. Les infections et les déficits immunitaires sont également plus fréquents, concernant 17 et 26% des patients pédiatriques versus 1 et 9% des patients adultes respectivement.

Etude	Nombre de patients	Dont II**	Autres symptômes, étiologies secondaires avérées ou suspectées :					
			AI	**LP**	**Hémopathie**	**DI**	**Infection**	**Autre**
Pui [178]	11	4	Lupus (3)	6	Anémie aplasique (1)	hypoγglob (1)	6	
Ng [189]	12		Lupus-like (6)					
Savaşan [184]	11	0**	Diabète (1), divers (6)†	6		hypoγglob (2)		migraine (1)
Blouin [185]	36	0**	Lupus (1) lupus-like (12), autres (4)	13		hypoγglob (6), lymphopénie (3), déficit CD4 (4)		
Michel [180]	68	34	Lupus (7), Lupus-like (3), Sjögren (2), SAPL (2)		lymphomes (6)	DICV (4), déficit IgA (2), déficit CD4 (1)	VHC (1)	Asplénie (1), cancers (5)
Aladjidi [187]	156	16 ou 109*	Lupus (13), ND*	ND*		ALPS (3), ND*	18	
Al Ghaithi [186]	23	4**	Lupus (1), *Thyroïdite (1)*, *Diabète (1)*	16		*DIC (2)* TACI (1), DICV (4) ALPS-like (7) hypoγglob (5)		

Tableau 1.10 – **Syndrome d'Evans secondaire : étiologies.** II secondaires ; AI auto-immunité ; DI déficit immunitaire ; DIC déficit immunitaire combiné ; DICV déficit immunitaire commun variable ; SAPL syndrome des anti-phospholipides primaire ; VHC virus de l'hépatite C ; ALPS autoimmune lymphoproliferative syndrome ; ALPS-like patients présentant certains critères diagnostiques de l'ALPS sans qu'une mutation des gènes FAS, FASLG, CASP10 et CASP8 n'ai été mise en évidence ni systématiquement recherché ; LP lymphoprolifération bénigne, regroupant hépatomégalie, splénomégalie, adénopathies ; hypoγglob hypogammaglobulinémie ; Lupus-like, ou lupus incomplets, patients présentant des symptômes de lupus sans atteindre les critères diagnostiques de l'ACR. †Savaşan *et al.* listent 3 néphrites interstitielles, 2 eczema et 1 syndrome de Guillain-Barré. *Aladjidi *et al.* considèrent uniquement comme secondaires les 16 cas où une cause est formellement identifiée (cat. 1 voir dans le texte). Si on ajoute les 93 patients de la cat.2, comprenant auto-immunité, hypogammaglobulinémie et lymphoprolifération, on obtient 109 patients avec une étiologie suspectée. **Lorsque les études distinguent entre étiologies connues au diagnostic du syndrome d'Evans ou diagnostiquées secondairement, le nombre reporté ici est le premier et les étiologies en italique dans le tableau. Al Ghaithi *et al.* considèrent avoir identifié 13 étiologies secondaires après évaluation.

1.3.7 Physiopathologie

Depuis l'hypothèse initiale d'Evans *et al.* d'un mécanisme commun aux thrombopénies immunologiques et aux anémies hémolytiques auto-immunes, tous les auteurs s'accordent sur l'origine dysimmunitaire du syndrome d'Evans. Evans discute le rôle de la rate, arguant qu'elle jouerait un rôle pathologique dans la production d'auto-Ac plutôt que dans la destruction des lignées sanguines [160]. Savaşan *et al.* relèvent les nombreuses variations du dosage des immunoglobulines avec des hyper- et des hypogammaglobulinémies, la fréquente lymphoprolifération exacerbée pendant les épisodes cytopéniques et les autres symptômes auto-immuns dans leur série et suggèrent une dérégulation immune généralisée. Celle-ci serait responsable des symptômes déficitaires, auto-immuns et prolifératifs souvent observés chez les patients [184]. Certaines études ont également relevé une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD4 ou l'augmentation des cytokines IL-10 et IFNγ mais ces anomalies ne sont pas spécifiques du syndrome d'Evans et sont observées dans d'autres maladies auto-immunes ou au cours d'infections virales [191, 192]. L'exploration de la voie Fas chez les patients présentant un syndrome d'Evans, réalisée par Teachey et par Blouin donne des résultats contradictoires, très probablement liés au recrutement des patients de la série de Teachey [182, 185]. Par ailleurs, Blouin et ses collègues soulignent la fréquence élevée des antécédents auto-immuns familiaux et d'autres anomalies immunitaires sans que d'authentiques lupus ou déficits immunitaires soient mis en évidence [185]. Ils s'interrogent sur la spécificité pédiatrique de ces observations. D'une façon globale, les données suggèrent une dérégulation immune induisant des anomalies à la fois cellulaires et humorales [193].

Particularités de l'enfant

L'inversion du sex ratio et la répartition différente des maladies sous-jacentes et symptômes associés suggère des mécanismes physiopathologiques différents entre les syndromes d'Evans de l'enfant et de l'adulte [186]. Notamment, la fréquence élevée des symptômes auto-immuns, déficitaires et lymphoprolifératifs observés chez l'enfant pousse à rechercher des causes génétiques. L'identification de telles causes pourrait conduire à la mise en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques.

1.4 Objectifs et méthodologie

Les maladies auto-immunes monogéniques sont rares. Leur étude met en évidence des mécanismes de contrôle de la tolérance immune, centraux ou périphériques. Elles apparaissent précocement dans l'enfance et mettent souvent en jeu le pronostic vital. A l'autre bout du spectre on trouve les maladies auto-immunes se déclarant chez l'adulte, considérées comme polygéniques tels le lupus, la sclérose en plaque ou le diabète de type 1. Ce constat est comparable à ce que l'observe pour les maladies infectieuses où l'âge est proposé comme un facteur déterminant la part génétique dans la variabilité de la présentation clinique. A l'âge adulte, une présentation grave d'une infection est supposée être la résultante complexe de facteurs multiples, dont certains génétiques. Au contraire, chez l'enfant, une infection banale dont la présentation clinique met en jeu le pronostic vital fera rechercher une origine monogénique [194].

Bien que les gènes en cause soient différents, on observe un chevauchement important des symptômes entre les différentes maladies auto-immunes monogéniques. De plus, même lorsque les gènes sont identifiés, le détail des mécanismes conduisant à l'apparition des symptômes n'est pas entièrement connu. En particulier, comment expliquer la pénétrance variable de certaines maladies ? Ou encore l'existence de plusieurs maladies ou de plusieurs modes de transmission pour un même gène muté ? Nous avons vu que plusieurs hypothèses ont déjà été démontrées : l'existence de mutations somatiques ou le cumul de plusieurs facteurs génétiques sur un même gène comme dans l'ALPS, notamment. On peut également évoquer une corrélation entre la mutation – son type, sa localisation sur le gène – et ses conséquences pour la structure et les intéractions protéiques, ou encore l'existence de facteurs non génétiques – épigénétique, environnement.

Il s'agit enfin d'un domaine où les connaissances évoluent rapidement. Ainsi, au début de ce travail de thèse, les déficits en LRBA, CTLA-4 et les mutations gain de fonction de STAT-3 n'étaient pas encore rapportées dans la littérature.

Dans ces maladies monogéniques, les cytopénies sont très fréquentes et très souvent au premier plan. A l'opposé, l'étude de la littérature sur le syndrome d'Evans nous a confirmé la rareté de cette pathologie. Il s'agit d'une affection dont la physiopathologie est mal connue, supposée secondaire à une dérégulation immune généralisée. Parmi les syndromes d'Evans secondaires ayant une étiologie formellement identifiée, les déficits immunitaires primitifs et les maladies auto-immunes sont fréquents, surtout dans la population pédiatrique. Chez l'enfant encore plus que chez l'adulte, on observe souvent des patients présentant des symptômes associés au syndrome d'Evans, auto-immuns, lymphoprolifératifs ou déficitaires, faisant suspecter une origine immunologique commune aux différents symptômes et la question d'une étiologie génétique est fréquemment soulevée. Pourtant peu d'études ont cherché à mettre en évidence des facteurs de susceptibilité génétique, faute de cohortes assez grandes, contrairement à ce qui a été fait pour d'autres maladies auto-immunes, notamment le lupus.

Notre objectif est d'identifier des variants génétiques rares pouvant avoir un rôle dans la pathogénie de ce syndrome. L'objectif de ce travail est l'identification de causes génétiques chez des patients pédiatriques présentant un syndrome d'Evans sans étiologie sous-jacente identifiée.

Nous faisons l'hypothèse que les syndromes d'Evans débutant précocement dans l'enfance ont une composante génétique plus importante et que la proportion de formes monogéniques sera augmentée. En étudiant des patients présentant un syndrome d'Evans précoce et sévère, sans étiologie sous-jacente identifiée, issus de familles consanguines ou non, nous visons à mettre en évidence des sous-groupes rares de patients chez lesquels le syndrome d'Evans a une origine monogénique.

Dans une première partie, nous avons étudié des patients ayant présenté un syndrome d'Evans précoce et sévère, parfois dans un contexte de consanguinité ou d'auto-immunité familiale. Nous présenterons les caractéristiques clinico-biologiques des patients étudiés.

L'analyse du séquençage de l'exome d'une partie de notre cohorte nous a permis d'identifier des gènes candidats forts. Pour certains, nous avons effectué des travaux en vue de mieux comprendre le rôle les protéines faisant défaut. Nous présenterons dans différentes parties successives, les travaux effectués sur le déficit en LRBA, en CTLA-4 et sur la maladie auto-immune par gain de fonction de STAT3 et sur IκBα.

Pour d'autres patients, l'analyse d'exome a mis en évidence plusieurs gènes à explorer. Nous présenterons succinctement les gènes candidats potentiels dont l'implication fonctionnelle dépasse le cadre de ce travail (résultats complémentaires).

Matériels et méthodes

Nous détaillerons dans cette partie les méthodes mises en œuvre au cours de nos recherches. D'une façon globale, une partie importante de ce travail a été consacré à l'analyse de données de masse, issues principalement du séquençage d'exome et également de protéomique. Pour confirmer et approfondir les résultats générés par ces analyses, nous avons développé et mis en œuvre des techniques expérimentales variées, intégrant de la culture cellulaire, de la biochimie, des tests fonctionnels et des marquages avec immunofluorescence pour une acquisition soit en microscopie confocale, soit en cytométrie en flux.

2.1 Patients et familles

Les patients et familles ont été recrutés par l'intermédiaire des médecins qui les suivent. Un consentement écrit a été recueilli pour tous les patients et apparentés prélevés, après explication par le médecin. Pour les patients mineurs et les patients décédés, l'autorisation des parents a été demandée.

La cohorte de patients avec des cytopénies auto-immunes a été constituée à partir de patients initialement explorés pour un tableau clinico-biologique d'ALPS chez lesquels il n'avait pas été identifié de cause génétique, soit 250 patients. Parmi ceux-ci, nous avons conservé les patients présentant un syndrome d'Evans, ou lorsqu'il s'agissait de familles consanguines, une thrombopénie immunologique chronique précoce associée à d'autres manifestations auto-immunes, soit 70 patients. Au cours de notre travail, cette cohorte s'est enrichie de nouveaux patients présentant un syndrome d'Evans ou présentant des cytopénies parmi d'autres atteintes auto-immunes. Notamment, devant la fréquence élevée des entéropathies auto-immunes dans les déficits en LRBA, nous avons aussi exploré certains patients initialement suivis pour un tableau d'IPEX chez lesquels la recherche de mutation de FOXP3 et de CD25 était restée infructueuse (40 patients). Tous les patients inclus ont débuté leur maladie dans l'enfance et présentaient des cytopénies chroniques ou récidivantes.

2.2 Conservation des prélèvements

Nous avons travaillé essentiellement à partir de sang veineux, prélevé sur EDTA ou sur héparinate de lithium. Ces prélèvements ont été fractionnés de façon stérile selon des protocoles standards.

Brièvement, après une première centrifugation à 2200rpm pendant 5 minutes, le plasma est prélevé, aliquoté et conservé à -20°C. Une partie du culot cellulaire peut être aliquoté et conservé à -20°C pour extraction ultérieure des acides nucléiques. Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement sur héparinate de lithium, le culot cellulaire est dilué dans du PBS (entre au 1/2 et au 1/3) et les PBMC sont isolés par centrifugation sur gradient de densité à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll Paque ou équivalents chez différents fournisseurs). Les PBMC sont lavés, comptés, aliquotés pour congélation d'ampoules contenant 5 à 10 millions de cellules dans du milieu de congélation (90% de SVF et 10% de DMSO). La congélation s'effectue à -80°C puis les ampoules sont transférées quelques jours plus tard dans l'azote liquide pour conservation optimale. Le culot cellulaire contenant les globules rouges et les polynucléaires est conservé à -20°C pour extraction ultérieure des acides nucléiques.

2.3 Biologie moléculaire

2.3.1 Extraction d'ADN

Nous avons utilisé 2 techniques différentes d'extraction de l'ADN. La première technique extrait l'ADN à l'aide de solvants (phénol et chloroforme). La seconde utilise un kit commercial d'extraction sur colonnes.

2.3.1.1 Extraction en phénol/chloroforme

L'ADN des patients ont été extraits à partir du sang total, des culots de polynucléaires et globules rouges, de PBMC ou de cellules en culture.

Lyse des globules rouges Lorsqu'on extrait l'ADN à partir d'une fraction contenant des globules rouges, une première étape de lyse de ces cellules est nécessaire. Les cellules sont incubées dans un grand volume de TE 20 :5 (Tris 20mM, EDTA 5mM final dans de l'eau) à 4°C pendant 10 minutes puis centrifugées à 3000rpm pendant 10 minutes et le surnageant éliminé. Ces étapes sont répétées jusqu'à obtenir un culot cellulaire propre, c'est-à-dire blanc.

Digestion enzymatique Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 500μL tampon TSE (Tris 100mM, NaCl 200mM, SDS 0,2%, EDTA 5mM, eau) et 10μL de protéinase K (à 20mg/ml). La digestion s'effectue à 56°C pendant 2h ou 50°C pendant la nuit ou 37°C pendant le week-end.

Extraction proprement dite Elle s'effectue à froid (4°C). La suspension digérée est mélangée volume à volume avec une solution de phénol/chloroforme (ultrapure phenol/chloroform : Isoamyl Alcohol, Invitrogen). Après homogénéisation vigoureuse, l'échantillon est centrifugé à 12 000rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure, aqueuse est conservée et mélangée volume à volume avec une solution de chloroforme (Chloroform/Isoamyl Alcohol ; 24 :1). Après homogénéisation vigoureuse, l'échantillon est centrifugé à 12 000rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure, aqueuse est conservée. La précipitation de l'ADN a lieu en ajoutant 2 volumes d'éthanol pur froid. L'agitation

par retournement permet la formation du précipité et la visualisation d'une « méduse » d'ADN. Celle-ci est récupérée par centrifugation et lavée plusieurs fois à l'éthanol 70% pour éliminer toutes traces des solvants organiques. L'ADN est ensuite séché puis resolubilisé dans un volume d'eau dépendant de sa quantité. Selon les applications d'aval, il peut aussi être resuspendu dans un tampon TE 10 :1 (Tris 10mM, EDTA 1mM). L'ADN est conservé à -20°C.

2.3.1.2 Extraction sur colonnes - Kit Qiagen

L'ADN est extrait en suivant les instructions fournies dans le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen). Très rapidement, le sang total ou le culot cellulaire est dilué et digéré par la protéinase K puis transféré sur les colonnes pour élimination des autres constituants cellulaires et lavages grâce à des étapes de centrifugations successives avec différents tampons fournis. L'ADN est ensuite élué dans un tampon fourni ou dans de l'eau.

2.3.2 Extraction d'ARN, obtention d'ADNc

2.3.2.1 Extraction de l'ARN

L'ARN a été extrait à partir de PBMC ou de lignées cellulaires. Nous avons utilisé le kit RNeasy commercialisé par Qiagen et suivi les instructions fournies pour une extraction sur colonnes. Très rapidement, le culot cellulaire lavé en PBS est remis en suspension dans un tampon de lyse. Après homogénéisation, ce lysat peut être conservé à -80°C pour extraction ultérieure. L'extraction consiste en une première étape de précipitation des acides nucléiques. Elle est suivie d'étapes de lavages par centrifugations successives sur les colonnes avec les différents tampons fournis. L'ARN est ensuite élué dans de l'eau ne contenant pas de RNAses, fournie dans le kit. L'ARN est conservé à -80°C pour utilisation ultérieure

2.3.2.2 Rétrotranscription

L'ARN a été rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription de Qiagen. Rapidement, entre 10pg et 1μg d'ARN sont mélangé avec du tampon d'élimination de l'ADN génomique et de l'eau pour un volume final de 14μL. Une première étape de digestion d'éventuels fragments d'ADN génomiques contaminants s'effectue en chauffant le mélange à 42°C pour 2 à 10minutes. Sont ensuite ajouté des amorces aléatoires, la rétrotranscriptase et un tampon adapté. La rétro-transcription est effectuée par incubation du mélange à 42°C pour 30 minutes. L'enzyme est ensuite inactivée par chauffage à 95°C pendant 3 minutes. L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

2.3.3 Qualité des acides nucléiques

Les acides nucléiques ont été dosés par mesure de l'absorbance à 260nm sur un nanodrop. La qualité a été vérifiée de plusieurs façons : lors du dosage, les ratios d'absorbance à 260/230 et 260/280 ont été mesuré. Les acides nucléiques sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% et les profils de migration examinés. Lorsque des techniques de séquençage haut débit étaient mises en œuvre en aval, les ADN ont été purifiés et si besoin concentrés à l'aide de colonnes de filtration Amicon, Millipore.

2.3.4 Séquençage haut débit

Le séquençage haut débit de l'exome ou de panels de gènes ciblés est effectué par la plateforme de génomique de l'Institut Imagine.

2.3.4.1 Exome

Les banques d'ADN ont été préparées à l'aide du kit 50Mb SureSelect Human All Exon kit V3 (Agilent Technologies). Des lectures en mode « paired-end 75+35 » ont été générées à l'aide d'un SOLID5500XL (Life Technologies) et localisées avec LifeScope (Life Technologies) La profondeur moyenne de couverture obtenue pour chaque échantillon était supérieure ou égale à 70X, avec au moins 83% de l'exome couvert à au moins 15 fois. La reconnaissance des SNPs et des indel a été faite avec les outils GATK. Un logiciel développé dans l'Institut (PolyWeb) a été utilisé pour filtrer les variants.

2.3.4.2 Panel ciblé

A partir des ADN génomiques des patients, des banques « génome complet » compatibles avec la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) Illumina sont fabriquées. 1 à 3μg de chaque ADN est fragmenté mécaniquement de façon à obtenir des fragments de taille régulière (300 pb, utilisation d'un Covaris). Après une étape de réparation des extrémités des fragments, des adaptateurs spécifiques à la technologie de NGS Illumina et contenant des code-barre sont ligués aux extrémités des fragments d'ADN. Ces code-barres sont de courtes séquences de 8 bases qui servent à identifier les données de chaque patient au moment du séquençage (un code-barre par patient). La préparation de la banque « génome complet » se finalise par quelques cycles de PCR utilisant des primers complémentaires des adaptateurs Illumina. Plusieurs banques de pré-capture sont mélangées en concentrations équimolaires. Le processus de capture est réalisé en utilisant ce mélange et des sondes biotinylées du panel SureSelect, conformément au protocole SureSelect (Agilent). Dans la banque de molécules avec codes-barres, celles qui sont complémentaires des sondes biotinylées sont retenues par les billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Elles sont ensuite amplifiées par PCR pour générer un mélange final de banques post-capture. Les banques post-capture sont séquencées sur un Illumina HiSeq2500 (mode « paired-end, 130x130 bases, haut débit). Les séquences lues sont alignées avec le génome de référence humain hg19, à l'aide de la version 0.6.2.13 du Burrows-Wheeler Alignment. La profondeur moyenne de couverture obtenue pour chaque échantillon était supérieure ou égale à 300X avec au moins 97% de l'exome couvert au moins 15 fois et au moins 90% couvert au moins 30 fois.

2.3.5 Séquençage Sanger

Les gènes candidats et les variations identifiées par les techniques haut-débit ont été vérifiées par séquençage Sanger selon des protocoles classiques. Rapidement, les amorces ont été dessinées pour une température d'hybridation de 60°C chaque fois que cela était possible. La liste des amorces utilisées pour l'ADN génomique et le cDNA de *LRBA*, *CTLA-4*, *STAT3* et *NFKBIA* est donnée en annexe dans le tableau 5.26, page 210.

2.3.5.1 Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

Une première amplification exponentielle est réalisée par PCR avec le kit GoTaq (Promega). Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 2.14, page 80.

pour 25μL final	
Réactif	**Volume (en μL)**
Tampon	5
$MgCl_2$	2,5
dNTP	0,5
amorces (F et R)	0,5
Taq polymérase	0,1
ADN échantillon	1
H_2O	14,9

Tableau 2.11 – **Mélange réactionnel pour amplification d'un fragment d'ADN par PCR.** Le kit GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega) est utilisé et contient le tampon, le $MgCl_2$, la polymérase. Les dNTP sont mélangés de façon équimolaire, dilués à 100mM chaque et stockés à -20°C.

Le programme PCR usuel utilisé est présenté dans le tableau suivant :

Étape	dénaturation	40 cycles			Élongation finale
Température	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
Durée	5'	30"	30"	variable	7'

Tableau 2.12 – **Programme PCR : étapes, durées et températures.**

Les produits PCR sont ensuite contrôlés par migration dans un gel d'agarose 1%, puis purifiés sur colonnes de Sephadex (GE Healthcare). Ils sont conservés à -20°C.

2.3.5.2 Réaction de séquence

Les produits PCR purifiés sont amplifiés linéairement au cours de la réaction de séquence. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 2.13, page 80.

Le programme usuel utilisé est présenté dans le tableau suivant :

Les produits de séquence sont purifiés sur colonne de Séphadex (GE healthcare). Les produits de séquence peuvent être conservés avant et après purification à -20°C. Le séquençage (éléctrophorèse capillaire et capture de la fluorescence des fragments par caméra CCD) est réalisé sur l'analyser de séquences 3500xL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies).

L'analyse des séquences est réalisée avec le logiciel ApE – a plasmid Editor.

pour 10μL final	
Réactif	**Volume (en μL)**
Tampon Big Dye (Life Technologies)	2
Big Dye	1
amorce (F ou R)	0,4
Produit PCR purifié	0,5 à 3
H_2O	qsp 10μL

Tableau 2.13 – **Mélange réactionnel pour réaction de séquence.** Le kit Big Dye Terminator v.1.3 (Applied Biosystems, Life Technologies) est utilisé et contient le tampon, les dNTP et les ddNTP marqués, la polymérase et les ions nécéssaires à son fonctionnement.

Étape	dénaturation	25 cycles		
Température	96°C	96°C	50°C	60°C
Durée	3'	10"	5"	2'30"

Tableau 2.14 – **Programme de la réaction de séquence : étapes, durées et températures.**

2.4 Culture cellulaire

2.4.1 Activation et mise en culture des lymphocytes T

Milieu de culture Le milieu de culture utilisé pour l'activation et la culture des lymphocytes T activés est constitué de milieu Panserin 401 auquel on ajoute 5% de sérum AB décomplémenté, 1% de glutamine et 1% de pénicilline et streptomycine. L'ensemble du milieu est filtré lors de la préparation et manipulé stérilement. La concentration cellulaire est de 0,5 à 1 million de cellules par mL de milieu. L'entretien des cellules se fait 3 fois par semaine. Les cellules sont incubées en atmosphère contrôlée, à 37°C, 5% CO_2.

Activation L'activation des lymphocytes T à partir de PBMC fraichement isolés du sang ou décongelés se fait par ajout au milieu de culture de SEE (ET404, Toxin Technology) à 0,1ng/mL final ou de PHA à 12,5μg/mL final. Entre J2 et J4, on réalise une séparation sur gradient de densité (voir paragraphe 2.2, page 75) pour éliminer les cellules mortes et l'activateur du milieu de culture. On ajoute au milieu de culture de l'IL-2 (concentration finale 100UI/mL) qui entretient la prolifération et la survie cellulaires. L'IL-2 est ensuite renouvelée lors de l'entretien des cellules, 3 fois par semaine.

2.4.2 Culture de lignées B-EBV et HeLa

Des lignées B-EBV contrôles ont été cultivées en milieu RPMI Glutamax (Gibco), avec 20% de SVF et 1% de pénicilline et streptomycine. L'entretien se fait toutes les semaines.
Des cellules HeLa ont été cultivées en milieu DMEM Glutamax (Gibco), avec 10% de SVF et 1% de pénicilline et streptomycine. Le passage se fait à confluence.

2.5 Tests fonctionnels

2.5.1 Tests d'apoptose

Ces tests ont été réalisés sur des lymphocytes T activés en culture, à partir du 7e jour de culture.

2.5.1.1 J0 - Induction de l'apoptose

200 000 cellules par condition sont déposées en duplicats dans une plaque 96 puits à fond rond, dans 100μL de milieu de culture. On y ajoute l'inducteur choisi :

- Apo1.3, anticorps agoniste anti-FAS (réf : 80-020-C100, COGER) aux concentrations finales de 10 et 100 ng/mL. Après 15 minutes d'incubation, on ajoute le RAMIG à la concentration finale de 10μg/mL (rabbit anti-mouse Ig, réf : 315-005-046, Interchim) qui rapproche physiquement les anticorps anti-FAS et permet l'activation de la voie FAS.
- RAMIG seul (condition contrôle).
- Surnageant de culture des lignées Neuro2A sécrétant du FAS Ligand oligomérisé, 100μL par puits.
- TRAILkiller (réf : ALX-201-073-C020, COGER) à la concentration finale de 250ng/mL. On peut bloquer la synthèse protéique, notamment de cFLIP en ajoutant de la cycloheximide (CHX, réf : C-7698, Sigma) à la concentration finale de 1μg/mL.
- CHX seul, contrôle de la condition précédente.
- Chloroquine (CHQ) à la concentration finale de 0,1mM, bloque l'apoptose par la voie des granzymes et perforine.
- Staurosporine à la concentration finale de 0,5μg/mL. Active les voies d'apoptose dépendantes et indépendantes des caspases.
- Condition contrôle avec le milieu seul.

Le volume de milieu est ensuite ajusté à 200μL dans chaque puits. Sauf pour les conditions testant le sevrage en cytokines, on y ajoute de l'IL2 (à la concentration finale de 100UI/mL). Les cellules sont incubées à 37°C entre 18h et 24h, ou plusieurs jours (J2 à J7) pour les tests d'apoptose induite par le sevrage en cytokines.

2.5.1.2 J1 à J7 - Mesure de l'apoptose

Après incubation, le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont remises en suspension dans une solution d'iodure de propidium, lysant les cellules et marquant les noyaux. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux et la proportion de noyaux hypoploïdes et marqués par l'iodure de propidium (pic d'émission : 620nm) est mesurée. Les différents analyseurs de cellules utilisés pour l'acquisition des données sont le MACSQuant (Miltenyi), le Calibur (BD), le Fortessa (BD), le Canto (BD). L'analyse des données de cytométrie en flux a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo. Le pourcentage de cellules en apoptose est calculé pour chaque condition d'activation selon la formule suivante :

$$\%\text{ d'apoptose} = 100\frac{\text{Apoptose observée} - \text{Apoptose spontanée}}{100 - \text{Apoptose spontanée}}$$

2.5.2 Exploration globale de la voie NF-κB

Ce test, réalisé sur sang total frais a pour objet de tester globalement la voie NF-κB dans les cellules mononucléées du sang. Il se décompose en 2 grandes étapes. La première consiste à activer la voie NF-κB via différents récepteurs de surface à l'aide d'agonistes. Elle est réalisée en conditions stériles. Après 24 ou 48h de culture, le surnageant de culture est recueilli afin de mesure la quantité de cytokines produites. Cette mesure est réalisée par ELISA.

2.5.2.1 Activation des cellules

Les échantillons de sang frais des patients et d'un contrôle, prélevés sur héparinate de lithium sont dilués au demi dans du RPMI. En parallèle, une numération des leucocytes est faite sur les échantillons de sang non manipulés. 450μL de sang dilué sont stimulés avec l'un des activateurs (IL-2β, TNFα, Pam2, R848, PMA/ionomycine, LPS) ou non stimulés. Les caractéristiques des activateurs (concentration du stock, concentration finale, chemin d'activation, fournisseur) sont résumées dans le tableau 2.15, page 82. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C.

Stimulus	[ ] **du stock**	[ ] **finale**	**Chemin**	**Fournisseur**
IL1β	5 μg/mL	20 ng/mL	IL-1R, MyD88, IRAK4	R&D
TNFα	10 μg/mL	20 ng/mL	MyD88, IRAK4, NEMO	R&D
Pam2	10 μg/mL	100 ng/mL	TLR2/6	Invivogene
R848	1 mg/mL	3 μg/mL	TLR7/8	Invivogene
PMA/Ionomycine	$5.10^{-5}/10^{-2}$M	$10^{-7}/10^{-5}$M	Stocks Ca^{2+}	Sigma
LPS	1 μg/mL	1 ng/mL	TLR4	Sigma

Tableau 2.15 – **Activateurs de la voie NF-κB utilisés sur sang frais pour tester globalement le fonctionnement de la voie.** PMA Phorbol myristate acetate, LPS lipopolysaccharide, TLR toll-like receptor.

Après 24 ou 48h, les surnageants de culture sont collectés et conservés à -20°C.

2.5.2.2 Mesure des cytokines par ELISA

La concentration de 2 cytokines est mesurée dans les surnageants de culture recueillis. Il s'agit de l'IL-6 et de l'IL-10. On utilise les kits ELISA Sanquin.

Préparation des plaques ELISA Des plaques Maxisorp sont incubées en avance (sur la nuit à 4°C ou 1h à 37°C) avec 100 μL d'anticorps (anti-IL-6 ou anti-IL-10) dilué dans le tampon de « coating » (tampon HPE, fourni dans le kit). Après 4 lavages en PBS, la plaque est saturée pendant 1h avec une solution de lait demi-écrémé Régilait, 5% dans du PBS puis lavée.

Dilutions préparatoires Deux dilutions de chaque échantillon sont testées. Selon les stimuli et la cytokine mesurée, les dilutions varient du 1/2 au 1/500 (voir tableau 2.16, page 83). Une gamme contrôle est également préparée pour chaque ELISA.

dilutions pour IL-6	
Non stimulé	1/2 et 1/4
IL-1β	1/20 et 1/100
Pam2	1/20 et 1/100
R848	1/20 et 1/100
LPS	1/100 et 1/500
PMA/ionomycine	1/50 et 1/100
dilutions pour IL-10	
Non stimulé	1/2
TNFα	1/2, 1/4 et 1/10
PMA/ionomycine	1/2 et 1/4

Tableau 2.16 – **Dilutions des surnageants de culture pour les ELISA IL-6 et IL-10.**

ELISA Les échantillons dilués et la gamme sont incubés pendant 1 heure en agitation douce. Après 4 lavages au PBS-tween, l'anticorps secondaire est incubé pendant 1 heure en agitation douce. Après 4 lavages, la plaque est incubée avec la solution contenant l'enzyme HRP pendant 30 minutes en agitation douce. après 4 lavages, la plaque est incubée avec le substrat (TMB, Eurobio) pendant 5 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de H_2SO_4 et l'absorbance à 450 nm est lue dans les 30 minutes suivantes.

2.5.3 Etude de l'activation de STAT3

L'activation de STAT3 a été étudiée à l'aide de 2 techniques : d'une part en stimulant des PBMC et en regardant la cinétique de phosphorylation de STAT3 en cytométrie en flux. D'autre part, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative la transcription de SOCS3 induite par la stimulation de STAT3 dans des lymphocytes T activés.

2.5.3.1 Etude de la phosphorylation de STAT3

Des PBMC fraichement isolés du sang ont été stimulés par l'IL-10 à 20 ng/mL ou l'IL-21 à 100 ng/mL pendant 20, 90 ou 120 minutes. Après arrêt de l'activation par lavages des cellules en PBS-2% SVF froid, les cellules ont été marquées en surface avec les anticorps anti-CD45-APC, anti-CD3-BV510, anti-CD4-PE-Cy7, anti-CD19-V450 et anti-CD14-FITC pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Après lavage, les cellules ont été fixées (10 minutes, 37°C) et perméabilisées 30 minutes, 4°C) avec le kit Cytofix/Cytoperm (BD). Un marquage intra-cellulaire avec l'anticorps anti-phospho-STAT3-PE ou l'isotype contrôle est réalisé pendant 1h à l'abri de la lumière. Après lavages en PBS-2% SVF, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur l'appareil Canto (BD). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.5.3.2 Etude de la transcription de SOCS3

Des lymphocytes T activés par la PHA et mis en culture avec de l'IL-2 pendant 8 à 12 jours sont sevrés en IL-2 pendant la nuit. Le lendemain, ils sont stimulés par l'IL21 à 100 ng/mL pendant 20h. L'ARN total est ensuite extrait et dosé. 1 μg d'ARN est rétro-transcrit. La PCR quantitative est réalisée avec la méthode Taqman pour SOCS3

et RPLPO comme gène de normalisation. Les résultats sont analysés et la comparaison des quantités relatives des transcrits est réalisée selon la méthode des ΔΔCT.

2.5.4 Etude de la formation de la synapse immunologique

Les cellules B Raji sont récoltées, lavées et marquées avec le cell Tracker blue CMAC (Life Technologies) pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules T Jurkat sont récoltées et lavées. Après lavages, les cellules T et B sont déposées ensemble (150 000 cellules B et 150 000 cellules T) sur des lamelles préalablement recouvertes de poly-L-lysine (voir section 2.8.1, page 85) et incubées pendant 30 minutes à 37°C (adhérence et formation des conjugués). Les cellules sont ensuite stimulées par la SEE (100 ng/mL) pendant 30 minutes. La réaction est stoppée par lavages en PBS froid. Puis les cellules sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de PFA à 4%. Après lavage en PBS, les cellules sont incubées 30 minutes avec de la glycine (10mM) puis perméabilisées avec de la Saponine. Le marquage est ensuite réalisé classiquement (incubation des anticorps primaires puis secondaires) dans un tampon contenant de la saponine jusqu'à l'étape de montage (voir protocole général de microscopie confocale, page 85).

2.6 Marquages par cytométrie en flux

2.6.1 Principe

Les cellules sont marquées 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière avec les différents anticorps de surface détaillés ci-dessous. Après 2 lavages avec du PBS, les cellules sont fixées et perméabilisées avec le kit FoxP3 / Transcription factor staining buffer set (eBiosciences). Elles sont ensuite marquées 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière avec les différents anticorps intracellulaires. Après 2 lavages dans le tampon de perméabilisation/lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur l'appareil Fortessa (BD). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2.6.2 Marquage des lymphocytes T régulateurs

Pour l'étude des sous-populations T régulatrices, les cellules sont marquées en surface avec les anticorps anti-CD3-BV510 (Sony),anti-CD4-FITC (BD), anti-CD45RA-PE-Cy5 (Sony), anti-CD127-PE-Cy7 (Sony) et anti-CD25-BV650 (BD). Les anticorps anti-FOXP3-PE (eBioscience) et anti-Hélios-eF450 (eBioscience) sont utilisés après perméabilisation.

2.6.3 Marquage de CTLA-4 dans les lymphocytes T activés

Pour l'étude de l'expression de CTLA-4 dans les lymphocytes T activés, les cellules sont marquées en surface avec les anticorps anti-CD3-BV510 (Sony), anti-CD4-FITC (BD), anti-HLA DR-PE-Cy7 (BioLegend) et anti-CD25-BV650 (BD). L'anticorps anti-CTLA4-PE (BD) ou l'isotype contrôle est utilisé après perméabilisation.

2.7 Western blotting

Après lavage, les cellules sont incubées pendant 30 minutes sur glace en tampon RIPA avec antiprotéases et antiphosphatases (1mL pour 40 millions de cellules). Après centrifugation à froid (5 minutes à 12 000 rpm), le surnageant est recueilli. Ce lysat protéique est conservé à -80°C. La concentration protéique est mesurée par la méthode de Bradford à l'aide du kit Bradford Test reagent (Biorad). 25 à 40 μg de lysat protéique de chaque échantillon sont mélangés à un agent réducteur (DTT, concentration finale 200mM) et un tampon de charge (NuPage 4X loading buffer, Life Technologies). Du tampon RIPA est ajouté pour ajuster les volumes à 40 μL. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 104°C pendant 5 minutes. Pour LRBA, la migration se fait dans un gel précoulé NuPage Tris-acétate 3-8% d'acrylamide (Life Technologies), en tampon Tris-acétate-SDS à 150V pendant 1h20. Pour CTLA-4, la migration se fait dans un gel précoulé NuPage Bis-Tris 10% d'acrylamide (Life Technologies), en tampon MOPS à 150V pendant 1h10. Le transfert est réalisé sur une membrane PVDF en tampon tris-glycine pendant 1h30 ou 2h30 (CTLA-4 et LRBA respectivement). Les membranes sont saturées en PBS-BSA 5% pendant 30 minutes. Les anticorps primaires anti-LRBA (HPA023597 Sigma au 1/1000^e), anti-CTLA-4 (sc-376016 au 1/500^e), anti-Ku70 (Thermofisher Scientific au 1/10 000) sont incubés pendant la nuit à 4°C. Après lavages de la membrane en PBS-Tween 1‰, les anticorps secondaires (anti-souris HRP et anti-lapin HRP, Santa Cruz, au 1/10 000^e) sont incubés pendant 1h. après lavages, la membrane est incubée avec l'ECL (Thermo Scientific) pendant 5 minutes. La révélation se fait sur films radiographiques (GE healthcare) après exposition de 1 à 5 minutes et développement dans un Curix 60 (AGFA).

2.8 Microscopie confocale

2.8.1 Préparation des cellules

Des lamelles de verre sont incubées dans une solution de poly-L-lysine pendant la nuit puis rincées 3 fois dans du PBS et séchées. Les lymphocytes T activés sont rincés en PBS et resuspendus à 4.10^6 millions/mL. 50 μL de suspension cellulaire sont déposé par lamelle. Les cellules sont fixées par ajout de PBS-PFA, à la concentration finale de 4% et incubées 30 minutes à température ambiante. Après 2 lavages en PBS, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 à 0,1% pendant 1 minute. Les cellules sont ensuite rincées, saturées pendant 1h avec une solution de PBS-SVF 5% puis incubées avec les anticorps primaires pendant 1h. Après 4 lavages, elles sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 45 minutes à l'abri de la lumière. Après 4 lavages en PBS, les lamelles sont montées avec le milieu ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies) et conservées à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à acquisition des images.

Les différents anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau 2.17, page 86.

Anticorps primaires				
Cible	**Espèce**	**Dilution**	**Fournisseur**	**Référence**
LRBA	lapin	1/200	Sigma	HPA023597
CTLA-4	souris	1/100	Santa Cruz	sc-376016
TGN38	souris	1/100	Thermo Scientific	MA3-063
GRIM19	souris	1/100	Abcam	ab110240
α-tubuline	souris	1/100	BioLegend	627901
EEA1	souris	1/200	Santa Cruz	sc-53939
Calréticuline	poulet	1/200		
Lamp2	souris	1/200	Abcam	ab25631
Giantine	souris	1/200	Abcam	ab37266
MVP	souris	1/200	Santa Cruz	sc-23917
Perforine	souris	1/100	BD	556434
LAT	souris	1/200	R&D systems	MAB63341
Anticorps secondaires				
Cible	**Fluorochrome**	**Dilution**	**Fournisseur**	**Référence**
Souris	AlexaFluor 555	1/1000	Life Technologies	A21425
Lapin	AlexaFluor 488	1/1000	Life Technologies	A21206
Poulet	AlexaFluor 647	1/1000	Life Technologies	A21449

Tableau 2.17 – **Liste des anticorps utilisés en microscopie confocale.**

2.8.2 Acquisition et analyse des images

Les images sont acquises sur un microscope confocal SP8 (Leica), objectif 40 à immersion. Elles sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Lors des expériences de stimulation du TCR et de formation de la synapse immunologique entre des lignées B et T (voir paragraphe 2.5.4, page 84), nous avons utilisé ImageJ pour mesurer le pourcentage de cellules dans lesquelles LAT et LRBA étaient polarisés au niveau ou vers la synapse immunologique. Pour cela, nous avons défini la synapse immunologique comme la zone de contact entre la cellule B et la cellule T. Nous avons divisé la cellule en 2 moitiés selon un diamètre perpendiculaire à l'axe de la synapse immunologique. Puis nous avons quantifié la fluorescence correspondant aux molécules d'intérêt dans ces 2 moitiés cellulaires. Nous avons considéré que la molécule d'intérêt est polarisée à ou vers la synapse immunologique si la fluorescence est majoritairement située dans la moitié où se situe la synapse. Ces analyses ont été réalisées de façon indépendante par 2 personnes différentes, dont l'une ne connaissait pas le statut (stimulé/non stimulé) des cellules analysées.

2.9 Protéomique

2.9.1 Immuno-précipitation

1 à 2 mg de protéines totales fraichement extraites sont mises en suspension dans 1 à 2mL tampon d'extraction (RIPA + antiprotéases et anti-phosphatases) avec 2μg

d'anticorps anti-LRBA, anti-CTLA-4 ou de sérum normal de lapin ou souris et incubés pendant la nuit à 4°C sous agitation douce. 20 μL de billes de sépharose A et de sépharose G préalablement lavés sont ajoutés à chaque échantillon pour une incubation de 2h à 4°C sous agitation douce.

Après plusieurs lavages dans le tampon RIPA complet, le produit de l'immuno-précipitation peut être contrôlé par western blot. Dans ce cas, il est dénaturé (DTT, NuPage 4X loading buffer, chauffage à 104°C) puis déposé dans un gel pour migration selon le protocole de western blot décrit précédemment. A l'issue de la migration, le gel peut être transféré (voir section Western blotting) ou coloré (Colloidal Blue staining kit, Life Technologies) afin de visualiser le résultat et la spécificité de l'immuno-précipitation. Alternativement, les billes sont lavées et transférées à la plateforme de protéomique de l'Institut Jacques Monod pour digestion et analyse par spectrométrie de masse.

2.9.2 Spectrométrie de masse

Les étapes suivantes sont réalisées par le personnel de la Plateforme Protéomique Structurale et Fonctionnelle de l'Institut Jacques Monod. A partir des différents produits d'immuno-précipitation (IP spécifique avec l'anticorps anti-LRBA ou non-spécifique, extraits protéiques de différentes lignées cellulaires), les protéines sont digérées directement sur billes. Les échantillons sont dessalés et les peptides sont ensuite analysés sur le spectromètre nanoESI-Orbitrap. Les protéines présentes sont identifiées à l'aide du logiciel Mascot.

Résultats

Nous avons vu que les patients présentant un syndrome d'Evans présentaient souvent d'autres atteintes cliniques associées. Les plus fréquentes sont des symptômes auto-immuns, une lymphoprolifération bénigne ou des déficits immunitaires. Les patients rassemblés dans notre cohorte présentaient aussi ces caractéristiques, avec notamment des patients initialement suspects d'ALPS, de lupus ou de syndrome IPEX ou IPEX-like, sans en présenter l'intégralité des critères diagnostiques ou exclus par les recherches génétiques ciblées.

Devant l'hétérogénéité de cette cohorte, notre démarche a été la suivante : nous avons en premier lieu sélectionné des familles consanguines, des familles avec plusieurs personnes atteintes et quelques cas sporadiques particulièrement précoces et sévères pour réaliser un séquençage de l'exome. Ces 14 familles et leurs principales caractéristiques sont présentées dans la section 3.1, page 90.

Lors de l'analyse des exomes, nous avons pu identifier 4 gènes candidats forts, pour lesquels la suite du travail a été double : lorsqu'il s'agissait de gènes non encore impliqués dans des maladies auto-immunes chez l'homme, nous avons tenté d'apporter la preuve de leur implication fonctionnelle dans la maladie des patients. En parallèle, nous avons recherché des mutations par séquençage ciblé de ces gènes candidats (séquençage haut débit ou Sanger classique) pour le reste des patients de la cohorte présentant un syndrome d'Evans et pour d'autres patients présentant des tableaux cliniques proches – avec ou sans syndrome d'Evans. Ainsi, nous avons travaillé sur le déficit en LRBA (section 3.2, page 95), sur les mutations de CTLA-4 (section 3.3, page 129), sur les mutations gain de fonction de STAT3 (section 3.4, page 137) et sur un variant d'IκBα (section 3.5, page 141).

Pour les patients explorés génétiquement par séquençage d'exome, chez lesquels un gène candidat prioritaire n'a pas pu être mis en évidence, les principaux résultats de l'analyse d'exome, nos hypothèses prioritaires et les prochaines étapes de leur exploration sont présentés en résultats complémentaires, dans la section 3.6, page 152.

Enfin, nous avons souhaité caractériser plus finement, cliniquement et biologiquement, une petite cohorte d'enfants vus à Necker et présentant un syndrome d'Evans sporadique. Ce travail, en collaboration avec une interne de pédiatrie, fait l'objet d'une publication soumise, présentée section 3.7.1, page 159.

3.1 Séquençage d'exome chez 16 patients

Le séquençage de l'ensemble de l'exome (WES pour Whole Exome Sequencing en anglais) a été réalisé pour 16 patients atteints de syndrome d'Evans sans étiologie sous-jacente identifiée et 22 apparentés, dans 14 familles. 10 familles étaient d'origine consanguine (familles 1 à 9 et famille 14). Parmi les 4 familles restantes, le syndrome d'Evans était familial dans 1 cas, atteignant 2 patients de générations différentes (famille 10). Pour les 3 autres familles, il s'agissait de cas sporadiques d'apparition précoce avec une symptomatologie sévère (familles 11 à 13). Les arbres génétiques des familles ainsi que le nombre de variants privés identifiés pour chaque patient sont listés dans le tableau 3.1, page 92. Les cas index sont indiqués à l'aide de flèches. Le terme « multi-auto-immunité » correspond selon les familles à la présence d'un syndrome d'Evans accompagné d'autres symptômes auto-immuns chez le cas index – entéropathie +/- atteinte pulmonaire interstitielle pour les familles 2, 3 et 10 – ou à la présence chez le cas index de cytopénies accompagnées d'auto-anticorps (familles 6 et 7), ou encore à la présence de symptômes auto-immuns variés (cytopénies, diabète, arthrite juvénile) répartis entre plusieurs apparentés (familles 1 et 7).

Lors de la première étape d'analyse, nous avons recherché des gènes communs à plusieurs individus atteints dans au moins 2 familles, à l'aide des filtres décrits figure 3.12, page 91. Nous avons mis en évidence un gène candidat commun aux 3 premières familles. Nous n'avons pas identifié de variant partagé par plusieurs familles qui ne soit également fréquemment observé dans les données présentes sur la plateforme de bio-informatique de l'institut (actuellement plus de 8000 exomes). Nous avons ensuite adopté une stratégie consistant à analyser des groupes plus restreints d'individus partageant le même phénotype clinique : patients présentant en plus du syndrome d'Evans, d'autres atteintes auto-immunes, par atteinte (symptômes digestifs, diabète) ou globalement. Nos critères de filtre n'ont pas permis d'identifier d'autres gènes candidats acceptables. Enfin, nous avons utilisé les filtres de la figure 3.12, page 91 pour rechercher des gènes candidats famille par famille.

Les gènes candidats identifiés pour les familles 1 à 5 et la famille 10 sont décrits dans les sections suivantes des résultats. Les autres familles analysées sont présentées avec une liste de gènes candidats identifiés à partir des données de la littérature sur leur fonction, les scores prédictifs *in silico* générés par les programmes comme SIFT, Polyphen2 et Mutation Taster dans la section « Résultats complémentaires », page 152.

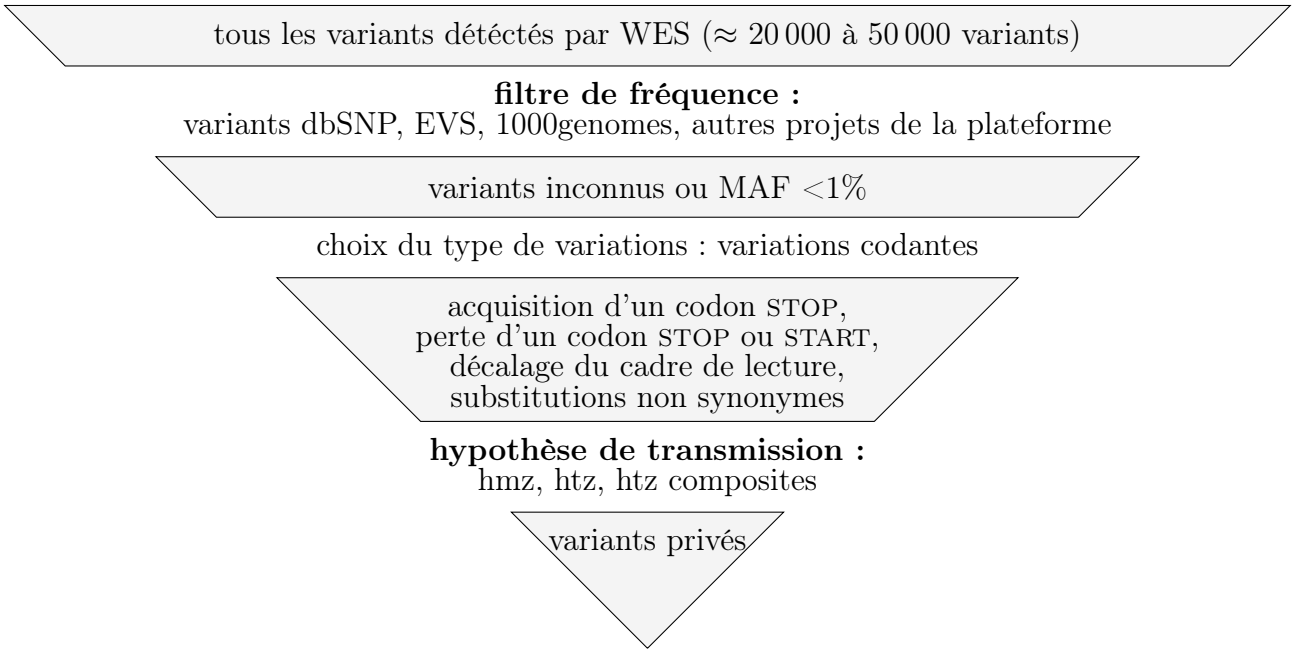
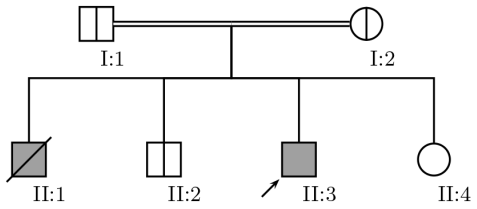
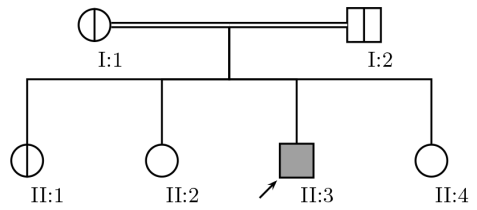
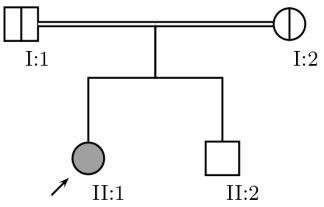
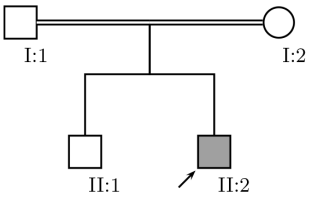
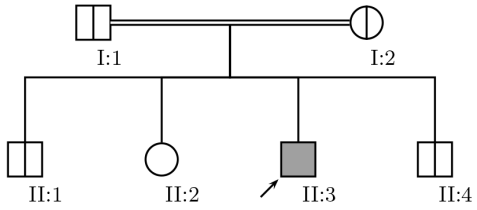
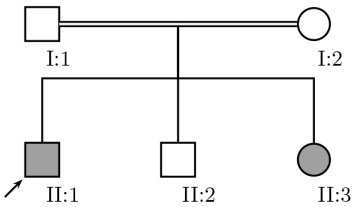
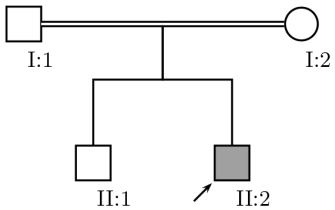
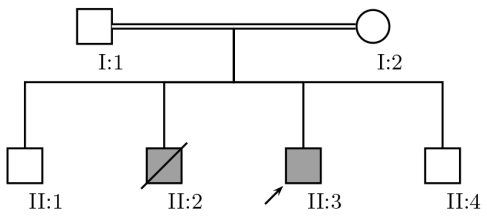
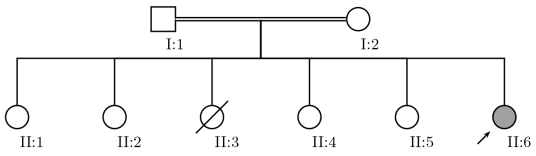
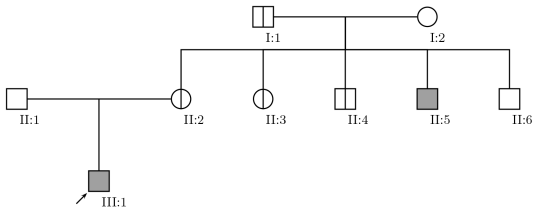
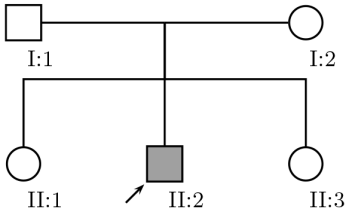
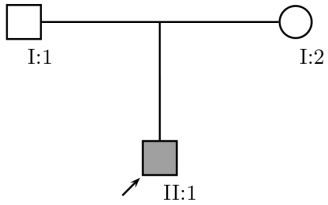


FIGURE 3.12 – **Stratégie de filtrage des variants mis en évidence par séquençage de l'exome.** L'ensemble des variants identifiés lors du séquençage d'exome (WES pour whole exome sequencing) ont été filtrés pour exclure les polymorphismes décrits dans les bases de données publiques (dbSNP, EVS, projet 1000 génomes). Ceux dont la fréquence de l'allèle minoritaire (MAF pour minor allele frequency) était $< 1\%$ ont été conservés. Les variants vus dans d'autres projets de la plateforme de génomique (>8 000 exomes) ont également été exclus. Les insertions, délétions substitutions, mutations décalant le cadre de lecture dans les régions codantes ainsi que les variants des sites d'épissage ont été sélectionnés. En fonction de l'histoire familiale, les variants de transmission homozygote (hmz), hétérozygote (htz) composite ou hétérozygote dominant ont été gardé en priorité. Les variations silencieuses, situées dans des ARN non messagers ou dans les régions non traduites n'ont pas été étudiés.

	Arbre génétique	**Nombre de variants**
Famille 1 consanguinité multi-auto-immunité trio parents-cas index séquencé		6 variants privés homozygotes dans 5 gènes
Famille 2 consanguinité multi-auto-immunité cas index + 2 sœurs séquencés		5 variants privés homozygotes dans 6 gènes
Famille 3 consanguinité multi-auto-immunité cas index séquencé seul		11 variants privés homozygotes dans 10 gènes
Famille 4 consanguinité multi-auto-immunité cas index séquencé seul		15 variants privés homozygotes dans 13 gènes
Famille 5 consanguinité TI cas index séquencé seul		29 variants privés homozygotes dans 29 gènes
Famille 6 consanguinité multi-auto-immunité 2 patients + frère sain séquencés		2 variants privés homozygotes dans 2 gènes
Famille 7 consanguinité multi-auto-immunité cas index, parents, frère séquencés		0 variants privés homozygotes ou hétérozygotes composites

	Arbre génétique	**Nombre de variants**
Famille 8 consanguinité Evans et lymphoprolifération cas index séquencé seul		7 variants privés homozygotes dans 7 gènes 3 variants privés hémizygotes
Famille 9 consanguinité syndrome d'Evans précoce cas index séquencé seul		22 variants privés homozygotes dans 19 gènes
Famille 10 multi-auto-immunité 2 patients séquencés		0 variants privés liés à l'X 32 variants privés hétérozygotes communs dans 31 gènes
Famille 11 cas sporadique ALPS-like trio cas index-parents séquencé		0 variants privés « hétérozygotes composites » 1 variant privé récessif lié à l'X 3 variants privés hétérozygotes *de novo* dans 2 gènes
Famille 12 cas sporadique ALPS-like trio cas index-parents séquencé		0 variants privés « hétérozygotes composites » 2 variants privés liés à l'X dans 2 gènes 2 variants privés hétérozygotes *de novo* dans 2 gènes

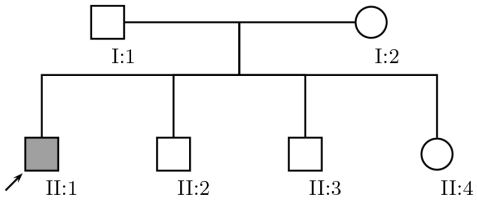
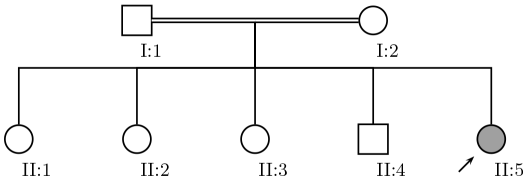
	Arbre génétique	**Nombre de variants**
Famille 13 cas sporadique ALPS-like trio cas index-parents séquencé		2 variants privés hétérozygotes dans 1 gène – hétérozygote composite 4 variants privés liés à l'X dans 4 gènes 2 variants privés hétérozygotes *de novo* dans 2 gènes
Famille 14 consanguinité ALPS-like 5 frères & sœurs séquencés		2 variants privés homozygotes dans 2 gènes 7 variants privés hétérozygotes *de novo* dans 6 gènes

Tableau 3.18 – **Séquençage d'exome : liste des familles concernées et nombre de variants identifiés.** TI thrombopénie immunologique. « multi-auto-immunité » : famille 1 : présence d'un syndrome d'Evans chez le patient II.1 et diabète et arthrite juvénile chez le patient II.3 ; famille 2 : tricytopénie (anémie, thrombopénie, neutropénie), entéropathie et une atteinte pulmonaire interstitielle auto-immunes chez le patient II.3 ; famille 3 : syndrome d'Evans et entéropathie auto-immune chez le patient II.1 ; famille 4 : thrombopénie immunologique et maladie cœliaque chez le patient II.2, dysthyroïdies chez ses tantes maternelle et paternelle ; famille 6 : thrombopénie immunologique avec test de Coombs érythrocytaire direct positif, anticorps anti-nucléaires et anti-thyroperoxydase, psoriasis et atteinte pulmonaire interstitielle chez les patients II.1 et II.2 ; famille 7 : thrombopénie immunologique et anticorps anti-nucléaires chez le patient II.2, diabète de type 1 familial ; famille 10 : syndrome d'Evans et syndrome pulmonaire interstitiel chez le patient III.1.

3.2 Déficit en LRBA (LPS-responsive, Beige-like anchor protein)

En 2012, un nouveau déficit immunitaire associant cytopénies auto-immunes et hypogammaglobulinémie a été décrit. Il est lié à des mutations du gène *LRBA*, de transmission autosomique récessive, entrainant une absence de cette protéine [100, 101, 102]. Compte-tenu des infections ORL et pulmonaires récurrentes également présentées par certains des patients décrits, ce défaut protéique de LRBA semblait être à l'origine de déficits immunitaires communs variables. Au moment où nous commencions ce projet, très peu était connu sur cette protéine, sa fonction, ses partenaires, en dehors de son appartenance à la même famille protéique que LYST, dont l'absence entraine le syndrome de Chédiak-Higashi.

Au cours de l'analyse d'exome, nous avons identifié 3 patients issus de familles consanguines présentant des variants homozygotes dans le gène *LRBA* (Familles 1 à 3). Compte-tenu de la clinique présentée par nos patients et du peu de connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de cette maladie, *LRBA* nous a semblé un gène candidat non seulement valide mais intéressant à explorer. Au cours des recherches secondaires, en explorant de façon ciblée LRBA chez des patients de notre cohorte présentant des similitudes cliniques avec ceux de nos 3 premières familles, nous avons constitué une cohorte de 11 familles avec 18 patients présentant un déficit en LRBA.

Les atteintes cliniques présentées par ces patients élargissent le spectre clinique du déficit décrit en 2012.

Le rôle de LRBA n'étant pas connu, nous avons cherché à progresser sur son implication dans les symptômes auto-immuns présentés par les patients. Notamment, nous avons choisi une double approche visant à mieux localiser la protéine dans la cellule et à identifier des partenaires protéiques.

Dans cette partie, nous décrirons successivement les caractéristiques cliniques et génétiques de notre cohorte de patients présentant un déficit en LRBA, les résultats d'immuno-précipitation couplée à la spectrométrie de masse visant à identifier des partenaires protéiques de LRBA, les résultats de microscopie confocale visant à localiser LRBA dans les sous-compartiments cellulaires.

La famille 1 présente un phénotype clinique particulier et a fait l'objet d'une publication dans Journal of Clinical Immunology. Cet article est présenté à la fin de cette section, page 111 et suivantes. De même, la famille 5 fait l'objet d'une publication soumise sous l'impulsion des cliniciens ayant suivi les patients. Elle est présentée en annexe, page 211 et suivantes.

3.2.1 Déficit en LRBA : description de notre cohorte

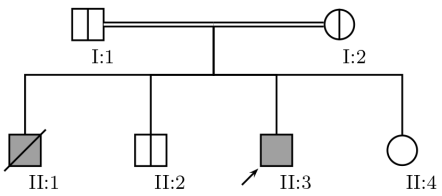
Notre cohorte est constituée de 13 patients dans 10 familles présentant une mutation homozygote ou 2 mutations hétérozygotes composites de *LRBA* associées à un défaut

complet d'expression protéique. Pour 3 familles (4 patients) le diagnostic moléculaire fait suite à l'analyse de l'exome ; pour 5 autres familles (7 patients), l'absence de protéine a été détectée par western blot et le gène séquencé secondairement pour identifier la ou les mutations ; enfin, les 2 autres familles ont fait l'objet de recherches génétiques ciblées (séquençage haut débit d'un panel de gènes). Ces 7 familles ont été explorées en raison de similitudes cliniques présentées par les patients en sus des cytopénies auto-immunes.

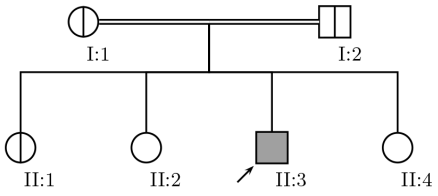
De plus, nous suspectons que 3 apparentés décédés des patients, pour lesquels nous n'avons pas d'ADN mais quelques informations sur la pathologie ayant conduit au décès, étaient également mutés (famille 6, individus II :3 et II :4 et famille 7, un cousin germain du cas index).

Dans la famille 4, l'individu II.1, père du cas index, est malade et porteur d'une part de la délétion transmise à son fils, et d'autre part d'une substitution faux-sens non rapportée dans la littérature. L'espression protéique est diminué mais présente au même niveau que chez la mère, non malade et seulement porteuse de la délétion.

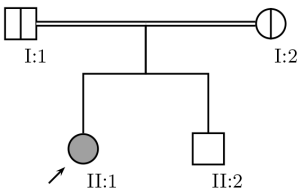
Enfin, nous avons identifié 2 mutations hétérozygotes chez une patiente d'une autre famille, présentant un tableau clinique compatible. Chez cette patiente, l'expression protéique de LRBA est conservée. Un des variants affecte un site d'épissage. Pour autant, l'étude de l'expression de l'ADNc sur plusieurs exons autour de cette variation n'a pas mis en évidence d'anomalie de l'épissage (famille 11). Les figures et tableaux suivants présentent les arbres génétiques (figure 3.13, page 97) et les caractéristiques cliniques (tableau 3.20, page 99) des 11 familles ainsi que les variants identifiés (tableau 3.19, page 98 et schéma 3.14, page 100).



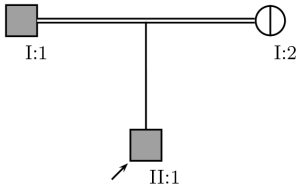
Famille 1 = Famille LRBA 1



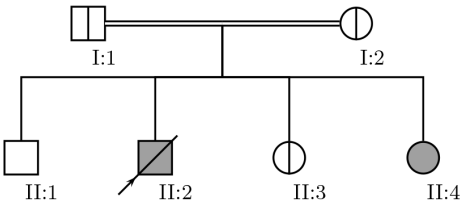
Famille 2 = Famille LRBA 2



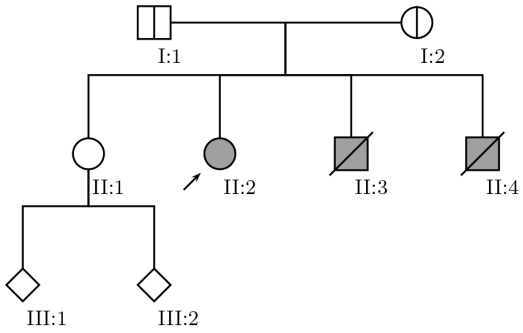
Famille 3 = Famille LRBA 3



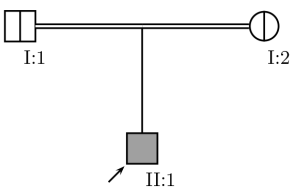
Famille LRBA 4



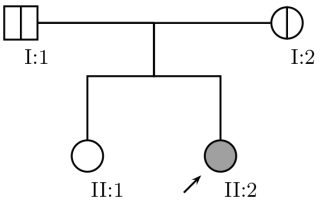
Famille LRBA 5



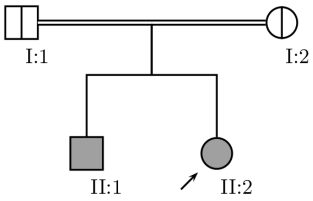
Famille LRBA 6



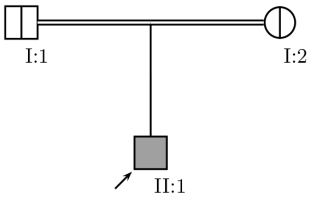
Famille LRBA 7



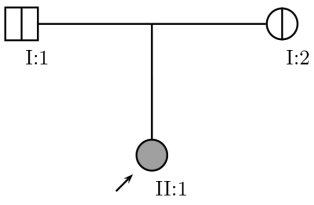
Famille LRBA 8



Famille LRBA 9



Famille LRBA 10



Famille LRBA 11

FIGURE 3.13 – **Familles LRBA : arbres génétiques.** Le cas index est indiqué par la flèche, les individus malades sont en gris, les individus hétérozygotes sains sont signalés par une barre verticale. La consanguinité est indiquée par la double barre horizontale entre les parents. La ségrégation familiale des mutations a été étudiée pour tous les individus représentés sauf : famille 6, individus II.3 et II.4 (décédés, clinique fortement évocatrice, pas de matériel), individus III.1 et III.2 (pas d'informations cliniques et pas de matériel) ; familles 8, 10 et 11, pas de matériel disponible pour les parents.

		Mutation : nomenclatures				
Famille	Patients	séquence codante (CDS)	Protéine	Localisation	Origine	Allèles
LRBA 1	II.1et II.3	c.7620_7621insT	p.A2541Yfs*2	exon 51	bi-parentale	homozygote
LRBA 2	II.3	c.2450+1C>T	p.E789fs*4	intron 20	bi-parentale	homozygote
LRBA 3	II.1	c.4522C>T	p.Q1508*	exon 28	bi-parentale	homozygote
LRBA 4	II.1	c.5769_5775delGTATTCT	p.Q1923fs*14	exon 37	bi-parentale	homozygote
	I.1	c.5769_5775delGTATTCT	p.Q1923fs*14	exon 37		hétérozygote
	I.1	c.6587G>A	p.R2196H	exon 44		hétérozygote
LRBA 5	II.2 et II.4	c.6842delT	p.Y2288Mfs*29	exon 46	bi-parentale	homozygote
LRBA 6	II.2 : confirmé	c.2258+3dupA	p.V723_K753del	intron 18	maternelle	hétérozygote
	II.3 et II.4 : supposé	c.1896C>T	p.R633*	exon 14	paternelle	hétérozygote
LRBA 7	II.1	c.1691delT	p.L564Rfs*25	exon 13	bi-parentale	homozygote
LRBA 8	II.1	c.3985_3986delGA	p.D1329Ifs*17	exon 24		hétérozygote
	II.1	c.8050+4A>G	?†	intron 54		hétérozygote
LRBA 9	II.1 et II.2	bornage en cours	p.R722_L1723del	intron 17- intron 30	bi-parentale	homozygote
LRBA 10	II.1	c.1748delC	p.P583Qfs*6	exon 13	bi-parentale	homozygote
LRBA 11	II.1	c.5030 A>G (rs17027133)	p.N1677S	exon 30		hétérozygote
	II.1	c.6874-3G>A	?†	intron 45		hétérozygote

Tableau 3.19 – **Tableau récapitulatif des mutations de *LRBA* identifiées.** La nomenclature CDS est sur le transcrit LRBA-002 ENST0000357115 (Ensembl), NM_006726 ou CCDS3773 et sur la forme protéique correspondante. †Famille 8 : l'étude du cDNA, permettant de déduire la séquence protéique théorique correspondant à la varaiation d'épissage est en cours. Famille 11 : l'étude d'une partie du cDNA incluant les exons 44 à 49 n'a pas mis en évidence de variant d'épissage.

Auto-immunité (15/18)	AHAI (9) TI (10) NAI (3) Entéropathie (10) Diabète de type I (5) Uvéïte (1) Thyroïde (6) Poumons : atteinte interstitielle granulomateuse (7) Peau : vitiligo (1), eczéma (2) Arthrite (2)
Lymphoprolifération (10)	Splénomégalie (9) Hépatomégalie (4) Adénopathies (7)
Infections récurrentes (6) Hypogammaglobulinémie (6)	ORL (3) Respiratoires (5) Ostéo-articulaires (1)
Cancers (3)	Lymphome (2) Estomac (1)
Autres	Retard de croissance (7) Ostéoporose (2)
Auto-anticorps	Anti-GR (6) Anti-plaquettes (3) Anti-neutrophiles (1) Anti-TPO (3), anti-TG (3), anti-TSHR (2) Anti-ilôts de Langerhans (1) Anti-nucléaires (3/6) Anti-goblet cells (1/9), anti-AIE75 (0/6), anti-entérocytes (0/9) Anti-muscle lisse (1)

Tableau 3.20 – **Résumé des atteintes cliniques et biologiques présentées par les patients déficitaires en LRBA.** AHAI anémie hémolytique auto-immune, TI thrombopénie immunologique, NAI neutropénie auto-immune, GR globules rouges, TPO thyroperoxydase, TG thyroglobuline, TSHR récepteur de l'hormone de stimulation de la thyroïde.

Les mutations identifiées sont réparties dans tout le gène (voir schéma 3.14, page 100). Elles entrainent toutes l'apparition d'un codon STOP prématuré, sauf celles de la famille LRBA11 (substitution codante et variant d'épissage), celle de l'individu I.1 de la famille LRBA4 (substitution) et la grande délétion de la famille LRBA9, qui ne décale pas le cadre de lecture.

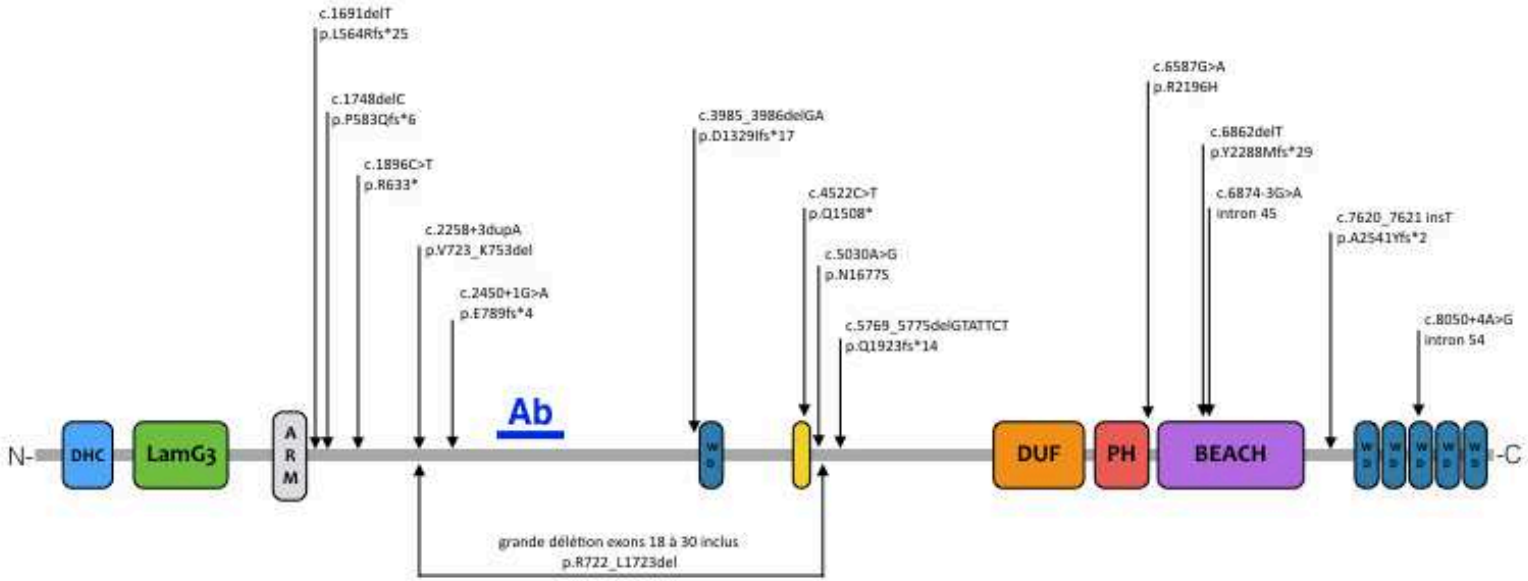


FIGURE 3.14 – **Schéma localisant les mutations de *LRBA* identifiées.** La nomenclature est celle du transcrit LRBA-002 ENST0000357115 (Ensembl), NM_006726 ou CCDS3773 et sur la forme protéique correspondante. Les domaines protéiques identifiés sont représentés : domaine cytochrome c di-hème (DHC, en bleu) ; domaine Laminine G (LamG3) ; répétitions de type armadillo (ARM) ; domaine transmembranaire (en jaune) ; DUF domain of unknown function (en orange) ; domaine d'homologie à la plekstrine (PH, en rouge) ; domaine BEACH (en violet) ; répétitions WD40 (WD, en bleu). La barre bleue Ab représente la portion de la protéine théoriquement reconnue par l'anticorps utilisé.

Les principales atteintes cliniques sont les atteintes auto-immunes et lymphoprolifératives. Nous avons également noté un retard de croissance chez un tiers des patients, sans toujours pouvoir distinguer s'il est lié à la maladie ou aux traitements reçus – corticoïdes, notamment. Les infections chroniques ou récurrentes et les déficits humoraux sont moins fréquents (voir tableau 3.20, page 99).

Lorsque nous disposions de cellules des patients et des membres de leur famille, nous avons étudié l'expression de la protéine LRBA par western blot (WB) à partir d'extraits protéiques totaux de cellules T activées. LRBA n'est pas détectée pour les patients ayant des mutations ayant pour conséquence un STOP à l'état homozygote ou hétérozygote composite. Pour la famille LRBA9, les épitopes reconnus par les anticorps disponibles étant situés dans la zone délétée, nous ne savons pas s'il existe une protéine résiduelle. Un exemple des résultats obtenus par WB pour la famille LRBA1 (famille 1) est présenté dans l'article 1, figure 1, page 111 et suivantes.

3.2.2 Partenaires protéiques de LRBA

Au début de ce projet, les rôles de la protéine LRBA étaient inconnues. Afin de progresser sur les fonctions de LRBA dans les cellules normales, et les mécanismes conduisant aux symptômes et aux anomalies des lymphocytes T régulateurs observés chez les patients déficients en LRBA, nous avons recherché des partenaires de LRBA par une approche couplant immuno-précipitation (IP) et spectrométrie de masse (MS pour mass spectrometry). Nous avons réalisé cette technique sur des lymphocytes B contrôles immortalisés par l'EBV (B-EBV), des cellules HeLa et des lymphocytes T activés contrôles. Nous avons analysé les résultats en appliquant les filtres résumés dans la figure 3.15, page 101.

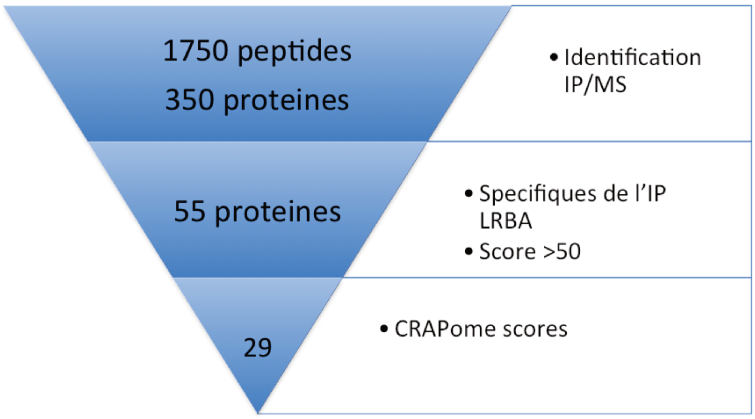


FIGURE 3.15 – **Filtrage des données IP LRBA/MS.** Dans les B-EBV, les 350 protéines identifiées par MS suite à l'IP sont filtrées selon un critère quantitatif : score supérieur à 50. En comparant les protéines trouvées dans l'échantillon issu de l'IP LRBA et celles identifiées dans l'IP non spécifique, on conserve uniquement les protéines spécifiquement retenues par LRBA. L'étude des bases de données publiques colligeant les principaux « faux positifs » de l'IP/MS permet d'éliminer d'autres probables contaminants (CRAPome [195]).

Dans les cellules B-EBV, à partir de 350 protéines identifiées, 29 sont des partenaires très probables de LRBA. En annexe, la figure 5.37, page 231 présente la répartition de

ces 29 protéines selon leurs localisations cellulaires, leurs fonctions moléculaires connues et les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Dans les HeLa, 158 protéines ont été identifiées par MS dont 14 à confirmer. Deux étaient communes avec celles identifiées dans les B-EBV. Enfin, à partir des protéines totales extraites des lymphocytes T activés, 77 protéines ont été identifiées et 7 sont à confirmer.

A l'issue de ce filtrage, nous avons étudié la littérature concernant les partenaires potentiels restants afin d'identifier les plus pertinents par rapport à la clinique du déficit en LRBA. Ainsi, parmi les 29 protéines identifiées dans les B-EBV et listées dans le tableau 3.21, page 103, nous en avons choisi 7 particulièrement intéressantes.

MVP et PARP4 sont des composants des « vault particles », organelles intracellulaires creuses d'environ 52 par 37nm, pouvant s'ouvrir et se fermer et possiblement contenir d'autres molécules. MVP (pour Major Vault Protein, MIM605088) et PARP4 (Poly ADP-ribose polymerase 4, MIM607519) en sont les composants principaux, associés à un petit ARN spécifique (VTRNA1-1) et TEP1. Si le rôle de ces urnes intracellulaires n'est pas bien connu, nous avons retenu ces protéines car les 2 ont été identifiée après IP/MS dans les B-EBV et les cellules HeLa.

TAP2 pour antigen peptide transporter 2 (MIM170261), associé à TAP1 forme le système de transport des peptides du cytosol vers le réticulum endoplasmique et de leur chargement sur les molécules de classe I du CMH pour présentation aux lymphocytes. LRBA pourrait participer à la régulation de ce système via son interaction avec TAP2.

N° d'accès	Nom	MIM	Score MS	CRAPome
P50851	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (LRBA)	606453	5097,43	5,4
Q9BZQ6	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3 (EDEM3)	610214	80,14	non présent
Q9Y6Y9	Lymphocyte antigen 96 (Ly96, MD2)	605243	54,64	non présent
P01605	Ig kappa chain V-I region Lay		53,14	non présent
P01611	Ig kappa chain V-I region Wes		70,92	non présent
P80748	Ig lambda chain V-III region LOI		116,82	non présent
A8MVU1	Putative neutrophil cytosol factor 1C		96,20	non présent
Q14764	Major vault protein (MVP, LRP)	605088	665,92	12,5
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5 (TXND5)		108,20	1,7
Q9BWS9	Chitinase domain-containing protein (CHID1, SICLP)	615692	80,57	1,8
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4 (PARP4, vPARP, ADPRTL1)	607519	61,89	1,6
Q53GQ0	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12 (DHB12)		120,47	1,9
Q9HCN8	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 (SDF2L)	607551	140,14	2,2
Q03519	Antigen peptide transporter 2 (TAP2, RING11, ABCB3, APT2, PSF2)	170261	69,42	1
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase (PBEF1, Vistafin)	608764	69,73	3,5
Q13148	TAR DNA-binding protein 43 (TADBP)	605078	56,70	3
Q15293	Reticulocalbin-1 (RCN1)	602735	54,87	2,3
Q99943	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha (PLCA, LPAATα)	603099	52,55	1,8
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide–protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	602202	57,86	3,6
O95864	Fatty acid desaturase 2	606149	50,12	1
Q6P5R6	60S ribosomal protein L22-like 1		61,14	1,8
P18085	ADP-ribosylation factor 4 (ARF4)	601177	63,09	3
O43808	Peroxisomal membrane protein PMP34	606795	80,42	1,7
P61009	Signal peptidase complex subunit 3 (SPCS3)		53,41	1,4
P46821	Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	157129	174,32	19
O14980	Exportin-1 (XPO1, CRM1)	602559	66,21	4
P17480	Nucleolar transcription factor 1 (UBF1)	600673	79,08	9,8
O75340	Programmed cell death protein 6 (PDCD6, ALG2)	601057	71,15	4,2
P09211	Glutathione S-transferase P (GST3)	134660	55,00	6,9

Tableau 3.21 – **Liste des 29 partenaires protéiques de LRBA issus de l'analyse des données d'IP/MS dans des B-EBV contrôles.** Les numéros d'accès des banques de données publiques (type UniProt), les noms des protéines en clair et les sigles associés, le numéro d'accès dans la banque Online Mendelian Inheritance in Man (MIM) sont indiqués. Les scores de qualité de spectrométrie de masse (score MS) et la moyenne de score du CRAPome pour cette protéine lorqu'elle est répertoriée dans la base des contaminants sont également notés. A titre comparatif, la première ligne reprend les mêmes informations pour LRBA.

EDEM3 pour endoplasmic reticulum degradation-enhancing α-mannosidase protein-like 3 (MIM610214) fait partie d'un groupe de protéines accélérant la dégradation des glycoprotéines mal pliées ou mal assemblées dans le réticulum endoplasmique. Elle participe au contrôle qualité des protéines sortant du réticulum endoplasmique. En imaginant que LRBA ait une action activatrice, on conçoit qu'en l'absence de cette dernière, une maladie auto-immune puisse émerger par stress du RE par accumulation de protéines mal assemblées ou mise en circulation de protéines anormales pouvant déclencher une réaction immunitaire dirigée contre des peptides du soi.

PDCD6 pour programmed cell death 6 ou ALG-2 (MIM601057), est une protéine dépendante du Ca^{2+} nécessaire à l'apoptose induite par le TCR, FAS, les gluco-corticoïdes et les dommages à l'ADN [196]. Elle se déplace de la membrane plasmique vers le cytosol pendant l'activation de l'apoptose par FAS, subit une coupure N-terminale et se détache de FAS après activation. Elle est induite en réponse à p53 [197]. Elle joue un rôle dans le transport dépendant du calcium entre l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique [198]. Elle est également un facteur pronostique indépendant dans de nombreux cancers. Son interaction avec LRBA pourrait intervenir sur une ou plusieurs de ces fonctions.

LY96 pour Lymphocyte Antigen 96 (MIM605243), aussi appelée MD2 est un co-récepteur, nécessaire pour la reconnaissance du LPS par TLR4 [199]. MD2 pourrait interagir avec LRBA en aval de la stimulation de TLR4 et intervenir dans l'augmentation de l'expression de LRBA après une stimulation par le LPS observée par Kerr *et al.* [99].

MAP1B pour microtubule-associated protein 1B (MIM157129) appartient à la famille des protéines associées aux microtubules, qui ont des fonctions de régulation, de support et de guidage des protéines dans la cellule. Bien que la littérature fasse plutôt état de son rôle dans les cellules neuronales, nous avons conservé ce candidat en raison d'un score très élevé et de sa présence spécifique.

Nous avons confirmé l'interaction de LRBA et MVP par co-IP révélée par WB et confirmé la colocalisation de MVP et LRBA par microscopie confocale (voir figure 3.17, page 107. L'interaction entre LRBA et les 6 autres protéines reste à confirmer.

Lors de ces choix des partenaires potentiels, la localisation dans les compartiments cellulaires des différentes protéines est un facteur important à prendre en compte. Celle de LRBA étant mal définie, nous l'avons étudiée en parallèle.

3.2.3 Localisation sub-cellulaire de LRBA

Nous avons étudié la localisation sub-cellulaire de LRBA en microscopie confocale, sur des lymphocytes T activés de contrôles. Nous avons tout d'abord vérifié la spécificité de notre anticorps en effectuant un marquage en parallèle sur des lymphocytes T activés contrôles et des lymphocytes T activés d'un patient n'exprimant pas LRBA (voir figure annexe 5.38, page 232).

Nous avons successivement marqué les endosomes, les lysosomes, les mitochondries, l'appareil de golgi, le réseau microtubulaire et le réticulum endoplasmique. Il n'y avait pas de co-localisation entre LRBA et la calréticuline, la giantine, Lamp2, GRIM19 ou l'α-tubuline. LRBA n'est donc pas localisée dans le réticulum endoplasmique, les lysosomes, les mitochondries, l'appareil de golgi (cis et médian), ni les micro-tubules. En ce qui concerne les endosomes et le réseau trans-golgien, les résultats sont moins évidents et suggèrent une co-localisation partielle. L'expérience doit être répétée, notamment sur d'autres types cellulaires pour pouvoir conclure. Ces résultats sont représentés dans la figure 3.16, page 106.

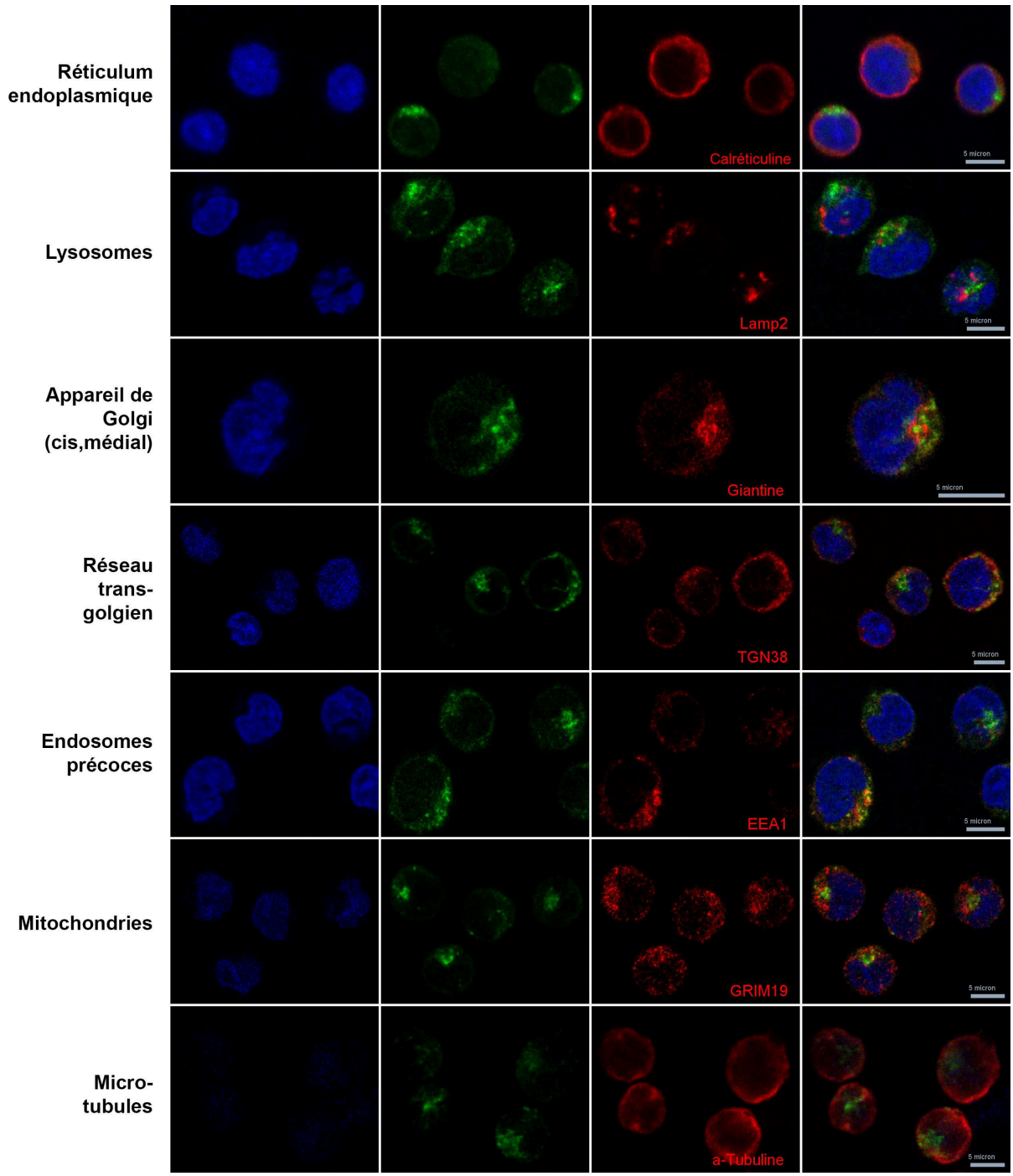


FIGURE 3.16 – **Localisation sub-cellulaire de LRBA.** Images de microscopie confocale après fixation et marquage de lymphocytes T activés contrôles. LRBA est représenté en vert, les noyaux sont en bleu, les molécules constitutives des différents compartiments cellulaires étudiés sont marquées en rouge : calréticuline pour le réticulum endoplasmique (RE), Lamp2 pour les lysosomes, Giantine pour l'appareil de golgi (partie cis et médiane), TGN38 pour le trans-golgi, EEA1 pour les endosomes, GRIM19 pour les mitochondries et α-tubuline pour les micro-tubules.

Compte-tenu du chevauchement des spectres cliniques, nous avons également marqué simultanément LRBA et CTLA-4 afin de rechercher leur éventuelle co-localisation. Nous avons mis en évidence une co-localisation partielle de LRBA et CTLA-4. De même, LRBA appartenant à la même famille que LYST, nous avons recherché une éventuelle

co-localisation de LRBA et de la perforine. Ces deux protéines ne semblent pas être co-localisées dans nos conditions expérimentales. Enfin, afin de confirmer les partenaires identifiés en IP/MS, nous avons cherché à mettre en évidence une co-localisation entre LRBA et les protéines identifiées par cette première technique. Nous avons pu mettre en évidence une co-localisation entre MVP et LRBA. Ces résultats sont présentés dans la figure 3.17, page 107.

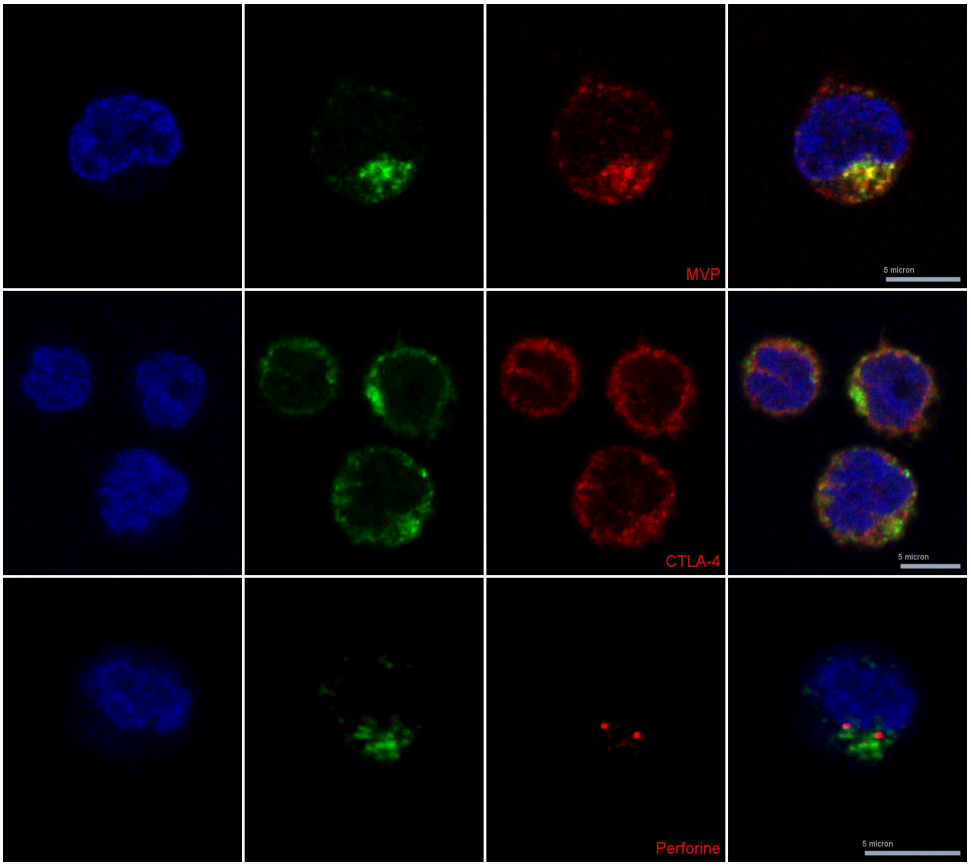


FIGURE 3.17 – **Recherche d'une éventuelle co-localisation de LRBA avec CTLA-4, MVP et la perforine en immuno-fluorescence.** Images de microscopie confocale après fixation et marquage de lymphocytes T activés contrôles. De haut en bas, marquage de LRBA et MVP, LRBA et CTLA-4 et LRBA et perforine. LRBA est représenté en vert, les noyaux sont en bleu, CTLA-4, MVP et la perforine sont marquées en rouge.

Devant l'aspect polarisé du marquage LRBA dans les cellules activées, nous nous sommes demandés si la localisation de LRBA changeait lors d'une stimulation du TCR. Nous avons donc réalisé des marquages de LRBA et de molécules recrutées au niveau de la synapse immunologique lors de la formation et de l'activation de conjugués B et T (LAT et LCK). Nous avons également mesuré le pourcentage de cellules dans lesquelles LRBA est polarisé vers la synapse immunologique. LRBA n'est pas recrutée au niveau de la synapse immunologique mais est polarisée en direction de cette synapse et pourrait donc être impliquée dans la signalisation en aval du TCR. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec A. Zucchetti (équipe de C. Hivroz, INSERM U932, Institut Curie). La figure 3.18, page 108 présente les images des marquages et le tableau 3.22, page 109 la quantification de la polarisation.

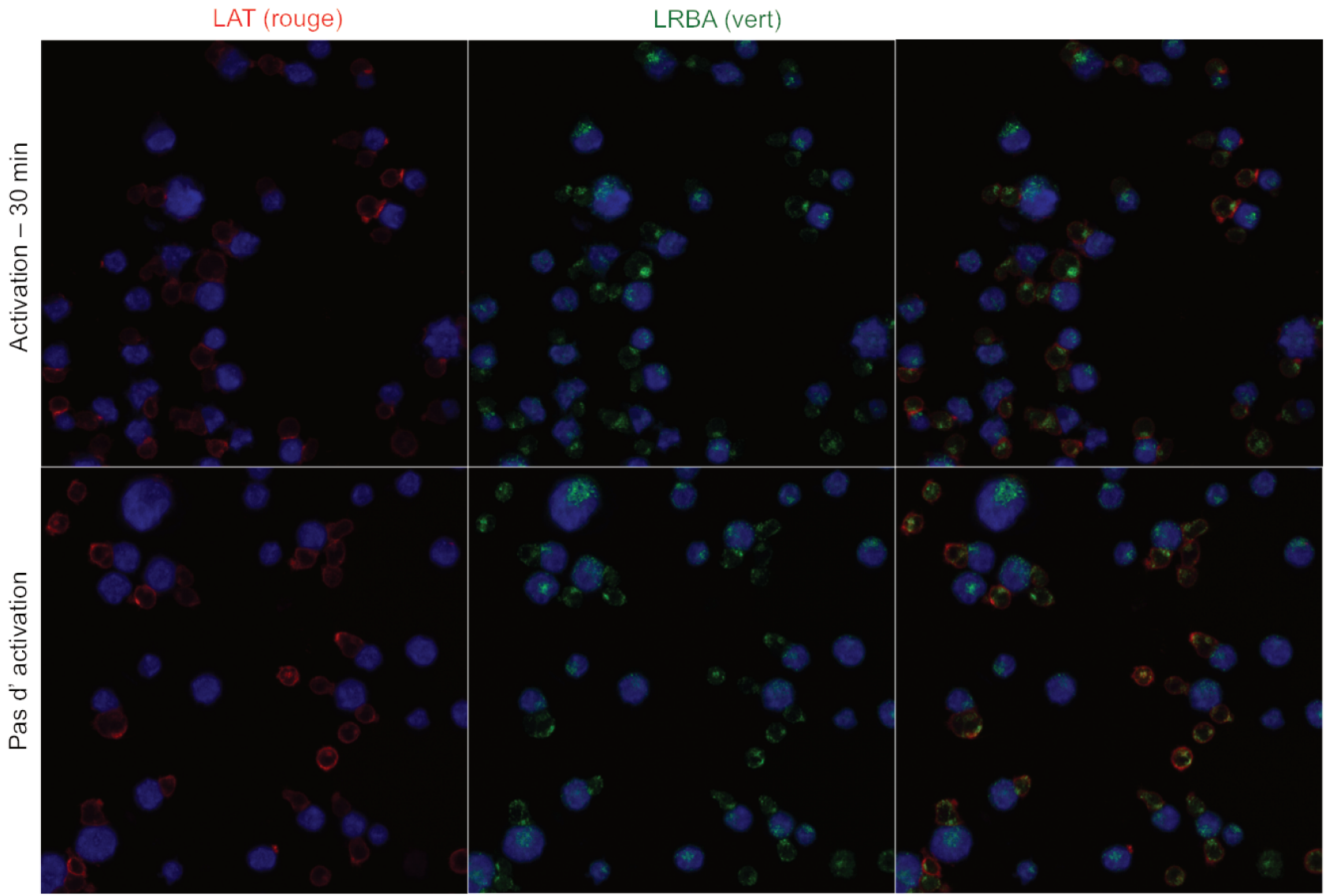


FIGURE 3.18 – **LRBA est polarisé vers la synapse immunologique.** Images de microscopie confocale après formation de conjugués B (cellules Raji, marquées en bleu) et T (cellules jurkat). En l'absence d'activation, LAT est réparti sous la membrane cellulaire et LRBA est polarisé de façon aléatoire dans la cellule. Après activation par la SEE pendant 30 minutes, LAT est polarisé au niveau de la synapse immunologique à l'interface entre la cellule B et la cellule T. LRBA, toujours polarisé, ne co-localise pas avec LAT au niveau de la synapse mais est cette fois majoritairesment situé à proximité. LRBA est représenté en vert ; LAT, recrutée à la synapse immunologique est marquée en rouge.

	% de cellules où LAT est polarisé à la synapse	% de cellules où LRBA est polarisé vers la synapse
Pas d'activation	9%	21%
Activation SEE – 30 minutes	68%	52%

Tableau 3.22 – **LRBA est polarisé vers la synapse immunologique.** En l'absence d'activation, LAT est réparti sous la membrane cellulaire et LRBA est polarisé de façon aléatoire dans la cellule. Après activation par la SEE pendant 30 minutes, LAT est polarisé au niveau de la synapse immunologique à l'interface entre la cellule B et la cellule T. LRBA est cette fois majoritairement polarisé en direction de la synapse immunologique. Les pourcentages indiqués ont été calculés sur une centaine de cellules dans chaque condition expérimentale.

3.2.4 Etude de l'apoptose dans le déficit en LRBA

Parmi les mécanismes impliqués dans l'apparition d'auto-immunité, les défauts d'apoptose permettent de contourner la plupart des points de contrôle de la tolérance au soi. Aussi, nous avons étudié différentes voies d'apoptose pour le patient II.3 et des membres de la famille 1. Nous avons exploré différentes voies d'apoptose sur les lymphocytes T du patient activés *in vitro*. Nous avons induit l'apoptose des cellules par le récepteur de mort Fas – à l'aide d'un anticorps agoniste ou de son ligand naturel Fas ligand –, la re-stimulation du TCR (AICD) ou le sevrage en facteurs de croissance (IL-2). Nous avons testé les voies dépendantes et indépendantes des caspases. A 24h, nous avons mesuré la proportion de cellules en apoptose par l'incorporation de l'iodure de propidium observée en cytométrie en flux. Ces expériences ont été réalisées 4 fois. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de la proportion de cellules apoptotiques entre les cellules du patient et celles d'un contrôle, dans les différentes conditions testées. La figure 3.19, page 110 représente l'une de ces expériences pour une partie des conditions testées.

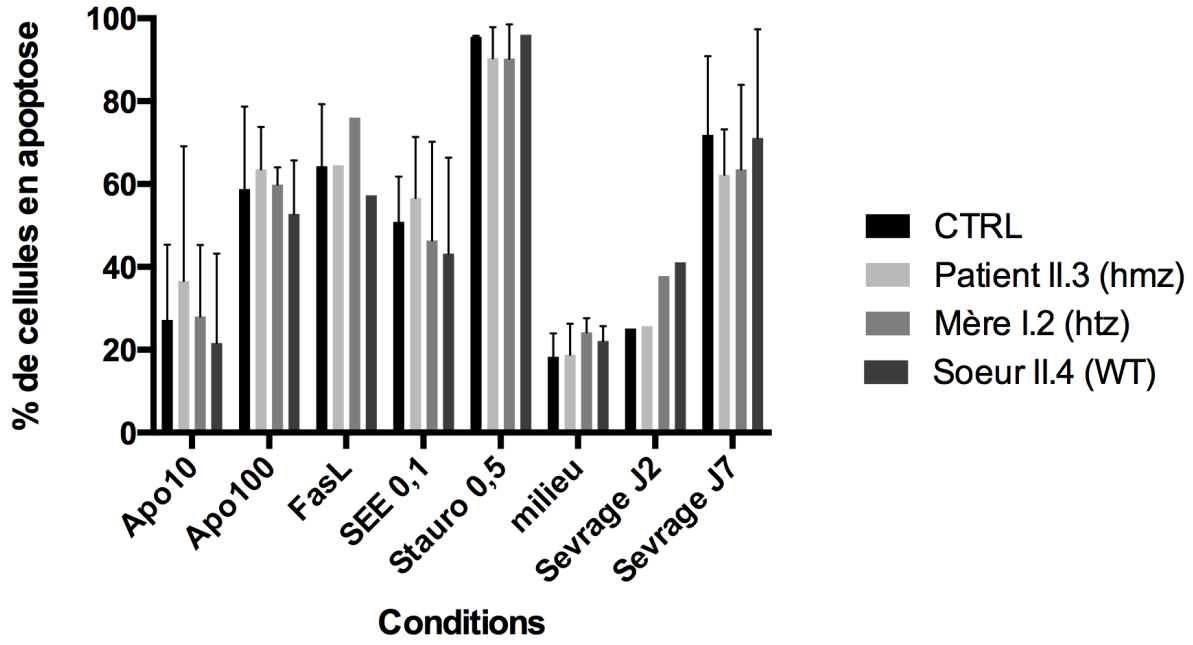


FIGURE 3.19 – **Etude *in vitro* de l'apoptose dans la famille LRBA1.** comparaison du pourcentage de cellules T activées en apoptose 24h après stimulation. La voie FAS a été activée par un anticorps agoniste (Apo) à différentes doses (en ng/mL) ou par son ligand naturel fas ligand produit par des lignées cellulaires (FasL). L'apoptose a été induite par restimulation du TCR (SEE 0,1ng/mL). L'apoptose est également mesurée après 2 et et 7 jours de sevrage (J2, J7) en facteurs de croissance (IL-2). Est également représentée la mesure de l'apoptose par les voies dépendantes et indépendantes des caspases, induite par la staurosporine à 0,5μg/ml (stauro). Le patient homozygote (hmz), sa mère hétérozygote (htz), sa sœur non mutée (WT) ainsi qu'un contrôle extra-familial ont été testés.

3.2.5 Article 1 : Déficit en LRBA associé à une polyarthrite précoce chronique érosive

Article publié :
LRBA deficiency with autoimmunity and early onset chronic erosive polyarthritis. Lévy E, Stolzenberg MC, Bruneau J, Breton S, Neven B, Sauvion S, Zarhrate M, Nitschké P, Fischer A, Magérus-Chatinet A, Quartier P, Rieux-Laucat F.Clin Immunol. 2016 Apr 5. pii : S1521-6616(16)30034-1. doi : 10.1016/j.clim.2016.03.006.

Cet article décrit les deux patients de la famille LRBA1. Il détaille leur présentation clinique, les explorations radiologiques (figure 2B), histologiques et biologiques réalisées (tableaux 1 et supplémentaire 1) et les résultats du séquençage d'exome. L'objet est de mettre en valeur la présentation originale du patient II.3, incluant diabète, polyarthrite et uvéite à partir de l'âge de 20 mois, sans cytopénies. A ce jour, la polyarthrite chronique n'a pas été décrite chez les patients présentant un déficit en LRBA. Son frère ainé présentait un tableau différent, avec un syndrome d'Evans précoce et sévère ayant conduit à son décès par hémorragie cérébrale à l'âge de 8 ans et demi. Les figures et tableaux présentent l'arbre de la famille (figure 1A), la stratégie de filtrage des données d'exome (figure 1B), les variants identifiés selon les hypothèses de transmission (tableaux supplémentaires 2 et 3), le séquençage de la mutation du patient identifiée dans *LRBA* (figure 1C), le WB LRBA des différents membres de la famille (figure 1D), le marquage de LRBA sur des tissus (figure 2A), l'étude des lymphocytes T régulateurs en cytométrie en flux (figure supplémentaire). Le séquençage de l'exome a également permis de mettre en évidence une autre maladie génétique de transmission autosomique récessive chez le patient II.3.

Principaux résultats et points de discussion :

Ce travail élargit le spectre clinique du déficit en LRBA en décrivant pour la première fois un patient présentant une polyarthrite juvénile sévère et précoce au premier plan dans la présentation de sa maladie. L'arthrite juvénile idiopathique est la première maladie rhumatologique de l'enfant et ses causes pour la plupart inconnues. Le déficit en LRBA pourrait en être une étiologie. L'analyse d'exome de cette famille a également permis d'identifier une mutation homozygote du gène *ABBC6*, responsable chez le patient II.3 d'un pseudoxanthome élastique. La mutation identifiée a déjà été rapportée précédemment. Ce résultat confirme s'il était nécessaire, que dans les familles consanguines, plusieurs maladies génétiques peuvent apparaitre, y compris chez un même individu. Enfin, cette étude confirme que des défauts complets de LRBA peuvent s'exprimer différemment cliniquement, y compris au sein d'une même famille. Cette grande variabilité clinique, déjà décrite pour les déficits en LRBA est également constatée chez les patients présentant des mutations de CTLA-4 ou des mutations gain de fonction de STAT3, pathologies dont les spectres cliniques sont chevauchants avec le déficit en LRBA. Cela nous fait suspecter l'action de facteurs additionnels, possiblement génétiques, restant à identifier. Nous recommandons donc de rechercher des mutations dans ces gènes récemment impliqués dans des déficits immunitaires avec auto-immunité (*LRBA*, *CTLA-4*, *STAT3*) face à des familles dans lesquelles un ou plusieurs patients présentent des atteintes auto-immunes multiples, incluant les cytopénies et les arthrites juvéniles, notamment.

LRBA deficiency with autoimmunity and early onset chronic erosive polyarthritis

Author names and affiliations:

Eva Lévy [a, b], Marie-Claude Stolzenberg [a, b], Julie Bruneau [b, c, d], Breton Sylvain [e], Bénédicte Neven [a, b, f], Sylvie Sauvion [g], Mohammed Zarhrate [h], Patrick Nitschké [b, i], Alain Fischer [b,f,j], Aude Magérus-Chatinet [a,b], Pierre Quartier [a,b f], and Frédéric Rieux-Laucat [a,b]

[a] INSERM UMR 1163, Laboratory of Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases, 75015 Paris, France

[b] Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France

[c] Pathology department, Necker-Enfants malades university hospital, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

[d] INSERM UMR 1163, Laboratory of molecular mechanisms of hematologic disorders and therapeutic implications, 75015 Paris, France

[e] Paediatric radiology department, Necker-Enfants malades university hospital, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

[f] Paediatric immuno-haematology and rheumatology department, Necker-Enfants malades university hospital, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

[g] Paediatric department, Jean-Verdier hospital, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, 93140 Bondy, France

[h] Genomic Platform, INSERM UMR 1163, Paris Descartes Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France

[i] INSERM UMR 1163, Bioinformatics Department, Institute Imagine, 75015 Paris, France.

[J] INSERM UMR 1163, Imagine Institute, 75015 Paris, France

Corresponding author:

Frédéric Rieux-Laucat, INSERM UMR 1163, Institut Imagine, 24 boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France. Phone: +33.1.42.75.42.00; Fax: +33.1.42.75.42.21; E-mail: frederic.rieux-laucat@inserm.fr

Abstract

LRBA (lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein) deficiency associates immune deficiency, lymphoproliferation, and various organ-specific autoimmunity. To date, prevalent symptoms are autoimmune cytopenias and enteropathy, and lymphocytic interstitial lung disease.

In 2 siblings from a consanguineous family presenting with early onset polyautoimmunity, we presumed autosomal recessive inheritance and performed whole exome sequencing.

We herein report the first case of early-onset, severe, chronic polyarthritis associated with LRBA deficiency. A novel 1bp insertion in the *LRBA* gene, abolishing protein expression, was identified in this family. Among the 2 brothers homozygous for *LRBA* mutation, one developed Evans syndrome and deceased at age 8.5 from complications of severe autoimmune thrombocytopenia. His brother, who carried the same homozygous *LRBA* mutation, early-onset erosive polyarthritis associated with chronic, bilateral, anterior uveitis and early onset type 1 diabetes mellitus.

This report widens the clinical spectrum of LRBA deficiency and, in lights of the variable phenotypes described so far, prompts us to screen for this disease in patients with multiple autoimmune symptoms in the family, including severe, erosive, polyarticular juvenile arthritis.

Highlights

- New LRBA null mutation leading to variable autoimmunity within a single pedigree
- LRBA deficiency could cause juvenile idiopathic arthritis
- Screen for LRBA deficiency in families with polyarthritis and polyautoimmunity

Keywords

LRBA deficiency, autoimmunity, juvenile idiopathic arthritis, primary immune deficiency, exome sequencing

1. Introduction

LRBA (lipopolysaccharide-responsive, Beige-like anchor protein) deficiency was first described in 2012 as a common variable immune deficiency associated with autoimmune cytopenias of autosomal recessive genetic inheritance. Initially reported patients shared recurrent respiratory infections, hypogammaglobulinemia and a decrease of memory switched B cells [1-3]. Subsequent reports progressively extended the disease's clinical spectrum [4-6], and to date, prevalent symptoms are autoimmune cytopenias and enteropathy, and lymphocytic interstitial lung disease[7]. The mechanism of the disease, though not totally elucidated, has been recently linked to an interaction with CTLA-4 [8].

We herein report a consanguineous family with 2 affected brothers, presenting with different clinical features, yet both carrying a novel 1-base pair (bp) insertion at homozygous state in the *LRBA* gene.

2. Methods

2.1. Patients

As detailed in the Results section, the index case was a child followed for early-onset, insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile polyarthritis and uveitis. His brother had been diagnosed with Evans syndrome several years before. The parents were healthy first cousins and there were 2 healthy siblings.

Written informed consent (parental consent for minors) was obtained from all participants. The study and protocols conform to the 1975 Declaration of Helsinki and were approved by the Comité de protection des personnes Ile de France II and the French advisory committee on data processing in medical research.

2.2. Genetic analyses

DNA samples were collected from peripheral blood from patients, family members and controls. Agilent SureSelect libraries were prepared from 3 µg of genomic DNA sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator as recommended by the manufacturer.

2.2.1. Exome Sequencing

Exome libraries were prepared using the 50 Mb SureSelect Human All Exon kit V3 (Agilent Technologies). Paired-end 75+35 reads were generated using a SOLiD5500XL (Life technologies) and mapped using LifeScope (Life Technologies). The mean depth of coverage obtained for each sample was >=70X, with >=83% of the exome covered at least at 15X. SNPs and indel calling were performed using GATK tools and an in-house software (PolyWeb) was used to filter the variants.

2.2.2. Sanger sequencing

All variants found by WES were validated on another DNA sample. *LRBA* exons were amplified by PCR from genomic DNA according to standard protocols. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. The PCR products were sequenced in both directions and analyzed with ApE- A plasmid Editor v2.0.45.

2.3. Immunologic analyses and immunohistochemistry

2.3.1. Immunoblotting

Cell lysates were prepared according to standard methods, separated using 3-8% Tris-acetate gels (Invitrogen), transferred onto PVDF membrane, and immunoblotted with primary antibodies to LRBA (HPA023597, Sigma), Ku70 (MA5-13110, Thermo scientific), and secondary antibodies to rabbit and mouse (Santa Cruz).

2.3.2. Immunohistochemistry

Skin and spleen specimen were fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded according to standard protocols. 5µm sections were cut.

Immunohistochemical staining was performed using primary antibody to LRBA and anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase.

3. Results

Patient II.1, born from first-cousin parents (Figure 1A), developed autoimmune anemia and thrombocytopenia with hepatosplenomegaly, leading to the diagnosis of Evans syndrome at age 5. Anti-platelets and anti-erythrocyte IgG antibodies (Coombs' test)

were present at high level. Despite several successive treatment lines including intraveinous immunoglobulins, high dose steroids, azathioprine, vincristine, and splenectomy, severe thrombocytopenia persisted. Cerebral hemorrhage occurred and the patient died at age 8.5. Limited clinical and laboratory information and no cells were available from that sibling.

A younger brother, patient II.2, was diagnosed with insulin dependent diabetes mellitus at 20 months of age. Erosive polyarthritis also developed within the first 2 years of life, extended to multiple joints including small distal joints and cervical spine and progressed over years with severe joint deformations and functional limitations (Figure 2B). Uveitis, also diagnosed at 20 months, initially affected the anterior segment of both eyes. There were no signs of digestive disease. The patient was initially diagnosed with juvenile idiopathic arthritis (JIA).

Biological assessments of patient II.2 showed no cytopenia, speckled antinuclear antibodies with anti-U1-RNP specificity and weak positive anti-erythrocyte IgG (Tables 1&S1). Inflammatory syndrome was only present during disease flares. Repartition of lymphocytes subsets showed naïve CD4+ and naïve and central memory CD8+ T cells lymphopenia and a reduction of Treg subsets (Figure S1). B cell study showed a slight increase of memory subset. ALPS markers were normal, as opposed to Revel-Vilk et al. report [6]. In vitro T cell proliferation was normal in response to antigens, decreased in response to anti-CD3 (Table 1).

Until the age of 7, arthritis was treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs and intra-articular steroid injections, and uveitis with topical steroids. Persistently active polyarthritis and uveitis lead to the initiation of methotrexate at 7.4 years of age and anti-TNFα therapy at age 8.9. Etanercept and adalimumab were only partly effective whilst the association of methotrexate and infliximab was efficient on both arthritis and uveitis for several years. However, cystoid macular edema complicated pan-uveitis of the left eye and polyarthritis flare occurred at age 14, affecting both knees, elbows, wrists and thoraco-cervical spine. Anti-IL6 receptor antibody (tocilizumab) was started but

ineffective. Marked bone demineralization and joint erosions were present on X-Rays (Fig. 2B). At onset of abatacept therapy, the patient had 6 active joints and 11 joints with limitation of motion, morning stiffness lasted more than 1 hour. At latest follow-up, after 4 months on CTLA-4-Ig fusion drug (abatacept), steroids, and methotrexate therapy, there was no active joints and 9 joints with limitation of motion, there was no more morning stiffness and corticosteroids treatment was decreased from 10 to 2mg/day. Inflammation markers (C-reactiv protein and erythrocyte sedimentation rate) normalized.

Patient II.2 was also diagnosed with *pseudoxanthoma elasticum* at age 11, with typical dermatological phenotype and developed mild aortic valve dysplasia and bilateral medullar nephrocalcinosis at age 14. In addition, he presented psoriasis-like skin lesions at age 16.5.

Because of early onset of polyautoimmune presentations in a consanguineous pedigree, we hypothesized a genetic disease with autosomal recessive inheritance and conducted whole exome sequencing on patient II.2 and his parents' DNA. Only three unreported variants were identified on that hypothesis (Table S2). Interestingly, a *LRBA* homozygous mutation was found in patient II.2, with a 1bp T insertion resulting in premature termination (c.7620_7621insT, p.A2541YfsX2542). This variation had not been previously described in public databases (dbSNP, 1KG, EVS, ExAC) nor reported in projects from our indoor exome-sequencing facility (Figure 1B). Direct Sanger sequencing confirmed the *LRBA* mutation's segregation in the family: patient II.1 was the only other family member carrying the mutation at homozygous state (Figure 1C). Immunoblotting of total protein extracts from superantigen-activated PBMC (Figure 1D) or immunohistochemistry stain (Figure 2A) confirmed the absence of LRBA protein expression in both patients II.1 and II.2 and its diminution in heterozygous individuals.

Exome analysis incidentally permitted us to link the *pseudoxanthoma elasticum* (PXE) with a previously described homozygous mutation in the *ABCC6* gene (c.1553G>A, p.R518Q) [9].

4. Discussion

Our observation has important clinical and research implications. Diabetes and uveitis were previously reported in LRBA-deficient patients, although not in the same patient [4,8], and so was less severe joint involvement [1,3,8]. Yet, to our knowledge, this is the first description of severe erosive polyarthritis with uveitis and diabetes associated with LRBA deficiency.

Initial diagnosis of patient II.2 was juvenile idiopathic arthritis (JIA), the most common chronic rheumatic disease in children, responsible for short-term and long-term disabilities [10]. Among patients with rheumatoid-factor negative, antinuclear antibody positive, early-onset oligo or polyarticular JIA, approximately 20% also develop chronic, bilateral, anterior uveitis, emphasizing the systemic processes at work [10,11]. The pathogenesis of JIA is currently hypothesized as multifactorial and autoimmune, with genetic predisposing factors and external modifiers. Although the respective role of all the actors of the immune system in JIA have been recently reviewed [11], our knowledge is still incomplete regarding the underlying mechanisms of this disease. LRBA deficiency could be responsible for some cases of JIA.

PXE-causing ABCC6 mutation can account for skin and vascular disease, but joint features have not been reported in this long known affection [12]. Psoriasis lesions were described in some LRBA-deficient patients. They could also be related to anti-TNF alpha treatments [13].

As there was no overlap of patients II.1 and II.2 symptoms, we can suspect that modifiers are at play, genetic and/or environmental, which remain to be identified. Thus, the incidental identification of *ABCC6* causal mutation for patient II.2. PXE confirms if necessary that in consanguineous families, several genetic recessive diseases can affect

the same individual. Alternatively, the early death of patient II.1 may have limited the expression of a full clinical spectrum and the biological findings nowadays associated with LRBA deficiency. Previous reports of LRBA-deficient patients showed high heterogeneity of clinical presentation in-between patients even within the same family, especially regarding autoimmune symptoms. LRBA deficiency symptoms also overlap with recently described genetic diseases such as CTLA-4 deficiency [14] and STAT3 gain-of-function mutations [15].

Furthermore, Lo et al. reported an overall improvement of LRBA-deficient patients with abatacept treatment [8]. After 4 months on abatacept, patient II.2 polyarthritic symptoms were totally abrogated, whereas previous treatments were partly or temporarily effective at best.

Our findings further expand the clinical spectrum of LRBA deficiency. As for the practicing pediatrician, encountering patients with multiple autoimmune manifestations in the family, including juvenile idiopathic arthritis, should prompt to search for mutations in the growing pool of genes (*LRBA*, *CTLA-4* autosomal dominant [14,16], *STAT3* gain-of-function [15] mutations) involved in primary immune deficiency with autoimmunity.

Acknowledgements

The authors wish to thank the patients and family members for their cooperation in this study. We thank the CEDI team and F. Devez for technical assistance, as well as Drs S. Hadj Rabia (dermatology department, Necker Hospital), J. Wipff (rheumatology department, Cochin Hospital), B. Bader-Meunier (paediatric immuno-haematology and rheumatology department, Necker hospital). This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation maladies rares, the European Research Council (ERC PIDIMMUN no. 249816 to A. Fischer), and Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 "Lumugene" to F. Rieux-Laucat). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the "Investments for the Future" program bearing the reference ANR-10- IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013 - 031 to F. Rieux-Laucat). E. Lévy is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche sur le Cancer (France) and Imagine Institute.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

Authorship Contributions

EL designed the research, acquired the data, analyzed data, and wrote the manuscript.
MCS, JB, MZ, PN acquired the data.
SB, AMC revised the manuscript.
SS, BN, AF participated in clinical care and revised the manuscript.
FRL designed the research and wrote the manuscript.
PQ participated in clinical care, designed the research and wrote the manuscript.

References

[1] Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. Am J Hum Genet 2012;90:986–1001. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.015.

[2] 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;130:481–2. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.043.

[3] Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, Curtis J, Mok K, Eisenhut M, et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol 2012;130:1428–32. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.035.

[4] Charbonnier L-M, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, et al. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-Linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. J Allergy Clin Immunol 2014. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.019.

[5] Serwas NK, Kansu A, Santos-Valente E, Kuloğlu Z, Demir A, Yaman A, et al. Atypical Manifestation of LRBA Deficiency with Predominant IBD-like Phenotype. Inflamm Bowel Dis 2014. doi:10.1097/MIB.0000000000000266.

[6] Revel-Vilk S, Fischer U, Keller B, Nabhani S, Gamez-Diaz L, Rensing-Ehl A, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease in patients with LRBA mutation. Clin Immunol 2015;159:84–92. doi:10.1016/j.clim.2015.04.007.

[7] Gamez-Diaz 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. doi:10.1016/j.jaci.2015.09.025.

[8] Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. Science 2015;349:436–40. doi:10.1126/science.aaa1663.

[9] Hosen MJ, Van Nieuwerburgh F, Steyaert W, Deforce D, Martin L, Leftheriotis G, et al. Efficiency of Exome Sequencing for the Molecular Diagnosis of Pseudoxanthoma Elasticum. J Invest Dermatol 2014. doi:10.1038/jid.2014.421.

[10] Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. Lancet 2007;369:767–78. doi:10.1016/S0140-6736(07)60363-8.

[11] Kalinina Ayuso V, Makhotkina N, van Tent-Hoeve M, de Groot-Mijnes JDF, Wulffraat NM, Rothova A, et al. Pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis associated uveitis: the known and unknown. Surv Ophthalmol 2014;59:517–31. doi:10.1016/j.survophthal.2014.03.002.

[12] Plomp AS, Toonstra J, Bergen AAB, van Dijk MR, de Jong PTVM. Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. Am J Med Genet A 2010;152A:1049–58. doi:10.1002/ajmg.a.33329.

[13] Harrison MJ, Dixon WG, Watson KD, King Y, Groves R, Hyrich KL, et al. Rates of new-onset psoriasis in patients with rheumatoid arthritis receiving anti-tumour necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. Ann Rheum Dis 2009;68:209–15. doi:10.1136/ard.2007.087288.

[14] 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. doi:10.1126/science.1255904.

[15] Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, Caswell R, Lango Allen H, De Franco E, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. Nat Genet 2014;46:812–4. doi:10.1038/ng.3040.

[16] 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. doi:10.1038/nm.3746.

[17] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity 2009;30:899–911. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019.

[18] Duchamp M, Sterlin D, Diabate A, Uring-Lambert B, Guérin-El Khourouj V, Le Mauff B, et al. B-cell subpopulations in children: National reference values. Immun Inflamm Dis 2014;2:131–40. doi:10.1002/iid3.26.

[19] van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. Clin Immunol 2009;133:95–107. doi:10.1016/j.clim.2009.05.020.

Legends of figures

Figure 1. Genetic assessment of the family.

A. Pedigree showing genetic status for LRBA mutation. Main clinical symptoms are represented by small black squares for the 2 homozygous affected brothers (II.1 and II.2).
B. Filtration scheme of the exome variants identified in patient II.2.
C. Direct sequencing (reverse orientation) of the mutated region. Arrows indicate the inserted 1bp in homozygous patients II.1 and II.2.
D. Western blot of total protein extracts from patient II.2 and healthy relatives. Antibodies against LRBA and Ku70 as a loading control were used. Activated PBMC from the patient show an absence of LRBA whereas heterozygous healthy individuals show present but reduced protein expression.

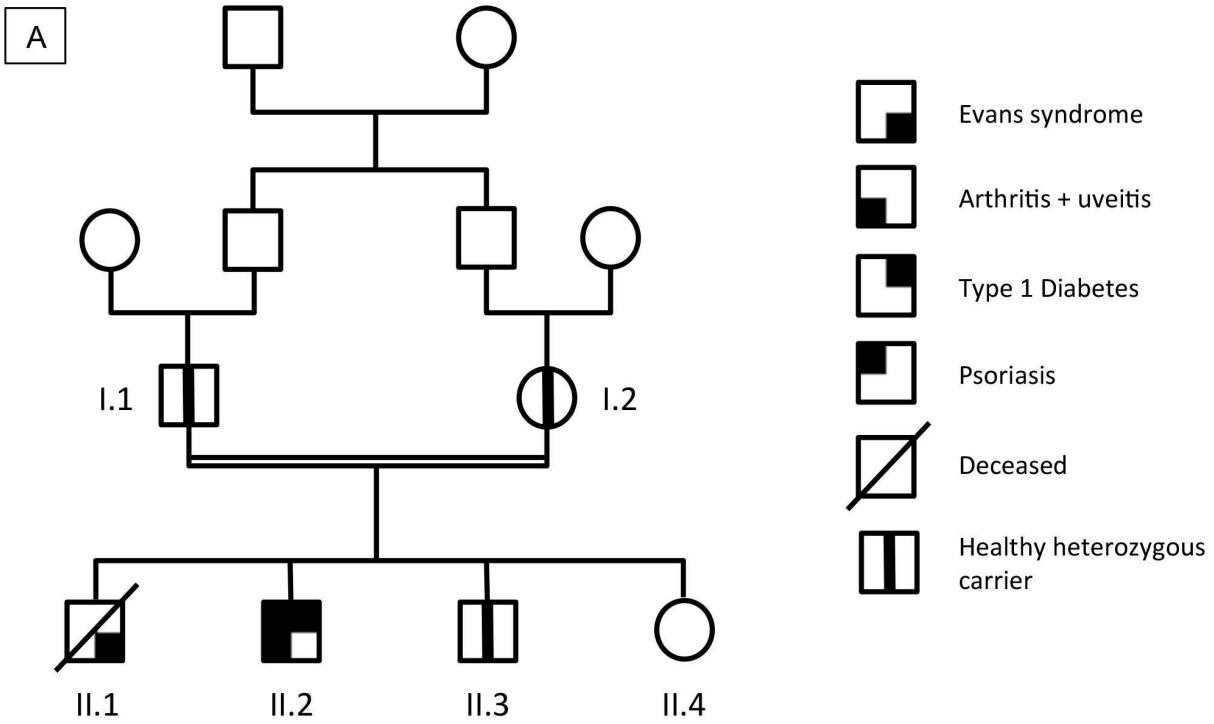
Figure 2. Histological and radiological findings.

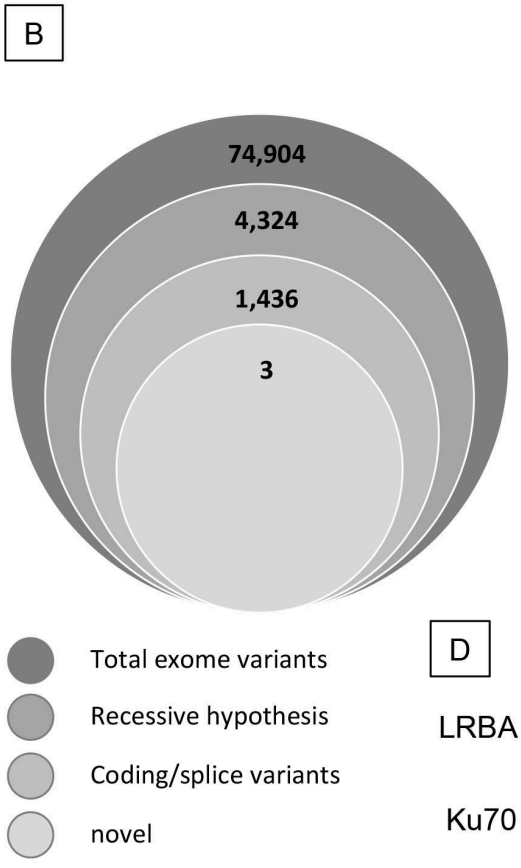
A. LRBA immunohistochemical staining in spleen (top) and skin (bottom) of controls (left) and patients (right). Patients II.1 and II.2 show no specific staining, as opposed to control specimen. For deceased patient II.1, for whom LRBA was a retrospective diagnosis, paraffin included spleen samples where the only available material for protein expression testing.

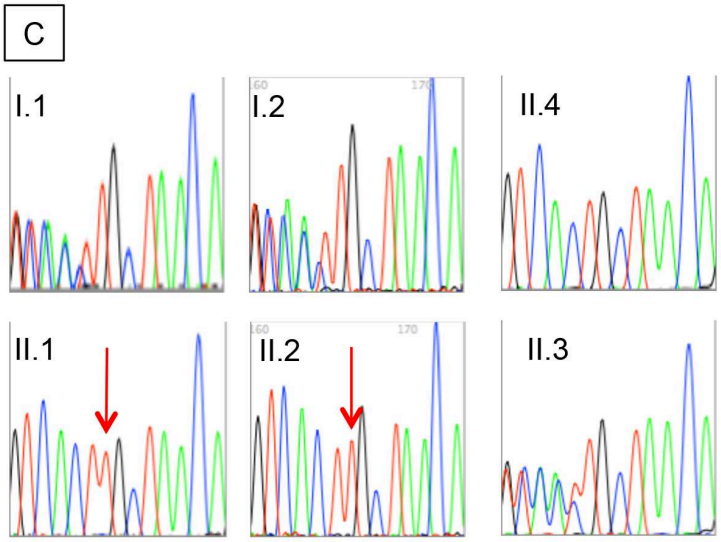
B. Patient II.2 at age 17, plain radiographs of wrists and hands, anterolateral view and oblique view. Bone demineralization with severe multifocal joints erosions involving distal joints, with flexion deformity.

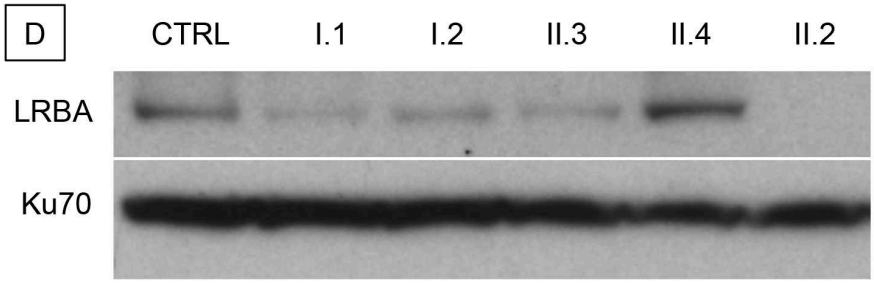
Supplementary Figure 1. Treg staining of patient II.2 at age 17 and control.

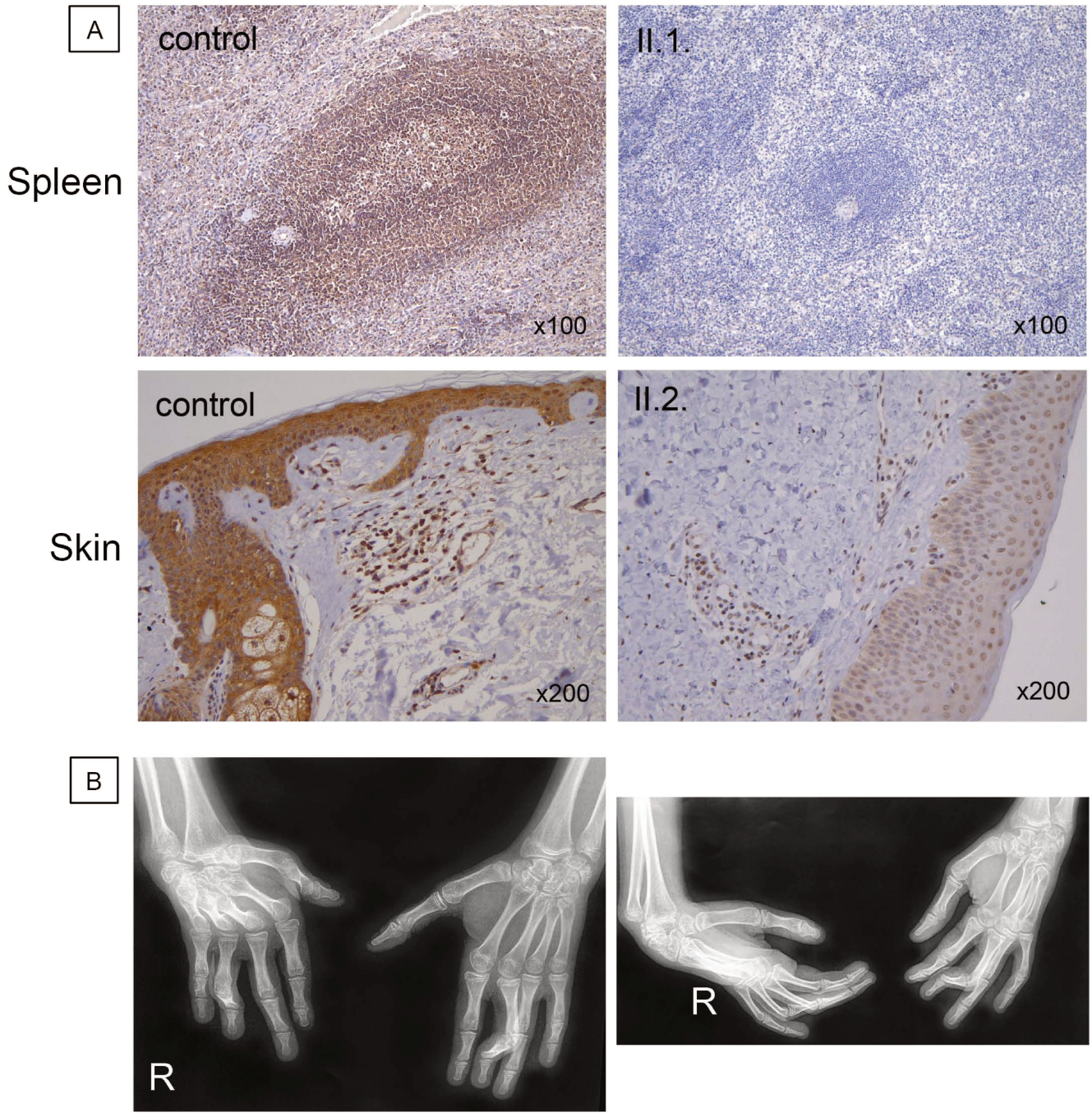
Patient II.2 presented a decrease of CD4+CD25+CD127^{low}, resting FOXP3^{low}CD25^{low}CD45RA^{+} and activated FOXP3^{hi}CD25^{hi}CD45RA^{-} Treg subsets as defined by Miyara et al.[17]. FOXP3 and Helios expression are normal as compared to the control. In blue, FOXP3^{+}Helios^{+}CD4^{+} cells, in red, FOXP3^{-}Helios^{-}CD4^{+} cells.

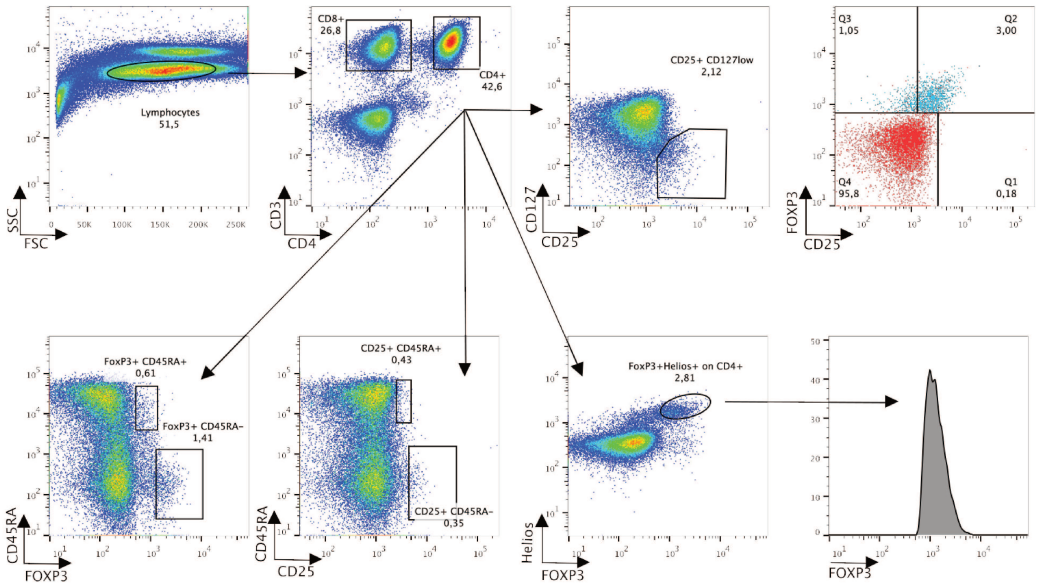

A
I.1
I.2
II.1
II.2
II.3
II.4
Evans syndrome
Arthritis + uveitis
Type 1 Diabetes
Psoriasis
Deceased
Healthy heterozygous carrier


B
74,904
4,324
1,436
3
Total exome variants
Recessive hypothesis
Coding/splice variants
novel

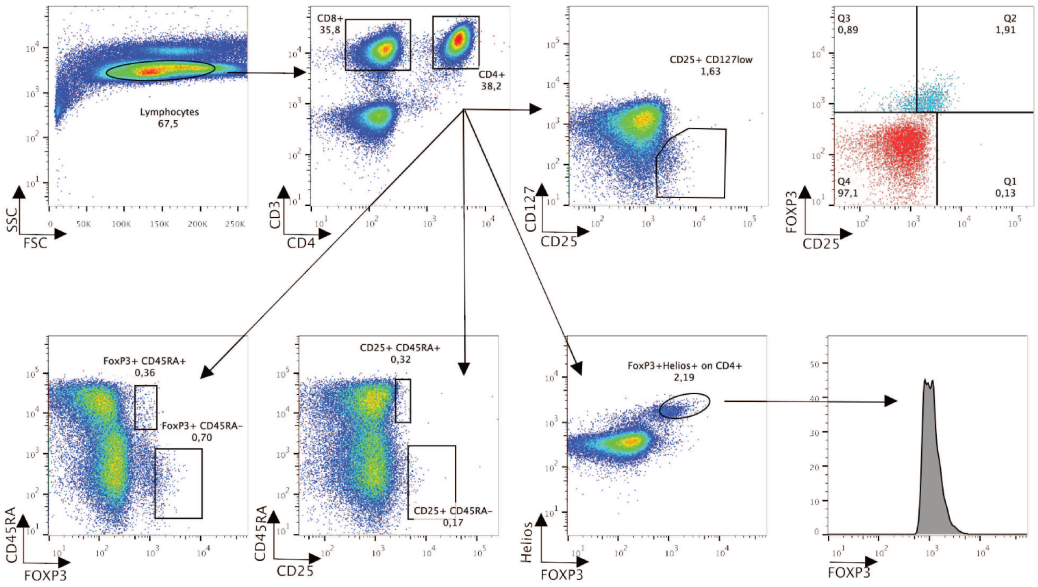

C
I.1
I.2
II.4
II.1
II.2
II.3


D
CTRL
I.1
I.2
II.3
II.4
II.2
LRBA
Ku70


A
control
II.1.
Spleen
x100
x100
control
II.2.
Skin
x200
x200
B
R
R



Control



Patient II.2

Lymphocyte counts			
Age at measurement	*8 years*	*11 years*	*17 years*
Lymphocytes (cells/µl)*	2500 (1761-3873)	2100 (1345-3725)	2700 (1379-3663)
CD3 (cells/µl)	1800	1638	2079 (1000-2200)
CD4+ (cells/µl)#	1075 (641-1453)	1008 (695-1473)	1296 (560-1067)
CD45RO+/CD4+%#			69 (27.3-49.8)
CD45RA+/CD4+%			**31** (58-70)
CD8+ (cells/µl)	650	567	729 (330-920)
CCR7+CD45RA+/CD8+%			**37** (52-68)
CCR7+CD45RA-/CD8+%			**2** (3-4)
CCR7-CD45RA-/CD8+%			16 (11-20)
CCR7-CD45RA+/CD8+%			**45** (16-28)
NK cells: CD16+CD56+ (cells/µl)	75		135 (70-480)
CD19+ (cells/µl)*	375 (273-860)	315 (219-509)	486 (193-628)
Memory B cells: CD27+/CD19+%*			**32** (7-29)
Naive B cells: CD27-IgD+/CD19+%*			64 (61.6-87.4)
Non-switched memory B cells: CD27+IgD+/CD19+%*			12 (2.6-13.4)
Switched memory B cells: CD27+IgD-/CD19+%*			19 (4.0-21.2)
CD4+ CD25+ FOXP3+ Treg/CD4+%		1.7	
Proliferation (10^3cpm)			
PHA			131.5 (>50)
OKT3 (50ng/ml)			**24.5** (>30)
Tuberculin			57 (>30)
Candidine			52 (>30)
Tetanus anatoxin			58 (>30)
ALPS markers			
TCR+ CD4- CD8- T cells		<2%	
IL-10 concentration in plasma (pg/ml)			10 (<20)
FAS-ligand concentration in plasma (ng/ml)			0,14 (<0,20)
Serum immunoglobulins			
Age at measurement	*2 years*	*14 years*	*17 years*
IgG	14.7 (5.3-10.1)	17 (10.5-14.9)	5.91 (6.65-12.78)
IgA	0.2 (0.34-0.78)	2 (1.16-2.28)	1.74 (0.7-3.44)
IgM	1.5 (0.54-1.06)	1.5 (0.88-1.72)	0.68 (0.5-2.09)

Supplementary Table 1: Immunological assessment for patient II.2.
Values in parentheses are normal values; age-adapted ranges obtained from Duchamp et al. [18]*, van Gent et al. [19]# or from internal reference ranges from age-matched healthy controls for lymphocyte counts ; for serum immunoglobulins and proliferation measurements, internal reference ranges from age-matched healthy controls are used. Cpm = counts per minute, PHA=phytohemagglutinin, OKT3 = agonistic anti-CD3 antibody. Treg = regulatory T lymphocytes.

Autoantibodies	
Antinuclear	positive, 1/400 to 1/800 homogeneous + speckled aspect
Anti-DNA Anti-extractable nuclear antigens: Jo1, scl70, SS-A, SS-B, Sm U1-RNP	negative negative positive: 1558 (<230)
Rheumatoid factor Anti-CCP	negative
Anti-GAD65	positive once
Anti-islet cell antibody Anti-IA2	negative
Anti-erythrocytes (Coombs test)	weak positive, IgG
Anti-enterocytes Anti-colonocytes Anti-AIE75 Anti-transglutaminase IgA Anti-endomysium Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)	negative
Anti-gliadine	positive, IgG
Anti-phospholipids (anti-cardiolipids and anti-β2GPI) Anti-smooth muscle Anti-mitochondrion Anti-reticulum (LKM1) Anti-ribosomes	negative
Anti-TSH receptor, thyroperoxydase, Thyroglobulin	negative

Supplementary Table 1: Autoantibodies assessed in patient II.2.

Gene	Reference transcript	Variation on cDNA	Proteic consequence	SIFT score	Polyphen score	Individuals I.1	I.2	II.1	II.2	II.3	II.4
LRBA	CCDS3773	c.7619_7620insT	p. A2541YfsX2542	NA	NA	htz	htz	**hmz**	**hmz**	htz	WT
SERPINB3	CCDS11987	c.702A>G	p.I234M	0,09	0,778	htz	htz	WT	**hmz**	htz	WT
SPTBN2	CCDS8150	c.5198G>A	p.R1733Q	0,74	0,044	htz	htz	htz	**hmz**	**hmz**	htz

Supplementary table 2. Extended familial Sanger sequencing of exome candidate variations. The 3 new variations compatible with recessive inheritance after analysis of trio exome data were sequenced for the whole family. Exome results were confirmed. Solely LRBA variation is homozygous in both and only the 2 affected brothers. WT = wild type, htz = heterozygous, hmz = homozygous, NA = non applicable

Gene	Gene name	Chr.	Reference transcript	Variation type	Variation on CDS	Proteic consequence (predicted)	Prediction scores (S/P/MT)	Gene known function, disease association
MTMR2 (MIM#603557)	Myotubularin related protein 2	11	CCDS8305	substitution	c.323C>T	p.T108M	D/D/D	Associated with Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B1 (MIM#601382), AR
DENND1A (MIM#613633)	DENN/MADD domain containing 1A	9	CCDS35133	deletion	c.820delA	p.T274PfsX7	NA	In rat brain, associated with clathrin-coated vesicle and early endosomes

Supplementary table 3. De novo undescribed variations found by exome sequencing of patient II.2.
We included all novel coding or splicing variants, present in patient II.2 at heterozygous state but found neither in our in-house exome database (to date >4000 exomes), in public databases (1000 genomes, EVS, dbSNP) nor in exome of parents of patient II.2, regardless of their SIFT or Polyphen2 software predicting scores. Only 2 variants were found and the gene functions could not readily be linked to patient II.2's symptoms. Chr. Chromosome, CCDS common coding sequence. Predictions abbreviations are D for damaging, probably damaging or disease causing prediction by SIFT (S), Polyphen2 (P) and Mutation taster (MT) respectively. AR autosomal recessive, NA not applicable.

3.3 Défaut en CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

En 2014, Schubert *et al.* et Kuehn *et al.* ont décrit un nouveau déficit immunitaire dont la présentation clinique est voisine de celle des patients présentant un défaut de LRBA. L'auto-immunité est au premier plan, souvent associée à des infections récurrentes et un déficit humoral. Les mutations identifiées sont hétérozygotes, situées dans le gène CTLA-4, avec une maladie autosomique dominante par haplo-insuffisance [95, 94]. Les patients présentent des défauts quantitatifs et fonctionnels des lymphocytes T régulateurs et une diminution de l'expression de CTLA-4.

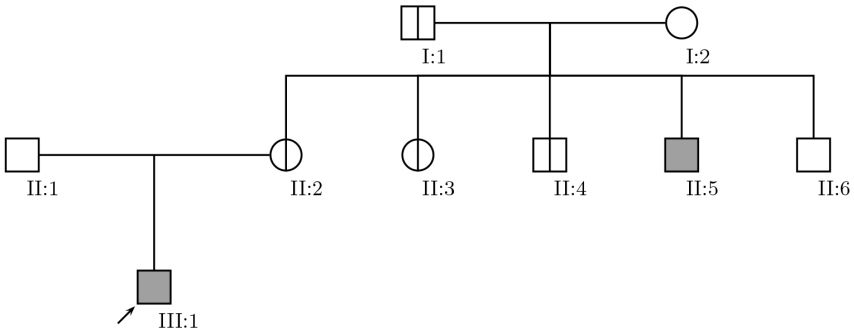
Nous avions à l'époque identifié au cours de l'analyse d'exome 2 familles présentant également des mutations de CTLA-4 mais les modes de transmission semblaient discordants (famille 10 = CTLA-4 1et famille CTLA-4 2). Au cours des recherches secondaires, nous avons constitué une cohorte de 10 familles avec des patients présentant un défaut en CTLA-4. La famille CTLA-4 2 est particulière : il s'agit d'une famille consanguine où seule la patiente porteuse de la mutation de CTLA-4 à l'état homozygote est malade.

La plupart des variants identifiés chez ces patients n'étant pas décrits, nous avons cherché à mettre en évidence leur implication dans la maladie des patients. Notamment, nous avons étudié l'expression de l'ARN et de la protéine lorsqu'il s'agissait de variants d'épissage (familles CTLA-4 1 et 2). Nous avons également réalisé des marquages de CTLA-4 (intracellulaire et membranaire) sur des lymphocytes T activés.

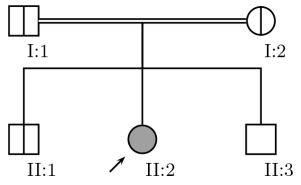
Dans cette partie, nous décrirons successivement (et succintement) les caractéristiques cliniques et génétiques de notre cohorte de patients présentant un défaut en CTLA-4 ainsi que les résultats des explorations effectuées.

3.3.1 Défaut en CTLA-4 : description de notre cohorte

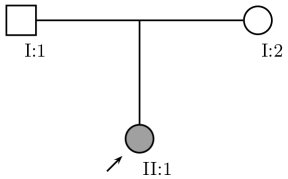
Nous avons identifié et confirmé les mutations de 11 patients dans 10 familles présentant un défaut en CTLA-4. Le spectre clinique des maladies de ces patients est partiellement chevauchant avec celui des patients présentant un déficit en LRBA. Les figures et tableaux suivants présentent les arbres génétiques (figure 3.20, page 130) et les caractéristiques cliniques (tableau 3.24, page 132) des 9 familles ainsi que les variants identifiés (tableau 3.23 et schéma 3.21, pages 131 et 133).



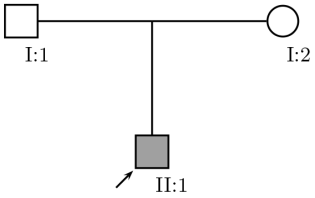
Famille 10 = Famille CTLA-4 1



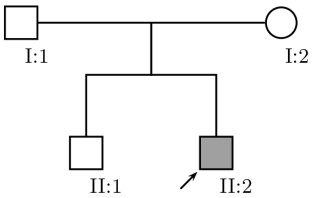
Famille CTLA-4 2



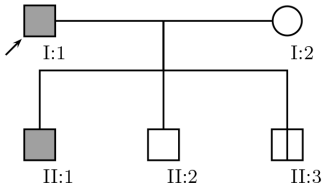
Famille CTLA-4 3



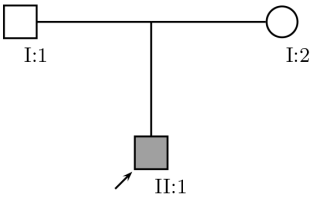
Famille CTLA-4 4



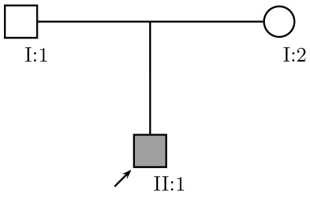
Famille CTLA-4 5



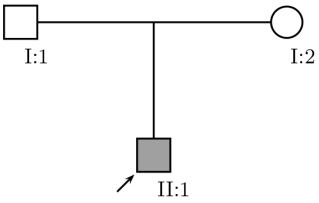
Famille CTLA-4 6



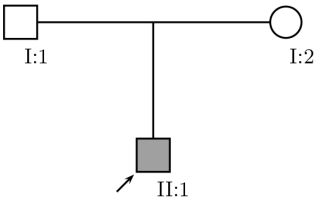
Famille CTLA-4 7



Famille CTLA-4 8



Famille CTLA-4 9



Famille CTLA-4 10

FIGURE 3.20 – **Familles CTLA-4 : arbres génétiques.** Le cas index est indiqué par la flèche, les individus malades sont en gris, les individus hétérozygotes sains sont signalés par une barre verticale. La consanguinité est indiquée par la double barre horizontale entre les parents. La ségrégation familiale des mutations a été étudiée pour tous les individus représentés sauf pour les familles 7, 9 et 10 (pas de matériel disponible pour les parents).

Famille	Patients	Mutation : nomenclatures séquence codante (CDS)	Protéine	Localisation	Origine	Allèles
CTLA-4 1	II.3	c.110-2A>G	?	intron 1	paternelle (II.5), maternelle (III.1)	hétérozygote
CTLA-4 2	II.2	c.568-3C>A	?	intron 3	bi-parentale	homozygote
CTLA-4 3	II.1	c.374G>T	p. G125V	exon 2	*de novo*	hétérozygote
CTLA-4 4	II.1	c.403dupA	p.Y135fs*	exon 2	*de novo*	hétérozygote
CTLA-4 5	II.2	c.209G>A	p.R70Q	exon 2	*de novo*	hétérozygote
CTLA-4 6	I.1, II.1	c.410C>T	p.P137L	exon 2	paternelle (II.1)	hétérozygote
CTLA-4 7	II.1	c.316 A>C	p.T106P	exon 2	?	hétérozygote
CTLA-4 8	II.1	c.172T>G	p.C58G	exon 2	*de novo*	hétérozygote
CTLA-4 9	II.1	c.151C>T	p.R51*	exon 2	?	hétérozygote
CTLA4 10	II.1	c.151C>T	p.R51*	exon 2	?	hétérozygote

Tableau 3.23 – **Tableau récapitulatif des mutations de *CTLA-4* identifiées.** La nomenclature CDS est sur le transcrit CTLA4-001, ENST00000302823, NM_005214 ou CCDS2362 et sur la forme protéique correspondante.

Auto-immunité (11)	AHAI (7) TI (6) NAI (3) Entéropathie (2) Uvéïte (1) Poumons : atteinte interstitielle granulomateuse (6) Arthrite (1) atteinte rénale (1)
Lymphoprolifération (4)	Splénomégalie (4) Hépatomégalie (0) Adénopathies (2)
Infections récurrentes (3) Hypogammaglobulinémie (10)	ORL (2) Respiratoires (2)
Autres	granulomatose multi-viscérale (4) Ostéoporose (1)

Tableau 3.24 – **Résumé des atteintes cliniques et biologiques présentées par les patients présentant un défaut en CTLA-4.** AHAI anémie hémolytique auto-immune, TI thrombopénie immunologique, NAI neutropénie auto-immune. Les hypogammaglobulinémies comptées ici sont celles présentes chez les patients avant tout traitement par rituximab.

Les atteintes cliniques les plus fréquentes, outre les cytopénies auto-immunes sont les atteintes granulomateuses multiviscérales, touchant en premier lieu le poumon (6 patients) mais aussi le cerveau (3 patients), le rein, le foie, la rate et la moelle osseuse hématopoïétique. Les hypogammaglobulinémies sont d'autant plus fréquentes qu'une partie des patients les présentent suite au traitement par rituximab.

Les mutations identifiées sont principalement localisées dans l'exon 2 (voir schéma 3.21, page 133). Cinq entrainent une substitution d'acide aminé, 2 entrainent un codon STOP prématuré et 2 sont situées sur les sites d'épissage.

3.3.2 Explorations spécifiques des familles CTLA-4 1 et 2

Les familles CTLA-4 1 et 2 présentent plusieurs particularités : les variants identifiés sont sur des sites d'épissage et dans la famille 2, où les parents sont consanguins, leur fille présentant la variation à l'état homozygote est la seule à avoir une expression clinique de la maladie. Nous avons donc étudié le cDNA afin de vérifier les conséquences de ces variations d'épissage. Chez le patient III.1 de la famille CTLA-4 1 et chez sa mère mutée non malade (II.2), nous avons pu observé que la forme la plus longue (4 exons) était la plus fréquente avec présence minoritaire des formes sans l'exon 2, sans l'exon 3 et sans les exons 2 et 3. La forme sans l'exon 2 n'est normalement pas présente chez l'homme. Nous n'avons pas mis en évidence d'autres variants d'épissage. Dans la famille CTLA-4 2, la forme majoritaire est la forme à 4 exons et nous n'avons pas mis en évidence de variants d'épissage anormaux. la figure 3.22, page 134 présente l'alignement du cDNA correspondant au variant d'épissage sans l'exon 2 pour les individus III.1et II.2 de la

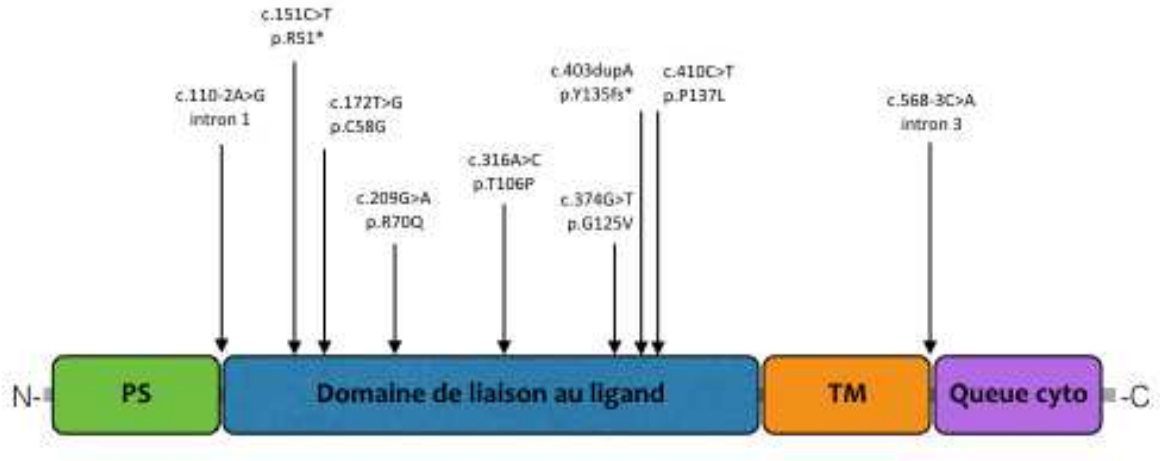


FIGURE 3.21 – **Schéma localisant les mutations de *CTLA-4* identifiées.** La nomenclature celle du transcrit CTLA4-001 ENST0000302823 (Ensembl), NM_005214 ou CCDS2362 et sur la forme protéique correspondante. Les domaines protéiques identifiés sont représentés : domaine peptide signal (PS, en vert) ; domaine de liaison aux ligands (en bleu) ; domaine transmembranaire (TM, en orange) ; portion intra-cytoplasmique (queue cyto, en violet).

famille 1 et le cDNA normal d'un contrôle extra-familial.

Nous avons également regardé l'expression protéique de CTLA-4 par WB sur des extraits protéiques totaux de lymphocytes T activés. Nous n'avons pas mis en évidence de variations quantitatives ou qualitatives de CTLA-4 dans ces 2 familles (voir figure 3.23, page 135).

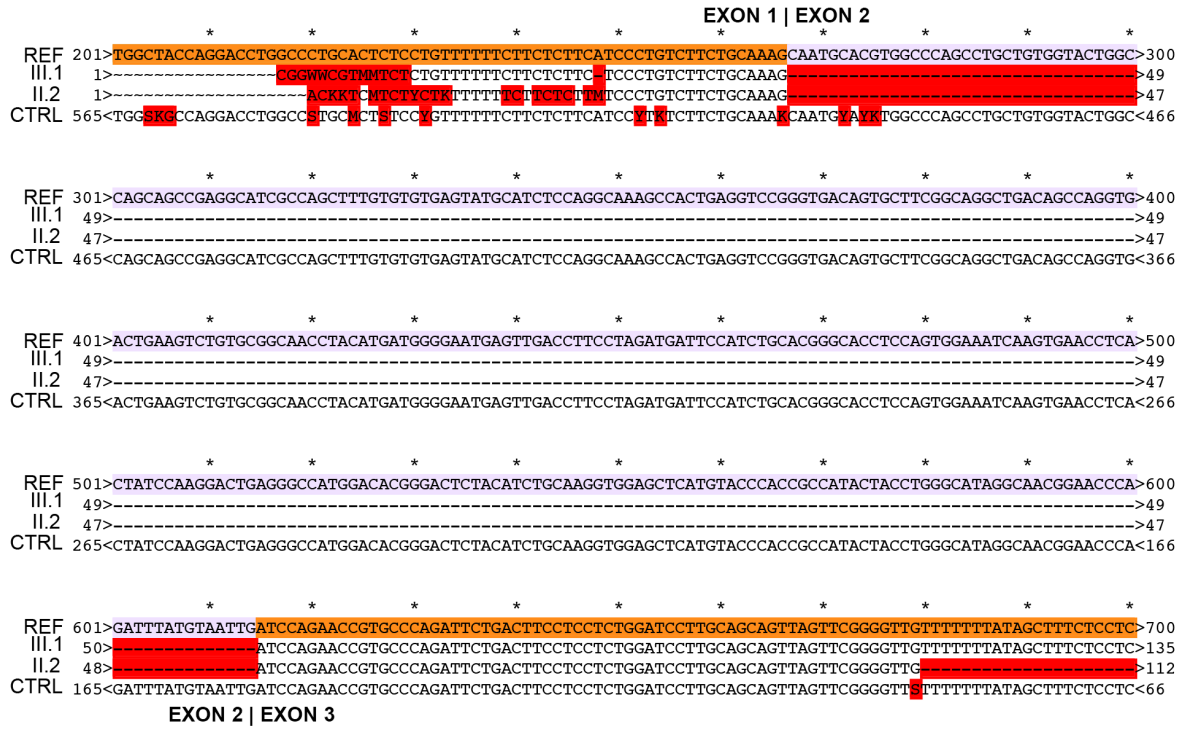


FIGURE 3.22 – **Séquençage du variant d'épissage anormal de CTLA-4 dans la famille CTLA-4 1.** l'alignement des séquences du cDNA anormal détecté par RT-PCR pour le patient (III.1), sa mère muté saine (II.2) et un contrôle extra-familial (CTRL) avec la séquence de référence (REF) met en évidence que ce variant d'épissage correspond à un saut de l'exon 2. La séquence de référence est colorée selon les exons : en orange les exons 1 et 3, en mauve l'exon 2. Les tirets dans la séquence correspondent à l'absence de base.

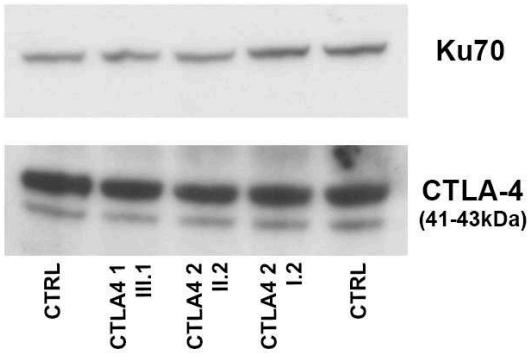


FIGURE 3.23 – **Étude de l'expression protéique de CTLA-4 par western blot.** Extraits protéiques totaux de lymphocytes T activés pour le patient III.2 de la famille CTLA-4 1, la patiente homozygote II.2 de la famille CTLA-4 2, sa mère hétérozygotes I.2 et 2 contrôles (CTRL). Ku70 est le contrôle de charge. Nous n'avons pas observé de différences significatives dans ces conditions.

3.3.3 LRBA et CTLA-4 : anomalies partagées

Nous avons vu que les spectres cliniques de ces deux maladies génétiques sont chevauchants. Dans les deux cas, on observe au premier plan des atteintes auto-immunes variées, parmi lesquelles les cytopénies sont les plus fréquentes. S'y ajoutent souvent lymphoprolifération bénigne, hypogammaglobulinémie et infections récurrentes.

Du fait des multiples atteintes auto-immunes dont les entéropathies, ce tableau rappelle la présentation clinique des patients IPEX. Il nous a donc semblé indispensable d'étudier les lymphocytes T régulateurs de ces patients. Nous avons marqué les PBMC et regardé la proportion de lymphocytes T régulateurs naturels, $FOXP3^{+}CD25^{+}$, $CD127^{low}CD25^{+}$ et les sous-populations Treg naïves et mémoires ($CD45RA^{+}$ ou $^{-}$) pour 9 patients LRBA et 6 patients CTLA-4. Nous avons fréquemment observé une diminution de la proportion des cellules $FOXP3^{+}CD25^{+}$. Ces résultats ont été également rapportés par d'autres équipes au cours de notre travail [103]. Un exemple du marquage et de la stratégie de fenêtrage est présenté dans la figure 3.24, page 136.

Nous avons également étudié l'expression du CTLA-4 total (membranaire et intracellulaire) dans les lymphocytes T activés de 5 patients LRBA et 6 patients CTLA-4. Son expression est diminuée pour les patients LRBA par rapport aux contrôles sains ou aux apparentés hétérozygotes. Un article publié en 2015 a également mis en évidence une diminution de l'expression de CTLA-4 chez les patients présentant un déficit en LRBA [98]. Les patients présentant un déficit en CTLA-4 ont également une diminution de l'expression du CTLA-4 total. En revanche, les apparentés hétérozygotes sains ne présentent pas de diminution de l'expression de CTLA-4. La figure 3.25, page 137 présente ce marquage pour les familles CTLA-4 1 et 2. Elle met en évidence que, dans la famille CTLA-4 2, la patiente homozygote malade présente une diminution de l'expression de CTLA-4 comparable à celle du patient hétérozygote malade de la famille CTLA-4 1. En revanche, la mère hétérozygote saine a un niveau d'expression de CTLA-4 intermédiaire. On notera qu'il existe une grande variabilité des moyennes d'intensité de fluorescence entre les différents contrôles.

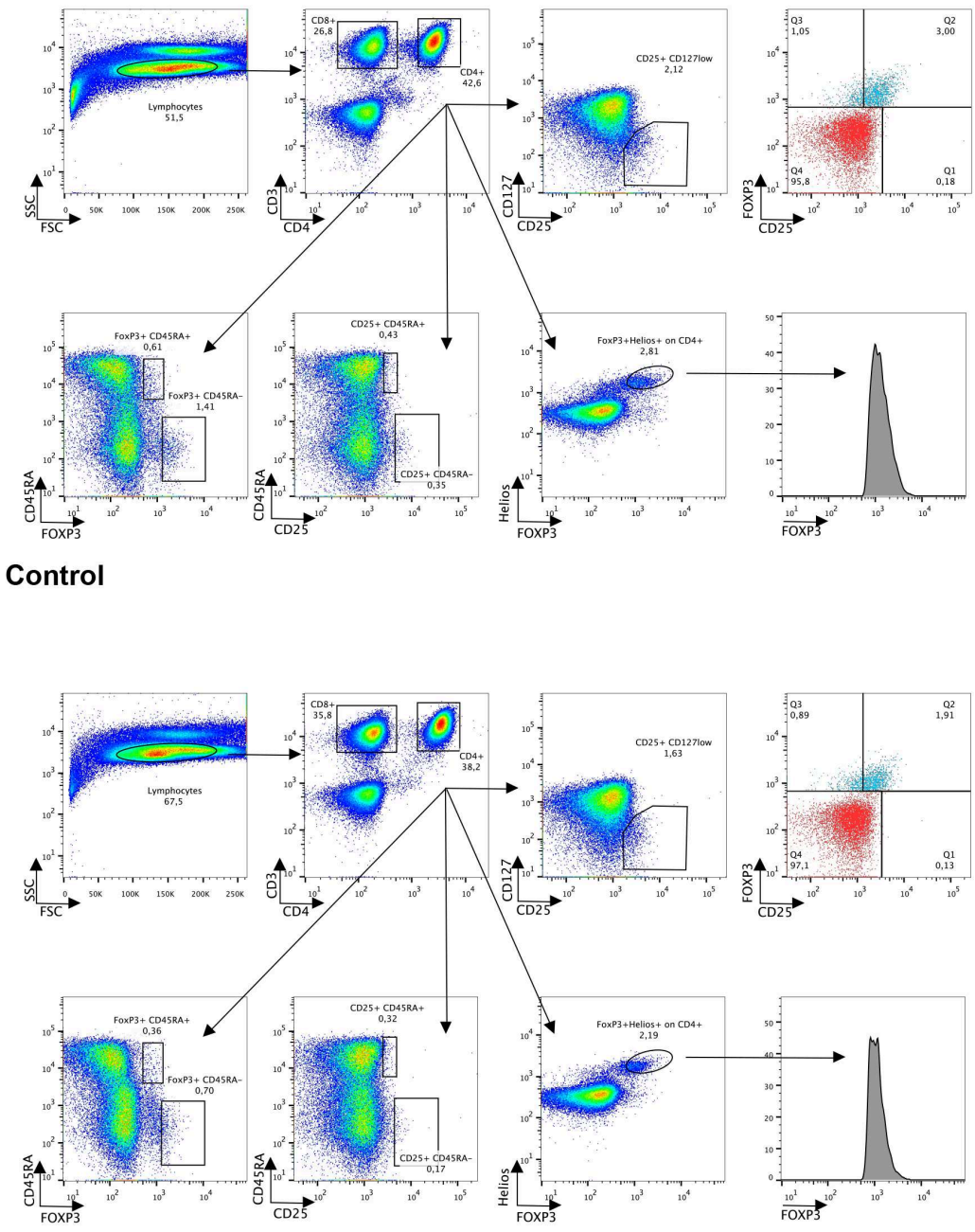
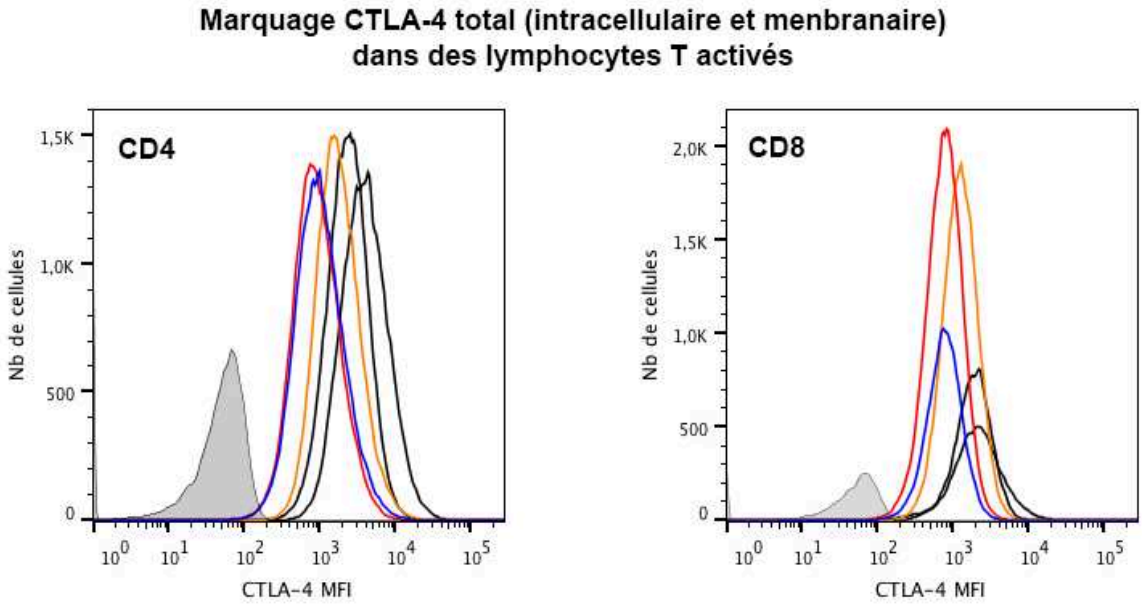


FIGURE 3.24 – **Marquage des lymphocytes T régulateurs.** Les PBMC du patient II.3 de la famille LRBA1 ainsi que ceux d'un contrôle extra-familial sont perméabilisés et marqués avec des anticorps anti-CD3, CD4, CD25, CD127, CD45RA, FOXP3 et Helios. Ces marquages mettent en évidence une diminution des sous-populations $CD4^+CD25^+CD127^{low}$, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. De même, les sous-populations Treg naïves et mémoires, $CD45RA^+$ ou $^-$ sont diminués chez les patients LRBA et CTLA4. Ce marquage est représentatif des marquages réalisés sur les cellules des différents patients présentant des mutations de LRBA ou CTLA-4.



Échantillon	MFI CTLA-4 des $CD4^+$	MFI CTLA-4 des $CD8^+$
contrôle isotypique	34,5	35,8
CTLA-4 1, patient III.1	955	725
CTLA4 2, patiente II.2	872	729
CTLA4 2, mère I.2	1679	1180
CTRL1	2207	1742
CTRL2	3750	1912

FIGURE 3.25 – **Marquage de CTLA-4 dans des lymphocytes T activés.** Les lymphocytes T activés d'un patient hétérozygote (famille CTLA-4 1, patient III.1, en bleu), d'une patiente homozygote (famille CTLA-4 2, patiente II.2, en rouge), de sa mère hétérozygote saine (famille CTLA4 2, mère I.2, en orange) et de 2 contrôles extra-familiaux (CTRL1 et CTRL2, en noir) ont été marqués après perméabilisation avec un anticorps anti-CTLA-4 ou avec un isotype contrôle, ainsi qu'avec des anticorps anti-CD4 et CD8. La fluorescence des isotypes étant comparable pour tous les échantillons, un seul est représenté (ombre grise). Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) sont rapportées dans le tableau.

3.4 Mutations gain de fonction de STAT3

Les mutations gain de fonction de *STAT3* ont été rapportées pour la première fois en 2014 puis 2015 [149, 151, 150]. Le tableau clinique des patients est chevauchant avec les déficits en LRBA et CTLA-4, avec des cytopénies auto-immunes présentées par la majorité des patients.

Dans la cohorte de patients dont nous avons analysé l'exome, un patient présentait une mutation gain de fonction de *STAT3*. Nous avons secondairement identifié 4 autres familles présentant des mutations de *STAT3*. Toutes ces mutations sont *de novo* sauf pour la famille 5 qui présente une mutation homozygote de STAT3 avec un phénotype clinique

correspondant à la maladie STAT3 GOF. Nous présenterons les explorations réalisées pour cette famille dans une section spécifique.

3.4.1 Mutations gain de fonction de STAT3 : description de notre cohorte

Au cours de notre travail, nous avons identifié 5 familles présentant des mutations gain de fonction de STAT3. Les arbres des familles sont présentés figure 3.26, page 138 et les mutations situées sur un schéma du gène (figure 3.27, page 138).

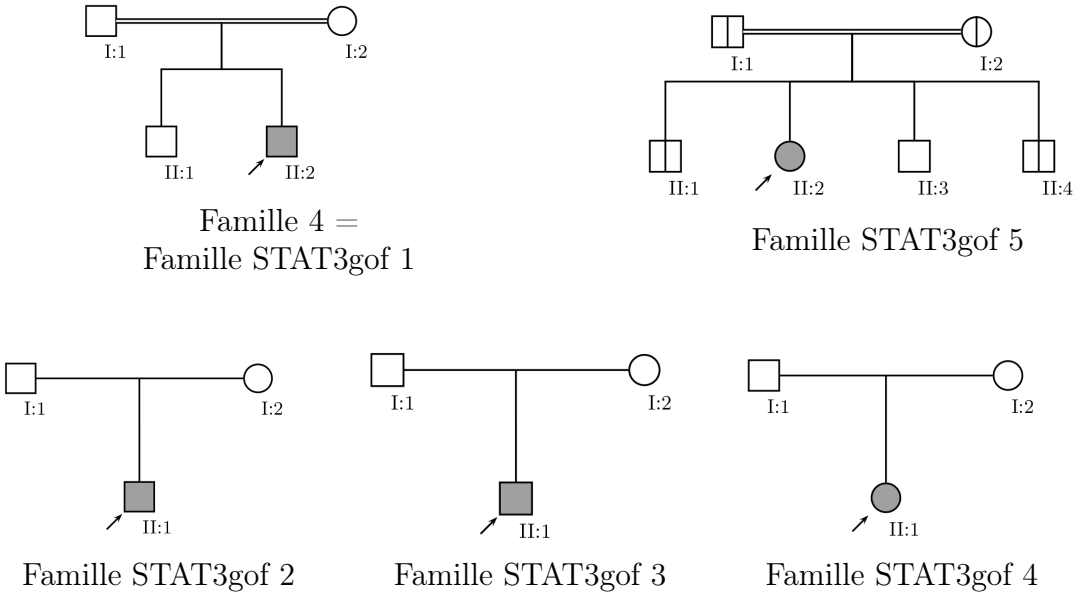


FIGURE 3.26 – **Familles STAT3 gain de fonction : arbres génétiques.** Le cas index est indiqué par la flèche, les individus malades sont en gris, les individus hétérozygotes sains sont signalés par une barre verticale.

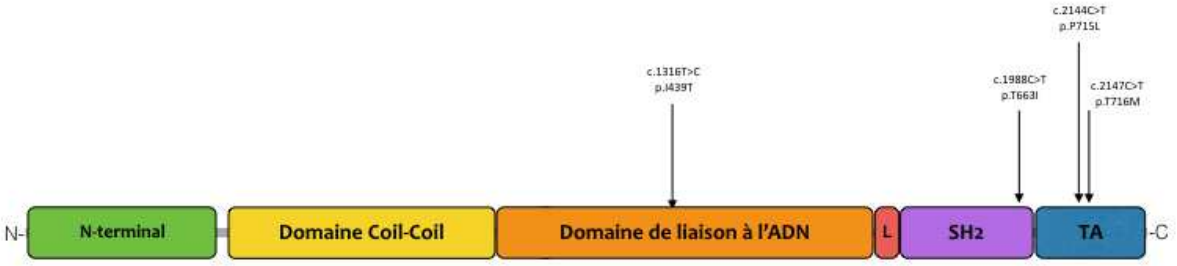


FIGURE 3.27 – **Schéma localisant les mutations de *STAT3* identifiées.** La nomenclature est celle du transcrit STAT3-001 ENST0000264657 (Ensembl), NM_139276 ou CCDS32656 et sur la forme protéique correspondante. Les domaines protéiques identifiés sont représentés : domaine N-terminal (en vert) ; domaine coil-coil (en jaune) ; domaine de liaison à l'ADN (en orange) ; linker (L, en rouge) ; domaine SH2 (en violet) ; domaine de trans-activation (TA, en bleu).

La première a été identifiée chez un patient issu d'une famille consanguine chez lequel nous avions réalisé le séquençage de l'exome (Famille 4 = Famille STAT3gof 1, voir aussi tableau 3.1, page 92). Cliniquement, ce patient présentait une tricytopénie avec auto-anticorps dirigés contre les 3 lignées depuis l'âge de 3 ans ainsi qu'une maladie cœliaque. Lors du bilan initial des cytopénies, le patient présentait aussi une splénomégalie, des adénopathies et de la fièvre. Il y a également des antécédents familiaux d'atteinte thyroïdienne auto-immune : maladie de Basedow chez une tante maternelle et une tante paternelle. Lors de l'analyse initiale des données d'exome, notre hypothèse était donc celle d'une transmission autosomique récessive (AR). Nous n'avions pas identifié de gène candidat solide. La mutation hétérozygote de STAT3 identifiée est c.2147C>T p.T716M, mutation également publiée dans l'article princeps sur les mutations gain de fonction de STAT3 [149]. Cette mutation est *de novo* chez le patient.

Depuis, nous avons mis en évidence la même mutation dans la famille STAT3gof 2, également hétérozygote *de novo* chez ce patient présentant un tableau clinique d'ALPS-like.

Le patient de la famille STAT3gof 3 présentait une tricytopénie immunologique avec présence d'auto-anticorps pour les 3 lignées, une lymphoprolifération bénigne, une bronchopneumopathie atypique. Une hypogammaglobulinémie est apparue progressivement en l'absence de traitement immunosuppresseur. La mutation hétérozygote présentée par ce patient, c.1988C>T p.T663I, est située dans l'exon 21 et dans le domaine SH2 de la protéine. Elle a déjà été rapportée par Milner *et al.* [151]. La ségrégation familiale est en attente de prélèvements des parents.

La patiente de la famille STAT3gof 4 présentait une bicytopénie immunologique (plaquettes et neutrophiles) depuis l'âge de 2 ans associée à un syndrome lymphoprolifératif bénin. Une AHAI a rapidement complété ce tableau. Elle a présenté de nombreux épisodes infectieux ORL et respiratoires associés à une hypogammaglobulinémie substituée. Enfin, elle présentait une dysmorphie faciale avec une anomalie velaire. Nous avons choisi d'explorer génétiquement cette patiente de façon ciblée (séquençage d'un panel d'une centaine de gènes) et identifié la mutation c.2144C>T p.P715L de STAT3 à l'état hétérozygote. Cette variation est prédite « tolérée » par SIFT et Polyphen2 et « délétère » par Mutation Taster. Il s'agit d'un variant non décrit dans les bases de données publiques ou dans les données de notre plateforme de séquençage. La ségrégation familiale est en attente de prélèvements des parents. Nous attendons également un nouveau prélèvement de la patiente afin de confirmer cette mutation, vérifier sa présence sur le cDNA et valider fonctionnellement son rôle causal.

3.4.2 mutation homozygote de STAT3 avec phénotype clinique de gain de fonction

La patiente de la famille STAT3gof 5 présentait à partir de l'âge de 7 ans une atteinte digestive auto-immune sévère (diarrhée sanglante et colite ulcérante) associée à une polyarthrite et une thrombopénie avec syndrome hémorragique. Les marquages cellulaires effectués sur les PBMC et les lymphocytes T activés n'ont pas montré de

déficit en Treg ou en CTLA4. La patiente étant issue d'une famille consanguine, nous avons initialement recherché un déficit en LRBA. Devant la présence de la protéine en WB, nous avons réalisé un séquençage haut débit ciblé et identifié un variant homozygote dans STAT3 : c.1316T>C p.I439T, situé dans le domaine de liaison à l'ADN. Cette variation est prédite « tolérée » par Polyphen2 et « délétère » par SIFT et Mutation Taster. Il s'agit d'un variant non décrit dans les bases de données publiques ou dans les données de notre plateforme de séquençage. Nous avons confirmé que la ségrégation de la mutation est compatible avec l'hypothèse d'une maladie autosomique récessive.

Nous avons tenté de mettre en évidence l'hyper-activation de STAT3 chez cette patiente par 2 séries d'expériences réalisées en collaboration avec l'équipe de N. Cerf-Bensussan, étudiant l'une la phosphorylation de STAT3 et l'autre l'expression de SOCS3 en réponse à une stimulation de STAT3.

Phosphorylation de STAT3

Des PBMC fraichement isolés du sang ont été activés par l'IL-10 ou l'IL-21 afin de regarder l'état de phosphorylation de STAT3 après 20, 90 ou 120 minutes. Le marquage en cytométrie en flux n'a pas mis en évidence de différence de phosphorylation (quantitative ou cinétique) entre la patiente, sa mère porteuse de la mutation à l'état hétérozygote, les 2 contrôles sains extra-familiaux ou le contrôle positif (patient II.1 de la famille STAT3gof 2), porteur de la mutation gain de fonction décrite p.T716M. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes figure 3.28, page 141 et la stratégie de fenêtrage et les graphes de fluorescence sont présentés dans les figures annexes 5.39 et 5.40, pages 233 et 234. Cette expérience, réalisée sur sang frais, doit être répétée lors d'un prochain prélèvement.

Expression de SOCS3 en réponse à l'activation de STAT3

Nous avons également regardé l'expression de par RT-PCR dans les cellules de la patiente suite à une stimulation par l'IL21, comme cela avait été fait par Milner *et al.* [151]. Cette expérience a été effectuée deux fois sur des lymphocytes T activés. Les résultats sont présentés dans la figure 3.29, page 142. En l'absence de stimulation, le niveau d'expression de *SOCS3* est comparable pour tous les individus testés. Après activation par l'IL-21, il semble que les cellules de la patiente homozygote présentent une augmentation de l'expression de *SOCS3* plus importante que celles des contrôles tout en restant un peu inférieure à celle présentée par le patient porteur de la mutation activatrice décrite. Les cellules de la mère hétérozygote saine présentent un niveau d'expression de *SOCS3* comparable à celui des contrôles sains. Cette expérience est compatible avec l'hypothèse d'une mutation gain de fonction hypomorphe, n'ayant des conséquences qu'à l'état homozygote. L'expérience doit être reproduite afin de pouvoir conclure à la significativité des différences observées. De plus, elle sera également réalisée sur une lignée cellulaire B de la patiente, immortalisée par l'EBV, dès que nous aurons assez de cellules.

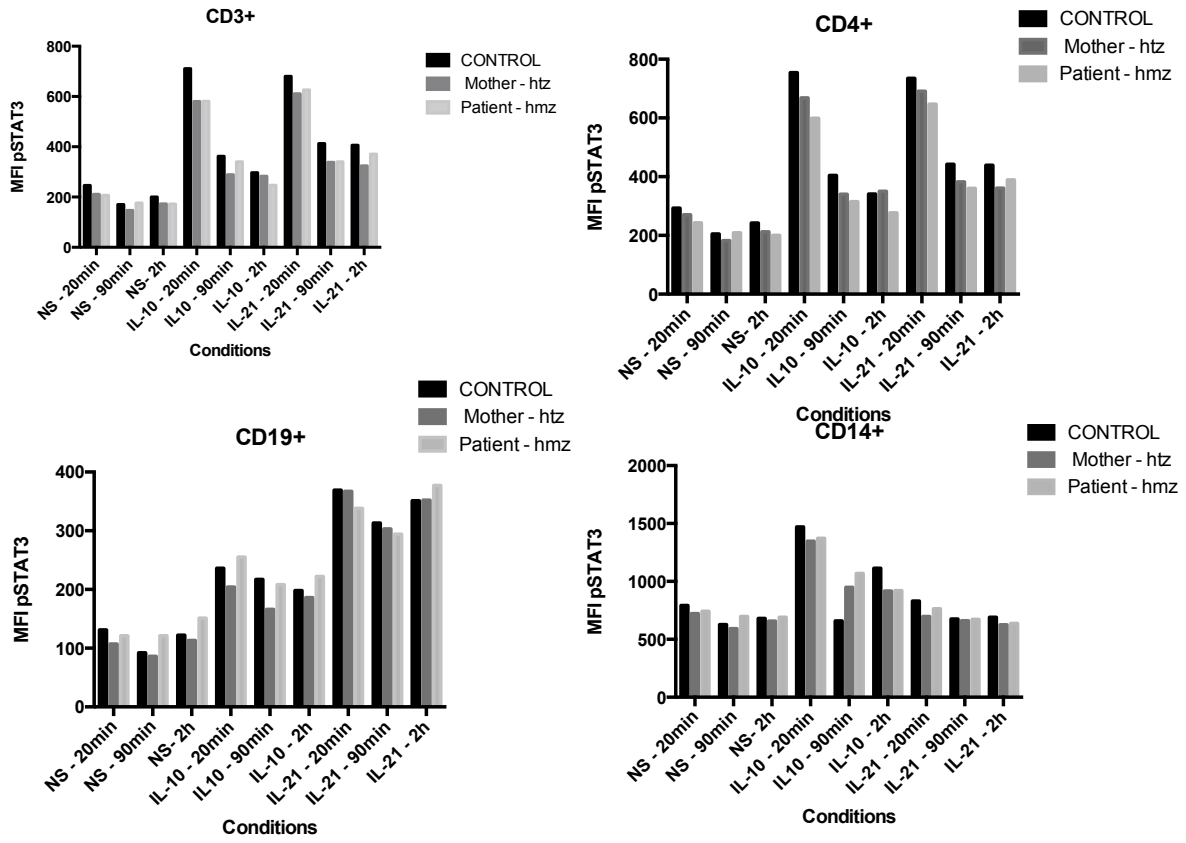


FIGURE 3.28 – **Etude de la phosphorylation de STAT3.** Les histogrammes représentent les moyennes d'intensité de fluorescence du marquage phospho-STAT3 (MFI pSTAT3) pour les sous-populations de lymphocytes B ($CD19^+$), T ($CD3^+$), T $CD4^+$ et monocytes ($CD14^+$), dans chaque condidtion étudiée : non stimulé (NS), stimulation par l'IL-10 (IL-10) ou par l'IL-21 (IL-21) pour le contrôle (CONTROL), la patiente homozygote (patient - hmz) et sa mère hétérozygote saine (mother - htz).

3.5 Mutation homozygote de IκBα : un nouveau mécanisme d'auto-immunité ?

L'analyse d'exome du cas index de la Famille 5 avec pour hypothèse une maladie de transmission autosomique récessive, compte-tenu de la consanguinité familiale a mis en évidence 29 variants privés dans 29 gènes (voir tableau 3.1, page 92). Parmi ceux-ci, nous avons retenu *NFKBIA* comme premier candidat à explorer.

NFKBIA pour Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor alpha, code pour la protéine IκBα . Cette protéine fait partie de la famille des facteurs de transcription NF-κB. IκBα se fixe à NF-κB et empêche sa translocation dans le noyau et bloque ainsi sa fonction de facteur de transcription (voir figure 3.30, pages 144 et 145). Dans le cadre d'une réponse immunitaire, lors de l'activation de la voie NF-κB par les Toll-like récepteurs, le récepteur du TNFα ou le TCR, IκBα est phosphorylée par la kinase d'IκB (IKK). Elle se détache alors de NF-κB et est rapidement ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome. NF-κB peut alors migrer dans le noyau et activer différents gènes conduisant à la prolifération et la survie cellu-

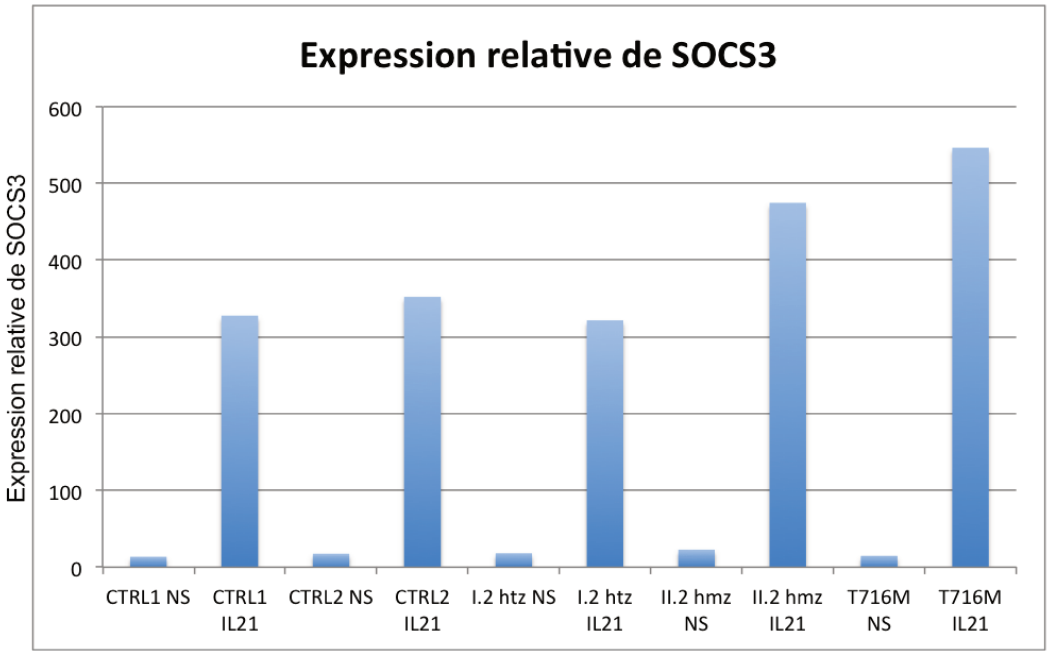


FIGURE 3.29 – **Etude de l'expression de *SOCS3*.** L'expression relative de l'ARN de *SOCS3* a été mesurée par RT-PCR à partir de l'ARN extrait de lymphocytes T activés, non stimulés (NS) ou stimulés par l'IL-21 (IL-21). En sus de la patiente homozygote (II.2) et de sa mère hétérozygote (I.1) contrôles sains extra-familiaux (CTRL1 et CTRL2) et un patient avec une mutation gain de fonction de STAT3 préalablement décrite (T716M) ont été inclus.

laire, et favorisant l'inflammation et la réponse immunitaire (voir figure 3.30 A, page 144).

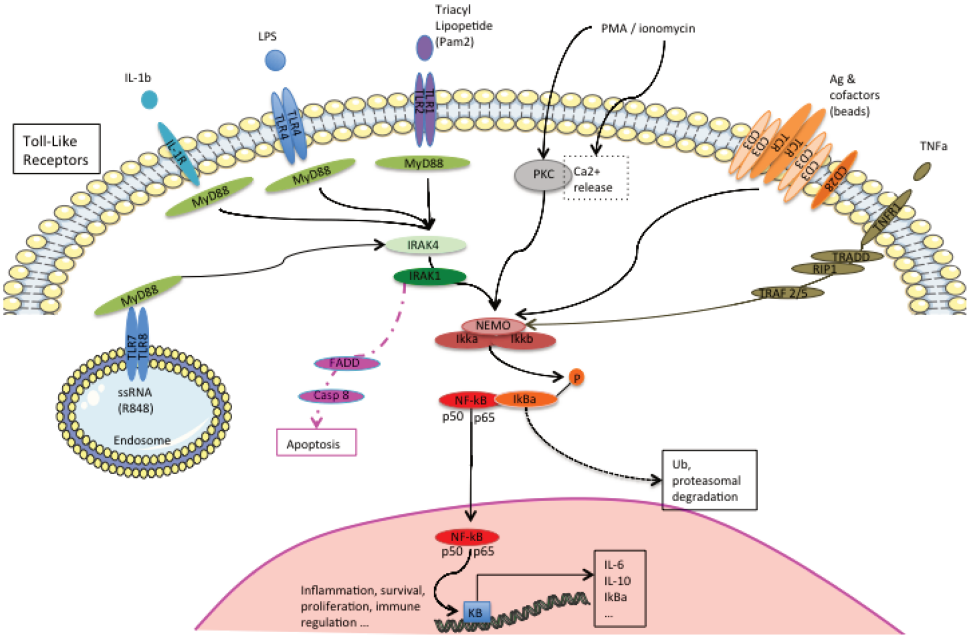
Des mutations autosomiques dominantes de *NFKBIA* sont associées à la dysplasie ectodermale anhydrotique avec déficit immunitaire T. Dans cette maladie, des mutations entrainant un codon stop précoce suivi d'une ré-initiation dela traduction d'une protéine anormale font disparaitre les sites de phosphorylation d'IκBα, ce qui empêche l'activation de la voie NF-κB (voir figure 3.30 B, page 144) [200, 201, 202].

Devant la mutation homozygote identifiée dans la famille 5, notre hypothèse est celle d'une perte de fonction. Une diminution de la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme par le mutant d'IκBα conduirait à un seuil d'activation moins élevé de la voie NF-κB ce qui rendrait les lymphocytes auto-réactifs facilement activables chez le patient (voir figure 3.5 C, page 145).

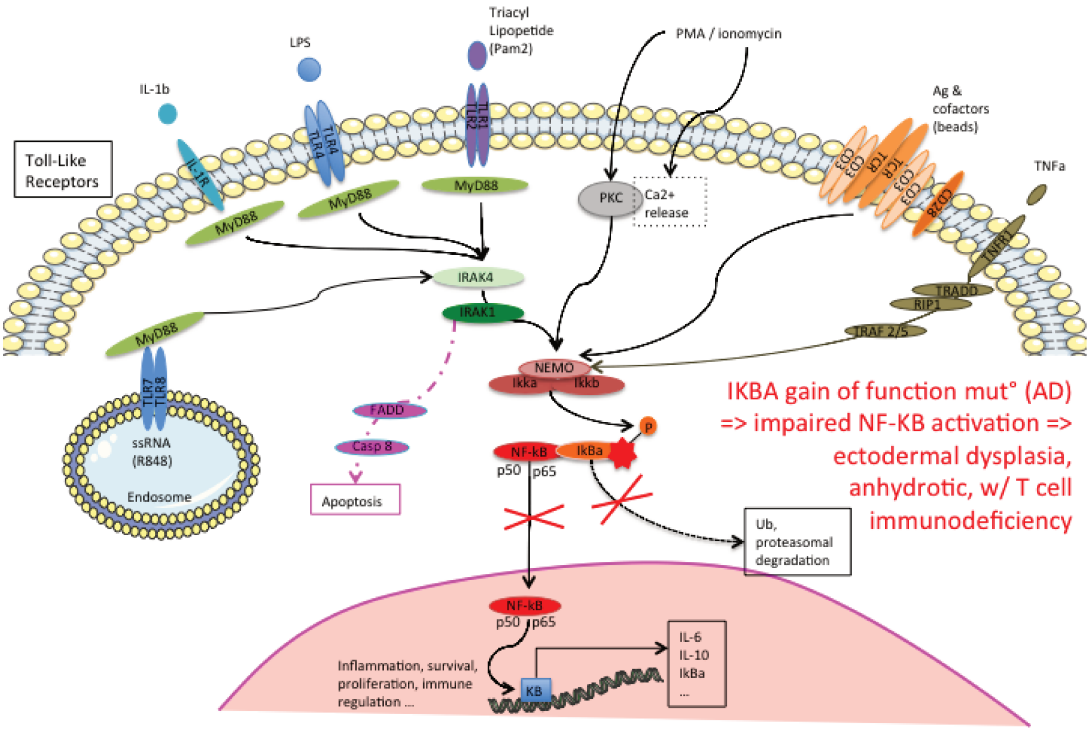
Un des tests fonctionnels utilisés pour étudier le fonctionnement global de la voie NF-κB est de l'activer dans des cellules mononuclées isolées du sang à l'aide de ligands des TLR et de regarder en aval par ELISA la production de cytokines dont la transcription est activée par NF-κB , comme l'IL-6 ou l'IL-10 (voir figure 3.5 D, pages 145). Nous l'avons utilisé sur des cellules du patient muté.

Pour tenter de valider notre hypothèse, nous avons commencé par étudier la ségrégation familiale de la mutation et confirmé son expression au niveau du transcrit. Nous avons mesuré l'expression d'IκBα en conditions basales et la production de cytokines pro-inflammatoires par ELISA. Nous avons également étudié l'impact de la mutation

sur l'apoptose. Les résultats de ces différentes expériences sont détaillés dans les sections suivantes.

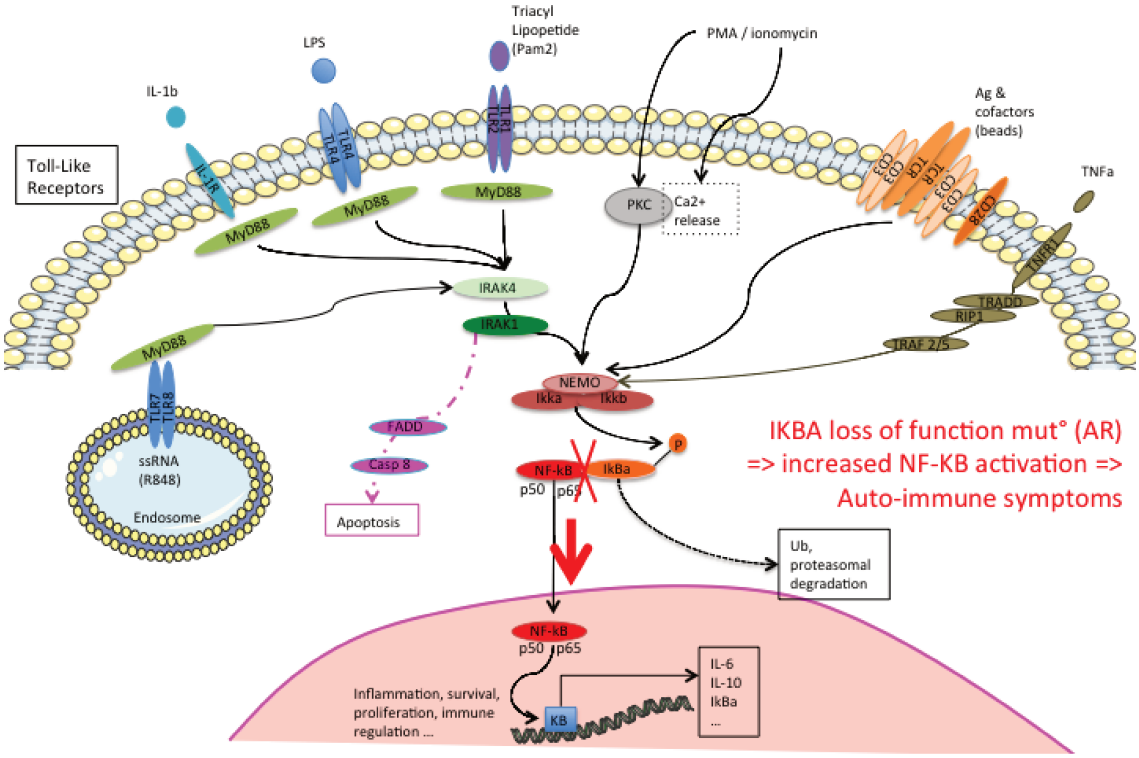


A. Activation de la voie NF-κB

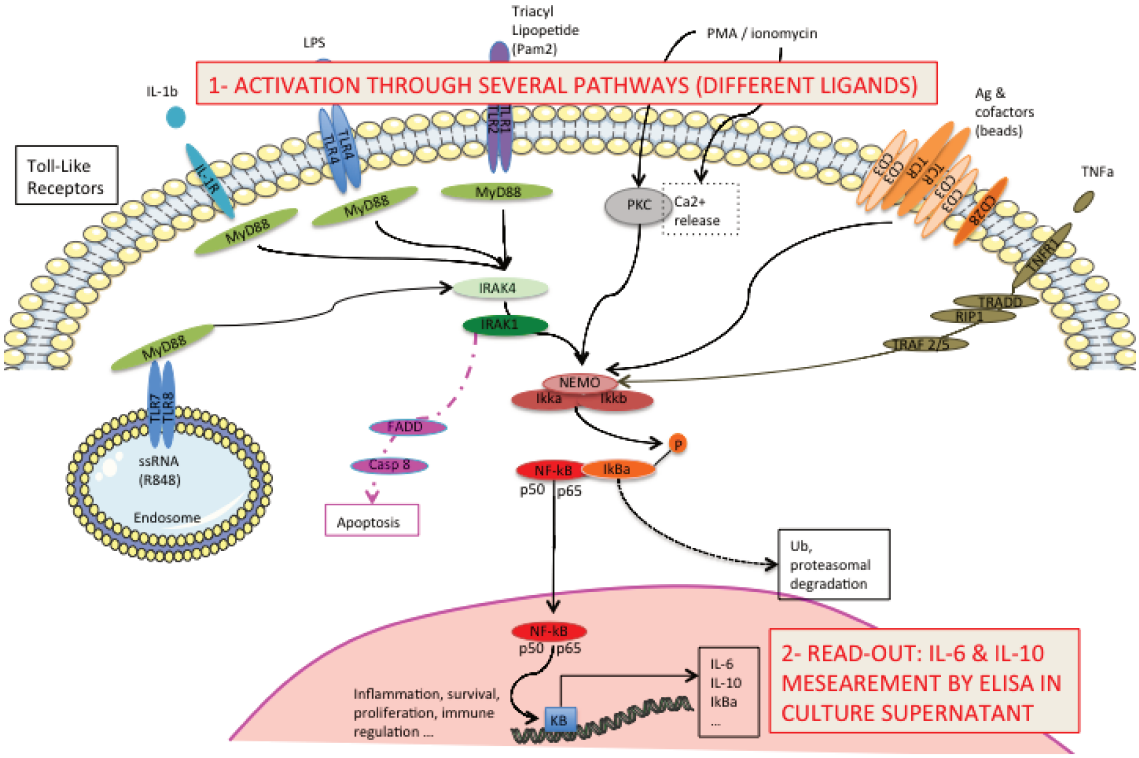


B. Mutations activatrices de IκBα

FIGURE 3.30 – **Voie NF-κB**



C. Mutations inhibitrices de IκBα



D. Tests *in vitro* de la voie NF-κB

FIGURE 3.31 – **Voie NF-κB (suite) :**

3.5.1 Présentation clinique du patient et de sa famille

Le patient II.3 de la famille 5 a présenté à partir de l'âge de 6 ans une thrombopénie auto-immune chronique, sévère (nadir des plaquettes à 3.10^9/L avec syndrome hémorragique). Le test d'agglutination indirect a mis en évidence des auto-anticorps anti-thrombocytes. Ce patient n'a pas présenté d'autres cytopénies. Il a présenté par ailleurs des anomalies ostéo-articulaires à type d'arthrogrippose et scoliose sévère, également présentes chez son frère II.4, exempt de cytopénies. Le patient II.3 a également une hydrocéphalie externe dérivée. La famille est consanguine au 2^e degré et un cousin germain présente lui aussi une thrombopénie. Biologiquement, le patient II.3 présentait une diminution modérée des lymphocytes B et de la proportion lymphocytes T naïfs (également observée chez le père et la sœur), des proliférations T normales en réponse à la PHA, diminuées en réponse à l'OKT3 et variables en réponse aux antigènes, résultat comparable à celui du père.

3.5.2 Etude de la ségrégation familiale et de l'impact transcriptionel de la mutation de *NFKBIA*

Le gène *NFKBIA* (MIM164008, ENSG00000100906, NC_000014.8) est situé sur le chromosome 14 et s'étend sur 4,2kb. La séquence codante est sur le brin reverse. Il comprend 6 exons. Le transcrit le plus long est le seul commun à plusieurs bases de données (ENST00000216797 ou NM_020529.2 ou CCDS9656). Il comprend 1558bp.

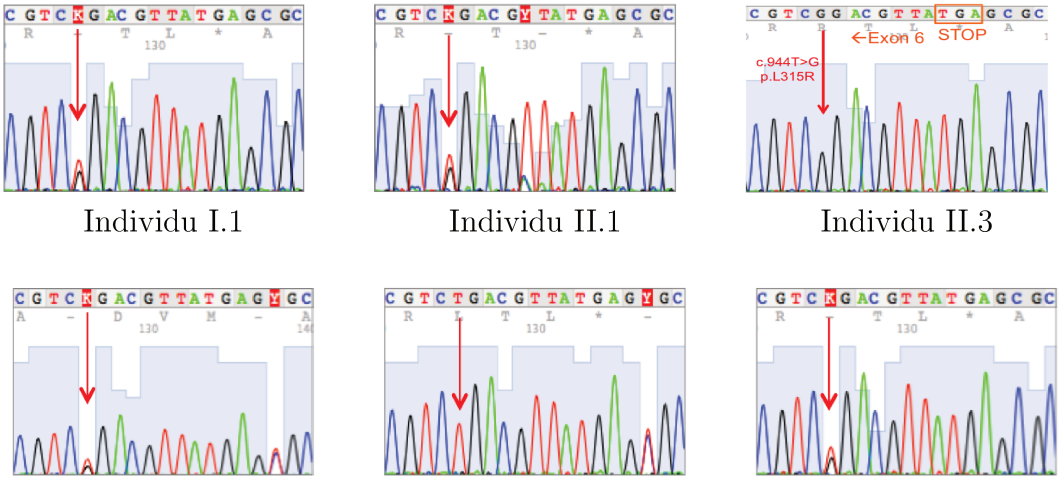
La variation présente dans la famille 5 est dans l'exon 6. Il s'agit d'une substitution d'une base modifiant l'antépénultième acide aminé de la protéine : c.944T>G p.L315R. Cette mutation est très rarement rapportée dans les bases de données publiques : absente de dbSNP, 1000 genomes et EVS, elle est vue 2 fois à l'état hétérozygote sur les 121376 allèles présents dans ExAC. Les différents programmes de prédiction *in silico* de l'impact de la mutation donnent des résultats concordants : elle est prédite délétère par Mutation Taster, Polyphen 2 et SIFT.

Seul l'ADN du patient a été séquencé pour analyse d'exome. Nous avons donc séquencé les 6 exons pour les 6 membres de la famille afin d'établir la ségrégation de la mutation. Nous avons confirmé la présence à l'état homozygote de la mutation sur l'ADN du patient extrait d'un autre prélèvement. Les 2 parents ainsi que les 2 frères sains portaient la mutation à l'état hétérozygote tandis que la sœur présentait une séquence non mutée. Par ailleurs, le séquençage a mis en évidence 6 autres variants. Un seul n'était pas décrit dans les bases de données. Situé dans l'exon 1 (c.129G>A), il ne modifie pas l'acide aminé. L'existence de ces variations nous a permis d'établir la transmission des allèles parentaux aux différents enfants, qui a également été vérifiée par étude de microsatellites dans la région afin d'exclure un évènement de recombinaison. Les résultats du séquençage des exons de *NFKBIA* pour la famille 5 sont résumés dans le tableau 3.25, page 147 et la figure 3.32, page 147.

La famille étant d'origine turque, nous avons souhaité exclure un variant restreint à une origine géographique ou éthnique. Nous avons donc séquencé l'exon 6 de *NFKBIA* chez 100 personnes d'origine turque non apparentées. Aucun des 200 allèles séquencés n'était porteur de ce variant. Nous avons également recherché des variations de *NFKBIA*

Individu	Exon 1	Exon 2	Exons 3-5	Exon 6
I.1	c.129G>A htz	rs1050851 htz	WT	c.944T>G htz
I.2	c.129G>A htz, rs1957106 htz	WT	WT	c.944T>G htz, rs8904 htz
II.1	c.129G>A htz	rs1050851 htz	WT	c.944T>G htz
II.2	rs1957106 htz	rs1050851 htz	WT	rs8904 htz
II.3	c.129G>A hmz	WT	WT	c.944T>G hmz
II.4	c.129G>A htz	rs1050851 htz	WT	c.944T>G htz

Tableau 3.25 – **Résumé des variations observées dans *NFKBIA* pour la famille 5.** Les variants sont décrits par leur numéro d'identification de référence des SNP commençant par rs lorsqu'ils sont déjà décrits, les nouveaux variants sont nommés selon la nomenclature sur la séquence codante. htz hétérozygote ; hmz homozygote ; WT wild type, séquence sauvage.



Individu I.1 Individu II.1 Individu II.3

Individu I.2 Individu II.2 Individu II.4

FIGURE 3.32 – **Electrophorégrammes représentant la fin du séquençage de l'exon 6 de *NFKBIA* pour la famille 5.** Les flèches indiquent la position de la mutation.

dans la cohorte de patients présentant un syndrome d'Evans en séquençant les 6 exons pour une vingtaine de patients. Nous n'avons pas mis en évidence de nouvelles variations dans les régions codantes et flanquantes du gène.

Le séquençage du cDNA pour les différents membres de la famille a permis de vérifier l'expression du transcrit muté chez tous les individus porteurs ainsi que le patient.

Il s'agit donc d'un variant très rare, jamais rapporté à l'état homozygote. La mutation n'altère pas l'épissage de l'ARN messager. La ségrégation de la mutation est compatible avec l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive puisque seul l'individu malade est homozygote.

3.5.3 Expression protéique de IκBα

L'isoforme la plus grande de la proteine IκBα est constituée de 317AA. Elle comprend 6 domaines inhibiteurs contenant des répétitions ankyrines et un domaine PEST (riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine, associé aux protéines à demie-vie courte, peptide signal pour leur dégradation) responsable de sa dégradation dépendante de la calpaïne par le protéasome. Elle possède plusieurs sites de phosphorylation sur des sérines et des thréonines et des tyrosines. La phosphorylation par IKK se fait sur les sérines en position 32 et 36. Elle possède aussi 2 sites d'ubiquitinylation (K21 et K22). Un schéma de la structure globale d'IκBα localisant les domaines et l'acide aminé muté est présenté figure 3.33, page 148. IκBα a été partiellement cristallisée, notamment sous forme complexée avec NF-κB.

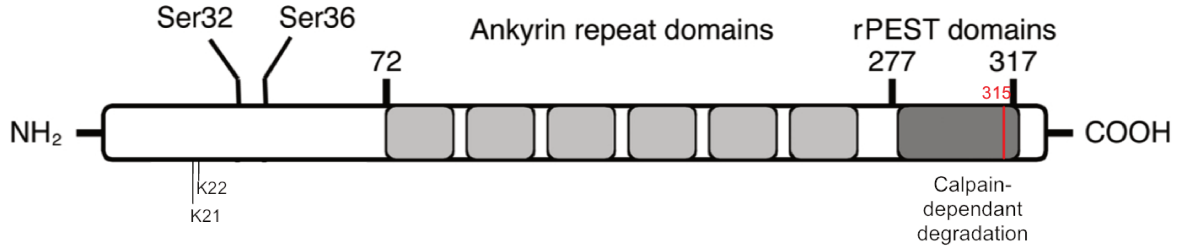


FIGURE 3.33 – **Schéma d'IκBα présentant ses domaines protéiques et ses principaux sites de modifications post-traductionnelles.** Adapté de Shumway *et al.* [203].

Nous avons étudié l'expression de la protéine dans les cellules du patient et de sa famille par western blot. Nous n'avons pas mis en évidence de variation du niveau d'expression de la protéine IκBα totale (voir figure 3.34, page 148).

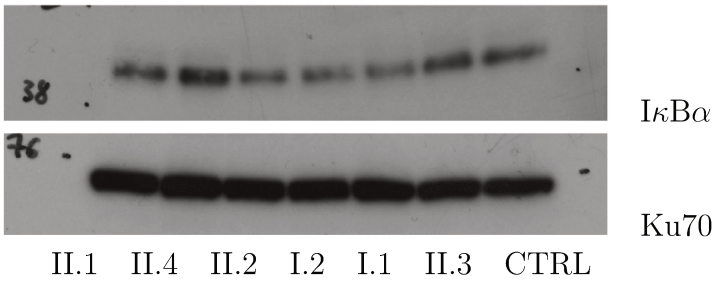


FIGURE 3.34 – **western blot d'IκBα pour la famille 5 et un controle (CTRL).** Dépôt d'extraits protéiques totaux issus de lymphocytes T activés par la PHA et entretenus par IL-2 pendant 11 jours de culture. Ku70 est le marqueur de dépôt.

Il existe également des anticorps dirigés contre la forme d'IκBα phosphorylée sur les sérines 32 et 36. Nous avons pu, en réalisant une cinétique d'activation des cellules avant extraction des protéines, mettre en évidence l'apparition transitoire de cette forme lors des temps très précoces d'activation (2 à 5 minutes) avant la dégradation de la protéine puis sa re-synthèse aux temps tardifs (>45min). La comparaison avec un contrôle est d'interprétation difficile et cette expérience n'a pas pu est reproduite suffisamment pour conclure sur l'existence d'une différence.

3.5.4 Étude globale de l'activation de la voie NF-κB

Nous avons étudié de façon globale l'activation de la voie NF-κB suite à une stimulation au niveau de différents récepteurs de surface. Pour cela, nous avons activé à 2 reprises les cellules du sang total frais avec différents ligands de récepteurs membranaires pendant 48h puis mesuré la concentration en IL-6 ou en IL-10 dans le surnageant de culture par ELISA. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre le patient, les apparentés sains hétérozygotes ou sauvages ou le contrôle extra-familial. Les résultats sont présentés dans la figure 3.35, page 149.

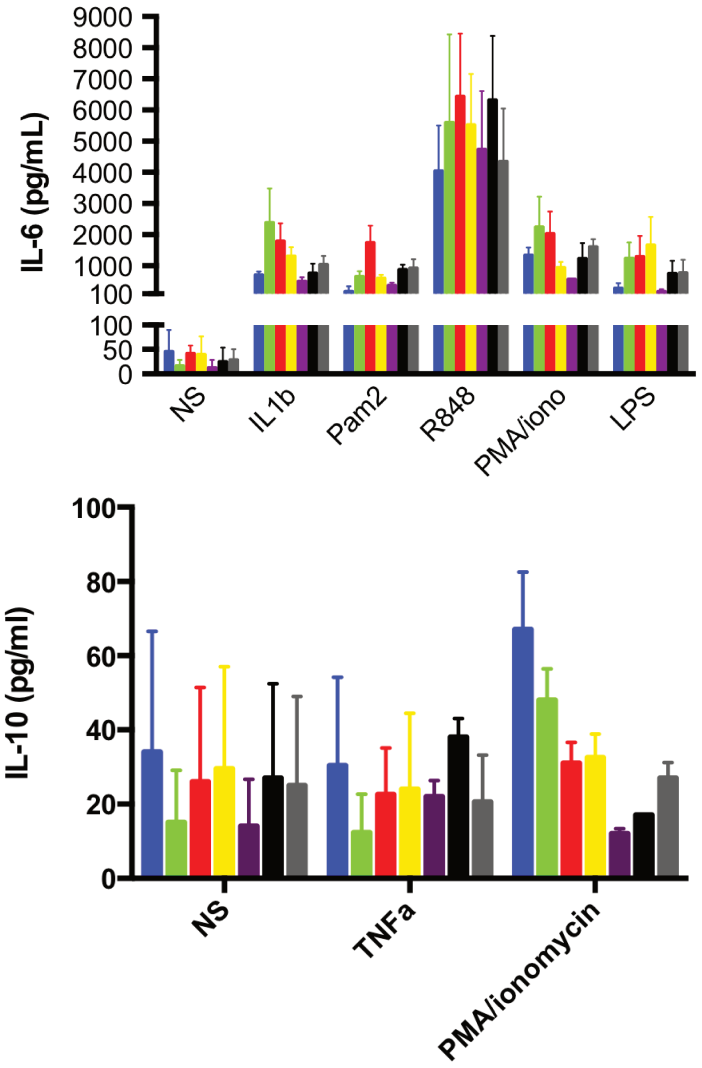


FIGURE 3.35 – **Etude globale de l'activation de la voie NF-κB sur sang total pour la famille 5.** Les ligands utilisés pour l'activation sont l'IL-1β, ligand du récepteur de l'IL-1, Pam2, ligand des TLR 2 et 6, R848, ligand des TLR 7 et 8, le LPS, ligand du TLR4, le TNFα, ligand du TNFR. La PMA associée à l'ionomycine activent la voie NF-κB sans passer par les récepteurs membranaires, en jouant sur la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et constituent un contrôle positif de l'expérience. Le contrôle négatif est le sang total non stimulé (NS). En bleu, un contrôle extra-familial, II.3 en vert, I.1. en rouge, I.2 en jaune, II.4 en violet, II.1 en noir et II.2 en gris. Ces graphes représentent 2 expériences, réalisés sur 2 échantillons sanguins différents. Les ELISA ont été réalisés avec 2 dilutions différentes de chaque surnageant de culture pour chaque échantillon.

3.5.5 Impact de la mutation sur l'apoptose

La voie NF-κB favorisant la survie cellulaire, nous avons souhaité étudier l'apoptose dans les cellules du patient. Nous avons exploré différentes voies d'apoptose sur les lymphocytes T du patient activés *in vitro*. Nous avons induit l'apoptose des cellules par le récepteur de mort Fas – à l'aide d'un anticorps agoniste ou de son ligand naturel Fas ligand – le récepteur TRAIL, la re-stimulation du TCR (AICD), avec ou sans inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide, CHX) et de la voie des perforines et granzymes (chloroquine, CHQ). Nous avons testé les voies dépendantes et indépendantes des caspases. A 24h, nous avons mesuré la proportion de cellules en apoptose par l'incorporation de l'iodure de propidium observée en cytométrie en flux. Ces expériences ont été réalisées 4 fois. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de la proportion de cellules apoptotiques entre les cellules du patient et celles d'un contrôle, dans les différentes conditions testées. La figure 3.36, page 150 représente l'une de ces expériences pour une partie des conditions testées.

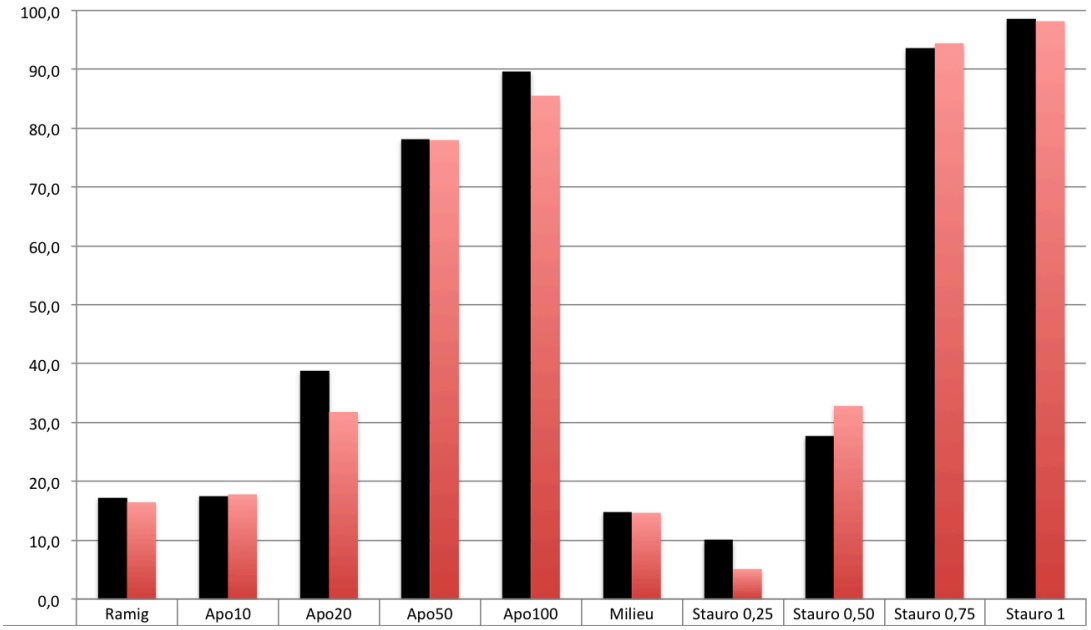


FIGURE 3.36 – **Etude de l'apoptose dans les cellules du patient.** comparaison du pourcentage de cellules en apoptose 24h après stimulation de la voie FAS par un anticorps agoniste (Apo) à différentes doses (en ng/mL) ou de l'apoptose par les voies dépendantes et indépendantes des caspases (staurosporine, doses en μg/ml). *in vitro* pour un contrôle (en noir) et le patient (en rouge). L'utilisation d'un anticorps anti-souris développé chez le lapin (Ramig pour rabbit anti-mouse Ig) permet de rapprocher par liaisons croisées (crosslink) les récepteurs ayant fixé l'anticorps agoniste. Il est ajouté systématiquement dans toutes les conditions avec l'anticorps agoniste. La condition Ramig seul est un contrôle négatif, de même que la condition milieu seul.

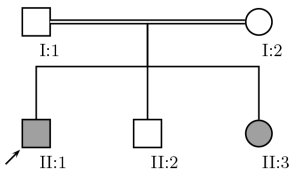
Nous avons également commencé la mise au point d'expériences permettant d'étudier la translocation de NF-κB dans le noyau en réponse à une stimulation (par WB sur des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques et en microscopie confocale) et préparé des plasmides contenant le gène *NFKBIA* sauvage ou porteur de la mutation du patient afin de pouvoir, une fois un défaut fonctionnel mis en évidence, étudier et complémenter ce défaut dans des cellules transfectées. A ce stade de notre travail sur cette mutation

homozygote d'IκBα , nous n'avons pas encore apporté la preuve fonctionnelle de son rôle dans la maladie immunologique du patient.

3.6 Résultats complémentaires - autres familles analysées en exome

Dans les pages suivantes sont présentés les principaux gènes candidats pour chaque famille. Nous avons vérifié la profondeur de séquençage (couverture) et l'existence des transcrits dans plusieurs bases de données. Dans le cas contraire, cela est précisé. Les hypothèses de transmission utilisées pour filtrer les variants sont indiquées : AD autosomique dominant, AR autosomique récessif, R-X récessif lié à l'X. Sont détaillés pour chaque gène et variant les scores prédictifs de Polyphen 2 (P), SIFT (S) et Mutation Taster (MT), codifiés vert pour toléré, rouge pour délétère. La fréquence allélique (MAF) est celle trouvée dans ExAC sauf indication contraire, lorsqu'il s'agit d'un variant non décrit, on utilise le symbole ∅.

3.6.1 Famille 6



Famille consanguine, 2 enfants atteints
TI (II.1 et II.3)+ AHAI (II.3) + atteinte pulmonaire (II.1)
Exome : les 3 enfants
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 2

ARHGEF4

MIM605216
c.613G>T, p.V205L
Scores P/S/MT
Ségrégation familiale : OK
MAF : ∅

Rho guanine nucleotide exchange factor 4. Accélère l'activité GTPase des Rho GTPases comme CDC42. Interagit avec APC, un gène suppresseur de tumeur. Transcrit seulement décrit dans Ensembl. Expression restreinte : cerveau, ±poumons, reins, muscles [204]

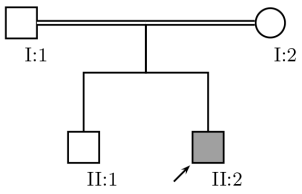
LRRK1

MIM610986
c.5933_5934delAC, p.T1978Rfs*41
Pas de scores (del)
Ségrégation familiale : OK
MAF : ∅

Leucine-rich region kinase 1, impliquée dans le trafic de l'EGFR des endosomes précoces aux endosomes tardifs. Pourrait agir comme protéine de support dans les processus d'endocytose [205]. LRRK1 est également impliquée dans la régulation de l'autophagie [206]. Expression ubiquitaire.
Etude du cDNA : présent.
Recherche d'un Ac pour WB. 2 Ac testés, non utilisables.

LRRK1 est un meilleur candidat que ARHGEF4. Les publications récentes ouvrent de nouvelles pistes et pourraient apporter de nouveaux outils pour explorer sa fonction et rechercher un défaut dans les cellules des patients.

3.6.2 Famille 7



Famille consanguine
NAI avec AAc (II.2)
Diabète type 1 chez II.1 et oncle paternel
Exome : II.2 seul initialement, ajout récent des parents et du frère

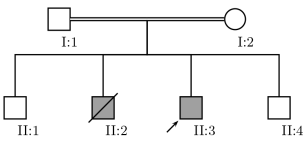
1re hypothèse de transmission : AR, mutations homozygotes ou hétérozygotes composites
Nb de gènes candidats : 0

2e hypothèse de transmission : AD en considérant II.1 comme atteint
Nb de variants : 17

3e hypothèse de transmission : AD en considérant II.1 comme sain
Nb de variants : 40

L'atteinte auto-immune du patient II.1 n'était pas connue initialement et n'avait donc pas été prise en compte dans le choix des échantillons à étudier. Les gènes candidats avec les hypothèses de transmission AD n'ont pas été vérifiés en termes d'existence des transcrits dans plusieurs bases de données, de couverture des zones séquencées et de scores de prédiction *in silico*. L'intérêt de ces gènes par étude de la littérature n'a pas été fait. Ce travail de filtre est à faire avant de poursuivre les recherches pour cette famille.

3.6.3 Famille 8



Famille consanguine, 2 enfants atteints
II.2 : syndrome d'Evans sévère, décès post-GMO
II.3 : TI avec AAc, lymphoprolifération
Exome : II.3 uniquement
Hypothèse de transmission : AR et R-X
Nb de gènes candidats : 2

ZCCHC13

Pas de MIM
c.433A>T, p.K145*
Scores P/S/MT
Ségrégation familiale : OK, pas d'ADN du frère décédé
MAF : ∅

Zinc finger CCHC-type containing 13. Gène situé sur le chromosome X. Entraine un STOP => exploré en premier malgré l'absence de littérature. Pas de matériel pour explorer le cDNA ou la protéine.

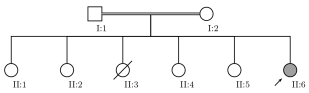
CHMP4C

MIM 610899
c.469G>A, p.D157N
Scores P/S/MT
MAF : ∅

Membre 4C de la famille CHMP ou chromatin-modifying protein 4C. Famille de protéines appartenant au complexe ESCRT-III, impliqué dans la dégradation des récepteurs de surface protéiques et de la formation des multi-vesicular bodies. Transcrit présent dans le cœur, la rate et le rein. Egalement impliqué dans les phases finales de la division cellulaire (Abscission, cytokinesis). Impliqué dans la régulation du trafic endosomal. Régulé de façon positive par p53 pour augmenter la sécrétion d'exosomes et l'internalisation des récepteurs à l'EGFR pour *in fine* ralentir la croissance cellulaire et augmenter l'autophagie [207].

L'ADN de ce patient a été séquencé dans les premiers exomes pris en charge par la plateforme de génomique. La couverture était relativement mauvaise à l'époque. De plus, la famille a été perdue de vue depuis. Le rôle d'un gène candidat, même hautement probable, ne pourra donc pas être confirmé fonctionnellement. En conséquence, l'étude de ce patient n'est actuellement pas poursuivie.

3.6.4 Famille 9



Famille consanguine, 1 enfant atteinte
II.6 : syndrome d'Evans précoce, lymphoprolifération
Exome : II.6 uniquement
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 3

ARHGAP10

MIM609746
insertion d'un A
dans un stretch de A
en -18 de l'exon 5
Pas de scores (intronique)
MAF : ∅

ρ-GTPase-activating protein 10. Régule l'activité de Cdc42, impliquée dans le maintien du cytosquelette d'actine et de la structure de l'appareil de Golgi [208]. Possède un rôle anti-apoptotique via son interaction spécifique avec la forme clivée de PAK2 (PAK2p24). L'interaction entre ARHGAP10 et PAK2p24 inhibe l'activité kinase et change la localisation cellulaire du noyau à la région périnucléaire et régule l'induction de l'apoptose par PAK2p24 [209].
Le séquençage direct n'a pas confirmé la présence de cette insertion.

TBK1

MIM604834
insertion d'un T
dans un strech de T
en -6 de l'exon 4
Pas de scores (intronique)
MAF : ∅

TANK-binding kinase 1. Kinase non-canonique des IκB. Expression ubiquitaire. Active la voie NF-κB en aval de PKCϵ. Son expression est suffisante pour induire la phosphorylation de IRF3, entrainer sa translocation et une signature interféron.
A confirmer par séquençage Sanger avec Taq haute fidélité.

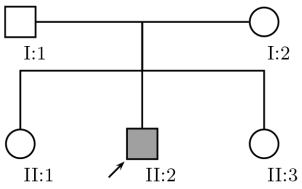
ATG2B

MIM616226
insertion d'un A
dans un strech de A
en -7 de l'exon 16
Pas de scores (intronique)
MAF : ∅

Homologue de S. Cerevisiae Autophagy 2. Indispensable à la formation des auto-phagosomes. Un SNP est impliqué dans la réponse immunitaire au BCG *in vitro* et *in vivo* et diminue la formation des autophagosomes LC3+.
A confirmer par séquençage Sanger avec Taq haute fidélité.

Ces trois gènes semblent de bons candidats en termes de fonctions. Néanmoins, compte-tenu de la localisation des variations (introniques, addition d'une base dans une séquence répétée), de la fiabilité des techniques de séquençage haut débit utilisées à l'époque (2012), il est indispensable de rechercher l'existence de ces variations par séquençage direct en Sanger. Cela a été fait pour ARHGAP10 et la variation n'a pas été confirmée. Cela reste à faire pour les ATG2B et TBK1. Il serait également préférable d'examiner l'exome d'autres membres de la famille avant d'éventuellement réanalyser les données avec une autre hypothèse de transmission.

3.6.5 Famille 11



Famille non consanguine, 1 enfant atteint
II.2 : syndrome d'Evans précoce, lymphoprolifération
Exome : II.2 et parents
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 0
Hypothèse de transmission : R-X
Nb de gènes candidats : 0
Hypothèse de transmission : *de novo*
Nb de gènes candidats : 1

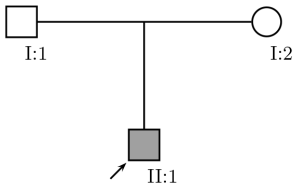
COLEC12

MIM607621
c.1256T>G
p.V419G
Scores P/S/MT
MAF : ∅

Collectin 12. Exprimé dans les cellules vasculaires endothéliales et les tissus placentaires. Appartient à la famille des lectines de type C, impliquées dans les défenses contre les micro-organismes. Dans des cellules de hamster transfectées, COLEC12 joue un rôle dans la liaison et la phagocytose de bactéries et de levures [210].

Le gène candidat identifié doit être validé : séquençage direct pour toute la famille, impact sur le cDNA et la protéine, tests fonctionnels. De nouvelles hypothèses de transmission AD à pénétrance incomplète sont également à explorer.

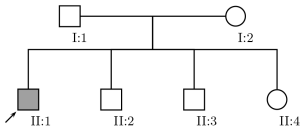
3.6.6 Famille 12



Famille non consanguine, 1 enfant atteint
II.1 : syndrome d'Evans précoce, lymphoprolifération
Exome : II.1 et parents
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 0
Hypothèse de transmission : R-X
Nb de gènes candidats : 0
Hypothèse de transmission : *de novo*
Nb de gènes candidats : 0

Les hypothèses de transmission testées jusqu'ici n'ont pas mis en évidence de gène candidat valide. De nouvelles hypothèses, de transmission AD à pénétrance incomplète sont à tester mais les listes des variants hétérozygotes partagés avec l'un ou l'autre des parents comprennent environ 60 variants chacune et n'ont pas encore été analysées.

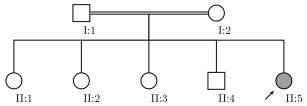
3.6.7 Famille 13



Famille non consanguine, 1 enfant atteint
II.1 : syndrome d'Evans précoce, lymphoprolifération
Exome : II.1 et parents
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 0
Hypothèse de transmission : *de novo*
Nb de gènes candidats : 0

Les hypothèses de transmission testées jusqu'ici n'ont pas mis en évidence de gène candidat valide. De nouvelles hypothèses, de transmission AD à pénétrance incomplète sont à tester mais les listes des variants hétérozygotes du fils partagés avec le père ou la mère comprennent 55 et 79 variants respectivement et n'ont pas encore été analysées.

3.6.8 Famille 14



Famille consanguine, 1 enfant atteint
II.1 : AHAI + NAI précoces, lymphoprolifération
retard de croissance Exome : tous les enfants
Hypothèse de transmission : AR
Nb de gènes candidats : 1

CHODL

MIM607247
c.259A>G
p.N87D
Scores P/S/MT
MAF : ∅

Chondrolectine. Son isoforme ΔE, localisée dans le réticulum endoplasmique tardif, est exprimée uniquement dans les lymphocytes et les thymocytes, et de façon différentielle, ce qui suggère un rôle dans le développement des lymphocytes T [211, 212].

Le gène candidat identifié doit être validé : séquençage direct pour toute la famille, impact sur le cDNA et la protéine, tests fonctionnels.

3.7 A propos de la cohorte de patients

Parmi les patients présentant un syndrome d'Evans, nombreux sont ceux présentant également d'autres atteintes cliniques. Celles-ci sont variées et les plus fréquentes sont des symptômes auto-immuns, une lymphoprolifération bénigne ou des déficits immunitaires. Notre cohorte ne fait pas exception. Elle a été constituée au cours des ans, et incluait historiquement des patients présentant des cytopénies auto-immunes, souvent associées à une lymphoprolifération bénigne, chez lesquels une suspicion d'ALPS avait été portée puis exclue (environ 250 patients). Au cours de ce travail, nous avons commencé pas vérifier l'existence d'une bicytopénie auto-immune chez ces patients, ce qui était le cas seulement pour 70 patients. Nous avons également enrichi notre cohorte des enfants suivis ou ayant consulté au moins une fois à l'hôpital Necker pour un syndrome d'Evans et d'enfants dont les prélèvements nous ont été adressé par des médecins collaborateurs, y compris de l'étranger, en raison de l'expertise de notre laboratoire sur les maladies auto-immunes pédiatriques d'origine génétique. Certains présentaient d'autres atteintes auto-immunes, notamment des auto-anticorps anti-nucléaires, sans pour autant présenter les critères diagnostiques du lupus. De même, nombre de patients présentaient, associés au syndrome d'Evans, des entéropathies auto-immunes et un diabète sans que des mutations dans *FOXP3* ou *CD25* n'aient été mises en évidence.

Parmi cette cohorte étendue et hétérogène, nous avons choisi certaines familles, en particulier les familles consanguines, pour les étudier par séquençage d'exome à la recherche de gènes candidats.

De la même façon, nous avons sélectionné une vingtaine de patients présentant un syndrome d'Evans sporadique et adressés à l'hôpital Necker pour réaliser, en collaboration avec C. Besnard, une interne de pédiatrie, une étude clinique plus approfondie et une recherche systématique de mutations dans *LRBA* et *CTLA-4*. Ce travail fait l'objet d'un article intégré ci-dessous.

Suite à l'identification de *LRBA*, *CTLA-4* et *STAT3* et à la caractérisation des atteintes cliniques des patients mutés, nous avons ouvert notre travail à d'autres patients, cliniquement proches, sans qu'ils présentent systématiquement un syndrome d'Evans. L'objectif étant alors de constituer des cohortes de patients présentant des mutations des mêmes gènes. Nous avons donc étudié de façon ciblée une cinquantaine de patients, notamment par séquençage haut débit d'un panel de gènes constitué par l'équipe de N. Cerf-Bensussan à d'autres fins.

Ainsi, les résultats présentés dans les sections précédentes portent sur une trentaine de familles, dans lesquelles au moins un patient présentait des cytopénies immunologiques. En sus de ces patients, notre travail a permis de porter un diagnostic génétique certain ou probable chez 5 autres patients (mutations de XIAP, de FOXP3, de NEMO) et d'identifier un nouveau gène candidat potentiel. Ces résultats mettent en évidence le chevauchement clinique de ces maladies monogéniques, en particulier la fréquence des cytopénies auto-immunes dans les formes avec un phénotype atténué de déficits immunitaires primitifs considérés comme bien caractérisés.

3.7.1 Article 2 : patients présentant un syndrome d'Evans sporadique : étude de 23 patients vus à Necker

Manuscrit en préparation pour soumission prochaine à Blood ou Hematologica.

Cet article a pour objet de décrire cliniquement et biologiquement une cohorte rétrospective de 23 patients ayant présenté un syndrome d'Evans à début pédiatrique. Les autres symptômes présentés au cours du suivi, les traitements reçus, l'évolution de la maladie sont présentés en détail. De plus, nous avons exploré ces patients de façon systématique à la recherche d'un défaut de CTLA-4 et de LRBA. Certains patients ont également fait l'objet d'explorations génétiques plus poussées (séquençage ciblé, panel de gènes, exome).

Parmi ces 23 patients, on retrouve les cas index des familles 2, 4, 9 et 13 (séquençage de l'exome), les cas index des familles CTLA-4 8 (séquençage d'un panel ciblé) et 9 (séquençage direct de CTLA-4), ainsi que le cas index de la famille STAT3gof 4 (séquençage d'un panel ciblé) décrits précédemment.

Principaux résultats et points de discussion :

A partir de 367 dossiers revus, 23 patients ont été finalement étudiés en détail. La plupart ont été exclus par manque de données. La quasi-totalité des 23 patients ont présenté d'autres symptômes au cours du suivi. La moyenne de suivi était de 10,9 ans. il s'agit de manifestations auto-immunes, infections et lymphoprolifération bénigne étaient les symptômes les plus fréquents. Les explorations génétiques ont permis d'identifier un gène en cause pour 8 patients soit 42% de la cohorte. Parmi les gènes identifiés, en plus de LRBA et CTLA-4, on note une mutation de *STXBP2*, 2 mutations gain de fonction de *STAT3* et une mutation somatique de *KRAS*. La prise en charge comprenait des corticoïdes et des immunoglobulines pour la quasi-totalité des patients. Une ou plusieurs autres lignes de traitement étaient requises dans 82,6% des cas et incluaient des immunosuppresseurs dont fréquemment l'anti-CD20, une splénectomie ou d'autres traitements. Une réponse complète a été obtenue pour 11 patients. Elle était partielle pour 9 patients. 18 patients présentaient des complications et 2 patients sont décédés pendant la période de suivi.

La particularité du recrutement dans notre centre de référence pour les déficits immunitaires primitifs peut expliquer la fréquence des symptômes associés, des comorbidités et la lourdeur des traitements mis en œuvre. La proportion élevée de patients chez lesquels nous avons identifié une cause génétique nous incite à rechercher des déficits immunitaires primitifs chez les enfants présentant un syndrome d'Evans dès lors qu'il existe d'autres symptômes associés. En raison de la variété des gènes impliqués et du chevauchement des symptômes, nous préconisons le séquençage au minimum d'un panel de gènes impliqués dans les déficits immunitaires primitifs. Le séquençage de l'exome permettrait d'identifier de nouvelles causes génétiques associées au syndrome d'Evans pédiatrique.

TITLE PAGE

CTLA-4 AND LRBA IN PEDIATRIC EVANS SYNDROME: A CLINICAL AND GENETIC STUDY

LEVY Eva[1,2]*, BESNARD Caroline[1,3,4]*, BOLE-FEYSOT Christine[5], NITSCHKE Patrick[2,6], RIEUX-LAUCAT Frédéric[1,2] and QUARTIER Pierre[1,2,3]

* These authors contributed equally to this work.

1. INSERM UMR 1163, Laboratory of Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases, 75015 Paris, France
2. Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France
3. Paediatric immuno-haematology and rheumatology department, Necker-Enfants malades university hospital, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France
4. UPMC
5. Genomic Platform, INSERM UMR 1163, Paris Descartes Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, 75015 Paris, France
6. INSERM UMR 1163, Bioinformatics Department, Institute Imagine, 75015 Paris, France

Corresponding author:

Frédéric Rieux-Laucat, INSERM UMR 1163, Institut Imagine, 24 boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France. Phone: +33.1.42.75.42.00; Fax: +33.1.42.75.42.21; E-mail: frederic.rieux-laucat@inserm.fr

Text : x words.
Abstract : 250 words.
Figures : 1
Tables : 6
References : x.

REGULAR ARTICLE

ABSTRACT

Evans syndrome (ES) is defined by the occurrence of immune thrombocytopenia and autoimmune haemolytic anaemia, following a chronic and relapsing course without any underlying disease. There is no consensus in patients' management. Morbidity and mortality remain high. Patients may present other features: autoimmunity, benign lymphoproliferation or immune deficiency, suggesting a yet to identify genetic defect. The predominance of autoimmune cytopenia in the recently described *cytotoxic-T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) and *lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor* (LRBA) deficiencies prompted us to explore these genes within our study of a pediatric cohort of ES patients.

We described 23 paediatric patients fulfilling strict inclusion criteria and performed systematic genetic investigation of LRBA and CTLA-4 and a wider screen by Next generation sequencing (NGS) on a case-by-case basis.

Mean age at first symptoms was 4.7 years old. Cytopenias occurred simultaneously in 9 (39%) cases. Other features were observed in 22 (95,7%) patients. 17 (73.9%) had benign lymphoproliferation. Dysimmune manifestations affected numerous organs, including lungs (52.2%), skin (47.8%), liver (34.8%) and central neural system (17.4%). 12 (52.2%) patients presented with autoimmunity. 10 (43.5%) contracted infectious diseases.Apart from corticosteroids and intravenous immunoglobulins, treatments included splenectomy (30.4%) and immunosuppressive therapy (82.6%), mainly rituximab (65.2%).

Gene sequencing led to a diagnosis in 7 patients (30.4%) involving LRBA, CTLA-4, STXBP2, STAT3 and KRAS.

Our results suggest that children presenting with ES should be thoroughly explored for other symptoms before excluding an underlying disease. Genetic investigations of LRBA, CTLA-4, and more widely, of PID should be performed more systematically in pediatric ES when associated with autoimmune, lymphoproliferative or immunodeficient features.

INTRODUCTION

The existence of a spectrum-like relationship between autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) and immune thrombocytopenia (ITP) was suggested by Evans and colleagues in 1951. It is characterized by a great variability of onset, course and duration, involving abnormal immune mechanisms [1]. Evans syndrome (ES) has been thereafter defined by simultaneous or sequential association of these disorders, without an underlying cause. The course of the disease is usually chronic and relapsing.

Only a few descriptive cohort studies have been published (summarised in Table 1) [2-8]. To date, there are no evidence-based studies establishing a clear algorithm to manage ES [9]. The few open trials of treatment regiments in ES contain only a small number of patients and there have been no randomized-controlled trials [10]. Therefore, despite a wide range of available therapeutics, the management of ES remains a challenge with an outcome burdened with mortality and complications.

Furthermore, immune cytopenia may associate with other manifestations, mostly dysimmune. Without reaching diagnostic criteria for a specific disease, like lupus or genetically characterised primary immune deficiency (PID), they suggest an underlying cause, which usually remains unidentified.

LRBA and CTLA-4 (MIM614700 and 616100) deficiencies are recently described genetic diseases [11,12]. Patients bearing homozygous or compound heterozygous mutations of the *LRBA* gene or heterozygous haplo-insufficient mutations in the *CTLA4* gene can present dysimmune manifestations: organ-specific autoimmunity, benign lymphoproliferation and humoral immune deficiency. Cytopenia are almost always present. The wide range of overlapping clinical features renders LRBA and CTLA-4 defect diagnosis dependent upon laboratory and genetic testing.

This cohort study aims to describe the clinical spectrum, treatment and outcome of children presenting with ES. We also sought to identify genetic underlying aetiologies that can lead to immune cytopenia. We chose to systematically explore *CTLA4* and *LRBA*, in an attempt to get a better understanding of both the clinical spectrum of these newly described diseases and their contribution to paediatric ES.

METHODS

This retrospective cohort study was initiated in the department of the Paediatric Immunology, Haematology and Rheumatology Unit at Necker Hospital (Paris, France), a primary national referral center for paediatric autoimmune cytopenias, and the Laboratory of Immunogenetics of Paediatric Autoimmune Diseases at Imagine Institute (Paris, France).

Written informed consent (parental consent for minors) was obtained from all participants. The study and protocols conform to the 1975 Declaration of Helsinki and were approved by the Comité de protection des personnes Ile de France II and the French advisory committee on data processing in medical research.

We recruited children presenting with autoimmune cytopenias addressed to the paediatricians of our department and children needing immunological explorations from 1996 to 2014.

Inclusion criteria were: occurrence of first symptoms before 18 years old (yo), ES defined by the simultaneous or sequential occurrence of AIHA and ITP, no underlying disease, with minimal follow-up of 6 months.

AIHA was defined by a hemoglobin (Hb) level < 10 g/dL with a positive direct antiglobulin test (DAT) and hemolysis (abnormal values of reticulocytosis, free bilirubin, lactate deshydrogenase (LDH) and haptoglobin). ITP was defined by a platelet count <100 000/mm3, on two separate occasions, after exclusion of non-immune aetiologies [13].

To assess treatment efficacy, the following criteria were used. No remission was defined by a platelet count < 30 000/mm^3 or Hb < 7 g/dL. Partial remission was defined by a platelet count between 30 and 100 000/mm3 or Hb between 7 and 11 g/dL with hemolysis. Complete remission was defined by a platelet count > 100 000/mm3 and Hb > 11 g/dL without hemolysis, with substitutive or symptomatic treatment ongoing (hydrocortisone or substitutive intravenous immunoglobulin) or discontinued for at least 12 months [6,7,10,14]. A relapse of ITP or AIHA was defined by the recurrence of ITP and/or AIHA after partial or complete remission.

Data collected included demographics, clinical presentation, laboratory explorations (including immunological and genetic results), management and outcome.

DNA samples were collected from peripheral blood from patients using standard phenol-chloroform extraction method or QIAampDNA blood mini kit (Qiagen).

Sequencing of genes of interest were either done gene by gene by direct Sanger sequencing or part of a wider genetic analysis, either through exome or target gene panel NGS-sequencing. Mutations identified by NGS-sequencing were verified by Sanger, preferably on another sample.

When Sanger sequencing was performed, exons were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA according to standard protocols. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. The PCR products were sequenced in both directions and analyzed with ApE- A plasmid Editor v2.0.45.

Illumina compatible precapture barecoded genomic DNA libraries were constructed according to the manufacturer's sample preparation protocol (Ovation Ultralow, Nugen Technologies). Briefly, 1 to 3 µg of each patient's genomic DNA was mechanically fragmented to a median size of 300 bp using a Covaris. 100 ng of double strand fragmented DNA was end-repaired and adaptors containing a specific 8 bases barecode were ligated to the repaired ends (one specific barecode per patient). DNA fragments were PCR amplified to get the final precapture barecoded libraries.
Several precapture libraries were pooled at equimolar concentrations. The capture process was performed using this pool and biotinylated probes from the SureSelect panel according to the SureSelect protocol (Agilent). The barecoded libraries molecules complementary to the biotinylated beads retained by streptavidine coated magnetic beads were PCR amplified to generate a final pool of postcapture libraries.
Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq2500 (Paired-End sequencing 130x130 bases, High Throughput Mode).
Sequence reads were aligned to the human hg19 reference genome using the Burrows-Wheeler Alignment version 0.6.2.13. The mean depth of coverage obtained for each sample was >= 300X, with >=97% of the exome covered at least at 15X and >=90% of the exome covered at least at 30X.

Exome libraries were prepared using the 50 Mb SureSelect Human All Exon kit V3 (Agilent Technologies). Paired-end 75+35 reads were generated using a SOLiD5500XL (Life technologies) and mapped using LifeScope (Life Technologies). The mean depth of coverage obtained for each sample was >=70X, with >=83% of the exome covered at least at 15X.

For all high throughput sequencing, single nucleotide polymorphisms and indel calling were performed using GATK tools and an in-house software (PolyWeb) was used to filter the variants.

Peripheral blood mononuclear cells were collected from blood using standard density gradient separation method. Cells were either cultivated right away or frozen and activated upon thawing. T lymphocytes were activated by SEE (0,1ng/ml) and cultured in Panserin, 5% SAB, 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine medium. At day 3 of culture and further on three times per week, IL-2 (100ng/ml) was added to maintain cell proliferation.

Cell lysates were prepared according to standard methods, separated using 3-8% Tris-acetate gels (Invitrogen), transferred onto PVDF membrane, and immunoblotted with primary antibodies to LRBA (HPA023597, Sigma), Ku70 (MA5-13110, Thermo scientific), and secondary antibodies to rabbit and mouse (Santa Cruz).

Descriptive statistics included mean (standard deviation) or median (minimum-maximum) as appropriate for continuous variables and frequency (percentage) for categorical variables.

RESULTS

Characteristics of patients

Out of 367 recruited patients, we included 23 patients fulfilling the inclusion criteria (Table 2). Most patients excluded were due to insufficient data (244), followed by the identification of an underlying diagnosis (34) and the presence of a unique cytopenia (32) (Figure1).

Among the 23 included patients, 21 was referred to us by other hospitals: University Hospital Center of Angers (1 case), Hospital Group Pellegrin in Bordeaux (1 case), Jeanne de Flandre Hospital in Lille (2 cases), La Timone Hospital in Marseille (3 cases), Arnaud de Villeneuve Hospital in Montpellier (2 cases), Hospital Center of Montauban (1 case), Hospital Center of Mont-de-Marsan (1 case), Louis Mourier Hospital in Paris (1 case), Armand-Trousseau Hospital in Paris (2 cases), Children's Hospital in Toulouse (5 cases), Clocheville Hospital in Tours (1 case).

When cytopenia occurred sequentially, the main delay was from 15 days to 10 years (3.8 years).

Clinical spectrum (Table 3)

In addition to cytopenia, almost all patients (22/23) presented various clinical features, usually more than one (19/22).

The main feature presented was lymphoproliferation. 52.2% of patients had hepatomegaly, 69.6% splenomegaly and 52.2% lymphadenopathy.

Organ-specific features were frequent, mostly immune and infectious. 52.2% of patients had pulmonary manifestations, infectious and dysimmune in respectively 7 and 6 cases. 21.7% had an ENT involvement: dental abcess (1), sinusitis (1), mouth ulcers (1), adenoid hypertrophia (1), deafness (1) and recurrent otitis (1). 47.8% had skin involvement including zona (5), eczema (2) and other various lesions (7). Hepatobiliary disorder affected 34.8% of patients: chronic cholecystitis (1), autoimmune hepatitis (2), hepatic cytolysis (2), Gilbert's disease (1), hepatic hemangioma (1) and hepatic infiltration (1). 30.4% of patients had gut involvement, including 4.3% with chronic interstitial gastritis, 17.4% with small intestine and 13% with colic involvement. Musculo-skeletal troubles affected 30.4% of patients, located in muscle (1), hip (2), back (2) and other joints (3). 17.4% of patients had neurologic involvement: meningitis (3) and velar insufficiency (1). 8.7% of patients had cardiac involvement: one had pericarditis and one had cardiomyopathy.

Laboratory explorations (Table 4)

Autoimmune neutropenia was associated with bicytopenia in 12 (52.2%) cases.

The direct antiglobulin test (DAT) pattern was immunoglobulin (Ig) G in 16 (69.6%) patients. Positive in 10 (43.5%) cases, the Dickson test showed anti-GPIIbIIa antibodies in 3 (13%), anti-GPIbIX antibodies in 2 (8.7%) and anti-GPIaIIa antibodies in 2 (8.7%).

A search for autoantibodies was performed in 22 (95.6%) patients. Positivity was found for anti-platelet antibodies in 4 (17.4%) patients, anti-neutrophils antibodies in 6 (26.1%), anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 5 (21.7%), anti-nuclear antibodies in 8 (34.8%), anti-smooth muscle antibodies in 4 (17.4%), anti-thyroperoxydase antibodies in 2 (8.7%), anti-mitochondrial antibodies in 1 (4.3%), anti-ADAMST13 antibodies in 1 (4.3%) and anti-GAD65 antibodies in 1 (4.3%).

When positive, the anti-neutrophils antibodies were specifically directed at NA1 in 2 (8.7%) and CD16 in 2 (8.7%).

Humoral immunity has been explored by quantification of serum Ig in 20 (87%) patients. 3 patients had a diminished level of Ig A and M, 2 had an hypogammaglobulinemia before treatment and 1 patient had a deficiency restricted to IgG2 and IgG4.

Cellular immunity has been explored by lymphocyte phenotype in 20 (87%) patients and was abnormal in 14 cases. Abnormalities included lymphopenia (12 patients) involving NK cells in 8 cases, B cells in 7 cases and/or T cells in 7 cases. Among T lymphopenia, CD4 and CD8 were exclusively affected in respectively 2 and 1 patients. Conversely, 2 patients presented CD8 lymphocytosis. An increase of double negative T lymphocyte percentage was observed in 6 patients.

Basic assessement of the complement system was performed in 10 (43.5%) patients and showed abnormalities in 3 cases.

Anomalies in the myelogram were observed in 3 out of the 16 performed.

Genetic defects

LRBA and CTLA-4 were explored in 19 (82.6%) patients. Whole exome sequencing was performed in 5 (21.7%) and panel sequencing in 7 (30.4%) patients, respectively. The 4 exons and flanking sequences of CTLA-4 were studied by Sanger direct sequencing in 10 (43.5%) patients. *LRBA* exons and flanking sequences were sequenced by NGS-methods in 12 (52.2%) patients. LRBA protein was studied by western blot in 9 (39.1%) patients.

We found disease-causing mutation in 7 patients: 2 in *CTLA-4*, 2 gain-of-function mutation of *STAT3*, 1 *LRBA* homozygous null mutation in a consanguineous family, 1 *STXBP2* mutation and 1 somatic mutation in *KRAS*.

Patient 2 had consanguinous parents but no familial background. ES occurred at age of 3 with hepatomegaly and splenomegaly. Explorations showed T CD8 lymphocytosis, 2% of T double negative subset and positivity of ANCA. First treated with corticosteroids and intravenous immunoglobulins, his digestive and respiratory autoimmune disorders required several treatment lines including rituximab and azathioprine. This led to a complete response at last follow-up despite various complications (growth retardation, osteopenia, hepatic cytolysis). Recently, exploration of LRBA found a mutation.

Patient 4 had consanguinous parents and his aunts had Basedow disease. ES developed at age of 3, associated with coeliac disease, splenomegaly and lymphadenopathy. Lymphocyte phenotyping showed in NK lymphopenia, T CD8 lymphocytosis and 5 to 8% of T double negative subset. At last follow-up, introduction of azathioprine permitted

discontinuation of corticosteroids and complete remission. Recent sequencing brought to light a *STAT3* gain-of-function.

With no familial background, patient 6 presented with ES at the age of 13 months along with splenomegaly, hepatomegaly and hepatic cytolysis. She relapsed during chickenpox infection. After wild type results of *CTLA-4*, *LRBA* sequencing (among other genes), stigma of hemophagocytosis brought us to identify *STXBP2* mutation. Corticosteroids and intravenous immunoglobulins were discontinued after initiation of ciclosporine. Autoimmune hepatitis required azathioprine, discontinued because of hepatic cytolysis, and mofetil mycophenolate. Hematopoietic stem cell transplantation was performed recently, with complete remission at 3 months.

Patient 9 had no familial background. ES occurred belatedly at age of 14. He became dependent on steroids despite 8 treatment lines including splenectomy and rituximab. He presented with disorders in the respiratory tract: pulmonary nodules, bronchitis and sinusitis with nasal polyposis requiring surgery. He reached partial remission taking azathioprine with adrenal insufficiency and substituted hypogammaglobinaemia. No immune abnormalities were found over the years except recently for *CTLA4* loss-of-function.

Except for her father's leukemia, Patient 14 had no familial background. At age 2, ES developed with concomitant hepatomegaly, splenomegaly and lymphadenopathy. Undergoing corticosteroids, azathioprine and rituximab, she achieved complete remission. She had signs of immune deficiency with bronchitis and recurrent otitis. A syndrome was suspected on dysmorphia and velar insufficiency. An unreported heterozygous *STAT3* mutation was found, requiring functional test to confirm gain-of-function and pathogenicity.

The case of Patient 21, presenting with ES at age 5 and evolving from an indolent to an aggressive form of leukemia, was previously published. The identification of *KRAS* somatic mutation occurred during follow-up, which is why *LRBA* and *CTLA-4* were not sequenced [15].

Patient 23, whose uncle had autoimmune cytopenia, presented with ES at age 6. Subsequently, he developed eczema and interstitial pneumonia. Laboratory investigations showed deficiency of C4 and 4% of lymphocyte T double negative subset. He underwent intravenous immunoglobulins and splenectomy then became dependent on steroids. Rituximab was partially efficient but induced hypogammaglobulinaemia. Exploration of CTLA4 established a haploinsufficiency.

Management, follow-up and outcome (Table 5)

All 23 patients were given corticosteroids. Initial dose ranged from 2 mg/kg per day for 13 (56.5%) patients to 4 mg/kg per day for 6 (26.1%) patients. A response permitted the discontinuation of the treatment in 15 (65.2%) cases, with a complete response without relapse in 1 patient. Intravenous bolus injection was administrated to 4(7.4%) children. Corticosteroid-dependence occurred in 7 (30.4%) cases. Complications due to corticosteroids were observed in 11 (47.8%) cases and included Cushing syndrome (5), growth retardation (4) and adrenal insufficiency (2).

Twenty-two (95.7%) patients received intravenous immunoglobulins, with a complete response in 1 case and a partial response in 3. First at 2 g/kg to begin the treatment, 9 (39.1%) patients received then the substitutive dose ranging from 0.4 to 0.8 g/kg every 3 to 4 weeks for at least 3 months.

Additional treatment was required in 19 (82.6%) cases. In total, 2 to 8 treatment lines have been used.

Splenectomy was performed in 7 (30.4%) cases with a complete response in 2 patients.

Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) was administered to 15 (65.2%) children, with a complete or partial response in 5 and 6 cases respectively.

Hypogammaglobulinaemia occurred in 9 (39.1%) patients after the injections, requiring regular injections of intravenous immunoglobulins.

Azathioprine was given to 10 (43.5%) patients with a complete or partial response in 2 and 4 patients respectively. Hepatic cytolysis led to discontinuation of treatment in 4 cases.

Ciclosporine and mofetil mycophenolate were used in association with other treatments, respectively in 7 (30.4%) and 5 (21.7%) cases.

Other therapeutic molecules included: eltrombopag (thrombopoietin receptor agonist) in 2 (8.7%), purinethol in 2 (8.7%), hydroxychloroquine in 2 (8.7%), cyclophosphamine in 1 (4.3%), anti-D gammaglobulins in 1 (4.3%), vinblastine in 1 (4.3%) and colchicine in 1 (4.3%).

Follow-up lasted from 7 months to 29 years (mean 10.9 years). Complete response was obtained in 11 (47.8%) patients and partial response in 9 (39.1%). Eighteen (78.3%) children had complications after treatment. We observed 2 (8.7%) deaths in our cohort, one due to severe juvenile myelo-monocytic leukemia and the other to meningitis.

DISCUSSION

Epidemiology

Neither the prevalence nor the incidence of primary ES could be estimated given the retrospective design of the study.

The familial background (autoimmune diseases or consanguinity) did not tend to worsen the clinical presentation, neither to identify genetic defect, nor to modify their response to treatments.

Clinical presentation

Besides cytopenia, nearly all our patients (22/23) presented additional manifestations during follow-up. This seems comparable to other paediatrics studies, although strict comparison is impossible due to variations in published specifics [2,4,6].

Most patients (17/23) developed benign lymphoproliferative disorder during the period studied. This is more than reported in paediatric literature, where it varies between 36 and 69% [2,4,6,8]. Conversely, only one patient developed haematopoietic malignancies: he had a B lymphoma and later developed severe juvenile myelo-monocytic leukemia (JMML). As we previously reported elsewhere, we consider that this patient presented with a continuum of his disease from Evans syndrome to JMML [15].

More than half of our patients (52.2%) had severe and/or chronic infections, which lead to the decease in one case. Pui et al. and Aladjidi et al. also reported infections affecting 11.5 and 54.5% of ES patients, respectively [2,7].

In our cohort, humoral and organ-specific autoimmune manifestations affected 43.5% of the patients. They were more frequent in Blouin's (55.6%) and Savasan's (82%) series. Regarding anti-nuclear antibodies, 30.4% of the patients presented with significant levels versus 25 and 18% for Blouin or Savasan, respectively [4,6]. Overall specific autoantibodies, found in nearly half of our patients, were not assessed in previous series.

Our hospital is a national referral center for PID. ES occurs in about 2/3 of PIDs (ref: Seidel ou Rao). Patients referred to us with ES are usually thoroughly explored at diagnosis including genetic screen for PID. Patients with underlying PID known or diagnosed at ES first episode were excluded from our cohort. For instance, we excluded 30 patients with ALPS-FAS diagnosis. This could explain the relatively lower frequency of autoimmune manifestations in our cohort as compared to other studies.

Management, follow-up and outcome

In our cohort, morbidity is high with 78.3% of patients having complications. They are mainly due to corticosteroid and rituximab treatments. Mortality rate was 8.7%. In previous studies, mortality ranges from 0 to 36% and morbidity is not evaluated in published paediatric series.

Severity of clinical presentations, morbidity, mortality and the number of treatment lines needed (mean 4) in our cohort may as well relate to peculiar characteristics in the

population seen at our referral center. Nevertheless, clinical and laboratory follow-up of patients with ES seems essential for early diagnosis of an underlying cause unravelling as new symptoms develop. This appears all the more required when children already present additionnal dysimmune features.

Genetic findings

A genetic defect was identified in one third of our patients within 5 different genes. Only 2 genes (*LRBA*, *CTLA4*) were systematically explored.

In published pediatric series, there were no systematic genetic investigations. *FAS* and other ALPS-related genes were sequenced in the most recent studies when double negative T lymphocyte subset was assessed and increased (>2%) [7,8]. A few other genetic explorations were performed on a case-by-case basis [8].

Our results correlate with the many other symptoms presented by our specific population of patients but may overestimate the proportion of monogenic aetiologies in pediatric ES. On the other hand, immune cytopenia are frequently featured in numerous PID. Conversely, cytopenia are among the predominant features mainly in IPEX, IPEX-like, APS1, ALPS, LRBA, CTLA-4 and STAT3 GOF syndromes and in combined immune deficiencies with hypomorphic mutations.

Performing a larger genetic screen allowed us to identify 4 other genetic defects. Because clinical spectra of these diseases are often overlapping, it might be a reasonable diagnostic method to use NGS for targeted panel or exome sequencing in these patients. For example, a PID-oriented panel is currently used at our referral center for PID. Moreover, it could lead to the discovery of new genes or new transmission mechanisms. Furthermore, identification of specific genetic defects can lead to targeted treatments such as abatacept (CTLA-4-Ig) in CTLA-4 and LRBA deficiencies [16].

In conclusion, to our view, this NGS strategy could also be applied more often for diagnosis in children with predominant Evans syndrome associated with either other autoimmune or lymphoproliferative features.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the patients and family members for their cooperation in this study. We thank the CEDI team for technical assistance. This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation maladies rares, the European Research Council (ERC PIDIMMUN no. 249816 to A. Fischer), and Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 “Lumugene” to F. Rieux-Laucat). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the “Investments for the Future” program bearing the reference ANR-10- IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013 - 031 to F. Rieux-Laucat). E. Lévy was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche sur le Cancer (France) and Imagine Institute. C. Besnard is supported by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (France).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

CB, EL designed the research, acquired the data, analyzed data, and wrote the manuscript. These authors contributed equally to this work.

FRL designed the research and wrote the manuscript.

PQ participated in clinical care, designed the research and wrote the manuscript.

CBF, PN acquired the data.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. EVANS RS, TAKAHASHI K, DUANE RT, PAYNE R, LIU C. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia; evidence for a common etiology. *AMA Arch Intern Med*. 1951;87(1):48–65.
2. Pui CH, Wilimas J, Wang W. Evans syndrome in childhood. *J. Pediatr.* 1980;97(5):754–758.
3. Wang WC. Evans syndrome in childhood: pathophysiology, clinical course, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1988;10(4):330–338.
4. Savaşan S, Warrier I, Ravindranath Y. The spectrum of Evans' syndrome. *Arch. Dis. Child.* 1997;77(3):245–248.
5. Mathew P, Chen G, Wang W. Evans syndrome: results of a national survey. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1997;19(5):433–437.
6. Blouin P, Auvrignon A, Pagnier A, et al. [Evans' syndrome: a retrospective study from the ship (French Society of Pediatric Hematology and Immunology) (36 cases)]. *Arch Pediatr*. 2005;12(11):1600–1607.
7. Aladjidi N, Fernandes H, Leblanc T, et al. Evans Syndrome in Children: Long-Term Outcome in a Prospective French National Observational Cohort. *Front Pediatr*. 2015;3:79.
8. Ghaithi Al I, Wright NAM, Breakey VR, et al. Combined Autoimmune Cytopenias Presenting in Childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(2):292–298.
9. Norton A, Roberts I. Management of Evans syndrome. *Br. J. Haematol.* 2006;132(2):125–137.
10. Bader-Meunier B, Aladjidi N, Bellmann F, et al. Rituximab therapy for childhood Evans syndrome. *Haematologica*. 2007;92(12):1691–1694.
11. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(6):986–1001.
12. Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat. Genet.* 2014;46(8):812–814.
13. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009;113(11):2386–2393.
14. Michel M, Chanet V, Dechartres A, et al. The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. *Blood*. 2009;114(15):3167–3172.
15. Lanzarotti N, Bruneau J, Trinquand A, et al. RAS-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(12):1960–1963.
16. Lo B, Zhang K, Lu W, et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015;349(6246):436–440.

TABLES

	Year	Type	Number of centers	Number of patients	Duration of follow-up (median)
Pui	1980	Retrospective	1	7	4,8
Wang	1988	Prospective	1	10	7
Mathew	1997	Retrospective	21	42	3
Savasan	1997	Retrospective	1	11	8
Blouin	2005	Retrospective	32	36	4
Aladjidi	2015	Retrospective	26	156	6,8
Al Ghaithi	2016	Retrospective	3	23	5

Table 1. Main series of ES in children.

Characteristic	N (%) patients
Gender male/female	15 (65.2) / 8 (34.8)
Consanguinity	4 (17.4)
Family background	10 (43.5)
- Autoimmune cytopenia	3
- Autoimmune disease (dysthyroidism, diabetes mellitus type I)	6
- Blood disease (leukemia)	1
Age (years) : mean +/- SD	
- At first symptoms	4.5 +/- 4.3
- At diagnosis	6.7 +/- 4.5
- At last follow-up	15.4 +/- 6.2
Duration of follow-up (years)	10.9 +/- 6.7
Occurrence of cytopenia	
- Simultaneous	9 (39.1)
- Sequential	14 (60.9)
AIHA first	3
ITP first	11
Transfusions needed	9 (39.1)
Number of treatment lines : mean value (median) +/- SD	4 (4) +/- 1.7

Table 2. Characteristics. SD: standard deviation. AIHA : auto-immune haemolytic anaemia. ITP : immune thrombocytopenia.

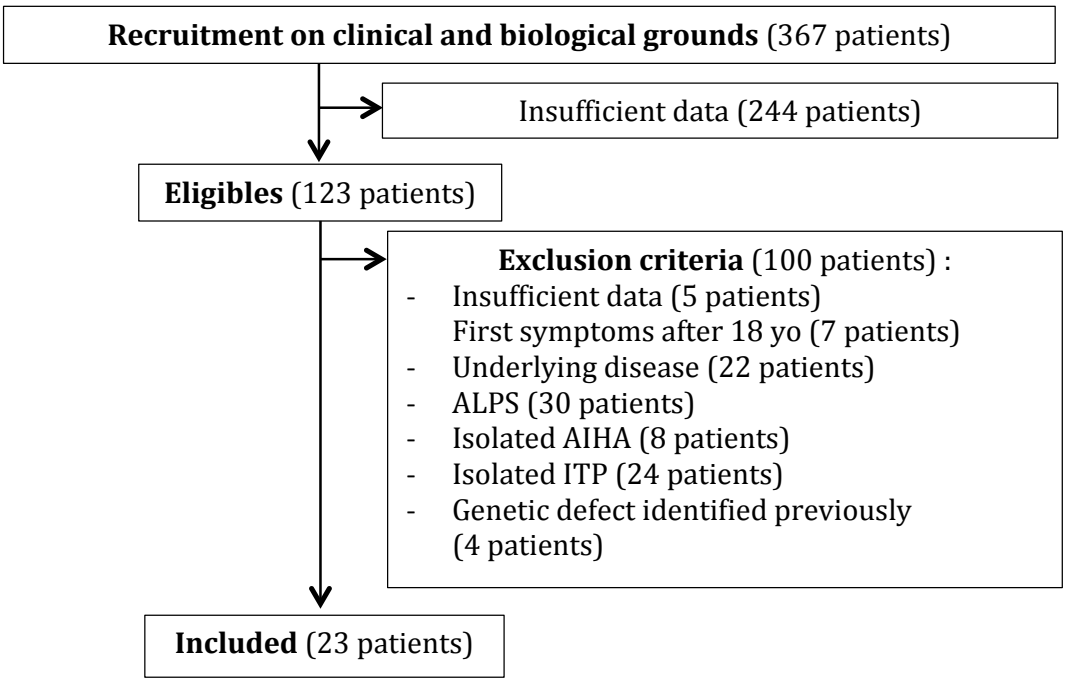


Figure 1. Flow chart.

	HMG	SMG	ADG	Lung	Skin	Liver	Joint	ENT	Gut	CNS	Other	Complications
1	+	+	+	Bronchiectasies, micronodules	-	Cytolysis	-	-	-	-	-	Hypogammaglobulinemia
2	+	+	-	Bronchitis	-	Chronic cholecystitis	-	-	Autoimmune enteropathy, interstitial gastritis	-	-	Growth retardation, hypogammaglobulinemia, hepatic cytolysis
3	+	+	+	Bronchitis	Zona	-	-	-	Appendicitis	Meningitis	-	Hypogammaglobulinemia
4	+	+	+	-	-	-	-	-	Coeliac disease	-	-	Hypogammaglobulinaemia, growth retardation
5	-	-	-	Pneumonia	-	-	-	Dental abcess	-	-	-	-
6	+	+	+	Interstitial pneumonia	-	Autoimmune hepatitis	-	-	-	-	-	Hepatic cytolysis
7	+	+	+	Interstitial pneumonia	Eczema	Autoimmune hepatitis	Knee pain	-	-	-	-	Hepatic cytolysis, growth retardation, hypogammaglobulinemia
8	-	+	+	-	-	Cytolysis	-	Adenoid hypertrophia	-	-	-	EBV reactivation
9	-	-	-	Bronchitis, nodules	-	-	-	Sinusitis	-	-	-	Surrenal insufficiency, hypogammaglobulinemia
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Anxiety disorder, Cushing syndrome, hypogammaglobulinaemia
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	Granulomes	-	Coxalgia	Ulcers	Colitis	Meningitis	-	-
13	-	+	-	-	-	Gilbert's disease	Coxalgia	-	Gluten intolerance	-	-	Growth retardation
14	+	+	+	Bronchitis	Dysmorphia	-	-	Recurrent otitis	Fungus infection	Velar insufficiency	Papillar edema, deafness	Hypogammaglobulinaemia, growth retardation
15	-	+	-	Bronchitis	Furonculosis	-	Back pain	-	-	-	-	Hypogammaglobulinemia, surrenal insufficiency,

												Cushing syndrome
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	Interstitial pneumonia	Zona, vitiligo	Infiltration	Back and joint pain	-	-	Meningitis	Cardiomyopathy, uveitis, renal nodules, diabetes I	Hepatic cytolysis
18	-	-	-	-	Livedo, telangiectasias, zona	-	Myalgia	-	-	-	-	Cushing syndrome
19	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Cushing syndrome
20	-	+	+	-	Urticaria	-	-	-	-	-	-	Cushing syndrome
21	+	+	+	Pneumonia	Zona	Hemangioma	Joint pain	-	Sigmoid mass	-	Pericarditis	-
22	+	-	-	-	Zona	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	Interstitial pneumonia	Eczema	-	-	-	-	-	-	Osteoporosis

Table 3. Clinical features. HMG : hepatomegaly. SMG : splenomegaly. ADG : lymphadenopathy. ENT : ear, nose and throat. CNS : central neural system. + : presence. - : absence.

	AIHA : nadir	AIHA : relapses	ITP : nadir	ITP : relapses	AIN	DAT	Dickson test	Inflammatory syndrome	Anti-neutrophils	AAN	ANCA	Anti-TPO	Anti-SM	Anti-platelet
1	3.5	2	7	1	+	IgG	+	-	+	-	-	-	-	-
2	4	2	10	2	+	IgG	+	-	+	-	+	-	+	+
3	3.6	3	11	4	+	IgG	+	-	+	-	-	-	-	-
4	7.4	3	13	2	+	IgG	+	+	+	-	-	-	-	+
5	4.7	3	*	1	-	IgG	-	-	-	-	-	-	-	-
6	*	2	*	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
7	6.3	2	*	1	-	IgG	+	+	-	+	+	-	+	-
8	*	2	*	5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	6	3	4	13	-	IgG	-	-	-	-	-	-	-	-
10	6.3	3	1	15	-	IgG+C3d	+	-	-	+	-	-	-	+
11	*	1	*	2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	*	1	*	1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
13	7.4	2	9	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
14	3,8	5	*	2	+	IgG	-	-	+	-	+	-	-	-
15	8.3	1	5	7	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
16	4.4	3	2	5	-	IgG+C3d	-	+	-	+	-	+	-	-
17	*	1	*	2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
18	6.9	1	*	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	*	3	5	5	+	IgG	-	-	-	-	-	-	-	-
20	5.7	2	1	5	+	IgG	+	+	-	-	-	-	-	-
21	8.7	2	39	2	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
22	*	1	*	5	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
23	7.5	4	2	3	-	IgG	-	-	-	+	-	-	-	-

Table 4. Laboratory explorations. AIHA : auto-immune haemolytic anaemia. ITP : immune thrombocytopenia. AIN : auto-immune neutropenia. DAT : Direct Antiglobulin Test. AAN : auto anti-nuclear antibodies. ANCA : anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. Anti-TPO : anti-thyroperoxydase antibodies. Anti-SM : anti-smooth muscle antibodies. IgG : immunoglobulin G. C3d : Complement 3d. + : presence at significant level. - : absence or undone. * : absence of data.

	Age at onset (yo)	1st line	Response	2nd line	Response	3rd line	Response	Other	Duration of follow-up (y)	Outcome
1	0	IVIg	NR	CTC	CR + R	Rituximab	CR		7	CR
2	3	CTC	CR + R	IVIg+CTC	CR + R	Ciclosporine	NR	Azathioprine, Rituximab, MMF, Purinethol, Remicade, Humira, Temsirolimus + CTC	16	CR
3	5	CTC+IVIg	CR + R	Azathioprine	PR	Ciclosporine	NR	Splenectomy	7	PR
4	4	CTC+IVIg	CR + R	Azathioprine	PR				11	CR
5	5	IVIg	CR + R	CTC	CR				5	CR
6	1	CTC+IVIg	CR + R	Ciclosporine	CR + R	Azathioprine	CR + R	MMF, HSCT	12	CR
7	2	CTC	CR + R	Azathioprine	PR	Rituximab	PR	Ciclosporine, MMF, eltrombopag	13	†
8	2	CTC+IVIg	CR + R	Splenectomy	NR	Rituximab	PR		29	PR
9	14	IVIg	PR	CTC	PR	Splenectomy	NR	Ciclosporine, rituximab, azathioprine, eltrombopag, hydroxychloroquine	12	CR
10	2	IVIg	CR + R	CTC, Romiplostim, hydroxychloroquine	NR	Rituximab	PR		12	CR
11	3	CTC	CR + R	IVIg	PR				7	PR
12	0	CTC+IVIg	CR + R	Rituximab	CR				7	CR
13	1	IVIg	CR + R	Splenectomy	NR	Rituximab + CTC	PR	Ciclosporine, MMF, azathioprine	21	PR
14	2	CTC+IVIg	CR + R	Rituximab	PR	Azathioprine	NR		9	PR
15	6	CTC+IVIg	CR + R	Rituximab	CR				5	CR
16	3	CTC	CR + R	Azathioprine	NR	Vinblastine	PR	Ciclosporine, Rituximab	16	CR
17	2	CTC+IVIg	PR	Azathioprine	CR + R	Cyclophosphamide	PR	MMF, Rituximab, splenectomy	15	NR
18	12	CTC+IVIg	PR	Rituximab	CR				2	CR
19	13	CTC+IVIg	PR						1	PR
20	13	IVIg	CR + R	CTC	PR				4	PR
21	5	CTC+IVIg	PR	Rituximab	CR + R	Splenectomy	CR + R	Colchicine, Purinethol	14	†
22	3	CTC+IVIg	PR	Rituximab	PR	Anti-D gammaglobulins			6	PR
23	6	IVIg	CR + R	Rituximab	PR	Splenectomy	PR		19	PR

Table 5. Treatment and outcome. Yo : years old. Y : years. IVIg : intravenous immunoglobulins. CTC : corticosteroids. HSCT : haematopoietic stem cell transplantation. CR : complete remission. PR : partial remission. NR : no remission. R : relapse. † : death.

Gene	STXBP2 (MIM#613101)	KRAS (MIM#6114470)	STAT3 (MIM#615652)	LRBA (MIM#614700)	CTLA4 (MIM#616100)
Gene name	Syntaxin-binding protein 2	V-Ki-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogen homolog	Signal transducer and activator of transcription 3	Lipopolysaccharide-responsive, beige-like anchor protein	Cytotoxic T lymphocyte-associated 4
Chr	19	12	17	4	2
Variation type		Substitution			
Variation on CDS		C.37G>T			
Proteic consequence (predicted)		p.G13C			
Disease association	Hemophagocytic lymphohistiocytosis familial 5	RAS-associated autoimmune lymphoproliferative syndrome type IV	Autoimmune disease, multisystem, infantile-onset	Immunodeficiency, common variable with autoimmunity	Autoimmune lymphoproliferative syndrome type V

Table 6. Gene mutations.

Discussion et perspectives

Les maladies auto-immunes sont en général considérées comme multi-factorielles. Il existe quelques gènes dont les mutations sont associées à des maladies où les symptômes auto-immuns sont au premier plan (défauts de AIRE, FOXP3, CD25 notamment). Le syndrome d'Evans est défini par l'association d'au moins 2 cytopénies auto-immunes concomitantes ou séquentielles. L'objectif de ce travail était d'identifier des causes génétiques dans le syndrome d'Evans pédiatrique, en faisant l'hypothèse que cette population serait enrichie en formes monogéniques. Nous avons donc recruté des familles – majoritairement consanguines – avec un ou plusieurs individus présentant un syndrome d'Evans sévère et précoce et choisi de les explorer par une approche initiale de séquençage de l'exome.

Dans cette partie, nous reprendrons les principaux résultats, questions en suspens et expériences à mener en suivant le même plan que dans la partie précédente. Nous discuterons les conséquences des choix faits lors de l'analyse d'exome. Pour chaque gène candidat validé, nous comparerons nos résultats avec ceux des autres équipes ayant publié sur ces déficits au cours de nos travaux. Nous discuterons des contours de la cohorte des patients présentant un syndrome d'Evans et interrogerons la notion de syndrome d'Evans primaire. Enfin, nous exposerons les problématiques restantes concernant la physiopathologie des déficits immunitaires précédemment étudiés.

4.1 Séquençage de l'exome : l'analyse n'est jamais totalement terminée

Nous avons séquencé l'exome pour 16 patients présentant un syndrome d'Evans et 22 apparentés sains dans 14 familles. Cette approche est considérée depuis quelques années comme la méthode de choix pour identifier des causes monogéniques de maladies rares. Nous avons centré notre étude sur des formes sévères à début pédiatrique en faisant l'hypothèse que les maladies monogéniques devraient être plus fréquentes dans ce sous-groupe de patients.

Nous avons étudié 10 familles consanguines. En raison des contraintes de l'époque (disponibilité de l'ADN en quantité et de qualité suffisantes, coût technique du séquençage d'un exome), nous avions choisi pour les 8 familles consanguines initiales d'explorer uniquement l'exome des individus malades encore vivants. Nous espérions en effet mettre en évidence des variants de mêmes gènes dans plusieurs familles.

Bien qu'elle nous ait permis d'identifier des gènes pour 3 de ces familles, cette stratégie a aussi montré ses limites. Elle ne nous permettait d'analyser les données famille par famille – c'est-à-dire bien souvent dans notre cas individu par individu – qu'avec une hypothèse de transmission autosomique récessive. Aussi, lorsque nous pouvions disposer du matériel nécessaire pour les apparentés sains, nous avons secondairement séquencé l'exome de certains d'entre eux et ré-analysé les données en prenant en compte les liens. Ceci nous a permis d'identifier le gène causal dans la famille 2 et de restreindre la liste de gènes à explorer à 2 gènes pour la famille 6.

Pour chaque exome séquencé, des dizaines de milliers de variants sont identifiés et nous avons adapté la stratégie de filtres à notre hypothèse de transmission mendélienne monogénique et aux phénotypes cliniques sévères et précoces présentés par les patients. Nous avons donc gardé en priorité les variants susceptibles d'avoir un fort impact sur la protéine elle-même, c'est-à-dire situés dans les régions codantes et les sites d'épissage essentiels. Nous avons inclus tous les types de variations (substitutions, insertions, délétions) sans nous limiter à celles les plus à risque d'être pathogéniques (apparition/disparition d'un codon d'initiation ou de terminaison de la traduction, décalage du cadre de lecture). Concernant la fréquence des mutations, nous avons conservé en priorité les variants privés ou très rares. Nous avons choisi de ne pas exclure tous les variants connus. En effet, un variant présent à une faible fréquence à l'état hétérozygote dans la population générale pourra entrainer la maladie à l'état homozygote. C'est pourquoi nous avons gardé les variants présents dans les bases de données publiques avec une fréquence de l'allèle minoritaire (MAF) inférieure à 1%.

Parmi les nombreux outils *in silico* de prédiction d'impact des variants, nous avons utilisé SIFT, Polyphen2 et Mutation Taster. Les résultats obtenus étaient souvent discordants, ces programmes utilisant des algorithmes de calcul différents. De plus, ils alignent les séquences d'acides aminés mais ne prennent pas en compte la structure 3D de la protéine. C'est pourquoi nous les avons utilisé comme information supplémentaire pour prioriser les variants mais pas dans les paramètres initiaux de filtre des données.

Le séquençage de l'exome puis le filtrage des données selon le mode de transmission supposé permet d'obtenir une liste de gènes candidats sans biais sur la fonction. Lorsque cette liste est longue (plus d'une dizaine de gènes), il devient nécessaire d'effectuer un tri en se basant pour chaque gène sur les données de la littérature. Ceci peut amener à éliminer le variant causal par manque d'informations sur la fonction du gène. Ainsi, dans les listes comportant plus de 10 gènes, nous avons systématiquement éliminé les gènes pour lesquels aucune information n'était disponible dans les bases de données PubMed et OMIM. Lorsque des informations existaient mais portaient toutes sur un type cellulaire (neurones uniquement par exemple) nous avons cherché les données d'expression de l'ARN et de la protéine (BioGPS, Human Protein Altas) et en l'absence d'expression avérée dans le tissu hématopoïétique, nous avons également exclus temporairement ces variants.

Lors de ce travail, nous avons identifié des gènes en cause dans 5 familles, un gène candidat probable dans une sixième famille, soit au total dans 43% des familles. En incluant les 5 familles pour lesquelles nous avons entre 1 et 3 gènes candidats à explorer, nous pouvons extrapoler que la cause génétique de la maladie sera identifiée dans environ 70% des familles. Ces résultats sont cohérents avec les taux d'identification anticipé par Gilissen *et al.* [213].

Néanmoins, il existe plusieurs hypothèses expliquant que nous n'ayons pas identifié de gène candidat pour toutes les familles. Les premières causes possibles sont techniques : certains variants peuvent être situés dans des zones non couvertes. Cela est d'autant plus probable pour les premiers exomes réalisés avec des techniques de capture bien moins efficaces qu'aujourd'hui.

De plus, les variants structuraux comme de grandes insertions, délétions, des inversions ou des translocations ne sont pas toujours détectables sur les données d'exome. Notamment, dans la famille LRBA 9, le trio père-mère-patiente a fait l'objet d'un séquençage d'exome préalablement à notre travail et l'analyse initiale de celui-ci n'a pas permis de mettre en évidence la grande délétion emportant un tiers des séquences codantes de LRBA. Après la mise en évidence d'une absence de la protéine par western blot, une ré-analyse ciblée des données d'exome a confirmé que cette portion du gène n'était pas couverte. De fait, la détection de variations du nombre de copies d'un gène aujourd'hui visualisable sur l'interface d'analyse développée par la plateforme bio-informatique de l'institut est encore en phase de test.

D'autre part, les variants responsables de la maladie des patients peuvent être localisés hors des séquences codantes. Ainsi, de plus en plus de micro-ARN sont impliqués dans des processus immunologiques [214]. De même, des variants d'épissage peuvent survenir au niveau du site de branchement, situé très loin des régions codantes et non couvert par le séquençage de l'exome. Des variations dans les séquences régulatrices des gènes, là encore non séquencées ont déjà été impliquées dans des déficits immunitaires [215]. On peut alors se poser la question de l'intérêt du séquençage du génome entier quand le séquençage de l'exome, réalisé dans de bonnes conditions techniques et analysé de façon adaptée et approfondie, ne permet pas d'identifier de cause génétique. De plus, le séquençage du génome, bien que plus couteux, permet en premier lieu une meilleure

couverture des séquences exoniques [216, 217].

Avant cela, il peut être utile de revoir régulièrement les données d'exome en ré-interrogeant nos hypothèses de transmission. Ainsi, la consanguinité n'implique pas forcément une transmission autosomique récessive de la maladie et nous avons mis en évidence une mutation gain de fonction de *STAT3*, hétérozygote, dans la famille 4 (Famille STAT3-1) où les parents sont apparentés. A l'opposé, nous avons pu identifier plusieurs maladies monogéniques, au sein d'une même famille consanguine, y compris chez un même individu (Famille 1, *LRBA* et *ABCC6*). De plus, le statut des individus peut changer : certains apparentés, sains au moment du séquençage et de la première analyse peuvent développer une forme atténuée ou déclarer tardivement la maladie. Ces changements nécessitent de ré-analyser les données. Ainsi, dans la famille LRBA 9, le frère, initialement considéré comme sain, a développé une forme atténuée de la maladie. Après séquençage ciblé du gène muté identifié chez la patiente, il s'avère être également muté homozygote.

Notre travail nous a montré qu'il est également important d'anticiper en amont du séquençage les différentes hypothèses de transmission et la validation fonctionnelle à réaliser secondairement pour bien prévoir le recueil nécessaire du matériel biologique du patient et des apparentés. Ainsi, nous avons perdu la trace de l'une des familles pour lesquelles nous avons des gènes candidats à confirmer. Cela nous contraint à utiliser d'autres modèles (mutagénèse dirigée, transfections, modèles animaux) pour valider l'implication de ces gènes dans la pathologie du patient.

Enfin, si dans toutes les familles séquencées, au moins un patient présentait bien des cytopénies, l'hétérogénéité clinique des patients est un facteur limitant la réussite de l'analyse des données d'exome, en particulier pour les cas sporadiques. Souvent, la recherche famille par famille de mutations hétérozygotes composites ne donne pas de résultats. Dans une hypothèse de transmission *de novo* ou dominante, les variants hétérozygotes pour un individu isolé, y compris privés, sont nombreux. Lorsque l'on essaye de filtrer ces variants hétérozygotes en recoupant les patients, aucun gène commun n'est identifié. La constitution de cohortes cliniquement bien caractérisées et homogènes, couplée au séquençage de l'exome de tous les membres de la famille dont le matériel est disponible reste donc à nos yeux la stratégie la plus efficace, et ce quel que soit le mode de transmission de la maladie initialement supposé.

4.2 Déficit en LRBA : beaucoup de patients, quelques réponses, beaucoup de questions...

Cohorte LRBA : patients, présentation clinique et mutations

Au cours de ce travail, nous avons identifié 14 nouvelles mutations de LRBA dans 11 familles (voir tableau 3.19, page 98). Il s'agit pour la plupart de variations entrainant l'apparition précoce d'un codon stop précoce. Nous décrivons aussi une grande délétion et un saut d'exon entrainant l'absence de protéine détectable par western blot.

Huit familles étaient consanguines, avec des mutations homozygotes chez les patients. Deux présentaient des mutations hétérozygotes composites. Dans l'une des familles consanguines (Famille LRBA 4), le père, également malade, présentait 2 variants différents dont l'un entraine une simple substitution d'acide aminé. Il n'a transmis à son fils que le variant décalant le cadre de lecture qu'il partage avec sa mère, indiquant que ces 2 variants n'étaient pas sur le même allèle.

Notre cohorte de 10 familles comprend 18 patients, 15 dont le déficit est génétiquement confirmé et 3 patients ayant présenté un tableau clinique compatible mais dont le décès empêche la confirmation moléculaire du défaut. Il s'agit donc d'une cohorte de taille importante puisqu'à ce jour moins d'une quarantaine de patients sont décrits et la plus grande cohorte, publiée très récemment rapporte 22 patients [106].

Dans la onzième famille, la patiente présentait deux variants, l'un faux-sens et l'autre au niveau d'un site d'épissage. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'épissage anormal et l'expression protéique est conservée. Pour autant, le tableau clinique est compatible. Cette patiente pose donc la question des fonctions des différents domaines de LRBA. Dans la littérature, seul un autre patient a été rapporté avec une variation faux-sens conservant l'expression protéique [104]. Il est également possible qu'un autre gène soit à l'origine de la pathologie présentée par cette patiente et il serait intéressant de réaliser le séquençage d'exome de cette famille.

Au moment où nous commencions ce travail, le déficit en LRBA n'était pas connu. Dans les 3 premiers articles publiés en 2012, 6 mutations ont été décrites [100, 101, 102]. LRBA était alors considéré comme un gène à l'origine d'un déficit immunitaire commun variable. Notre cohorte, comme l'ensemble des patients décrits par d'autres groupes en parallèle de nos travaux, élargit considérablement le phénotype clinique initial et met en lumière les différentes atteintes auto-immunes d'organes. En particulier, les cytopénies auto-immunes, point de départ de notre travail concernent 67% des patients et les entéropathies 56%. Au total, des atteintes auto-immunes sont présentes chez 83% des patients de notre cohorte, les atteintes lymphoprolifératives concernent 56% des patients, les infections récurrentes 33% de même que les dysglobulinémies. Ces pourcentages sont inférieurs aux 95, 86 71 et 57% rapportés par Gamez-Diaz *et al.* [106]. Il est cependant à noter que notre recueil de données cliniques n'est pas totalement complet. Notamment, nous n'avons que des informations parcellaires concernant les patients décédés. De plus, notre premier critère de recrutement était que les patients présentent des cytopénies

auto-immunes, ce qui a certainement sélectionné différemment les patients explorés.

Dans notre cohorte, 2 patients de familles différentes ont présenté des polyarthrites chroniques, précoces et sévères. A ce jour, ce type d'atteinte n'a pas été décrit dans les autres études et nous élargissons donc les atteintes auto-immunes d'organes, déjà très variées. Le déficit en LRBA pourrait être l'étiologie de certaines arthrites juvéniles idiopathiques, première maladie rhumatologique pédiatrique, comme discuté dans l'article 1 (pages 111 et suivantes). Nous observons également une proportion élevée (39%) de patients ayant présenté un retard de croissance. Cette proportion est trop importante pour être seulement due aux corticoïdes reçus par de nombreux patients. De plus, les atteintes auto-immunes endocrines de la maladie sont également fréquentes (au premier rang desquelles le diabète et les atteintes thyroïdiennes). Enfin, la pathologie digestive qui concerne 10 des 18 patients peut également avoir joué un rôle (par inflammation et malabsorption).

Lorsque nous avons exploré de façon ciblée des patients cliniquement proches, nous avons mis en évidence 6 nouvelles variations hétérozygotes de LRBA. Elles entrainent une substitution d'un acide aminé chacune. A ce jour, nous ne pouvons dire s'il s'agit de variants dominants responsables à eux seuls de la maladie des patients ou s'ils agissent avec un autre facteur à identifier ou encore s'ils sont de simples polymorphismes. Nous prévoyons de développer les outils nous permettant d'explorer leur rôle dans la maladie des patients.

Partenaires protéiques de LRBA

La fonction de LRBA était inconnue lorsque nous avons amorcé ce travail et nous avons choisi une approche protéomique pour identifier ses partenaires. L'expression de LRBA étant ubiquitaire, nous avons travaillé sur plusieurs types cellulaires, dont 2 impliqués dans le système immunitaire adaptatif (lymphocytes T activés et lignée B immortalisée par l'EBV) et une lignée cancéreuse, extra-hématopoïétique (cellules HeLa). Le nombre de protéines identifiées en spectrométrie de masse était très différent d'une lignée à l'autre, variant du simple au double mais proche entre les échantillons spécifiques de LRBA ou non pour une même lignée. Cet écart, qui pourrait être du a un paramètre technique ou lié à la nature des différentes lignées, est à identifier lors de la répétition de ces expériences.

Comme pour les données issues de l'exome, les données de spectrométrie de masse doivent être filtrées. Une première étape est indépendante de la fonction des protéines identifiées et repose sur des critères quantitatifs et comparatifs. On élimine ainsi les protéines très peu présentes, celles présentes dans l'échantillon non spécifique et celles très souvent présentes dans les expériences de spectrométrie de masse en général. Ce dernier paramètre nous est fourni par la base de données CRAPome, qui recense les protéines identifiées en MS en précisant les conditions expérimentales et proposant des scores basés sur la fréquence et la quantité de ces contaminants [195]. La problématique est la même que pour les variants déjà décrits dans les données d'exome : il existe un risque d'éliminer un variant interagissant spécifiquement avec LRBA car il est fréquemment présent dans d'autres échantillons biologiques. Après ces filtres « techniques », nous

classons les partenaires potentiels par association, sur la base de la littérature. Là aussi, nous avons pu ignorer un partenaire spécifique, faute d'information sur sa fonction.

Dans les BEBV, nous avons conservé à l'issue de l'analyse 29 partenaires potentiels. Seules 2 protéines ont été identifiées dans 2 lignées : MVP et PARP4. Ces protéines sont partenaires entre elles, indépendamment de LRBA au sein de particules intracellulaires structurées, les « vault particles ». Nous avons confirmé par immunoprécipitation l'interaction de LRBA et MVP et leur colocalisation partielle en microscopie confocale. Cependant, nous ne savons pas si cette interaction a lieu au niveau des vault particles ni si PARP4 interagit directement avec LRBA. La fonction des vault particles est mal cernée. En revanche, ces particules sont bien reconnaissables en microscopie électronique. Nous envisageons donc de marquer LRBA (marquage antigénique et anticorps secondaire couplé à des particules d'or colloïdal) et d'étudier leur localisation par cette technique. Il nous faudra également préciser les domaines des différents partenaires impliqués dans l'interaction, par exemple en transfectant des constructions entrainant l'expression de protéines tronquées. Cela nous aidera à déterminer le rôle de chacun des domaines de LRBA.

Pour les autres partenaires, la confirmation de l'interaction doit être apportée. Une des difficultés est technique : les anticorps spécifiques de ces protéines sont souvent développés dans la même espèce que celui dirigé contre LRBA. Il est à noter que CTLA-4, dont l'interaction avec LRBA a été décrite récemment par Lo et al. ne fait pas partie des partenaires identifiés par nos expériences [98]. Nous avons tenté depuis de co-immunoprécipiter LRBA et CTLA-4 sans succès jusqu'ici. En surexprimant des portions des protéines, Lo et al. ont mis en évidence une interaction entre le domaine lectine de type Concanavaline A (Con A-like lectin) de LRBA et le motif YVKM situé sur la portion cytoplasmique de CTLA-4 [98]. Il est possible que cette interaction soit dépendante du type cellulaire et de l'activateur utilisé. Elle pourrait ainsi ne concerner qu'une faible proportion des molécules CTLA-4 dans les cellules T activées, ce qui expliquerait sa non-détection dans nos conditions expérimentales.

De plus, chaque expérience d'IP/MS n'a pu être effectuée qu'une fois par lignée et nous n'avons pas utilisé de lignées du système immunitaire inné. Il sera important de reproduire tous ces résultats et d'explorer une lignée macrophagique.

Localisation de LRBA

Lorsque nous avons commencé ce travail, Wang et al. avaient étudié la localisation de LRBA à l'aide d'une protéine fusionnant la partie C-terminale de LRBA (domaine BEACH et répétitions WD40) à la GFP surexprimée par transfection dans des cellules macrophagiques de souris ainsi qu'en microscopie électronique. Ils avaient ainsi montré une localisation à la membrane cellulaire, dans des vésicules d'endocytose, le réticulum endoplasmique, le réseau transgolgien et les lysosomes [140]. Nous avons souhaité reprendre ce travail de colocalisation dans des cellules humaines en marquant la protéine native.

Nous avons donc marqué différents compartiments cellulaires et étudié la localisation de LRBA en microscopie confocale. Nos résultats confirment la présence de LRBA dans le réseau trans-golgien et les endosomes précoces. En revanche, nous n'avons

pas observé de co-localisation de LRBA et Lamp2, marqueur des lysosomes. Nous n'avons pas pu explorer les autophagosomes. Nous avons effectué ces marquages dans des lymphocytes T activés. Nous souhaitons vérifier que LRBA reste localisée dans les mêmes compartiments cellulaires d'un type cellulaire à l'autre et dans différentes conditions *in vitro*. Notamment, nous projetons de réaliser les mêmes marquages sur des PBMC, des B-EBV et dans des cellules extra-hématopoïétiques. Les patients présentant un déficit en LRBA ayant des anomalies des lymphocytes T régulateurs, il sera intéressant d'étudier spécifiquement LRBA dans cette sous-population lymphocytaire. Nous souhaitons également regarder la localisation de LRBA après activation par différentes voies (TCR, TLR, TNFα).

Dans cette optique, nous avons étudié la localisation de LRBA lors de la formation de la synapse immunologique et mis en évidence qu'après activation, LRBA est polarisée vers la synapse immunologique sans y être directement recrutée. Ces résultats suggèrent un rôle de LRBA dans la signalisation en aval du TCR, après les premières étapes ayant lieu à la synapse immunologique. Pour confirmer ce résultat, nous prévoyons de regarder la présence de LRBA dans des extraits protéiques spécifiques du complexe de signalisation d'aval dans des lymphocytes T activés mais également dans des lymphocytes B. La mise au point de ces expériences est en cours. *In fine*, cela pourrait nous permettre de faire le lien entre la localisation de LRBA et son rôle dans le contrôle de la tolérance au soi.

En raison du chevauchement des spectres cliniques des deux déficits, avons également recherché et mis en évidence une co-localisation de LRBA et CTLA-4. Cette co-localisation est partielle et nous n'avons pas encore identifié le compartiment dans lequel elle a lieu. En parallèle de nos travaux, Lo et al. ont montré une co-localisation partielle de CTLA-4 et LRBA, au sein des endosomes de recyclage et du réseau trans-golgien en utilisant les marqueurs Rab11 et STX6 dans des cellules T activées [98].

Après avoir identifié MVP comme un partenaire de LRBA, nous avons confirmé leur co-localisation partielle en microscopie électronique. Là encore, nous devons préciser le lieu de cette co-localisation et sa dynamique. Les autres partenaires potentiels identifiés en spectrométrie de masse restent à étudier.

LRBA et apoptose

Nous avons étudié l'apoptose dans l'une des familles présentant un déficit en LRBA. Nous avons exploré plusieurs voies (TCR, récepteur FAS, sevrage en facteurs de croissance) et les avons activées de plusieurs façons (ligand naturel, anticorps agoniste). Nous avons répété l'expérience 4 fois. Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre le patient, les contrôles et les apparentés sains. Ces résultats ne sont pas en accord avec les expériences rapportées par Lopez-Herrera *et al.* dans lesquelles la proportion de B-EBV de patients en apoptose après sevrage en sérum était augmentée par rapport aux cellules de contrôles [100]. Nous faisons l'hypothèse que le type cellulaire entre en jeu dans la réponse, de même que la durée du sevrage. De plus, la transformation des cellules B par l'EBV entraine des modifications du fonctionnement cellulaire interagissant avec la survie cellulaire.

Compte-tenu de l'importance de l'apoptose dans la mise en place de la tolérance immunitaire (élimination des cellules T auto-réactives dans le thymus, AICD, contraction de la réponse immune après activation), nous confirmerons ces résultats sur d'autres patients, dès que le matériel biologique nécessaire sera disponible. Nous souhaitons être les plus exhaustifs possible sur ces mécanismes et testerons donc également d'autres conditions d'activation et l'apoptose dans d'autres lignées cellulaires.

Perspectives

Depuis le début de ce travail, les connaissances sur LRBA ont beaucoup progressé. Grâce à la constitution et à l'étude d'une cohorte de patients, nous avons élargi et mieux cerné les contours du spectre clinique de cette maladie. Nous considérons désormais qu'il s'agit d'un déficit immunitaire primitif dans lequel les symptômes auto-immuns – au premier rang desquels les cytopénies – sont au premier plan, associés à des symptômes lymphoprolifératifs très fréquents et à un déficit humoral. Il faut penser à évoquer ce diagnostic face à des arthrites juvéniles idiopathiques si d'autres symptômes compatibles sont présents chez le patient ou ses apparentés. Nous avons également observé une grande proportion de patients présentant un retard de croissance, d'origine probablement multifactorielle.

Avec nos collègues cliniciens, nous allons continuer à suivre et explorer ces patients. Nous poursuivrons également les explorations biochimiques et génétiques à visée diagnostique quand le phénotype clinique est compatible, le suivi d'une cohorte plus importante permettant d'affiner encore nos connaissances épidémiologiques et médicales.

Les travaux fondamentaux effectués en parallèle par différents groupes dont le notre ont ouvert des pistes sur les fonctions de LRBA : des interactions ont été mises en évidence (CTLA-4, MVP), des partenaires potentiels identifiés (MVP, PARP4, TAP2, LY96, PDCD6), la localisation de LRBA précisée, à l'état basal et après activation par un stimulus immunologique (polarisation vers la synapse immunologique). Les découvertes concernant à la fois LRBA et CTLA-4, notamment les spectres cliniques et biologiques, seront discutées plus en détail dans la section correspondante (**??**, page **??**).

En dehors des expériences à répéter ou des prolongements déjà proposés dans chaque partie précédente, avancer dans notre compréhension du rôle de LRBA requiert maintenant la mise au point de nouveaux outils.

Ainsi, une souris knock-out conditionnelle de LRBA est en cours de développement pour notre laboratoire. Elle permettra d'étudier en profondeur les implications de ce déficit sur différents organes, en particulier les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Nous pourrons étudier l'impact du déficit sur le développement des lymphocytes T et B ainsi que sur les autres cellules du système immunitaire adaptatif et inné. De même, il sera plus facile d'obtenir un grand nombre de lymphocytes T régulateurs afin de tester leurs fonctions suppressives.

Pour explorer l'implication des variants faux-sens dans la pathologie, nous prévoyons de cloner le gène LRBA dans un vecteur d'expression et de fabriquer par mutagénèse

dirigée une banque de mutants correspondant aux variations présentées par nos patients. Nous pourrons ainsi étudier plus précisément le rôle des différents domaines protéiques et peut-être en déduire des corrélations génotype-phénotype. Nous pourrons également nous aider de modélisations informatiques.

Les variants hétérozygotes chez des patients présentant une clinique comparable à celle des patients mutés sur les deux allèles soulèvent d'autres questions : existe-t-il d'autres mode de transmission de la maladie, avec des mutants dominants ou faut-il rechercher un autre facteur, une sorte de « deuxième cible » ? Cette dernière hypothèse, à rapprocher de la théorie « 2-hits » de Knudson dans les cancers, a déjà été confirmée dans l'ALPS, un autre déficit immunitaire primitif dans lequel les cytopénies auto-immunes sont également fréquentes.

4.3 Défaut de CTLA-4

CTLA-4, récepteur inhibiteur exprimé à la surface des lymphocytes T activés et des lymphocytes T régulateurs a été récemment impliqué dans un déficit immunitaire primitif.

Cohorte CTLA-4 : patients, présentation clinique et mutations

Lorsque nous avons initié ce projet, le déficit en CTLA-4 n'était pas décrit. Au cours de ce travail, nous avons identifié 8 nouvelles mutations de CTLA-4 dans 8 familles. Nous avons également mis en évidence dans 2 familles une mutation déjà rapportée [94]. Il s'agit d'une cohorte de grande taille puisqu'à ce jour seulement 11 familles ont été rapportées [94, 95, 96]. La plupart des variations sont situées dans l'exon 2 et au moins la moitié d'entre elles sont apparues *de novo*. La quasi-totalité des patients présente des variations hétérozygotes, en accord avec le mécanisme d'haplo-insuffisance décrit pour cette maladie. Cette cohorte inclut aussi des individus mutés sains, confirmant la pénétrance incomplète de ce défaut également rapportée par d'autres [94, 95, 96]. Nous décrivons un nouveau mode de transmission de cette maladie : une famille consanguine dans laquelle seule la personne avec la mutation à l'état homozygote est malade. Les 3 individus hétérozygotes sont tous sains, et chez la patiente, le défaut d'expression de CTLA-4 est comparable à celui des mutants entrainant une haplo-insuffisance. Il s'agit donc vraisemblablement d'une mutation hypomorphe.

Nous avons identifié 2 variants d'épissage et tenté de confirmer leur impact. Si dans les deux cas, les cellules des patients expriment moins CTLA-4, nous avons mis en évidence un cDNA anormal seulement pour l'une des mutations et cet ARN semble très minoritaire par rapport à la forme longue, comprenant tous les exons codants de CTLA-4. Les proportions relatives des différents ARN restent à étudier de façon plus quantitative, par RT-PCR en temps réelle, notamment. Le variant d'épissage détecté comprend les exons 1, 3 et 4 et exclut l'exon 2. Si cette forme n'est pas décrite chez l'homme, elle a été décrite chez la souris comme indépendante du ligand (liCTLA-4) car elle ne possède pas le domaine de liaison à CD80 et CD86. Chez la souris, cette forme pourrait avoir un rôle tolérogène car elle est 4 fois moins exprimée dans les splénocytes des souris diabétiques NOD par rapport aux souris des souches résistantes. L'expression de liCTLA-4 semble contrôlée par une séquence exonique de répression de l'épissage (exonic splicing silencer, ESS) non conservée chez l'homme [88]. Il semble que l'apparition anormale de ce variant d'épissage ait un effet contraire chez notre patient.

Concernant la description clinique de cette cohorte, les manifestations les plus fréquentes sont les symptômes auto-immuns qui concernent tous les patients et les hypogammaglobulinémies. Les atteintes granulomateuses affectent la moitié des patients, touchant toujours le poumon et souvent d'autres organes. Ces résultats sont proches de ceux présentés dans les 3 publications sur ce déficit [94, 95, 96]. On notera néanmoins que dans notre cohorte l'atteinte digestive ne concerne que 2 patients alors qu'elle est présente chez tous les patients décrits par d'autres. A l'opposé, nos patients présentent bien plus de cytopénies auto-immunes. Nous identifions là un biais évident, ce travail ayant pour point de départ le syndrome d'Evans.

LRBA et CTLA-4 : points communs et différences

Au niveau individuel, les symptômes cliniques présentés par les patients se chevauchent, mais la comparaison des caractéristiques cliniques les plus fréquentes pour chacune de nos deux cohortes met en lumière des différences : les symptômes lymphoprolifératifs bénins, les retards de croissance et les atteintes auto-immunes digestives sont beaucoup fréquents dans le déficit en LRBA alors que les hypogammaglobulinémies et les atteintes granulomateuses extra-pulmonaires sont plus souvent observées chez les patients avec mutation de *CTLA-4*.

Pour les patients déficitaires en CTLA-4 et LRBA, de nombreuses atteintes tissulaires sont observées. Pour autant, les explorations histologiques et immunohistochimiques ont été jusqu'ici limitées aux atteintes pulmonaires (CTLA-4, [98, 95]), digestives (CTLA-4 et LRBA, [101, 104, 107, 94, 95]) et à des marquages simples (coloration à l'hémalun éosine, marquages CD3 ou CD20). Nous avons commencé à rassembler le matériel histologique disponible pour les différents patients dans le but de caractériser de façon plus systématique les atteintes tissulaires, en collaboration avec les anatomo-pathologistes de l'hôpital Necker.

L'étude en cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs et de l'expression de CTLA-4 dans des lymphocytes T activés met en évidence les mêmes défauts pour les deux déficits : la proportion des cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ et $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ parmi les cellules T est diminuée et l'expression de CTLA-4 total (membranaire et intra-cytoplasmique) est réduite dans cellules T activées. Ces résultats sont concordants avec ceux récemment publiés [95, 94]. En raison du faible nombre de ces cellules, nous n'avons pas pu explorer les fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs de ces patients. Pour autant, il est possible qu'une population aux fonctions régulatrices soit présente en quantité normale mais qu'il faille utiliser d'autres marqueurs pour la mettre en évidence et tester ses fonctions. Nous pourrions ainsi utiliser le CD15s, décrit récemment comme un marqueur des Treg effectivement inhibiteurs [56].

Nous avons mis en évidence d'une part une co-localisation partielle de CTLA-4 et LRBA dans les lymphocytes T activés, et d'autre part la polarisation de LRBA vers la synapse immunologique lors d'une stimulation du TCR par un superantigène. Nous avons confirmé que LRBA se localise au repos dans les endosomes et le réseau trans-golgien et le travail de Lo et al. situe dans ces mêmes compartiments la co-localisation de LRBA et CTLA-4 [98]. Dans les lymphocytes T, CTLA-4 est stocké dans des vésicules d'endocytose et transporté pour expression à la surface membranaire suite à la stimulation du TCR puis ré-internalisé dans des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine pour être recyclé ou dégradé [77, 79]. Nous souhaitons donc étudier si, lors de la stimulation du TCR, LRBA et CTLA-4 sont co-localisés, et si oui, dans quel compartiment cellulaire. En effet, Lo et al. font l'hypothèse que LRBA pourrait réguler négativement la dégradation lysosomale de CTLA-4 en jouant un rôle dans le trafic des vésicules intracellulaires [98].

LRBA co-localise et interagit aussi avec MVP. En plus de déterminer si cette interaction a lieu au niveau des « vault particles », dont MVP est le composant principal, nous regarderons la dynamique de cette interaction lors d'une stimulation antigénique.

De plus, MVP est un substrat de la tyrosine phosphatase SHP-2 (aussi appelée PTPN11) avec laquelle CTLA-4 interagirait aussi de façon indirecte [218, 219]. Aussi, nous nous interrogeons sur l'existence potentielle d'un complexe multiprotéique rassemblant CTLA-4, LRBA, MVP et SHP2, bien que nous n'ayons pas identifié SHP2 et CTLA-4 dans nos expériences d'IP/MS.

En mettant en perspective toutes les données issues des travaux récents dont les nôtres, nous faisons l'hypothèse que LRBA aurait un rôle de plateforme de tri des molécules internalisées par endocytose après une stimulation antigénique, les orientant soit vers un recyclage, soit vers la dégradation.

4.4 STAT3 gain de fonction : existence de mutations hypomorphes ?

Comme pour les déficits en LRBA et CTLA-4, les mutations gain de fonction de *STAT3* n'étaient pas décrites quand nous avons débuté ce travail. Nous avons constitué une cohorte de 5 patients dans 5 familles différentes.

Nous avons identifié 3 mutations hétérozygotes de *STAT3* chez 4 patients non apparentés. Deux ont également été rapportées par d'autres groupes [149, 151]. Pour confirmer le gain de fonction associé au 3^{e} variant, nous génèrerons par mutagénèse dirigée une construction contenant ce variant et nous utiliserons un système rapporteur permettant de quantifier l'activité transcriptionnelle de STAT3 après transfection dans des lignées cellulaires HEK293, tel que décrit par Flanagan *et al.* [149].

L'un des patients présentant une mutation gain de fonction de *STAT3* était issu d'une famille consanguine. Nous avions réalisé un séquençage de l'exome pour ce patient. Notre première hypothèse d'analyse était une transmission autosomique récessive et nous n'avions pas identifié de gènes candidats pertinents. En deuxième intention, nous avions recherché des mutations dominantes transmises, car deux tantes présentaient des atteintes thyroïdiennes. Il s'est finalement avéré que la mutation causale était *de novo*. Ce cas met en valeur 2 points à garder à l'esprit : en l'absence de gène candidat identifié lors de l'analyse d'exome, il est nécessaire de s'interroger sur nos hypothèses de travail. D'autre part, les atteintes thyroïdiennes auto-immunes sont très fréquentes et le plus souvent isolées. Il faut être très prudent avant de les considérer comme faisant partie d'une multi-auto-immunité familiale ayant une étiologie unique.

Concernant le spectre clinique de nos patients, tous présentaient une bi- ou une tricytopénie auto-immune, une lymphoprolifération bénigne (splénomégalie et/ou adénopathies) et au moins une autre atteinte, digestive (2), pulmonaire (1) ou articulaire (1), ou une hypogammaglobulinémie (2). Parmi les 21 patients rapportés à ce jour, ces symptômes sont tous décrits et les cytopénies auto-immunes ainsi que les symptômes lymphoprolifératifs sont également très fréquents [149, 151, 150]. Parmi les autres symptômes fréquemment rapportés, nous n'avons pas observé de diabète ni de retard de croissance ou petite taille dans notre cohorte.

Nous avons également identifié une variation homozygote de *STAT3* chez une patiente issue d'une famille consanguine. Il s'agit d'une nouvelle mutation. Le phénotype clinique et biologique de cette patiente était comparable à celui des patients présentant une mutation gain de fonction de *STAT3* ou un déficit en LRBA ou CTLA-4 mais n'était pas compatible avec un syndrome de Job (associé à des mutations perte de fonction) : elle ne présentait ni infections récurrentes, ni augmentation des IgE, ni anomalies dentaires, osseuses ou du tissu élastique. Nous faisons l'hypothèse qu'il s'agit d'un nouveau mode de transmission de la maladie par gain de fonction de STAT3. Les explorations effectuées jusqu'ici pour mettre en évidence ce gain de fonction ne nous permettent pas de conclure et doivent être répétées. Nous prévoyons aussi d'utiliser un système de gène rapporteur pour tester l'impact du mutant sur l'activité transcriptionnelle de STAT3. Il sera de plus nécessaire de tester différentes co-transfections de la séquence sauvage et de la

séquence mutée, afin de comparer l'impact de la mutation à l'état homozygote et à l'état hétérozygote. En effet, dans cette famille, les parents et deux des frères de la patiente sont hétérozygotes et sains. Enfin, chez cette patiente, la variation de *STAT3* a été identifiée suite au séquençage ciblé d'un panel de gènes impliqués dans des maladies digestives. La patiente présentait effectivement une atteinte digestive au premier plan et *STAT3* est le seul gène candidat identifié dans ce panel. Néanmoins, il est aussi possible que la maladie de cette patiente soit liée à un autre gène, non séquencé. Si les tests fonctionnels ne valident pas l'implication de STAT3 dans sa pathologie, un séquençage de l'exome sera réalisé.

4.5 Mutation homozygote d'IκBα : nouveau déficit à confirmer

Nous avons mis en évidence, suite à l'analyse de l'exome d'un patient consanguin une mutation homozygote de *NFKBIA*. Ce gène appartient à la voie NF-κB , impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire. Dans cette voie, d'autres déficits immunitaires primitifs monogéniques sont déjà décrits. Notamment, des mutations de *NEMO* (ou *IKBKG*) et des mutations autosomiques dominantes de *NFKBIA*, responsables de dysplasies ectodermiques anhydrotiques avec déficit immunitaire T [220, 200], des mutations de *NFKB2* [221, 222] ou encore de *IKBKB* [223]. De plus, notre équipe a également identifié lors de l'analyse d'exome de patients lupiques d'autres gènes candidats sur cette voie, en cours de validation fonctionnelle. Ce gène nous a donc semblé être un bon candidat.

Nous avons fait l'hypothèse d'une perte de fonction de IκBα entrainant une diminution du seuil d'activation de la voie NF-κB conduisant aux symptômes auto-immuns du patient. Nous avons confirmé son caractère privé et extrêmement rare de la variation et sa ségrégation mais à ce jour, nous n'avons pas mis en évidence de défaut fonctionnel. Les tests que nous avons utilisés (mesure des cytokines sécrétées dans le surnageant de culture suite à la stimulation globale de la voie par les TLR et autres récepteurs de surface) ont été initialement mis au point pour détecter un défaut d'activation de la voie NF-κB et sont peut-être inadaptés pour détecter une activation plus précoce ou à plus faible seuil. L'apoptose des lymphocytes T activés est également normale. Nous souhaitons donc utiliser d'autres méthodes, notamment en étudiant la translocation de NF-κB dans le noyau et sa liaison à l'ADN ainsi que la prolifération cellulaire. A cette fin, EMSA, microscopie confocale et WB des fractions protéiques cytoplasmiques et nucléaires pendant une cinétique d'activation sont en cours de mise au point au laboratoire.

Cette mutation est une mutation faux-sens située à la fin du domaine C-terminal de la protéine. Il est donc possible qu'elle n'ait en réalité pas d'impact, bien que la modélisation *in silico* prédise un changement affectant le repliement de la protéine. Nous devrons alors explorer les 28 autres gènes candidats identifiés dans cette famille, en commençant par vérifier leur ségrégation familiale. Dans cette famille, seul l'exome du patient a été séquencé. Le séquençage d'autres membres de la famille, parents ou fratrie, permettrait de tester d'autres hypothèses de transmission.

4.6 Une cohorte hétérogène, des approches multiples, des résultats variés

Au cours de ce travail, nous avons étudié des patients ayant en commun des cytopénies auto-immunes. Leur caractérisation clinique et biologique précise a mis en évidence une grande hétérogénéité des autres atteintes qu'ils ont présentées.

Ils sont tout d'abord, hétérogènes dans leur présentation clinique, les diagnostics suspectés et les explorations réalisés avant l'inclusion dans notre cohorte : ainsi, la cohorte incluait les patients ALPS-like sans mutation de *FAS* ou des autres gènes impliqués dans l'ALPS. De même, s'y trouvaient des patients IPEX-like sans mutation ni de *FOXP3*, ni de *CD25*. Ces patients présentaient en plus des cytopénies des symptômes très variés, du déficit immunitaire commun variable aux entéropathies et diabète en passant par la lymphoprolifération bénigne.

Si cette hétérogénéité reflète bien celle décrite dans les séries rapportées de syndrome d'Evans pédiatriques, elle ne facilite pas l'identification de causes génétiques. Nous avons donc initialement centré nos recherches sur une dizaine de familles, pour la plupart consanguines, avec pour objectif d'identifier des gènes communs. En dehors du caractère précoce et sévère des présentations et de la consanguinité, l'hétérogénéité persistait dans ce sous-groupe. Ceci explique que les gènes identifiés soient finalement variés.

Cette cohorte a également des contours mouvants : les cytopénies faisant très fréquemment partie des symptômes des déficits immunitaires primitifs, à chaque nouveau gène découvert, nous revisitons les données cliniques et génétiques des patients pour identifier les quelques cas correspondants, ce qui permet d'apporter progressivement des diagnostics aux patients, malades le plus souvent depuis plusieurs années. Parfois, cela s'associe avec de nouvelles possibilités thérapeutiques. Ainsi, au cours de ce travail, nous avons également identifié quelques patients avec des mutations de *PIK3CD* ou *PIK3R1*. A l'opposé, la cohorte s'enrichit des nouveaux patients présentant un syndrome d'Evans pour lesquels ces nouvelles hypothèses se révèlent non confirmées. En effet, dans les déficits immunitaires décrits récemment avec des atteintes auto-immunes, les spectres cliniques sont étendus et chevauchants.

De ce fait, nous avons secondairement exploré des patients hors de notre cadre d'étude initial, c'est-à-dire ne présentant pas de syndrome d'Evans mais d'autres symptômes compatibles avec les gènes que nous avions identifiés. Dans ce cas, nous avons exploré ces patients de façon ciblée, par différentes techniques. Cette démarche a été efficace puisque nous avons ainsi identifié par western blot 6 familles présentant un déficit en LRBA (dont les mutations ont été localisées par séquençage haut débit), et par séquençage 8 familles CTLA-4 et 4 familles avec mutation gain de fonction de *STAT3*. De plus, nous avons également porté un diagnostic génétique pour 5 autres patients présentant des mutations de *XIAP*, *FOXP3* et *NEMO*. Au total, c'est une plus d'une trentaine de diagnostics pour les patients qui ont été réalisés au cours de ce travail.

Enfin, nous avons étudié un sous-groupe de patients présentant un syndrome d'Evans que nous avons mieux défini cliniquement, tout en cherchant là encore des mutations

dans nos gènes d'intérêt.

On voit donc qu'à l'hétérogénéité des patients répond la multiplicité des approches que nous avons mises en œuvre. Si les résultats fondamentaux associés sont parfois préliminaires, nous avons posé les bases de plusieurs projets futurs.

4.7 Existe-t-il un syndrome d'Evans primaire ?

Si nous avons longuement parlé de la définition du syndrome d'Evans et de l'hétérogénéité clinique des patients présentant des symptômes associés, nous n'avons volontairement pas défini précédemment le syndrome d'Evans dit « primaire ». Cette notion est en effet un peu variable selon les auteurs. Pour certains, elle ne s'applique que quand le syndrome d'Evans est isolé : pas d'autres symptômes associés, pas de cause identifiée. Pour d'autres, le syndrome d'Evans est primaire tant qu'une étiologie n'a pas été identifiée, même si elle est fortement suspectée, notamment en raison d'autres manifestations cliniques associées au syndrome d'Evans. Ainsi, Aladjidi *et al.* ont récemment classé les patients en 3 catégories : syndrome d'Evans primaire, (sans autres manifestations), secondaire (étiologie sous-jacente identifiée) et les autres patients (avec d'autres symptômes sans atteindre les critères diagnostiques d'une étiologie définie) [187]. Bien avant nous, Sokol *et al.* s'interrogeaient déjà sur la notion de « secondaire », cette fois dans le cadre des anémies hémolytiques, en questionnant la co-occurrence fortuite ou significative des AHAI avec d'autres maladies [164]. On voit donc que selon les définitions, notre travail pourrait avoir porté sur des patients présentant un syndrome d'Evans primaire ou secondaire.

De plus, qu'en est-il maintenant du syndrome d'Evans des patients pour lesquels ce travail a permis d'identifier une cause génétique ? On s'aperçoit que ce critère « primaire/secondaire » peut également varier au cours du temps. Ainsi, selon les études, les auteurs ont considéré comme secondaires les syndromes d'Evans avec d'autres manifestations au diagnostic ou plus tard dans l'évolution de la maladie. Certains ont exclu de leurs études les patients avec d'autres manifestations au diagnostic, ne les considérant pas comme rentrant dans la définition du syndrome d'Evans. Ils ont alors considéré les patients présentant de nouvelles manifestations au cours du suivi comme présentant un syndrome d'Evans secondaires [184, 185, 182]. D'autres ne font pas cette distinction temporelle [178]. D'autres enfin n'ont pas suivi les patients dans le temps [160], ou ne se sont pas particulièrement intéressés aux étiologies possibles. Ceci a compliqué notre travail de comparaison et nous a amené à interpréter ces données avec prudence.

S'il existe très certainement des patients présentant un syndrome d'Evans strictement isolé, ce ne sont pas ceux que nous avons eu l'occasion d'étudier. Cela est très vraisemblablement lié au biais de recrutement des patients adressés à l'hôpital Necker, centre de référence pour de nombreux déficits immunitaires primitifs et aux équipes de recherche travaillant sur ce site, en partenariat avec les cliniciens. Nous avons donc étudié des patients présentant tous des symptômes associés à leurs cytopénies auto-immunes. En ce sens, nous pouvons suspecter une cause sous-jacente pour chacun d'entre eux. Et nous l'avons identifiée au cours de ce travail pour une partie des patients. Il est à noter que les gènes mis en cause dans la pathologie des patients ont tous été décrits récemment, au cours de ce travail de thèse (sauf STAT3 pour lequel seul la pathologie liée au gain de fonction est de découverte récente). Nul doute qu'à l'avenir nos travaux et ceux d'autres équipes contribueront à augmenter la proportion des patients avec une étiologie supposée pour leur syndrome d'Evans, monogénique ou plus complexe.

4.8 LRBA, CTLA-4, STAT3, IκBα : des mécanismes physiopathologiques à préciser

Nous avons vu que la clinique des déficits en LRBA, en CTLA-4 et des gain de fonction de STAT3 entrainent des syndromes cliniques de large spectre et encore mal individualisés. La physiopathologie de ces 3 entités est seulement en partie connue : il a été mis en évidence un défaut des lymphocytes T régulateurs dans les 3 maladies, ce qui suggère un dérèglement au niveau de ce point de contrôle de la tolérance périphérique. Ce défaut pourrait notamment expliquer les atteintes digestives, endocrines et cutanées, également observées dans les défauts de FOXP3 et CD25. L'interaction de CTLA-4 et LRBA décrite par Lo *et al.* trace les contours d'un mécanisme commun dans les Treg où LRBA pourrait contrôler la dégradation de CTLA-4 [98].

La diversité des signes cliniques et biologiques observés suggère également que d'autres mécanismes sont probablement à l'œuvre.

Ainsi, on observe chez ces patients – et de façon plus fréquente pour les défauts de CTLA-4 – des atteintes granulomateuses, le plus souvent pulmonaires mais pouvant toucher d'autres organes. Une fois établis, ces granulomes sont de nature inflammatoire, sans germe identifié. Qu'en est-il de leur induction ? On peut faire l'hypothèse qu'un pathogène a initié leur formation mais que la prolifération cellulaire amorcée ne s'est pas arrêtée une fois le germe éliminé. A l'opposé, il se peut que la formation des granulomes soit indépendante de tout pathogène. Dans les deux cas, cela fait suspecter des disfonctionnements d'autres points de contrôle de la tolérance immune.

De même, l'hypogammaglobulinémie progressive observée chez les patients déficitaires en LRBA a-t-elle la même origine que celle des patients ayant des mutations de *CTLA-4* ou *STAT3* ? Dans les DICV, les causes suspectées sont multiples : régulation négative des Treg, apoptose des cellules T accélérée, production anormale de cytokines, augmentation de la production de cellules B auto-réactives, défaut de différenciation et de commutation de classe des lymphocytes B [224]. Quelques gènes entrainant spécifiquement des DICV ont également été décrits [225, 226, 227, 228, 229].

L'hypogammaglobulinémie peut être un défaut intrinsèque des B ou lié à un défaut de coopération T-B ou encore au défaut des lymphocytes T régulateurs. Par exemple, le déficit en inducible costimulator (ICOS), molécule exprimée sur les lymphocytes T activés induit un défaut de différentiation terminale des lymphocytes B [225]. De même, l'absence de Treg chez la souris entraine une diminution des lymphocytes B sécréteurs d'IgA au niveau intestinal [230].

Concernant *NFKBIA*, gène déjà impliqué dans un autre déficit immunitaire, autosomique dominant, nous n'avons pas encore mis en évidence une conséquence fonctionnelle de cette mutation homozygote. Nous avons par ailleurs également identifié au cours de l'analyse d'exome de cohortes de patients présentant un lupus pédiatrique d'autres gènes candidats forts situés sur cette voie. Un des projets en cours au laboratoire est d'étudier l'implication fonctionnelle de l'ensemble de ces différents candidats.

Nous avons aussi mis en évidence qu'un même patient d'origine consanguine peut présenter plusieurs maladies monogéniques autosomiques récessives. C'est notamment le cas du cas index de la famille 1, présentant un déficit en LRBA et une mutation d'*ABCC6* responsable d'un pseudoxanthome élastique. Nous suspectons donc que des facteurs additionnels, différents d'un défaut à l'autre et même peut-être d'un patient à l'autre, viennent compliquer ces descriptions mendéliennes monogéniques et expliquer la diversité des présentations cliniques y compris au sein d'une même famille. Nous faisons l'hypothèse que, comme dans le cancer, ces facteurs peuvent être génétiques et s'additionner, certains étant des facteurs de susceptibilité, dont l'implication serait une modulation de la maladie, d'autres plus essentiels ou déclencheurs. Ainsi, dans la famille LRBA 9, la patiente présente aussi une mutation homozygote du gène *ELKS*, impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans le rôle dans la pathologie n'est pas clairement identifié.

De plus, ces évènements génétiques additionnels pourraient être somatiques, situés sur le même gène comme cela a été montré dans l'ALPS [24, 25]. Nous avons commencé à en rechercher chez les familles présentant des mutations de *CTLA-4*, déficit pour lequel la pénétrance est incomplète. L'identification préalable d'une population pathognomonique de ces déficits, comme cela est le cas avec les lymphocytes double négatifs dans l'ALPS, pourrait orienter ces recherches. Les facteurs génétiques secondaires pourraient tout aussi bien être situés sur d'autres gènes. Ainsi, les maladies auto-immunes seraient bien à la fois génétiques et multi-factorielles.

Conclusions

Pour identifier des causes génétiques du syndrome d'Evans pédiatrique, nous nous sommes intéressés à une cohorte de patients présentant une maladie précoce et sévère, dont certains étaient issus de familles consanguines. Nous avons séquencé et analysé l'exome de 16 patients et identifié 4 gènes candidats : *LRBA*, *CTLA-4*, *STAT3*, et *NFKBIA*. Sur la base des résultats obtenus, nous avons approfondi les explorations par des tests fonctionnels, biochimiques, protéomiques et de co-localisation. Nous avons également ouvert les explorations à d'autres patients de présentation clinique similaire. L'ensemble des données rassemblées suite à ces expérimentations nous mène à plusieurs conclusions.

Tout d'abord, nous confirmons que les patients présentant un syndrome d'Evans d'origine monogénique présentent d'autres symptômes associés : auto-immunité, lymphoprolifération ou déficit humoral. Malgré des présentations cliniques souvent chevauchantes, les gènes impliqués et modes de transmission des mutations responsables d'un syndrome d'Evans sont variables d'une famille à l'autre. Nous avons porté un diagnostic de maladie génétique rare pour une trentaine de patients. Pour certains, cela a d'ors et déjà des conséquences thérapeutiques puisque le traitement par abatacept (CTLA-4-Ig) semble améliorer les symptômes des patients présentant un déficit en CTLA-4 ou en LRBA.

L'exploration du déficit en LRBA nous a appris que LRBA est localisée dans les endosomes et le réseau trans-golgien. Elle interagit avec CTLA-4 dont elle pourrait contrôler la dégradation. Elle a également comme partenaire confirmé MVP et 28 autres partenaires potentiels. La preuve de leur implication et l'identification plus détaillée des domaines protéiques impliqués prolongera ce travail. Notre cohorte de 18 patients dans 11 familles avec 15 nouvelles mutations identifiées nous a permis de préciser les contours d'un spectre auto-immun très large avec en particulier des atteintes articulaires sévères s'associant à un diabète précoce, ou des entéropathies.

La comparaison de cette cohorte LRBA avec notre cohorte CTLA-4 (12 patients, 10 familles présentant 9 nouvelles mutations), nous permet de les discriminer sur le plan clinique : en dehors des cytopénies auto-immunes, très fréquentes dans les 2 maladies, les atteintes granulomateuses et l'hypogammaglobulinémie sont plus spécifiques du déficit en CTLA-4. De la diminution du pourcentage de lymphocytes T $CD4^+FOXP3^+CD25^+$ et la diminution de l'expression de CTLA-4 nous tirons l'enseignement qu'il s'agit de 2 maladies impliquant une rupture de la tolérance immune induite par les lymphocytes T régulateurs. Leur faible nombre a limité nos moyens d'étudier leur fonction mais nous

projetons d'utiliser d'autres marqueurs comme le CD15s pour contourner cette difficulté.

Nous avons également identifié 5 patients présentant un syndrome d'Evans avec des mutations gain de fonction de *STAT3*. La confirmation fonctionnelle du rôle des nouvelles mutations est en cours. L'une est de transmission autosomique dominante, mettant en évidence un nouveau mode de transmission de cette maladie. Enfin, nous avons commencé l'exploration fonctionnelle d'une mutation homozygote de *NFKBIA*. Cela fait partie des projets à poursuivre.

Nous pensons qu'il existe des facteurs modificateurs sur plusieurs points de contrôle de la tolérance immune permettant d'expliquer la pénétrance et la clinique variable de ces maladies. L'exploration prochaine du déficit en LRBA à l'aide d'un modèle murin permettra de décortiquer les rôles des différents domaines de cette protéine. L'expression des différents mutants dans des lignées cellulaires sera également un outil vers une compréhension plus fine des mécanismes à l'œuvre.

Ainsi, au delà de l'importance de ces découvertes pour les patients, notre travail ouvre des voies pour l'identification de nouveaux points de contrôle de la tolérance immune.

Annexes

Gène	Matériel	Nom de l'amorce	Séquence amorce	Taille produit (bp)	Produit
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex1F	CCCCAGCCAGCGTTTATAG		
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex1R	CGCCTTATGCAACCGGGGA	697	Exon 1
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex2-3F	GCCAGGAACACTCAGCTCAT		
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex2-3R	AAGCTCTTGCCTGGACTCCTTA	900	Exons 2 et 3
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex4-5F	CCCAGACTGTGGGTTCTTAAAAT		
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex4-5R	ACCCCTCTGATAAGGAGCAG	674	Exons 4 et 5
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex6F	TTGGGCTATGGAGAATGGAG		
NFKBIA	Génomique	huNFKBIA-Ex6R	GGCAGTGTGCAGTGTGGATA	288	Exon 6
NFKBIA	cDNA	hu-cDNA-NFKBIA-Ex1-4F	AGCCCACAGAAGTCCGT		
NFKBIA	cDNA	hu-cDNA-NFKBIA-Ex1-4R	AGCACCCAAGGACACCAAAA	731	Exons 1-4
NFKBIA	cDNA	hu-cDNA-NFKBIA-Ex3-6F	TCCACTCCATCCTGAAGGCTA		
NFKBIA	cDNA	hu-cDNA-NFKBIA-Ex3-6R	GAGGGCTGATCCTACCACAA		Exons 3-6
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex2F	GAAGCGGGTGGCTAGTAGTG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex2R	ACCACATGGCTCCAGCTTTA	643	Exon 2
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex12-13F	AAGGTGAATGGAAGGGTTACATC		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex12-13R	AGCAATCCACTGAAGTCTTGCAT	781	Exons 12 et 13
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex14F	CTTTTTGGAAGAAGCGTGGT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex14R	GGAATATAGAAAAACTGCCCAAA	382	Exon 14
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex15F	ATGGAAAAGCTGTTGGGAATGA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex15R	AACCACAGTAACCAAGCAAAGAA	275	Exon 15
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex16F	AGCTGACCAACTTGACAAATCT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex16R	GACACATTTACTCCCCATTACAGTT	275	Exon 16
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex17F	TTGGAGTTACAGAGGTGAATGTTT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex17R	TCATTTCATGCTATAAACTCATTTCA	393	Exon 17

Gène	Matériel	Nom de l'amorce	Séquence amorce	Taille produit (bp)	Produit
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex18F	GGAACTCTAGCCTGAGATAAGCA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex18R	TGGGATTACATTTATACAGCAATTT	400	Exon 18
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex19F	CATGCATATTAAGTAGAGCACAGAAAA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex19R	TTACCTACACAATGTTAAGAGGCATTT	245	Exon 19
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex20F	CCAGTGATTTGCTAATGTAATCCA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex20R	TCATCACCCTTAATGAAACATTC	248	Exon 20
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex21-22F	AAACTAAAGAAATTGCAATAGATGGA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex21-22R	CTTTCAGAAGATAACTTGCCTTTTT	844	Exons 21 et 22
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex23F1	TTCTGTGATTGACTTACATTTATCATT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex23R1	TACCAAACATGTCCAGTTTTTCA	847	Exon 23 (1^{re} partie)
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex23F2	TACCAGATGAAGGCACTTTGGA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex23R2	GAATAGCATGTGAACCAAATTCA	850	Exon 23 (2^{e} partie)
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex24F	TCTTAAAAACGTGTTAGATGAATTGC		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex24R	TTCTACTTTTTAACCAAATGTCTGAA	400	Exon 24
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex28F	TTCTGGTTCTGGGAATACTGTGT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex28R	TGCATCAGTTAAGAGAGTATGTGAAA	247	Exon 28
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex30F	AGGTGCACCCACTCAGTACA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex30R	AGGGCGTCATCATCCCTAA	696	Exon 30
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex31F	TTTCATGTTGGGTGAAAAGTCT		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex31R	CTAATGTGCCCCCAAATTTTAAGT	389	Exon 31
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex32F	CGTTATAATGCTTTTATTGACTGG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex32R	TGAAATGAAATGAAATGAAACGA	280	Exon 32
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex35F	GCATGAAATTGATATGGGTGA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex35R	GCTCCATTACATTACTGACTGAACA	286	Exon 35

Gène	Matériel	Nom de l'amorce	Séquence amorce	Taille produit (bp)	Produit
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex37F	AATTTTGGTTGTTTTGATTTAGGG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex37R	TCTCTTCTTCATCTGGCTTTGAT	364	Exon 37
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex39F	AGCATCTGCATTAAAGTTTGACA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex39R	AACATATATTTCAAACGCAAGTTTT	274	Exon 39
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex44F	CCATGAATTGTAGATTGAAACCTC		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex44R	AGCAATAACGGCAATAAAACAAG	382	Exon 44
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex46F	CCCAATATGATACTGTGTTGCAG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex46R	GGCAATACAAGCCAAATGAGA	453	Exon 46
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex50F	TCAGCATGAAACAAGCCAGAG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex50R	TGGTGGAGAAACTCAAGCACA	294	Exon 50
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex51F	TGCCCACTCAACAGTATCTCC		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex51R	TTCAGCAGTTACCATGCCTTA	249	Exon 51
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex51F200	AAGCCCAGCAGGATGTTATC	198	Exon 51
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex51F160	CCCTCCAACTCCCCTGTTAC	163	Exon 51
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex52F	TGGAAACAATTCTACATAAGGTTTGA		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex52R	GCAACCAGCAAGTGAAAAAC	250	Exon 52
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex54F	CCATCAGAGTTCATATAGCTTCG		
LRBA	Génomique	huLRBA-Ex54R	TCCTGTCTCACTTTTACCATAACAA	368	Exon 54
LRBA	ADNc	huLRBA-143F	AGAGGGACCCTTTCGTTTTG		
LRBA	ADNc	huLRBA-1141R	CCACTTTTGTGGCTTGAAATC	999	Exons 2-8
LRBA	ADNc	huLRBA-908F	ATAGCCAAATGGCCATACCA		
LRBA	ADNc	huLRBA-1903R	TTTTGAAAATGCAAGGCAAA	996	Exons 6-13
LRBA	ADNc	huLRBA-2652F	AGCATCCAGATCCTGATTCTTC		
LRBA	ADNc	huLRBA-3663R	CAGATGCAGCTGGAGACAAAT	1010	Exons 20-23

Gène	Matériel	Nom de l'amorce	Séquence amorce	Taille produit (bp)	Produit
LRBA	ADNc	huLRBA-4240F	GTGGAGAAGCCATTCAACAAA		
LRBA	ADNc	huLRBA-5249R	ACGGTGTAGCCTTAGTGTCCAA	1010	Exons 24-30
LRBA	ADNc	huLRBA-5032F	CACATCATCTGCTCGAAGGA		
LRBA	ADNc	huLRBA-6023R	CTGCAGAATACTGGGCACAC	992	Exons 30-37
LRBA	ADNc	huLRBA-5955F	GCAGGCAGAGAGCAGAAGAT		
LRBA	ADNc	huLRBA-6953R	GCAGGCAGAGAGCAGAAGAT	999	Exons 36-45
LRBA	ADNc	huLRBA-6715F	GGCAAACAGAGTTGCTGTGA		
LRBA	ADNc	huLRBA-7733R	GACTCACTTGCATGGCAGAA	1019	Exons 42-51
LRBA	ADNc	huLRBA-7559F	CGAGCCCTCAATGTGTTCTA		
LRBA	ADNc	huLRBA-8565R	GCCTGGAGTTTTCCATTCAC	1007	Exons 49-56
LRBA	ADNc	huLRBA-8425F	TGGAGACTTGTTGAGGACCTT		
LRBA	ADNc	huLRBA-9424R	ATAGCCTCCCCCAAACCATA	1000	Exons 56-58
LRBA	ADNc	huLRBA-8923R	AAGTTACATTCAGATGTGGTAGAAGA	499	Exons 56-58
LRBA	ADNc	huLRBA-2172F	GACCGCGACCTAATCAAAAA		
LRBA	ADNc	huLRBA-5736R	CCATGGCTACCCAAAAGTGT	3565	Exons 15-33
		Amorces spéciales pour la grande délétion de la famille LRBA9 => taille amplicon 559bp			
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex1F	AGTCCTTGATTCTGTGTGGGT		
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex1R	AAATCACTGCCTTTGACTGCT	297	Exon 1
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex2-3F	GGAGAAAAGGCCGTGGGG		
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex2-3R	AGCCCCAACTTCCCCAAATC	666	Exon 2
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex3F	CCTCAAGGCCTGGAAGCTC		
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex3R	ATGCCTACGGTTCTAGTGCG	374	Exon 3
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex4F	GGCTTCCGTATTCCTCAGTAGT		
CTLA-4	Génomique	huCTLA4-Ex4R	TGGGTTCCGCATCCAACTTT	300	Exon 4

Gène	Matériel	Nom de l'amorce	Séquence amorce	Taille produit (bp)	Produit
CTLA-4	ADNc	huCTLA4-cDNA-Ex1F	CTCAGCTGAACCTGGCTACC		
CTLA-4	ADNc	huCTLA4-cDNA-Ex3R	AAACAGCTGTGAGGAGAAAGC	522	Exons 1-3
STAT3	Génomique	STAT3-Ex15.2F	CCACCACACCCAGCTAATTT		
STAT3	Génomique	STAT3-Ex15.2R	CCCAGTGGAAGTTTTTGTCC	320	Exon 15
STAT3	Génomique	STAT3-Ex21F	ATTTCCACAGTGCCAGGCCA		
STAT3	Génomique	STAT3-Ex21R	CTCTTTAGACTCATGCACTC	565	Exon 21
STAT3	Génomique	STAT3-Ex22F	GCTTCCTCCAGCTCTGCTTA		
STAT3	Génomique	STAT3-Ex23R	CACACAAAGGGGACCAACTT	618	Exons 22 et 23
STAT3	Séquençage	STAT3-22R	CTCTCACCCAGTGTCCCATT		Exon 22
STAT3	Séquençage	STAT3-23F	TTTCCATTGTGTCTTGTCAACC		Exon 23

Tableau 5.26 – **Liste des amorces utilisées pour le séquençage direct des gènes d'intérêt.**

Article 3 :
Atypical manifestation of LRBA deficiency mimicking an autoimmune polyglandular syndrome

Manuscrit soumis dans le journal Endocrinology.

Atypical Manifestation of LRBA Deficiency mimicking an Autoimmune Polyglandular Syndrome.

Shahrzad Bakhtiar[1], Frank Ruemmele[3,4,5,6], Fabienne Charbit-Henrion[3,4,5,6], Eva Lévy[4, 7], Frédéric Rieux-Laucat[4,7], Nadine Cerf-Bensussan[3,4,5], Peter Bader[1], Ulrich Paetow[2]

[1]Division for Paediatric Stem-Cell Transplantation and Immunology, University Hospital Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt / Main, Germany.

[2]Division for Paediatric Endocrinology, University Hospital Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt / Main, Germany;

[3] INSERM, UMR1163, Laboratory of Intestinal Immunity, 75015 Paris, France

[4] Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité and Institut Imagine, 75015 Paris, France

[5] GENIUS group (GENetically ImmUne mediated enteropathieS) from ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition), www.genius-group.org

[6] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Department of Pediatric Gastroenterology, Paris, France

[7] INSERM UMR 1163, Laboratory of Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases, 75015 Paris, France

Abbreviated Title: Polyglandular autoimmunity caused by LRBA deficiency

Key words: Autoimmune Polyglandular Syndromes, autoimmune thyroiditis, Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor (LRBA) gene, autoimmune enteropathy, alloHSCT

Word count: 2274 (max 6000) excluding abstract, figure captions, and references

Numbers of figures and tables: 5

Corresponding author and the person to whom reprint requests should be addressed:

Shahrzad Bakhtiar MD

Division for Paediatric Stem cell transplantation and Immunology

Goethe-University Hospital

Theodor-Stern-Kai 7

60590 Frankfurt / Main, Germany.

Phone: 0049 69 6301 6432

Fax: 0049 69 6301 4464

Email: shahrzad.bakhtiar@kgu.de

Disclosure summary: authors have nothing to disclose.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Institutional grants from INSERM, by the European grant ERC-2013-AdG-339407-IMMUNOBIOTA, by the Investissement d'Avenir grant ANR-10-IAHU-01, by the Fondation Princesse Grace. FCH was supported by fellowships from Institut Imagine and from INSERM. NCB benefits from an Interface-Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. EL was supported by fellowships from INSERM, ARC and Imagine Institute.

FRL benefits received grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 "Lumugene") and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013).

Abstract:

Autoimmune polyglandular syndromes (APS) describe a variety of diseases affecting one or more endocrine or non-endocrine organs by autoimmunity during childhood. Clinical manifestations may include type 1 diabetes mellitus, hypothyroidism, adrenal insufficiency, enteropathy, vitiligo, and cytopenias. LRBA deficiency syndrome has been described in 2012 as a novel primary immunodeficiency, predominantly causing immune dysregulation and early onset enteropathy. We describe the heterogeneous clinical course of LRBA deficiency in two siblings, mimicking APS in one of them in presence of the same underlying genetic mutation.

The third child of consanguineous Egyptian parents (Patient 1) presented at six months of age with intractable enteropathy and failure to thrive. Later on he developed adrenal insufficiency, autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia, and infectious complications due to immunosuppressive treatment. The severe enteropathy was non-responsive to standard treatment and led to death at the age of 22 years. His younger sister (Patient 2) presented at the age of 12 to the endocrinology department with severe hypothyroidism, perioral vitiligo, delayed pubertal development, and growth failure without enteropathy. She was evaluated as APS. Using whole-exome sequencing (WES) we identified a homozygous mutation (homozygous c.6862delT) in the LRBA gene in both siblings. To our knowledge our patient (patient 2) is the first case of LRBA deficiency described with predominant multi-endocrine phenotype without type 1 diabetes mellitus and enteropathy. LRBA deficiency should be considered as underlying disease in young patients suffering from an APS-like disorder. The same genetic mutation can manifest with a broad phenotypic spectrum.

Introduction:

Autoimmune Polyglandular Syndromes are a heterogeneous group of diseases characterized by autoimmune activity against more than one endocrine organ, although non-endocrine organs can be affected as well (1). Based on their clinical manifestation, APS may be divided up into the juvenile type (APS I) and the more common adult type (APS II-IV). Furthermore other diseases – which have endocrine autoimmunity as one of their features – can cause an APS phenotype. APS I, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome (APECED) is a monogenic immune disorder caused by mutations in autoimmune regulatory (AIRE) gene. APS II-IV comprises several disorders suspected to have a multifactorial genesis (2). A series of additional monogenic primary immunodeficiency disorders (PID) has been described, causing a combination of immunodeficiency and multi-endocrine disorders. Examples are IPEX syndrome (3), Stat5b-deficiency (4), CD25-deficiency (5), and CTLA4 haplo-insufficiency (6) which all present with immunodeficiency and endocrine disorders. Recently, mutations in Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor (LRBA) gene have been introduced as a novel PID with a predominant polyautoimmune phenotype (7,8). Affected individuals typically present with severe enteropathy in early life and may suffer from hypogammaglobulinemia, pulmonary disease, lymphoproliferative disorder (9), and infancy-onset type 1 diabetes mellitus (10). A predominant endocrine phenotype of LRBA deficiency without symptoms of enteropathy and immunodeficiency has not been described yet.

Here we describe the clinical immune and endocrine profile of two LRBA-deficient siblings. We observed a heterogeneous presentation of symptoms. The older sibling (Patient1) suffered from a combination of complex immune dysregulation caused by LRBA deficiency, whereas the younger sibling (Patient 2) predominantly developed a multi-endocrine disorder mimicking APS.

Material and Methods

Patient Characteristics

Patient 1

The third of four children of consanguineous Egyptian parents presented at the age of six months with intractable diarrhoea, resulting in maldigestion and malabsorption. Over the first four years of life, the patient developed adrenal insufficiency, hyperpigmentation of the skin, and impetigo-like erosive eczema. Endocrine consequences of growth retardation, delayed puberty, and osteoporosis were observed as well. By the age of 14 years, two episodes of autoimmune haemolytic anaemia and one episode of rhabdomyolysis occurred, followed by polyserositis and chronic osteomyelitis of his left knee (Figure 1b). Initial combinatorial treatment with glucocorticoids and sirolimus resulted in short remission. However, further intensification of the immunosuppressive therapy, including administration of azathioprine and tacrolimus as well as splenectomy were necessary to ameliorate autoimmunity. The severe enteropathy continued to be the predominant complaint and remained non-responsive to immunosuppressive treatment (Table 2). The functional short bowel syndrome resulted in severe cachexia with a body weight of 33.5 kg at 20 years despite long-term parenteral nutrition. The course of the disease was complicated by secondary end organ damages. The patient suffered from liver disease, oesophageal varicose veins, and neuropathy. The option of allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation (alloHSCT) combined with short bowel and liver transplantation was considered at that stage. Intensified immunosuppression led to severe recurrent infections refractory to antibiotic treatment and surgical intervention. Eventually the patient lost his lower leg due to chronic osteomyelitis at the age of 21 years prior to a scheduled alloHSCT from an HLA-identical family donor. Eventually, the patient deceased due to recurrent septic complications and respiratory failure after lower leg amputation (Figure 2a, b).

Laboratory results showed mild CD4-lymphopenia (CD4 505/µl [NR 700-1300]) with normal distribution of T-, B-, and NK-cells. IgA deficiency was observed with normal IgG and slightly reduced IgM and low tetanus vaccine antibodies and normal hepatitis B vaccine antibodies. Thyroid hormones, growth factors and PTH were within the normal range with low levels of vitamin D (<5 ng/ml [NR 20-30]). Sanger sequencing showed no *FoxP3* mutation indicative of IPEX syndrome and the presentation was evaluated as IPEX-like. In search of the underlying disease, whole exome sequencing (WES) was performed three years after the patient's death on genomic DNA from the patient, his affected sister and both parents. Both affected children were found to carry a homozygous frameshift *LRBA* mutation (c.6862delT), whereas parents were found to be heterozygous, and healthy siblings either heterozygous or wild-type. The western blot on total protein extracts from activated T lymphocytes showed absent LRBA protein expression.

Patient 2

The younger sister of patient 1 was admitted to the endocrinology department at the age of 12 years with severe decompensated hypothyroidism (TSH > 200 mU/l [NR 0.5-3.6]); fT4 0.1 ng/dl [NR 0.9-1.6]), growth retardation (<P3), pubertal arrest, and progressive perioral vitiligo. Her past medical history was unremarkable with regards to severe infections and gastro-intestinal symptoms. We observed high thyroid antibody titres (aTPO-ab >2818 IU/ml [NR <35]; TG-Ab >3000 IU/ml [NR <40]). Low IGF-1 (170 ng/ml [NR 190-805]) and IGFBP3 (2.5 µg/ml [NR 2.2 – 4.6 µg/ml]) were detected with normal level of cortisol in plasma. Her vitamin D was significantly reduced (<4 ng/ml [NR 20-45]) with slightly elevated AP (173 U/l, [NR 47-119]) and high PTH (764 pg/ml [NR 15-65]), whereas calcium and phosphate in plasma were at the lowest normal range pointing to a biochemical constellation of rickets. Bone density – measured by peripheral quantitative CT-scan – was

146 within the lower normal range. On ultrasound, a small thyroid gland (2.5 ml [NR 5.7-13.3])
147 with several nodules (<5mm) was observed. Echocardiography revealed a minor pericardial
148 effusion resolving after thyroxin substitution. On further follow-up, bone age remained
149 significantly retarded. Despite severe growth retardation, there was no biochemical evidence
150 of growth hormone deficiency in this patient. Positive antinuclear antibodies (ANA 1:320,
151 [NR <1:80 plasma dilution]) were detected. Furthermore slightly elevated anti-gliadin-IgG
152 (35 U/ml, [NR <12]) was measured in presence of normal anti-transglutaminase antibodies.
153 WBC showed mild thrombocytopenia with detectable anti-thrombocyte antibodies (185/nl,
154 [NR 200-400]) and slightly reduced haemoglobin (Hb 10.1 g/dl [NR 11-15.5]). The
155 lymphocyte subset analysis showed mild CD4-lymphocytopenia (594/µl [NR 700-1400])
156 with normal naïve population and normal distribution of effector and memory T-cells, normal
157 B- and B-cell subpopulations, and normal NK-cells. CD25+ T cells were observed in the
158 normal range with regular FoxP3 expression. As in her brother, IgA deficiency was detected
159 (17mg/dl [NR 70-300]) with normal IgG and slightly reduced IgM levels in plasma (Table 1).
160 She was diagnosed with an APS-like disorder. After thyroid hormone substitution and
161 vitamin D supplementation, the patient re-started to grow and later experienced delayed
162 menarche at the age of 16 years. The patient is currently 19 years old and on thyroid hormone
163 substitution, as well as oral vitamin D, and calcium supplements. No immunosuppressive
164 therapy has been initiated yet.
165 She was found to share the same homozygous frameshift mutation as her brother, resulting in
166 absent LRBA protein expression (Figure2 a, b).
167
168 **Genetic analysis using whole exome sequencing**
169 Genomic DNA from peripheral blood cells was isolated using the QIAamp® DNA Blood
170 Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. Whole

exome sequencing was performed on the genomic platform of Institut IMAGINE's. Agilent SureSelect librairies were prepared from 3 µg of genomic DNA sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator. Exons regions were captured using the Agilent Sure Select All Exon 51Mb V5 (AGILENT, Les Ulis, France) and sequenced using a HiSeq2500 next generation sequencer (Illumina) on the Genomic Platform of Institut IMAGINE, Paris. Depth of coverage obtained for each sample was around 100X with >98% of the exome covered at least 15 fold. Paired-end sequences were then mapped on the human genome reference (NCBI build37/hg19 version) using the Burrows-Wheeler Aligner. Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard, following documented best practices (http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices). Variant calls were made with the GATK Unified Genotyper. All variants were annotated using the in-house software (PolyWeb) developed by Paris Descartes University Bioinformatics platform as described in Figure 1. All the annotation process was based on the 72 version of ENSEMBL database. Analysis of genome variations was made using the PolyWeb software. This software allows to filter variants and to eliminate irrelevant and common polymorphisms, to compare exomes of patients and relatives, to detect variations compatible with the different modes of inheritance. Variants were compared to the ones already present in US National Center for Biotechnology Information database (10) of SNP, 1000 Genome, and Exome Variant Server databases. The functional consequence of the mutation on the protein function was predicted using 3 algorithms: Polyphen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), Sift (Sorting Intolerant From Tolerant, J. Craig Venter Institute) and Mutation Taster (www.mutationtaster.org). To confirm the mutation by Sanger sequencing, genomic DNA was amplified by standard techniques using oligonucleotide primers flanking the exon 46 on the Ensembl transcrit ENST00000357115 of *LRBA* (forward 5'-

196 TTTCCCTCCCTATTGGCAGC -3', lower 5'- ACAGCAAGCATCTGAAGGGG-3') using
197 TaqDNA Polymerase (Life Technologies, Saint-Aubin, France). After purification with
198 theQIAquick PCR Purification kit (Qiagen), PCR fragments were sequenced using the same
199 primers by Eurofins on the Genomic Platform of Université Paris Descartes.
200 Using these filter criteria, we identified a total of 14 genes with homozygous variants. These
201 homozygous variants included 2 genes with missense predicted to be damaging and one
202 frameshift in the LRBA gene.
203
204 **Cell culture and immunoblotting**
205 PBMC were collected from blood using standard density gradient separation method. Cells
206 were either cultivated right away or frozen and activated upon thawing. T lymphocytes were
207 activated by SEE (0,1ng/ml) or PHA (12,5 µg/ml) and cultured in Panserin, 5% SAB, 1%
208 penicillin/streptomycin, 1% glutamine medium. At day 3 of culture and further on three times
209 per week, IL-2 (100ng/ml) was added to maintain cell proliferation.
210 Cell lysates were prepared according to standard methods, separated using 3-8% Tris-acetate
211 gels (Invitrogen), transferred onto PVDF membrane, and immunoblotted with primary
212 antibodies to LRBA (HPA023597, Sigma), Ku70 (MA5-13110, Thermo scientific), and
213 secondary antibodies to rabbit and mouse (Santa Cruz).
214
215 **Results and Discussion**
216 Paediatric patients with an autoimmune polyglandular syndrome may present with variable
217 and combined multi-organ symptoms in early childhood. Heritable monogenic primary
218 immunodeficiency disorders with a predominant autoimmune phenotype have overlapping
219 symptoms with the clinical spectrum of endocrine disorders (2). Whereas some of patients
220 suffer from a classic combination of symptoms, others might initially and exclusively present

221 with endocrine symptoms causing a delay in diagnosis and treatment. Early diagnosis of the
222 underlying disease is important in order to provide optimal treatment, but may be a challenge
223 in such patients.
224 We observed a heterogeneous clinical manifestation of LRBA deficiency in two siblings of a
225 consanguineous family with a frameshift mutation, resulting in truncation of the LRBA
226 protein. Our patient (P2) suffering from LRBA deficiency presented with a predominant
227 endocrine phenotype of severe hypothyroidism, severe growth retardation, delayed menarche,
228 vitiligo and rickets, but without type 1 diabetes mellitus and severe enteropathy. Within the
229 spectrum of autoimmune polyglandular endocrine diseases, LRBA-deficiency has to be
230 considered in addition to IPEX, CTLA4-haplo-insufficiency, CD25-, and Stat5b-deficiency.
231 The detailed pathomechanism underlying the variable symptom complex in LRBA deficiency
232 is not completely understood yet. The recent description of the extended phenotype of the
233 disease in twenty- two genetically confirmed cases of LRBA deficiency showed immune
234 dysregulation (95%), organomegaly (86%), recurrent infections (71%), and
235 hypogammaglobulinemia (57%) as the main clinical complications, whereas 81% of these
236 LRBA-deficient patients had normal T-cell counts and 73% had reduced regulatory T (Treg)
237 cell numbers (9). Disturbed homeostasis of Tregs resulting in an IPEX-like disorder was
238 previously described in one paediatric patient by Charbonnier et al. (11). However, as
239 observed in P2, LRBA-deficiency can also present with normal $CD25^{+}$ T- cells and FoxP3
240 expression. Most LRBA-deficient patients have low B-cell counts with low switched-
241 memory B-cells (80%) and plasma blasts (92%), and a defective specific antibody response
242 in 67% (9). None of these patients presented with severe autoimmune thyroiditis as the major
243 clinical manifestation. As observed in this cohort and in additional reports, the clinical course
244 of the disease remains highly variable (7, 9, 12). While some of the patients die early due to
245 enteropathy and complications of the immunosuppressive treatment, others remain stable

under systemic immunosuppression with glucocorticoids as single agents or as part of combinatorial therapy (9). In concordance with recent publications, we observed significant disease heterogeneity in two siblings. Additional disease-modifying factors likely complicate the phenotype of LRBA deficiency. Furthermore secondary changes in organ function due to immunosuppressive treatment might contribute to the variable outcome in LRBA-deficient patients. However, due to the clinical heterogeneity the underlying diagnosis might remain undetected in some patients and lead to delayed treatment. Undoubtedly, these patients need early multidisciplinary care involving specialists in the fields of endocrinology, gastroenterology, and immunology. LRBA deficiency should be assessed by analysis of LRBA protein expression and should be confirmed genetically by Sanger sequencing or next generation sequencing. Supportive medical therapy of the evolving endocrine insufficiencies is indicated at an early stage with continuous follow-up to detect further organ manifestations. Some patients may remain refractory to standard therapy. Extended immunosuppressive therapy may be necessary for patients with progressive symptoms of the disease and might result in stable disease, but also can lead to lethal complications. Recently abatacept was shown to provide improvement in LRBA-deficient patients (13). There is no long-term evaluation of efficacy and safety of the treatment available yet. In patients suffering from threatening autoimmunity, enteropathy, severe adrenal insufficiency, and infectious complications of the immunosuppressive treatment, early alloSCT could be the only curative treatment option. A few LRBA-deficient patients being treated successfully by alloHSCT have been reported (14, 15). However further studies on alloHSCT in LRBA deficiency are necessary to evaluate the optimal conditioning regimen and HSCT-related problems such as immune reconstitution post-alloHSCT and the risk of graft versus host disease. Given the severe fatal course of the disease in patient 1, the question of - preventive - alloSCT seems relevant in patient 2 at this stage. Further data on LRBA-deficient patients,

especially on those with an endocrine phenotype are necessary to evaluate the long-term risk of endocrine disorder, their outcome, and the optimal treatment options in these patients.

Acknowledgments

We thank our patients and their family for their support.

References

1. Neufeld M, Maclaren N, Blizzard R. Autoimmune polyglandular syndromes. *Pediatr Ann*. 1980;9(4):154-162.
2. Eisenbarth GS, Gottlieb PA. Autoimmune polyendocrine syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350(20):2068-2079. doi:10.1056/NEJMra030158.
3. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-21. doi:10.1038/83713.
4. Kofoed EM, Hwa V, Little B, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med*. 2003;349(12):1139-1147. doi:10.1056/NEJMoa022926.
5. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(2):482-487. doi:10.1016/j.jaci.2006.10.007.
6. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med*. 2014;20(12):1410-1416. doi:10.1038/nm.3746.
7. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet*. 2012;90(6):986-1001. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.015.
8. Alangari A, Alsultan A, Adly N, 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(2):481-488.e2. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.043.
9. Gámez-Díaz L, August D, Stepensky P, et al. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):223-230. doi:10.1016/j.jaci.2015.09.025.
10. Schreiner F, Plamper M, Dueker G, et al. Infancy-onset T1DM, short stature and severe immunodysregulation in two siblings with a homozygous LRBA-mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. January 2016:jc20153382. doi:10.1210/jc.2015-3382.
11. Charbonnier L-M, Janssen E, Chou J, et al. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):217-227. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.019.
12. Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1428-1432. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.035.
13. Lo B, Zhang K, Lu W, et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015;349(6246):436-440. doi:10.1126/science.aaa1663.
14. Seidel MG, Hirschmugl T, Gamez-Diaz L, et al. Long-term remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. December 2014. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.048.
15. Sari S, Dogu F, Hwa V, et al. A Successful HSCT in a Girl with Novel LRBA Mutation with Refractory Celiac Disease. *J Clin Immunol*. December 2015. doi:10.1007/s10875-015-0220-y.

Tables

Table 1: Endocrine and immunology diagnostic work up in 2 siblings with LRBA deficiency. Patient 1: results at 2 years and 14 years (*). Patient 2: results at disease onset with 12 years. N. a.: not available

Table 2: The course of the disease and clinical complications.

Patient 1 developed severe autoimmune complications resulting in death at 22 years despite multiple immunosuppressive treatments. Patient 2 developed autoimmune thyroiditis and vitiligo. She is currently 19 y/o in stable condition on thyroid hormone replacement.

Figures

Figure 1: a) Pat 1 showing severe polyserositis and b) complete destruction of the knee by chronic osteomyelitis. c) Pat 2 with perioral vitiligo, d) thyroid gland 2.5 ml, several nodules <5mm.

Figure 2: a) The LRBA gene is located on the long (q) arm of chromosome 4 at position 31.3. Both siblings shared the same homozygous mutation. B) LRBA protein was not detectable in western blot in both patients.

Figure 3: Healthy consanguineous parents and sister where found to be heterozygous for the mutation. One brother was wild type.

Lab results	Normal range	Pat 1	Pat2
WBC	4 - 11/nl	9.0	6.5
Hb	11 - 15 g/l	11.2	**10.7**
Thromocytes	200 - 400/nl	289	185
Lymphocytes	2 - 4.8/nl	3.7	2.3
Granulocytes	1.8 - 7.1/nl	4.7	3.9
T helper cells	700 -1400/µ	505*	594
T cytotoxic cells	200 - 900/µ	314*	585
naive $CD4^+$	220 - 873/µ	n.a.	185
naive $CD8^+$	100 - 470/µ	n.a.	368
DNT ($CD3^+B^-$)	0 - 5%	n.a.	5%
$CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$	20 - 125/µl	n.a.	34
Regulatory T cells	1 - 5 %	n.a.	2.5%
$CD19^+$	100 - 500/µ	104*	164
naive B-cells	150 - 515/µl	n.a.	220
Switched memory B	5 - 77/µl	n.a.	20
IgG	590 - 1400 mg/dl	1159	1220
IgM	50 - 317 mg/dl	**45**	**44**
IgA	70 - 250 mg/dl	**<7**	**17**
IgE	<100 U/ml	1.2	1
Coombs	not detectable	**+++***	negative
Anti-thrombocyte-ab	not detectable	-	+
Anti-granulocyte-ab	not detectable	**++***	**+**
TSH	0.5 - 3.6 mU/l	1.7	**200**
fT4	0.9 - 1.6 ng/dl	1.4	**0.1**
fT3	2.2 - 4.4 pg/ml	2.7	3.5
PTH	15 - 65 pg/ml	24*	**>700**
25-OH-vitD	20 - 30 ng/ml	**<5***	**<4**
Calcium	2.1 - 2.55 mmol/l	2.1	2.44
IgfBP3	2.2 - 4.6 µg/ml	2.1*	2.5
HGH	0.14 - 14 ng/ml	n.a.	1
IGF-1	190 - 805 ng/ml	466*	170
TG-ab	<40 IU/ml	n.a.	**>3000**
aTPO-ab	<35 IU/ml	**76***	**2818**
Adrenal-ab	not detectable	n.a.	negative
TRAK	<1 U/l	0.03*	0.04
HbA1C	4.8 - 5.9 %Hb	4.9	5.1
IFT ANA	<1:10	**1:160***	**1:320**
GAD-ab	<50 mGAD/ml	n.a.	<50
Anti-IA2-Ab	<8 U/ml	<8*	<8
Insulin-ab	<0.4 IU/ml	<0.4*	<0.4
Anti-gliadin-ab	<15 U/ml	12*	**35**
Anti-transglutaminase-ab	<12 U/ml	10*	1

Table 1. endocrine and immunology diagnostic work up in 2 siblings with LRBA deficiency sharing the same mutation with lack of LRBA protein expression. Patient 1 : results at 2 years and 14 years (*).
Patient 2 : results at disease onset with 12 years. N.a.: not available

Table 2. The course of the disease and clinical complications. Patient 1 developed severe autoimmune complications resulting in death at 22 years, despite multiple immunosuppressive treatment. Patient 2 developed autoimmune thyroiditis and vitiligo. She is currently 19 y/o, stable on thyroid hormone replacement.

Patient 1	Immunosuppression
6 months: severe pan-colitis , failure to thrive	
2 y/o: chronic diarreha, TPN- dependent	Steroids
5 y/o: hearing loss	
10 y/o: subclavian vein thrombosis	
14 y/o: AI-hemolytic anemia, rhabdomyolysis	+ Splenectomy
15 y/o: severe cachexia, liver failure	+ Ciclosporine
17 y/o: recurrent GI-bleeding (ICU)	+ Tacrolimus
20 y/o: neuropathy, seizure	+ Sirolimus
21y: 2x AI-hemolytic anemia, AI-thrombocytopenia, polyserositis	+ Azathioprine
21y: chronic osteomyelitis (complete destruction of the joint)	
22y respiratory failure, death	
Patient 2	**Immunosuppression**
12y: AI-thyroiditis: starting on L-thyroxine	none
14y: vitiligo	none
15y: 2 x severe decompensated hypothyroidism (non-compliance)	none

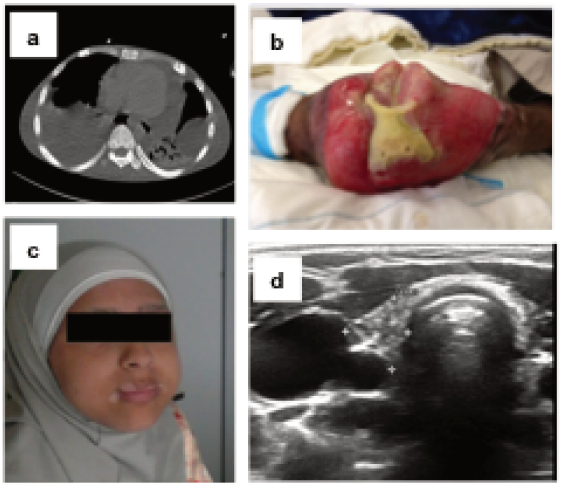


Figure 1: a) Pat 1 showing severe polyserositis and b) complete destruction of the knee by chronic osteomyelitis. c) Pat 2 with perioral vitiligo, d) thyroid gland 2,5 ml, several nodules <5mm.

Figure 2. a) The LRBA gene is located on the long (q) arm of chromosome 4 at position 31.3. Both affected siblings shared the same homozygous mutation.

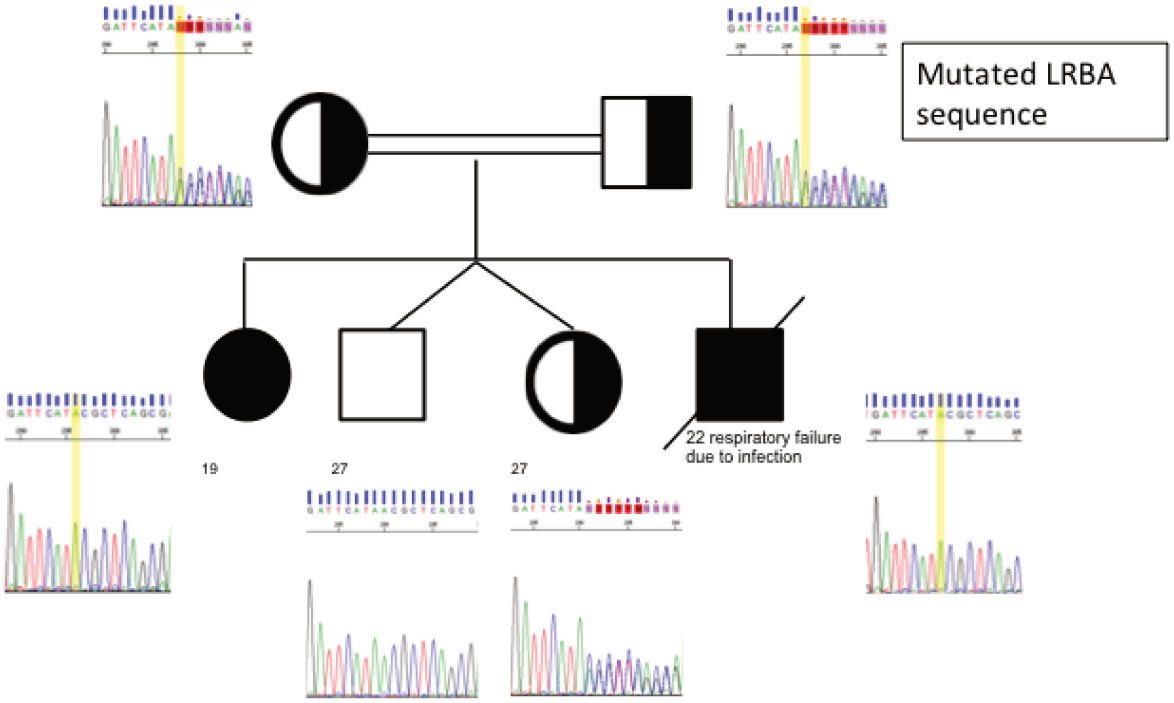


Figure 2. b) LRBA protein was not detectable in western blot in both patients.

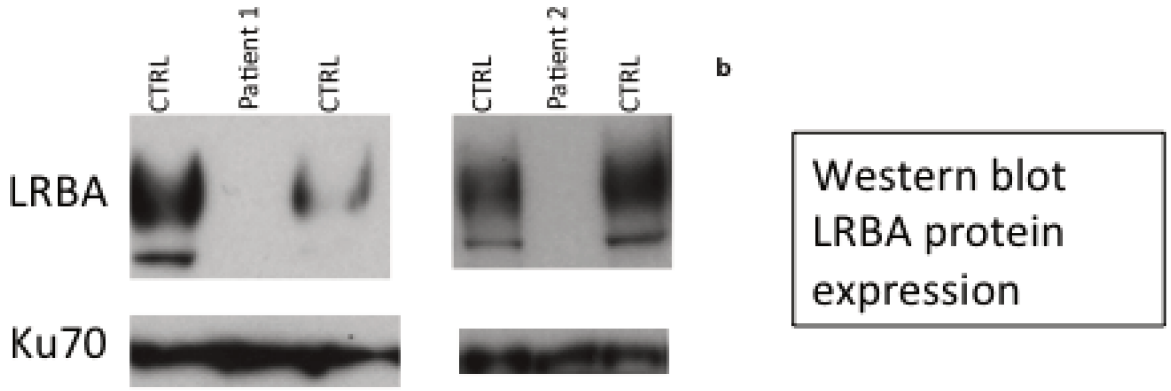
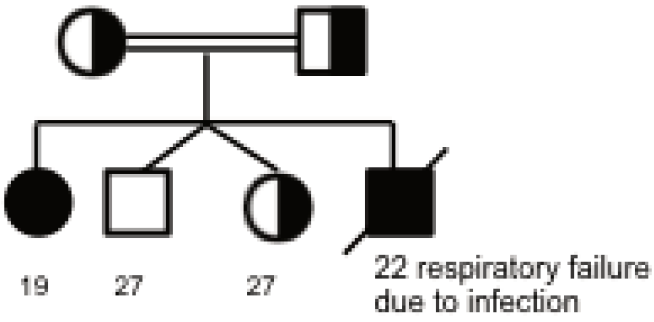


Figure 3. Healthy consanguineous parents and sister where found to be heterozygous for the mutation. One brother was wild type.



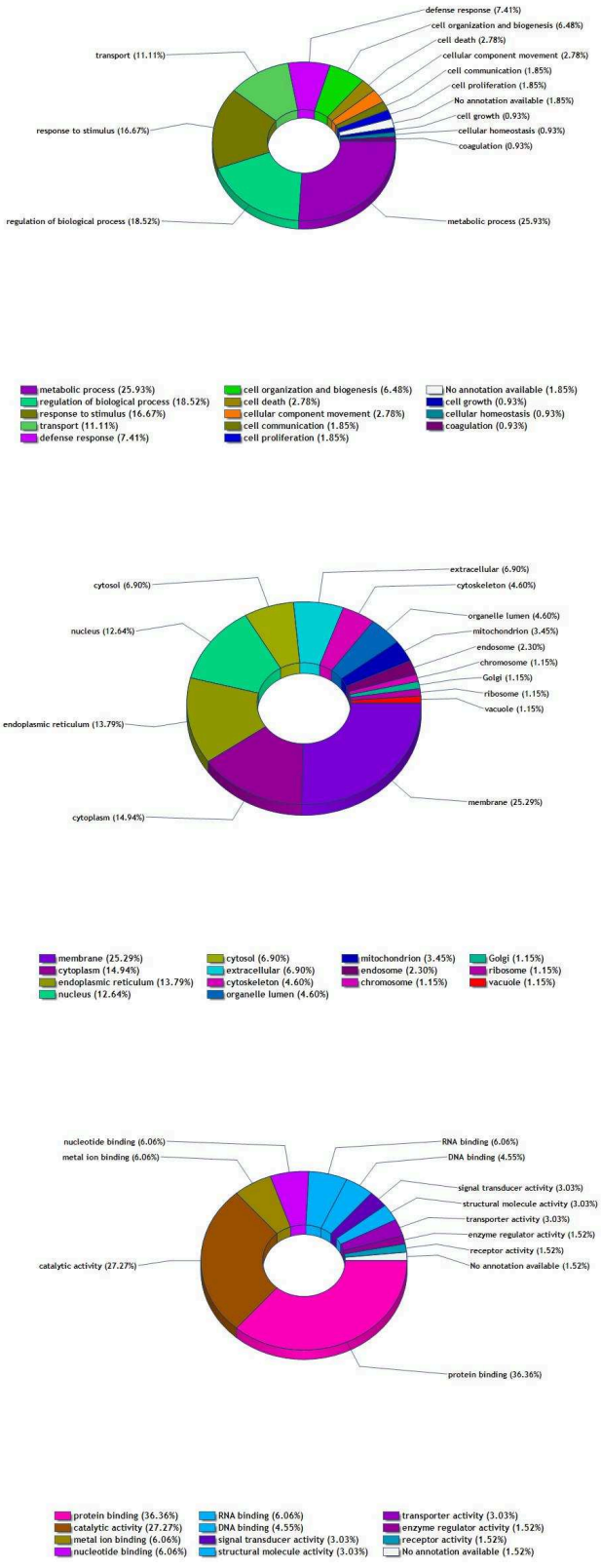


FIGURE 5.37 – **Diagramme de répartition des protéines candidates partenaires de LRBA.** Les protéines 29 identifiées par IP/MS dans les B-EBV contrôles sont réparties en fonction de leurs localisations cellulaires et de leurs fonctions moléculaires connues et des processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

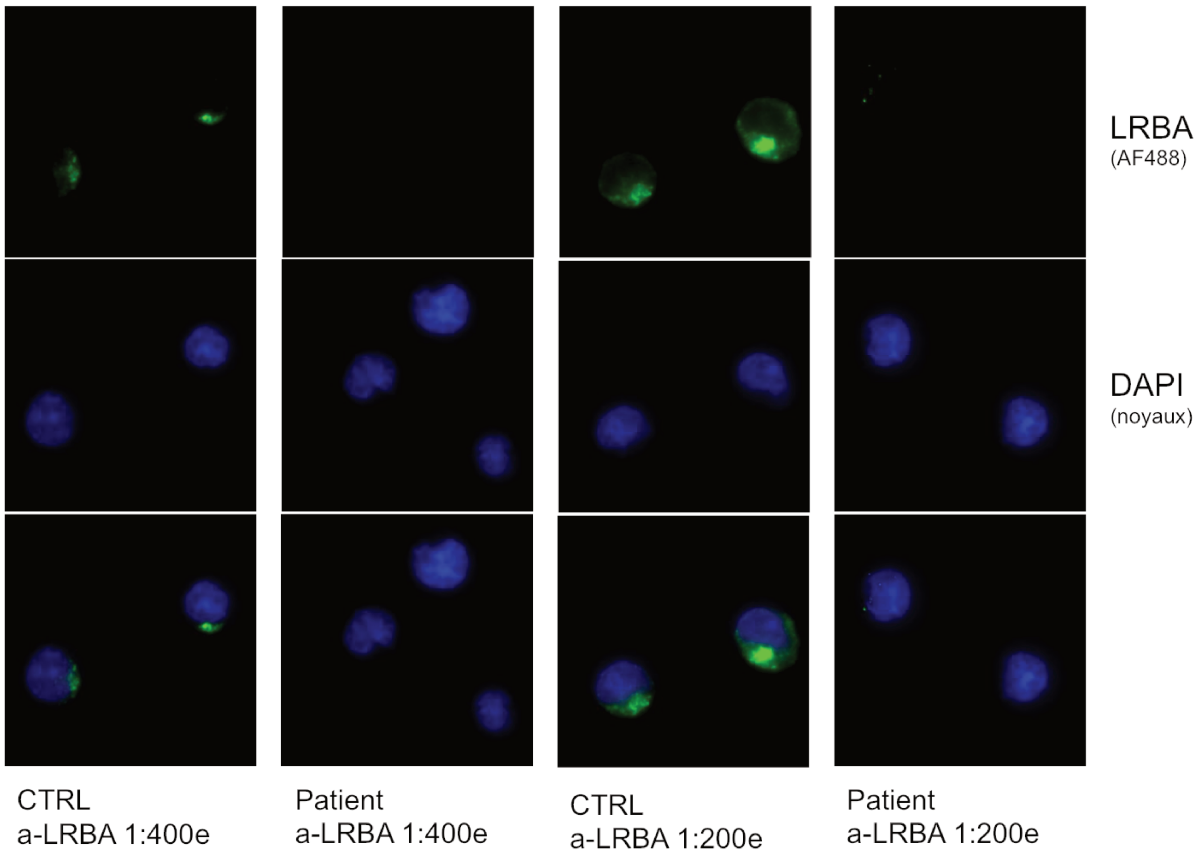


FIGURE 5.38 – **Vérification de la spécificité de l'anticorps anti-LRBA pour l'immuno-fluorescence.** Marquage de lymphocytes T activés d'un controle sain (CTRL) et d'un patient n'exprimant pas LRBA avec 2 dilutions différentes de l'anticorps (en vert). Les noyaux sont en bleu.

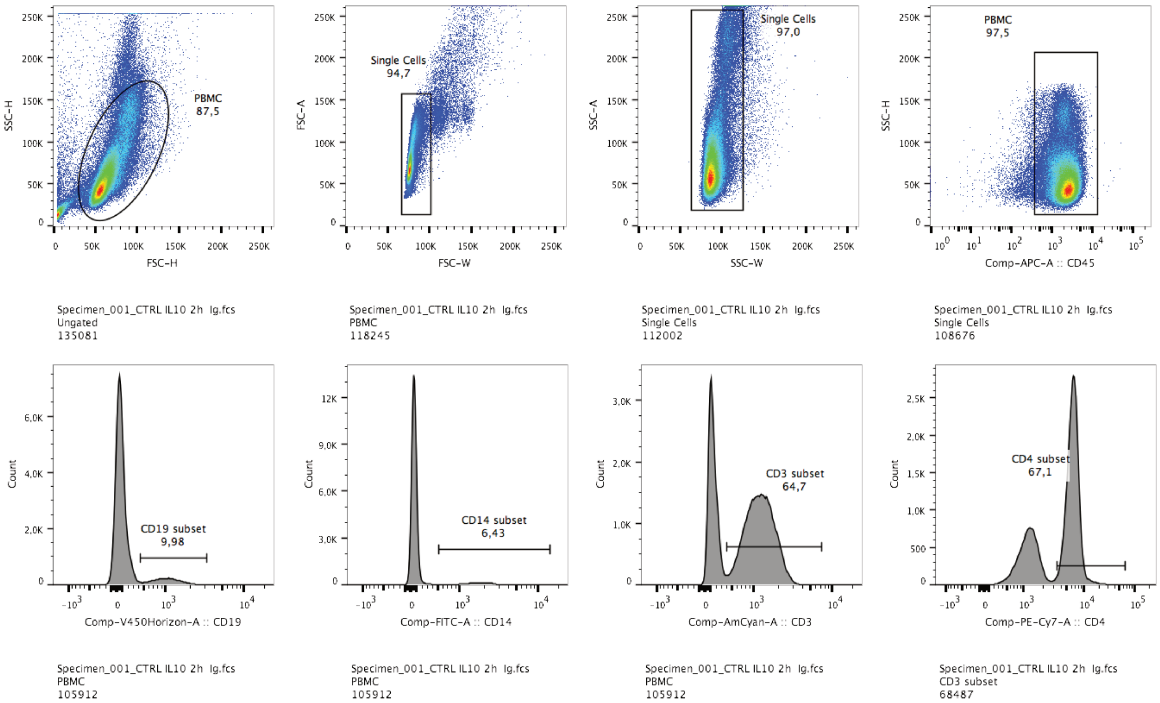
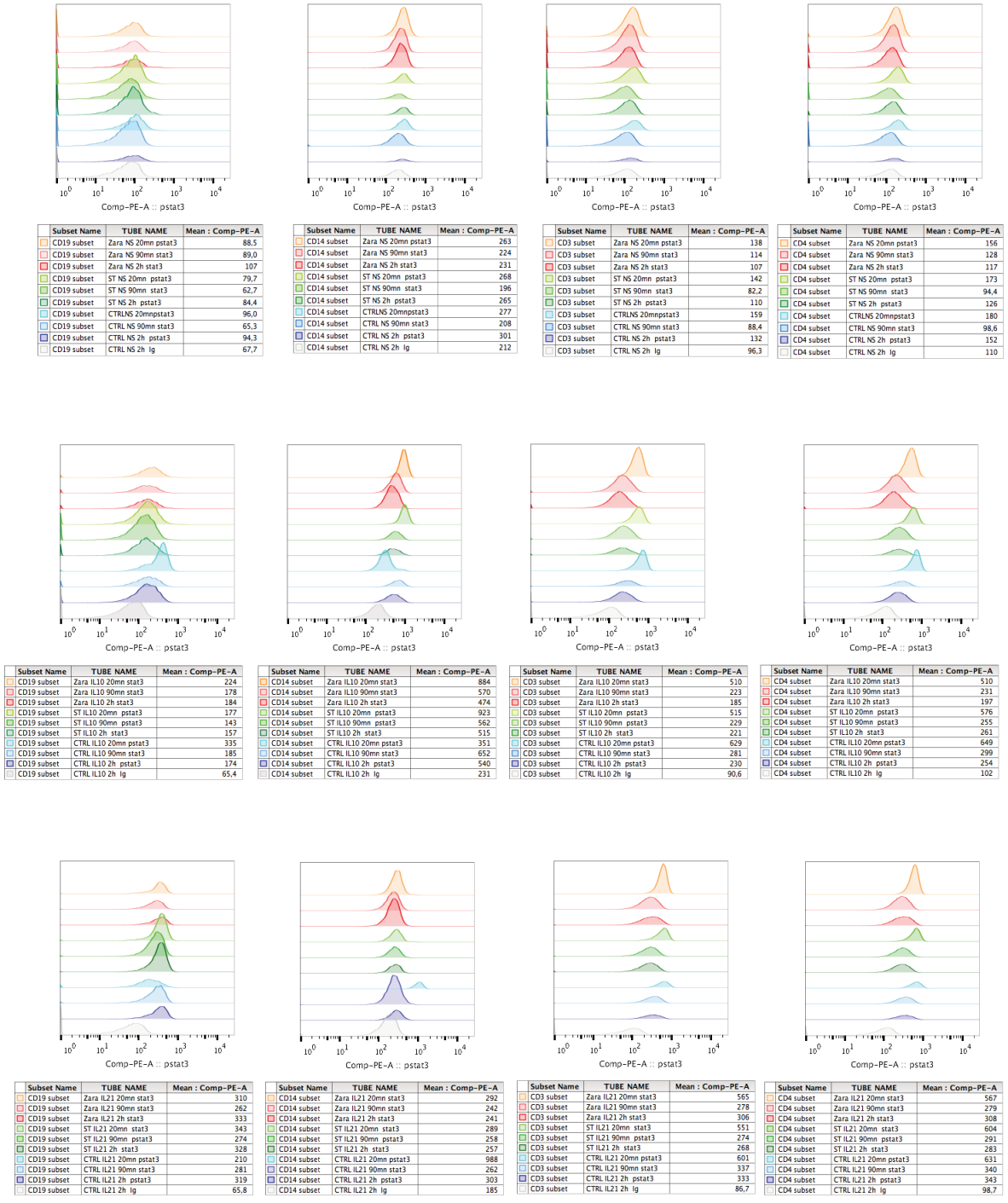


FIGURE 5.39 – **Stragégie de fenêtrage pour l'étude de la phosphorylation de STAT3** De gauche à droite en haut : sélection des cellules, élimination des doublets (2 cadrants), sélection des leucocytes ($CD45^+$). En bas, sur les cellules $CD45^+$, sélection des différentes sous-populations, lymphocytes B ($CD19^+$), des monocytes ($CD14^+$), des lymphocytes T ($CD3^+$) ou des lymphocytes T $CD4^+$. C'est sur ces 4 sous-populations cellulaires ainsi sélectionnées qu'a été mesurée la moyenne d'intensité de fluorescence représentée dans la figure suivante, page 234 et dans la figure 3.28, page 141.



Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD19 subset	Zara NS 20mn pstat3	88,5
CD19 subset	Zara NS 90mn stat3	89,0
CD19 subset	Zara NS 2h stat3	107
CD19 subset	ST NS 20mn pstat3	79,7
CD19 subset	ST NS 90mn stat3	62,7
CD19 subset	ST NS 2h pstat3	84,4
CD19 subset	CTRLNS 20mnpstat3	96,0
CD19 subset	CTRL NS 90mn stat3	65,3
CD19 subset	CTRL NS 2h pstat3	94,3
CD19 subset	CTRL NS 2h Ig	67,7

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD14 subset	Zara NS 20mn pstat3	263
CD14 subset	Zara NS 90mn stat3	224
CD14 subset	Zara NS 2h stat3	231
CD14 subset	ST NS 20mn pstat3	268
CD14 subset	ST NS 90mn stat3	196
CD14 subset	ST NS 2h pstat3	265
CD14 subset	CTRLNS 20mnpstat3	277
CD14 subset	CTRL NS 90mn stat3	208
CD14 subset	CTRL NS 2h pstat3	301
CD14 subset	CTRL NS 2h Ig	212

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD3 subset	Zara NS 20mn pstat3	138
CD3 subset	Zara NS 90mn stat3	114
CD3 subset	Zara NS 2h stat3	107
CD3 subset	ST NS 20mn pstat3	142
CD3 subset	ST NS 90mn stat3	82,2
CD3 subset	ST NS 2h pstat3	110
CD3 subset	CTRLNS 20mnpstat3	159
CD3 subset	CTRL NS 90mn stat3	88,4
CD3 subset	CTRL NS 2h pstat3	132
CD3 subset	CTRL NS 2h Ig	96,3

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD4 subset	Zara NS 20mn pstat3	156
CD4 subset	Zara NS 90mn stat3	128
CD4 subset	Zara NS 2h stat3	117
CD4 subset	ST NS 20mn pstat3	173
CD4 subset	ST NS 90mn stat3	94,4
CD4 subset	ST NS 2h pstat3	126
CD4 subset	CTRLNS 20mnpstat3	180
CD4 subset	CTRL NS 90mn stat3	98,6
CD4 subset	CTRL NS 2h pstat3	152
CD4 subset	CTRL NS 2h Ig	110

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD19 subset	Zara IL10 20mn stat3	224
CD19 subset	Zara IL10 90mn stat3	178
CD19 subset	Zara IL10 2h stat3	184
CD19 subset	ST IL10 20mn pstat3	177
CD19 subset	ST IL10 90mn pstat3	143
CD19 subset	ST IL10 2h stat3	157
CD19 subset	CTRL IL10 20mn pstat3	335
CD19 subset	CTRL IL10 90mn stat3	185
CD19 subset	CTRL IL10 2h pstat3	174
CD19 subset	CTRL IL10 2h Ig	65,4

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD14 subset	Zara IL10 20mn stat3	884
CD14 subset	Zara IL10 90mn stat3	570
CD14 subset	Zara IL10 2h stat3	474
CD14 subset	ST IL10 20mn pstat3	923
CD14 subset	ST IL10 90mn pstat3	562
CD14 subset	ST IL10 2h stat3	515
CD14 subset	CTRL IL10 20mn pstat3	351
CD14 subset	CTRL IL10 90mn stat3	652
CD14 subset	CTRL IL10 2h pstat3	540
CD14 subset	CTRL IL10 2h Ig	231

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD3 subset	Zara IL10 20mn stat3	510
CD3 subset	Zara IL10 90mn stat3	223
CD3 subset	Zara IL10 2h stat3	185
CD3 subset	ST IL10 20mn pstat3	515
CD3 subset	ST IL10 90mn pstat3	229
CD3 subset	ST IL10 2h stat3	221
CD3 subset	CTRL IL10 20mn pstat3	629
CD3 subset	CTRL IL10 90mn stat3	281
CD3 subset	CTRL IL10 2h pstat3	230
CD3 subset	CTRL IL10 2h Ig	90,6

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD4 subset	Zara IL10 20mn stat3	510
CD4 subset	Zara IL10 90mn stat3	231
CD4 subset	Zara IL10 2h stat3	197
CD4 subset	ST IL10 20mn pstat3	576
CD4 subset	ST IL10 90mn pstat3	255
CD4 subset	ST IL10 2h stat3	261
CD4 subset	CTRL IL10 20mn pstat3	649
CD4 subset	CTRL IL10 90mn stat3	299
CD4 subset	CTRL IL10 2h pstat3	254
CD4 subset	CTRL IL10 2h Ig	102

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD19 subset	Zara IL21 20mn stat3	310
CD19 subset	Zara IL21 90mn stat3	262
CD19 subset	Zara IL21 2h stat3	333
CD19 subset	ST IL21 20mn stat3	343
CD19 subset	ST IL21 90mn pstat3	274
CD19 subset	ST IL21 2h stat3	328
CD19 subset	CTRL IL21 20mn pstat3	210
CD19 subset	CTRL IL21 90mn stat3	281
CD19 subset	CTRL IL21 2h pstat3	319
CD19 subset	CTRL IL21 2h Ig	65,8

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD14 subset	Zara IL21 20mn stat3	292
CD14 subset	Zara IL21 90mn stat3	242
CD14 subset	Zara IL21 2h stat3	241
CD14 subset	ST IL21 20mn stat3	289
CD14 subset	ST IL21 90mn pstat3	258
CD14 subset	ST IL21 2h stat3	257
CD14 subset	CTRL IL21 20mn pstat3	988
CD14 subset	CTRL IL21 90mn stat3	262
CD14 subset	CTRL IL21 2h pstat3	303
CD14 subset	CTRL IL21 2h Ig	185

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD3 subset	Zara IL21 20mn stat3	565
CD3 subset	Zara IL21 90mn stat3	278
CD3 subset	Zara IL21 2h stat3	306
CD3 subset	ST IL21 20mn stat3	551
CD3 subset	ST IL21 90mn pstat3	274
CD3 subset	ST IL21 2h stat3	268
CD3 subset	CTRL IL21 20mn pstat3	601
CD3 subset	CTRL IL21 90mn stat3	337
CD3 subset	CTRL IL21 2h pstat3	333
CD3 subset	CTRL IL21 2h Ig	86,7

Subset Name	TUBE NAME	Mean : Comp-PE-A
CD4 subset	Zara IL21 20mn stat3	567
CD4 subset	Zara IL21 90mn stat3	279
CD4 subset	Zara IL21 2h stat3	308
CD4 subset	ST IL21 20mn stat3	604
CD4 subset	ST IL21 90mn pstat3	291
CD4 subset	ST IL21 2h stat3	283
CD4 subset	CTRL IL21 20mn pstat3	631
CD4 subset	CTRL IL21 90mn stat3	340
CD4 subset	CTRL IL21 2h pstat3	343
CD4 subset	CTRL IL21 2h Ig	98,7

FIGURE 5.40 – **Etude de la phosphorylation de STAT3.** Les PBMC ont été activés avec l'IL-10 ou l'IL-21 pendant 20, 90 ou 120 minutes puis marqués avec des anticorps anti-CD45, CD3, CD4, CD19, CD14 afin d'étudier les différentes sous-populations de leucocytes. La moitié des cellules est également marquée avec un anti-phospho-STAT3, l'autre moitié avec l'isotype correspondant. En rouge la patiente homozygote, en vert sa mère hétérozygote saine, en bleu un contrôle extra-familial, en gris un exemple d'isotype, tous étant superposables.

Bibliographie

[1] Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).

[2] Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590–597 (2005).

[3] Basten, A. & Silveira, P. A. B-cell tolerance : mechanisms and implications. *Current opinion in immunology* **22**, 566–574 (2010).

[4] Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology* **11**, 7–13 (2010).

[5] von Boehmer, H. & Melchers, F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology* **11**, 14–20 (2010).

[6] Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *The Journal of clinical investigation* **125**, 2203–2210 (2015).

[7] Carpenter, A. C. & Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology* **11**, 666–673 (2010).

[8] Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 1395–1401 (2002).

[9] Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. & Goodnow, C. C. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology* **4**, 350–354 (2003).

[10] Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C. & Mathis, D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* **140**, 123–135 (2010).

[11] Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nature genetics* **17**, 399–403 (1997).

[12] Nagamine, K. *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nature genetics* **17**, 393–398 (1997).

[13] Kisand, K. & Peterson, P. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. *Journal of clinical immunology* **35**, 463–478 (2015).

[14] Cheng, M. H. & Anderson, M. S. Monogenic autoimmunity. *Annual review of immunology* **30**, 393–427 (2012).

[15] Oftedal, B. E. *et al.* Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. *Immunity* **42**, 1185–1196 (2015).

[16] Li, P. *et al.* Updated Understanding of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS). *Clinical reviews in allergy & immunology* (2015).

[17] Magerus-Chatinet, A. *et al.* FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* **113**, 3027–3030 (2009).

[18] Caminha, I. *et al.* Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, 946–949.e6 (2010).

[19] Dowdell, K. C. *et al.* Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **115**, 5164–5169 (2010).

[20] Rieux-Laucat, F. *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)* **268**, 1347–1349 (1995).

[21] Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946 (1995).

[22] Bi, L. L. *et al.* Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC medical genetics* **8**, 41 (2007).

[23] Magerus-Chatinet, A. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *The Journal of allergy and clinical immunology* **131**, 486–490 (2013).

[24] Holzelova, E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *The New England journal of medicine* **351**, 1409–1418 (2004).

[25] Magerus-Chatinet, A. *et al.* Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *The Journal of clinical investigation* **121**, 106–112 (2011).

[26] Oliveira, J. B. *et al.* Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) : report from the 2009 NIH International Workshop. In *Blood*, e35–40 (Department of Laboratory Medicine, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA. oliveirajb@cc.nih.gov, 2010).

[27] Bidere, N., Snow, A. L., Sakai, K., Zheng, L. & Lenardo, M. J. Caspase-8 regulation by direct interaction with TRAF6 in T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *Current biology : CB* **16**, 1666–1671 (2006).

[28] Chun, H. J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395–399 (2002).

[29] Wang, J. *et al.* Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**, 47–58 (1999).

[30] Oliveira, J. B. *et al.* NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8953–8958 (2007).

[31] Lanzarotti, N. *et al.* RAS-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia. *Blood* **123**, 1960–1963 (2014).

[32] Belot, A. *et al.* Protein kinase C δ deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B-cell defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis and rheumatism* (2013).

[33] Kuehn, H. S. *et al.* Loss-of-function of the protein kinase C delta (PKCδ) causes a B cell lymphoproliferative syndrome in humans. *Blood* (2013).

[34] Salzer, E. *et al.* B cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C delta. *Blood* (2013).

[35] Angulo, I. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 866–871 (2013).

[36] Deau, M.-C. *et al.* A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *The Journal of clinical investigation* **124**, 3923–3928 (2014).

[37] Snow, A. L. *et al.* Congenital B cell lymphocytosis explained by novel germline CARD11 mutations. *The Journal of experimental medicine* **209**, 2247–2261 (2012).

[38] Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology* **10**, 490–500 (2010).

[39] Seddiki, N. *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1693–1700 (2006).

[40] Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1701–1711 (2006).

[41] Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **190**, 995–1004 (1999).

[42] Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).

[43] Andersson, J. *et al.* CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1975–1981 (2008).

[44] Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* **8**, 1353–1362 (2007).

[45] Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting edge : contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 1783–1786 (2005).

[46] Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1303–1310 (2007).

[47] Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* **3**, 1097–1101 (2002).

[48] Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 271–275 (2008).

[49] Kinnunen, T. *et al.* Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood* **121**, 1595–1603 (2013).

[50] Caridade, M., Graca, L. & Ribeiro, R. M. Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult : From Experiments to Models. *Frontiers in immunology* **4**, 378 (2013).

[51] Yadav, M., Stephan, S. & Bluestone, J. A. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Frontiers in immunology* **4**, 232 (2013).

[52] Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 3433–3441 (2010).

[53] Gregori, S., Goudy, K. S. & Roncarolo, M. G. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Frontiers in immunology* **3**, 30 (2012).

[54] Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* **19**, 739–746 (2013).

[55] Miyara, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).

[56] Miyara, M. *et al.* Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7225–7230 (2015).

[57] Dinesh, R. K., Skaggs, B. J., La Cava, A., Hahn, B. H. & Singh, R. P. CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmunity reviews* **9**, 560–568 (2010).

[58] Venuprasad, K. Cbl-b and itch : key regulators of peripheral T-cell tolerance. *Cancer research* **70**, 3009–3012 (2010).

[59] Venuprasad, K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nature immunology* **9**, 245–253 (2008).

[60] Lohr, N. J. *et al.* Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *American journal of human genetics* **86**, 447–453 (2010).

[61] Perry, W. L. *et al.* The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nature genetics* **18**, 143–146 (1998).

[62] Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330–336 (2003).

[63] Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology* **4**, 337–342 (2003).

[64] Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* **299**, 1057–1061 (2003).

[65] Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* **27**, 20–21 (2001).

[66] Chatila, T. A. *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation* **106**, R75–81 (2000).

[67] Barzaghi, F., Passerini, L. & Bacchetta, R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome : a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Frontiers in immunology* **3**, 211 (2012).

[68] Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**, 936–940 (2007).

[69] Fu, W. *et al.* A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nature immunology* **13**, 972–980 (2012).

[70] Rudra, D. *et al.* Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nature immunology* **13**, 1010–1019 (2012).

[71] Bandukwala, H. S. *et al.* Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* **34**, 479–491 (2011).

[72] Bacchetta, R. *et al.* Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1713–1722 (2006).

[73] O'Shea, J. J., Ma, A. & Lipsky, P. Cytokines and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 37–45 (2002).

[74] Sharfe, N., Dadi, H. K., Shahar, M. & Roifman, C. M. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3168–3171 (1997).

[75] Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P. & Verbsky, J. W. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology* **119**, 482–487 (2007).

[76] Goudy, K. *et al.* Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **146**, 248–261 (2013).

[77] Mead, K. I. *et al.* Exocytosis of CTLA-4 is dependent on phospholipase D and ADP ribosylation factor-1 and stimulated during activation of regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 4803–4811 (2005).

[78] Linsley, P. S. *et al.* Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *The Journal of biological chemistry* **270**, 15417–15424 (1995).

[79] Qureshi, O. S. *et al.* Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 9429–9440 (2012).

[80] Teft, W. A., Kirchhof, M. G. & Madrenas, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual review of immunology* **24**, 65–97 (2006).

[81] Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86 : a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* **332**, 600–603 (2011).

[82] Schneider, H. *et al.* Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1972–1975 (2006).

[83] Knieke, K., Lingel, H., Chamaon, K. & Brunner-Weinzierl, M. C. Migration of Th1 lymphocytes is regulated by CD152 (CTLA-4)-mediated signaling via PI3 kinase-dependent Akt activation. *PloS one* **7**, e31391 (2012).

[84] Krummey, S. M. & Ford, M. L. Braking bad : novel mechanisms of CTLA-4 inhibition of T cell responses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **14**, 2685–2690 (2014).

[85] Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. & Ivars, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* **118**, 240–249 (2006).

[86] Nisticò, L. *et al.* The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Human molecular genetics* **5**, 1075–1080 (1996).

[87] Qu, H.-Q. *et al.* Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity* **10 Suppl 1**, S27–32 (2009).

[88] Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506–511 (2003).

[89] Plagnol, V. *et al.* Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS genetics* **7**, e1002216 (2011).

[90] Gregersen, P. K. *et al.* REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nature genetics* **41**, 820–823 (2009).

[91] Stahl, E. A. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics* **42**, 508–514 (2010).

[92] Olde Nordkamp, M. J. M., Koeleman, B. P. & Meyaard, L. Do inhibitory immune receptors play a role in the etiology of autoimmune disease ? *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **150**, 31–42 (2014).

[93] Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 985–988 (1995).

[94] Kuehn, H. S. *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science (New York, N.Y.)* **345**, 1623–1627 (2014).

[95] Schubert, D. *et al.* Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature medicine* (2014).

[96] Zeissig, S. *et al.* Early-onset Crohn's disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4. *Gut* (2014).

[97] Herrero-Beaumont, G., Martínez Calatrava, M. J. & Castañeda, S. Abatacept mechanism of action : concordance with its clinical profile. *Reumatología clinica* **8**, 78–83 (2012).

[98] Lo, B. *et al.* AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science (New York, N.Y.)* **349**, 436–440 (2015).

[99] Kerr, W. G., Heller, M. & Herzenberg, L. A. Analysis of lipopolysaccharide-response genes in B-lineage cells demonstrates that they can have differentiation stage-restricted expression and contain SH2 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3947–3952 (1996).

[100] Lopez-Herrera, G. *et al.* Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *American journal of human genetics* **90**, 986–1001 (2012).

[101] Alangari, A. *et al.* LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* **130**, 481–8.e2 (2012).

[102] Burns, S. O. *et al.* LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *The Journal of allergy and clinical immunology* **130**, 1428–1432 (2012).

[103] Charbonnier, L.-M. *et al.* Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-Linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *The Journal of allergy and clinical immunology* (2014).

[104] Serwas, N. K. *et al.* Atypical Manifestation of LRBA Deficiency with Predominant IBD-like Phenotype. *Inflammatory bowel diseases* (2014).

[105] Revel-Vilk, S. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease in patients with LRBA mutation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **159**, 84–92 (2015).

[106] Gamez-Diaz, L. *et al.* The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* **137**, 223–230 (2016).

[107] Seidel, M. G. *et al.* Long-term remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* (2014).

[108] Tsang, W. H., Shek, K. F., Lee, T. Y. & Chow, K. L. An evolutionarily conserved nested gene pair - Mab21 and Lrba/Nbea in metazoan. *Genomics* **94**, 177–187 (2009).

[109] Jogl, G. *et al.* Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *The EMBO journal* **21**, 4785–4795 (2002).

[110] Gebauer, D. *et al.* Crystal structure of the PH-BEACH domains of human LRBA/BGL. *Biochemistry* **43**, 14873–14880 (2004).

[111] Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. & Neer, E. J. The WD repeat : a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* **24**, 181–185 (1999).

[112] Burgess, A., Mornon, J.-P., de Saint-Basile, G. & Callebaut, I. A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1219–1222 (2009).

[113] Cullinane, A. R., Schaffer, A. A. & Huizing, M. The BEACH is hot : a LYST of emerging roles for BEACH-domain containing proteins in human disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **14**, 749–766 (2013).

[114] Dephoure, N. *et al.* A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10762–10767 (2008).

[115] Olsen, J. V. *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* **3**, ra3 (2010).

[116] Rigbolt, K. T. G. *et al.* System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science signaling* **4**, rs3 (2011).

[117] Bian, Y. *et al.* An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *Journal of proteomics* **96**, 253–262 (2014).

[118] Sepulveda, F. E. *et al.* LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **16**, 191–203 (2015).

[119] Dyomin, V. G. *et al.* BCL8 is a novel, evolutionarily conserved human gene family encoding proteins with presumptive protein kinase A anchoring function. *Genomics* **80**, 158–165 (2002).

[120] Castermans, D. *et al.* The neurobeachin gene is disrupted by a translocation in a patient with idiopathic autism. *Journal of medical genetics* **40**, 352–356 (2003).

[121] Castermans, D. *et al.* SCAMP5, NBEA and AMISYN : three candidate genes for autism involved in secretion of large dense-core vesicles. *Human molecular genetics* **19**, 1368–1378 (2010).

[122] O'Neal, J. *et al.* Neurobeachin (NBEA) is a target of recurrent interstitial deletions at 13q13 in patients with MGUS and multiple myeloma. *Experimental hematology* **37**, 234–244 (2009).

[123] Wang, X. *et al.* Neurobeachin : A protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 8551–8565 (2000).

[124] Olszewski, P. K. *et al.* Neurobeachin, a regulator of synaptic protein targeting, is associated with body fat mass and feeding behavior in mice and body-mass index in humans. *PLoS genetics* **8**, e1002568 (2012).

[125] Wang, J.-W. *et al.* Deregulated expression of LRBA facilitates cancer cell growth. *Oncogene* **23**, 4089–4097 (2004).

[126] Gunay-Aygun, M. *et al.* NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α-granules. *Nature genetics* **43**, 732–734 (2011).

[127] Albers, C. A. *et al.* Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nature genetics* **43**, 735–737 (2011).

[128] Kahr, W. H. A. *et al.* Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nature genetics* **43**, 738–740 (2011).

[129] Han, J.-W. *et al.* Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* **41**, 1234–1237 (2009).

[130] Yang, W. *et al.* Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics* **6**, e1000841 (2010).

[131] Zhao, H. *et al.* An intronic variant associated with systemic lupus erythematosus changes the binding affinity of Yinyang1 to downregulate WDFY4. *Genes and immunity* **13**, 536–542 (2012).

[132] Gulsuner, S. *et al.* Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred. *Genome research* **21**, 1995–2003 (2011).

[133] Montfort, A. *et al.* FAN stimulates TNF(alpha)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 5369–5378 (2009).

[134] Ségui, B. *et al.* Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *The Journal of clinical investigation* **108**, 143–151 (2001).

[135] Finley, K. D. *et al.* blue cheese mutations define a novel, conserved gene involved in progressive neural degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1254–1264 (2003).

[136] Simonsen, A. *et al.* Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *Journal of cell science* **117**, 4239–4251 (2004).

[137] Filimonenko, M. *et al.* The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Molecular cell* **38**, 265–279 (2010).

[138] Andres, S. A., Brock, G. N. & Wittliff, J. L. Interrogating differences in expression of targeted gene sets to predict breast cancer outcome. *BMC cancer* **13**, 326 (2013).

[139] Andres, S. A., Smolenkova, I. A. & Wittliff, J. L. Gender-associated expression of tumor markers and a small gene set in breast carcinoma. *Breast (Edinburgh, Scotland)* **23**, 226–233 (2014).

[140] Wang, J. W., Howson, J., Haller, E. & Kerr, W. G. Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 4586–4595 (2001).

[141] de Souza, N., Vallier, L. G., Fares, H. & Greenwald, I. SEL-2, the C. elegans neurobeachin/LRBA homolog, is a negative regulator of lin-12/Notch activity and affects endosomal traffic in polarized epithelial cells. *Development (Cambridge, England)* **134**, 691–702 (2007).

[142] Tozlu, S. *et al.* Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocrine-related cancer* **13**, 1109–1120 (2006).

[143] Vogel, T. P., Milner, J. D. & Cooper, M. A. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *Journal of clinical immunology* **35**, 615–623 (2015).

[144] Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J. R. & O'Shea, J. J. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 21–27 (2015).

[145] Minegishi, Y. *et al.* Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* **448**, 1058–1062 (2007).

[146] Holland, S. M. *et al.* STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *The New England journal of medicine* **357**, 1608–1619 (2007).

[147] Jerez, A. *et al.* STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* **120**, 3048–3057 (2012).

[148] Koskela, H. L. M. *et al.* Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **366**, 1905–1913 (2012).

[149] Flanagan, S. E. *et al.* Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nature genetics* **46**, 812–814 (2014).

[150] Haapaniemi, E. M. *et al.* Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood* **125**, 639–648 (2015).

[151] Milner, J. D. *et al.* Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* **125**, 591–599 (2015).

[152] van de Veerdonk, F. L. *et al.* STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *The New England journal of medicine* **365**, 54–61 (2011).

[153] Liu, L. *et al.* Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1635–1648 (2011).

[154] Uzel, G. *et al.* Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked-like syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* **131**, 1611–1623 (2013).

[155] Nadeau, K., Hwa, V. & Rosenfeld, R. G. STAT5b deficiency : an unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *The Journal of pediatrics* **158**, 701–708 (2011).

[156] Hwa, V., Nadeau, K., Wit, J. M. & Rosenfeld, R. G. STAT5b deficiency : lessons from STAT5b gene mutations. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **25**, 61–75 (2011).

[157] Kofoed, E. M. *et al.* Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *The New England journal of medicine* **349**, 1139–1147 (2003).

[158] Snow, J. W. *et al.* Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 5042–5050 (2003).

[159] He, J. *et al.* STAT3 mutations correlated with hyper-IgE syndrome lead to blockage of IL-6/STAT3 signalling pathway. *Journal of biosciences* **37**, 243–257 (2012).

[160] EVANS, R. S., TAKAHASHI, K., DUANE, R. T., PAYNE, R. & LIU, C. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia ; evidence for a common etiology. *A.M.A. archives of internal medicine* **87**, 48–65 (1951).

[161] Troussard, X. *et al.* Full blood count normal reference values for adults in France. *Journal of clinical pathology* **67**, 341–344 (2014).

[162] Zierk, J. *et al.* Age- and sex-specific dynamics in 22 hematologic and biochemical analytes from birth to adolescence. *Clinical chemistry* **61**, 964–973 (2015).

[163] Michel, M. [Characteristics of warm autoimmune hemolytic anemia and Evans syndrome in adults]. *Presse médicale (Paris, France : 1983)* **37**, 1309–1318 (2008).

[164] Sokol, R. J., Booker, D. J. & Stamps, R. The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *Journal of clinical pathology* **45**, 1047–1052 (1992).

[165] Gehrs, B. C. & Friedberg, R. C. Autoimmune hemolytic anemia. *American journal of hematology* **69**, 258–271 (2002).

[166] Stasi, R., Amadori, S., Osborn, J., Newland, A. C. & Provan, D. Long-term outcome of otherwise healthy individuals with incidentally discovered borderline thrombocytopenia. *PLoS medicine* **3**, e24 (2006).

[167] Rodeghiero, F. *et al.* Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children : report from an international working group. In *Blood*, 2386–2393 (Department of Hematology, San Bortolo Hospital, Vicenza, Italy. rodeghiero@hemato.ven.it, 2009).

[168] Aster, R. H. & Bougie, D. W. Drug-induced immune thrombocytopenia. *The New England journal of medicine* **357**, 580–587 (2007).

[169] Lo, E. & Deane, S. Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia. *Autoimmunity reviews* **13**, 577–583 (2014).

[170] Terrell, D. R. *et al.* The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults : A critical review of published reports. *American journal of hematology* **85**, 174–180 (2010).

[171] Bux, J. Human neutrophil alloantigens. *Vox sanguinis* **94**, 277–285 (2008).

[172] Autrel-Moignet, A. & Lamy, T. Autoimmune neutropenia. *Presse médicale (Paris, France : 1983)* **43**, e105–18 (2014).

[173] Hsieh, M. M., Everhart, J. E., Byrd-Holt, D. D., Tisdale, J. F. & Rodgers, G. P. Prevalence of neutropenia in the U.S. population : age, sex, smoking status, and ethnic differences. *Annals of internal medicine* **146**, 486–492 (2007).

[174] Dupuis-Girod, S. *et al.* Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome : risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* **111**, e622–7 (2003).

[175] Humblet-Baron, S. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *The Journal of clinical investigation* **117**, 407–418 (2007).

[176] Tokgoz, H. *et al.* Variable presentation of primary immune deficiency : two cases with CD3 gamma deficiency presenting with only autoimmunity. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **24**, 257–262 (2013).

[177] Stepensky, P. *et al.* Early-onset Evans syndrome, immunodeficiency and premature immunosenescence associated with tripeptidyl-peptidase II deficiency. *Blood* (2014).

[178] Pui, C. H., Wilimas, J. & Wang, W. Evans syndrome in childhood. *The Journal of pediatrics* **97**, 754–758 (1980).

[179] SILVERSTEIN, M. N. & HECK, F. J. Acquired hemolytic anemia and associated thrombocytopenic purpura : with special reference to Evans' syndrome. *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic* **37**, 122–128 (1962).

[180] Michel, M. *et al.* The spectrum of Evans syndrome in adults : new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. *Blood* **114**, 3167–3172 (2009).

[181] Michel, M. *et al.* Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency : analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine* **83**, 254–263 (2004).

[182] Teachey, D. T. *et al.* Unmasking Evans syndrome : T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* **105**, 2443–2448 (2005).

[183] Pegels, J. G. *et al.* The Evans syndrome : characterization of the responsible autoantibodies. *British journal of haematology* **51**, 445–450 (1982).

[184] Savaşan, S., Warrier, I. & Ravindranath, Y. The spectrum of Evans' syndrome. *Archives of disease in childhood* **77**, 245–248 (1997).

[185] Blouin, P. *et al.* [Evans' syndrome : a retrospective study from the ship (French Society of Pediatric Hematology and Immunology) (36 cases)]. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Sociéte française de pédiatrie* **12**, 1600–1607 (2005).

[186] Al Ghaithi, I. *et al.* Combined Autoimmune Cytopenias Presenting in Childhood. *Pediatric blood & cancer* **63**, 292–298 (2016).

[187] Aladjidi, N. *et al.* Evans Syndrome in Children : Long-Term Outcome in a Prospective French National Observational Cohort. *Frontiers in pediatrics* **3**, 79 (2015).

[188] Wang, W. C. Evans syndrome in childhood : pathophysiology, clinical course, and treatment. *The American journal of pediatric hematology/oncology* **10**, 330–338 (1988).

[189] Ng, S. C. Evans syndrome : a report on 12 patients. *Clinical and laboratory haematology* **14**, 189–193 (1992).

[190] Mathew, P., Chen, G. & Wang, W. Evans syndrome : results of a national survey. *Journal of pediatric hematology/oncology* **19**, 433–437 (1997).

[191] Wang, W., Herrod, H., Pui, C. H., Presbury, G. & Wilimas, J. Immunoregulatory abnormalities in Evans syndrome. *American journal of hematology* **15**, 381–390 (1983).

[192] Karakantza, M., Mouzaki, A., Theodoropoulou, M., Bussel, J. B. & Maniatis, A. Th1 and Th2 cytokines in a patient with Evans' syndrome and profound lymphopenia. *British journal of haematology* **110**, 968–970 (2000).

[193] Norton, A. & Roberts, I. Management of Evans syndrome. *British journal of haematology* **132**, 125–137 (2006).

[194] Alcaïs, A. *et al.* Life-threatening infectious diseases of childhood : single-gene inborn errors of immunity ? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1214**, 18–33 (2010).

[195] Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome : a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods* **10**, 730–736 (2013).

[196] Vito, P., Lacanà, E. & D'Adamio, L. Interfering with apoptosis : Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 521–525 (1996).

[197] Suzuki, K. *et al.* Programmed cell death 6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer science* **103**, 1788–1794 (2012).

[198] Helm, J. R. *et al.* Apoptosis-linked gene-2 (ALG-2)/Sec31 interactions regulate endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport : a potential effector pathway for luminal calcium. *The Journal of biological chemistry* **289**, 23609–23628 (2014).

[199] Shimazu, R. *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1777–1782 (1999).

[200] Courtois, G. *et al.* A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1108–1115 (2003).

[201] McDonald, D. R. *et al.* Heterozygous N-terminal deletion of IkappaBalpha results in functional nuclear factor kappaB haploinsufficiency, ectodermal dysplasia, and immune deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* **120**, 900–907 (2007).

[202] Lopez-Granados, E. *et al.* A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Human mutation* **29**, 861–868 (2008).

[203] Shumway, S. D., Maki, M. & Miyamoto, S. The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30874–30881 (1999).

[204] Thiesen, S., Kübart, S., Ropers, H. H. & Nothwang, H. G. Isolation of two novel human RhoGEFs, ARHGEF3 and ARHGEF4, in 3p13-21 and 2q22. *Biochemical and biophysical research communications* **273**, 364–369 (2000).

[205] Hanafusa, H. *et al.* Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nature communications* **2**, 158 (2011).

[206] Toyofuku, T., Morimoto, K., Sasawatari, S. & Kumanogoh, A. Leucine-Rich Repeat Kinase 1 Regulates Autophagy through Turning On TBC1D2-Dependent Rab7 Inactivation. *Molecular and cellular biology* **35**, 3044–3058 (2015).

[207] Feng, Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001057 (2010).

[208] Dubois, T. *et al.* Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nature cell biology* **7**, 353–364 (2005).

[209] Koeppel, M. A., McCarthy, C. C., Moertl, E. & Jakobi, R. Identification and characterization of PS-GAP as a novel regulator of caspase-activated PAK-2. *The Journal of biological chemistry* **279**, 53653–53664 (2004).

[210] Ohtani, K. *et al.* The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 44222–44228 (2001).

[211] Weng, L. *et al.* A novel alternative spliced chondrolectin isoform lacking the transmembrane domain is expressed during T cell maturation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 19164–19170 (2003).

[212] Claessens, A. *et al.* Expression and localization of CHODLDeltaE/CHODLfDeltaE, the soluble isoform of chondrolectin. *Cell biology international* **31**, 1323–1330 (2007).

[213] Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European journal of human genetics : EJHG* **20**, 490–497 (2012).

[214] O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A. & Baltimore, D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **10**, 111–122 (2010).

[215] Van Hoeyveld, E., Zhang, P.-X., De Boeck, K., Fuleihan, R. & Bossuyt, X. Hyper-immunoglobulin M syndrome caused by a mutation in the promotor for CD40L. *Immunology* **120**, 497–501 (2007).

[216] Belkadi, A. *et al.* Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 5473–5478 (2015).

[217] Lelieveld, S. H., Spielmann, M., Mundlos, S., Veltman, J. A. & Gilissen, C. Comparison of Exome and Genome Sequencing Technologies for the Complete Capture of Protein-Coding Regions. *Human mutation* **36**, 815–822 (2015).

[218] Kolli, S., Zito, C. I., Mossink, M. H., Wiemer, E. A. C. & Bennett, A. M. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry* **279**, 29374–29385 (2004).

[219] Schneider, H. & Rudd, C. E. Tyrosine phosphatase SHP-2 binding to CTLA-4 : absence of direct YVKM/YFIP motif recognition. *Biochemical and biophysical research communications* **269**, 279–283 (2000).

[220] Smahi, A. *et al.* Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* **405**, 466–472 (2000).

[221] Chen, K. *et al.* Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF-κB Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *American journal of human genetics* **93**, 812–824 (2013).

[222] Brue, T. *et al.* Mutations in NFKB2 and potential genetic heterogeneity in patients with DAVID syndrome, having variable endocrine and immune deficiencies. *BMC medical genetics* **15**, 139 (2014).

[223] Pannicke, U. *et al.* Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *The New England journal of medicine* **369**, 2504–2514 (2013).

[224] Xiao, X., Miao, Q., Chang, C., Gershwin, M. E. & Ma, X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity–an inconvenient truth. *Autoimmunity reviews* **13**, 858–864 (2014).

[225] Grimbacher, B. *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology* **4**, 261–268 (2003).

[226] Losi, C. G. *et al.* Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology* **25**, 496–502 (2005).

[227] Salzer, U. *et al.* Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature genetics* **37**, 820–828 (2005).

[228] Castigli, E. *et al.* TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature genetics* **37**, 829–834 (2005).

[229] van Zelm, M. C. *et al.* An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England journal of medicine* **354**, 1901–1912 (2006).

[230] Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T. R. & Elson, C. O. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19256–19261 (2009).