



**HAL**  
open science

# Les immunodéficiences primaires comme modèles pour décrypter le contrôle moléculaire du remodelage de l'actine dans les cellules immunitaires

Laurene Pfajfer

► **To cite this version:**

Laurene Pfajfer. Les immunodéficiences primaires comme modèles pour décrypter le contrôle moléculaire du remodelage de l'actine dans les cellules immunitaires. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30304 . tel-03832289

**HAL Id: tel-03832289**

**<https://theses.hal.science/tel-03832289v1>**

Submitted on 27 Oct 2022

**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.



# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

---

**Présentée et soutenue par  
Laurene PFAJFER**

Le 17 novembre 2020

**Primary immunodeficiencies as models to decipher the molecular  
control of actin remodelling in immune cells**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :

**CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan**

Thèse dirigée par

**Loïc Dupré et Kaan Boztug**

Jury

**M. Fernando SEPULVEDA, Rapporteur**

**Mme Maria Carla PARRINI, Rapporteur**

**M. Denis HUDRISIER, Examineur**

**Mme Ana-Maria LENON-DUMENIL, Examinatrice**

**Mme Severine BOULLIER, Examinatrice**

**Mme Nabila JABRANE-FERRAT, Examinatrice**

**M. Loïc DUPRE, Directeur de thèse**

**M. Kaan BOZTUG, Co-directeur de thèse**

# ABSTRACT

Together with microtubules and intermediate filaments, the actin cytoskeleton is an essential structural component of cells. It relies on the assembly of very dynamic filaments that depend on polymerization, branching, capping and depolymerization events. Another key property of the actin cytoskeleton is its organization into complex and diversified meshworks that sustain multiple cellular functions. The actin cytoskeleton is particularly crucial in differentiated immune cells since it sustains their highly migratory behaviors as well as, most if not all, their specialized functions. This includes detection and clearance of pathogens by phagocytes, presentation, and recognition of antigens by antigen-presenting cells and lymphocytes, elimination of infected cells and tumor cells by cytotoxic lymphocytes, etc.

The crucial role of the actin cytoskeleton in the functioning of the immune system is best pointed out by the severity of primary immunodeficiencies (PID) caused by mutations in genes encoding actin cytoskeleton regulators. The actin cytoskeleton machinery is composed of numerous proteins controlling each of the remodeling processes. Approximately 20 deficiencies in these proteins have recently been discovered and studied, allowing to better understand the roles of individual actin regulators in controlling immune cell functions. However, many questions remain to be addressed. Do deficiencies in proteins controlling the same actin remodeling process lead to similar cellular defects and pathology? Do distinct actin regulatory pathways control different immune cell functions? Why are some actin related PID associated with inflammatory disorders? The objective of my PhD has been to address these fundamental and clinically relevant questions through the study of immune cells isolated from various actin related PID.

I initially investigated the role of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) via the study of a very rare case of WIP-deficiency. The studied patient presented a Wiskott-Aldrich syndrome-like pathology. Nevertheless, via the use of quantitative microscopy approaches, we reported that WIP-deficient T lymphocytes had more severe defects than WASP-deficient cells. Indeed, they failed to form a complete immunological synapse and displayed a severe migration defect towards chemokines, due to an abnormal polarization and actin remodeling. I then contributed to a collaborative study on ARPC1B-deficiency. ARPC1B is part of the ARP2/3 complex, which promotes actin filament branching downstream of WASP. T lymphocytes from 3 ARPC1B-deficient patients showed aberrant immunological synapse, distinct from what we had observed in the WASP and WIP deficiencies. This indicates that although WIP, WASP and ARPC1B contribute to same actin regulation process, their deficiencies in human T cells lead to non-overlapping functional perturbations.

After studying the role of actin polymerization promoting factors, I focused on WDR1, an actin filament severing protein. I had the opportunity to study 6 patients carrying mutation in the *WDR1* gene. In the lymphoid cell compartment, WDR1 deficiency led to increased actin level with a major impact on B cell differentiation but a limited impact on T cell signaling. In the myeloid compartment, neutrophil displayed a migration defect, while monocytes had an increased spreading capacity. The fact that defects of variable intensity and nature are observed in different immune cell subsets in the context of WDR1 deficiency therefore suggests that actin regulators may sustain distinct functions across immune cells.

The importance of WDR1 in the production of IL18, a cytokine produced via the activation of the inflammasome, gave me a hint about the possible impact of actin cytoskeleton on inflammasome activation. For that reason, the final part of my PhD thesis has been focused on deciphering the role of the actin in the context of inflammasome activation. My preliminary data based on the use of actin drugs and knock-out clones in the myeloid cell line THP-1 indicate that actin cytoskeleton integrity acts as a negative control of NLRP3 inflammasome activation. Further work is in progress to decipher the precise relationship between the actin cytoskeleton and the inflammasome.

In conclusion, my PhD work provides a molecular and cellular understanding of poorly characterized PID related to actin remodeling defects. It highlights the non-redundant function of actin regulators and their support of various processes (polarized migration, assembly of the immunological synapse, inflammasome activation) in the different cell subsets composing the immune system. Our findings and approaches may prove useful for the diagnosis of future PID patients and for the development of targeted treatment options.





# RESUME

Avec les microtubules et les filaments intermédiaires, le cytosquelette d'actine est un composant structurel essentiel des cellules. Il repose sur l'assemblage de filaments très dynamiques qui dépendent d'événements de polymérisation, de ramification, de coiffage et de dépolymérisation. Une autre propriété clé du cytosquelette d'actine est son organisation en maillages complexes et diversifiés qui soutiennent de multiples fonctions cellulaires. Le cytosquelette d'actine est particulièrement crucial dans les cellules immunitaires car il soutient leur comportement migratoire ainsi que la plupart, sinon la totalité, de leurs fonctions spécialisées. Cela comprend la détection et l'élimination des agents pathogènes par les phagocytes, la présentation et la reconnaissance des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes, l'élimination des cellules infectées et des cellules tumorales par les lymphocytes cytotoxiques, etc.

Une preuve du rôle crucial du cytosquelette d'actine dans le fonctionnement du système immunitaire est apportée par la gravité des déficits immunitaires primaires (PID) provoqués par des mutations dans les gènes codant pour les régulateurs du cytosquelette d'actine. La machinerie du cytosquelette d'actine est composée de nombreuses protéines contrôlantes chacun des processus de remodelage. Une vingtaine de carences en ces protéines ont été récemment découvertes et étudiées, permettant de mieux comprendre les rôles des régulateurs individuels de l'actine dans le contrôle des fonctions des cellules immunitaires. Cependant, de nombreuses questions restent à résoudre. Les carences en protéines contrôlant le même processus de remodelage de l'actine conduisent-elles à des défauts cellulaires et à une pathologie similaire ? Des voies de régulation de l'actine distinctes contrôlent-elles différentes fonctions des cellules immunitaires ? Pourquoi certains PID liés à l'actine sont-ils associés à des troubles inflammatoires ? L'objectif de ma thèse a été de répondre à ces questions fondamentales et cliniquement pertinentes à travers l'étude de cellules immunitaires isolées à partir de divers PID liés à l'actine.

J'ai d'abord étudié le rôle de la protéine WIP (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein) via l'étude d'un cas très rare de déficit en WIP. Le patient étudié présentait une pathologie de type syndrome de Wiskott-Aldrich. Néanmoins, via l'utilisation d'approches de microscopie quantitative, nous avons observé que les lymphocytes T déficitaires en WIP avaient des défauts plus sévères que les cellules déficitaires en WASP. En effet, ils n'ont pas réussi à former une synapse immunologique complète et ont présenté un défaut de migration vers les chimiokines, en raison d'une polarisation et d'un remodelage de l'actine anormaux. J'ai ensuite contribué à une étude collaborative sur le déficit en ARPC1B. ARPC1B fait partie du complexe ARP2/3, qui favorise la ramification des filaments d'actine en aval de WASP. Les lymphocytes T de 3 patients déficitaires en ARPC1B ont montré une synapse immunologique aberrante, distincte de ce que nous avons observé dans les déficiences WASP et WIP. Cela indique que bien que WIP, WASP et ARPC1B contribuent au même processus de régulation de l'actine, leurs déficiences dans les cellules T humaines conduisent à des perturbations fonctionnelles non identiques.

Après avoir étudié le rôle des facteurs favorisant la polymérisation de l'actine, je me suis concentré sur WDR1, une protéine de césure des filaments d'actine. J'ai eu l'occasion d'étudier 6 patients porteurs d'une mutation du gène WDR1. Dans le compartiment des cellules lymphoïdes, la carence en WDR1 a conduit à un niveau d'actine dérégulé avec un impact majeur sur la différenciation des cellules B mais un impact limité sur la signalisation des cellules T. Dans le compartiment myéloïde, les neutrophiles présentaient un défaut de migration, tandis que les monocytes avaient une capacité d'étalement accrue. Le fait que des défauts d'intensité et de nature variables soient observés dans différents sous-types de cellules immunitaires dans le contexte d'un déficit en WDR1 suggère que les régulateurs de l'actine soutiennent des fonctions distinctes en fonction des cellules immunitaires.

Le lien décrit entre carence en WDR1 et production accrue d'IL18, une cytokine produite via l'activation de l'inflammasome, m'a conduit à m'intéresser à l'impact possible du cytosquelette d'actine sur l'activation de l'inflammasome. Pour cette raison, la dernière partie de ma thèse de doctorat s'est concentrée sur le déchiffrement du rôle de l'actine dans le contexte de l'activation de l'inflammasome. Mes données préliminaires, basées sur l'utilisation d'inhibiteurs ciblant l'actine et de clones knock-out dans la lignée cellulaire myéloïde THP-1, indiquent que l'intégrité du cytosquelette d'actine agit comme un contrôle négatif de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des études complémentaires sont en cours pour déchiffrer la relation précise entre le cytosquelette d'actine et l'inflammasome.

En conclusion, mes travaux de doctorat fournissent une compréhension moléculaire et cellulaire de certains PID liés aux défauts de remodelage de l'actine. Ils mettent en évidence la fonction non redondante des régulateurs d'actine et leur support de divers processus (migration polarisée, assemblage de la synapse immunologique, activation de l'inflammasome) dans les différents sous-types cellulaires.

# REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le résultat de 4 années et demie de travail au sein de deux équipes de laboratoires exceptionnelles qui m'ont apporté autant sur le plan personnel que professionnel.

Ayant effectuée ma thèse dans deux pays, la France et l'Autriche, ces remerciements seront écrits tanto en français, tanto en anglais.

Je souhaite avant tout remercier les membres de mon jury de thèse sans qui rien n'aurait été possible. À mon président de jury **Denis Hudrisier**, je voudrais vous remercier pour votre enthousiasme exceptionnel pendant les cours à l'université, qui m'a décidé à plonger dans le monde de l'immunologie lors de mon entrée en L3. Je ne le regrette en rien, et j'espère pouvoir atteindre un jour votre niveau de pédagogie. À **Maria Carla Parrini** et **Fernando Sepulveda**, je souhaite vous remercier pour votre compréhension lors de la période d'écriture de manuscrit, et dont la date définitive a été beaucoup repoussée. Merci d'avoir accepté de réviser mon travail et pour vos conseils pour son amélioration. À **Ana-Maria Lenon Duménil**, je souhaite vous remercier pour avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinatrice et d'avoir apporté votre expertise sur le cytosquelette d'actine. Enfin à **Nabila Jabrane-Ferrat** et **Séverine Boullier**, je souhaite vous remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury au dernier moment et de vous être rendu disponible pour ce moment de discussion qu'est la soutenance.

**Kaan.** Thank you for having accepted me in your lab since my Master, even though my English was pretty (to not say very) bad. Thank you for letting me work in a competitive field in your lab, for the scientific discussions and for sharing your knowledge about primary immunodeficiencies.

**Loïc.** Merci de m'avoir fait aimer les lymphocytes T. Pour ceux et celles ne le savent pas, il était hors de question pour moi de travailler sur ces petites cellules, que je ne trouvais « pas intéressante ». Un cours de Loïc, et me voilà à effectuer une thèse principalement sur les lymphocytes T et cette petite structure magnifique qu'est le cytosquelette d'actine. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pendant ces presque 5 ans de supervisions (même si je n'arrive toujours pas à vous tutoyer), pour votre écoute, et m'avoir inculquée votre expertise de l'actine et de l'imagerie. Il y a eu des périodes très difficile, autant sur le plan personnel que professionnel, et je souhaite vous remercier de votre compréhension. Et félicitation pour avoir réussie à travailler avec une étudiante au caractère un peu (beaucoup) frondeur et aux manières sans filtre de dire les choses.

Merci à **Edouard Noisette** (<https://www.edouard-noisette.com>), l'illustrateur qui a pu confectionner les magnifiques illustrations des chapitres d'introduction, pour avoir mis en lumière mon amour pour la musique.

I will start first by my Austrian family. First, I'll miss our dinners, Halloween and Christmas parties, the science ball and all breaks we used to have all together. Thank you for all guys.

First, the G-team (present and former TA: **Raul, Tatjana, Ana, Anna** and **Jasmin**). You are the foundations of the lab, who work hardly everyday by communicating with all the clinicians over the world and doing the NGS. Nothing would be possible without all of you. **Raul**, you'll be forever my WDR1 teammate. Thank you for your work, your kindness and your friendship. I hope to see you soon, maybe in Spain. **Jasmin**, my theater buddy. Thank you for your happiness and I wish you all the best for your next carrier (we randomly met in Rio de Janeiro, so I guess everything is possible). **Tatjana**, I'm happy to call you my friend. You're the first one (plus Wojciech) with whom I was communicating the most during my first time in Vienna. You tried (and managed somehow) to teach me to do not say "I'm sorry" everytime, for anything. Even if you're not in Vienna anymore, I'm sure we'll meet somewhere at some point, to talk about our lives. I'll for sure remember you when I'll paint my next wall in my apartment, play harp, when I'll play guitar, or do aquarelle. Thank you for everything and I wish you all the best for your illustrator carrier (Tatjana Hirschmugl, check her website, she does an amazing job!).

**Isabel, Max** and **Johannes** (and **Doris** and **Anja**): thank you for everything. Without you, I would be totally lost in Vienna. **Alexis**, I wish you all the best for your time in Vienna! May the microscopy force be with you!

**Wojciech**. I can tell you now. The first time, when you did the lab tour to Loic and me: I did not understand anything of what you said. Except the most important rules which were basically "don't burn the lab and yourself". You cannot imagine how scared I was to do something wrong after that. And I did not do too many mistakes. Except forgetting to put back properly the boxes in the liquid nitrogen tank (which were swimming during a night then...). Oh, and forgetting the tap water which I let open for some time leading to the flood of the western blot area, and stock area and half of the corridor (oupsy?). Thank you for your help (for literally ANYTHING in the lab). You're the heart of the

lab. I wish you all the best for your future. **Lisi**, you did support me all the time when I arrived in Vienna. Thank you for your energy, your time, your good mood. Unfortunately, we didn't play together, however I'm sure it's gonna happen at some point in our lives. I want to play a violin-piano duet with you! I wish you all the best for the next step of your career as pediatrician and scientific researcher. **Rico** and **Tala**. The API meeting is one of the best memories I have (even though I almost died by fear and we all almost skip our own presentation). You are a model of strength for me and I hope to reach your scientific level. **Sevgi**, my dear Sevgi. Thank you for your joy, your smile, your energy. For all the discussions we had (scientific or music topics). Thank you for your time, your explanations. I wish we can make our road trip in Turkey at some point. I'll miss you for sure. But I'll try to come in Vienna before the end of 2021! **Samaneh**, I'll remember our time in Lisbon, when we spend a very good time at the ESID conference but also at the AirBnB, where we had to take a shower with the candles (thanks to the electric installation which was a bit random). You're an amazing person and scientist, and I wish you all the best for you and your family. All the best and see you soon. **Jana**, you were my last labmate in the KB lab. I would like to thank you for your support, your help during my time in Vienna. You're a wonderful person and a great scientist and I'm sure you'll finish your PhD with a shiny thesis.

For the other members of the KB lab: **Jakob** (the coffee drinker), I'll miss your message in the whatsapp group (basically a kiss and a coffee cup). **Marini**, I wish you all the best for your future! Artem, another actin lover in the KB lab: thanks for your input along all the different projects. **Christina**, thank you for your help and all the moments we had in the lab. All the best in the KB lab and for your life. **Ozlem**, my microscopy buddy. You're a wonderful scientist and I'm happy to know you. If your sons want to practice French, they will be more than welcome in France. **Julia**, our bioinformatician. Thanks for your energy, and I hope to reach your level of English at some point.

**Daniel, Vanessa, Mike, Matthias, Ben, Bernhard, Soren**: I wish you all the best for your life as scientist. I'm sure we'll meet somewhere over the world.

**Cecilia, Nina, Katharina** and **Birgit**: thank you for your expertise during my time in Vienna. You did teach me and transmit your expertise in basic experiments and I'm happy to have known you. Thank you for all, and I wish you all the best for your next career step.

**Nina** (Mair): my other WDR1 buddy. You're now a PhD student in Switzerland and I'm sure you're doing great. Maybe we'll see each other in Basel!

I would like to thank the microscope facility in Vienna (**Marion** and **Sabine**) for your expertise and your help. **A special thanks to our collaborators, the clinicians, the patients and their family** for their help during my PhD.

Au tour de ma famille française maintenant !

Je souhaite remercier toute l'équipe de Salvatore Valitutti qui m'ont accueilli dans leur équipe au tout début de mon aventure de thèse. **Liza** et **Yoan**, je vous fais un grand coucou depuis Toulouse, je n'oublierai pas notre week-end en montagne plein de rebondissement et de raclette.

À l'équipe de Renaud Lesourne : vous êtes arrivée pendant ma deuxième année comme « les gens du bâtiment B ». Comme je n'avais jamais mis les pieds au bâtiment B (ou très rarement), je me demandais qui étaient ces personnes qui arrivaient de si loin. **Renaud**, merci pour ton expertise depuis la fusion dans l'équipe. **Pierre** et **Isabelle**, les nouveaux DR de l'équipe : je vous souhaite bonne continuation au sein du CPTP et vous souhaite une très bonne continuation scientifique.

**Jeremy** et **Aurélie** (Mougel) (décidemment trop de personne avec les mêmes prénoms !) : vous avez enthousiasmé certaines soirées par nos soirées pizza ! Il faudra se refaire ça à l'occasion (quand toute la situation sanitaire sera passée évidemment). **Nelly**, tu es notre cœur de l'équipe. Ta joie de vivre est rafraichissante et je suis heureuse de te connaître (merci d'avoir migré au bâtiment F !) Je sais que le déménagement a été difficile, néanmoins, j'espère que vous avons un peu réussi à t'accueillir pour que tu te sentes comme chez toi. Surtout prend soin de toi. **Helene**, merci pour ta franchise, ton aide et ta capacité à comprendre les références à Kaamelott. J'avais hâte d'arriver au labo et de savoir que tu étais là, parce que cela signifiait des bonnes rigolades. Merci pour tout, et bon courage pour la suite (mais on planifie des vacances en Guadeloupe s'il te plait ? Il y a plusieurs choses que je n'ai pas pu faire !!). **Cui**, you're the next one I guess! You're an amazing student and I wish you all the best for your remaining time in France. **Suzanne** et **Claire**, je vois en vous des chercheuses remarquables. Je vous souhaite tout le courage pour la suite de votre thèse. Claire j'admire ta capacité d'adaptation dans ce monde de fou qu'est l'immunologie. Tu es capable alors ne lâche rien !! Au nouveaux arrivant-e-s **Mathieu**, **Lidia** et **Aurélie** je vous souhaite une très bonne aventure au sein de l'équipe Rle/LD et que celle-ci soit enrichissante.

**Anton**, even though you're in Vienna, you're a member of the LD group. You're a great scientist (and actor!) and it's always great to have another microscopy lover around! All the best for your future.

Je remercie les personnes des services communs pour leur aide et leur réactivité : Nathalie, Dominique, Lidia, Hassan, Caroline, Francine, Philippe, Pierre.

J'envoie un coucou tout particulièrement à **Florence**. Même si tu es partie du CPTP pour profiter d'une retraite bien méritée, cela me manque de ne pas venir te voir le matin pour te faire un petit coucou ou t'apporter le courrier. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je tiens également à remercier la plateforme de microscopie : **Sophie** merci pour ton aide et pour avoir acceptée de te prendre dans tes bagages pour Rio de Janeiro. **Danièle** : tu n'es plus au CPTP désormais (en retraite bien méritée également) cependant tu m'as appris énormément de chose sur le domaine de la microscopie. Je te remercie de tes conseils, de ta gentillesse, et pour moi tu resteras à jamais ma maman de microscopie du CPTP. Merci pour tout. **Astrid** reine du spinning, au final je ne t'ai pas beaucoup vu pendant ma thèse du fait de mes aller-retours entre la France et l'Autriche et la création de ta famille. Merci pour tes précieux conseils, et pour m'avoir fait aimer le spinning (même si bon il est capricieux certaines fois quand même). **Simon**, nouveau arrivant sur le plateau (et dont j'approuve les T-shirt geek à 100%), merci pour ton aide en macro FIJI (toujours un peu le mystère pour moi d'ailleurs). Bon courage et bonne aventure eu sein du CPTP. Un petit coucou à **Lhorane** également !

La plateforme de cytométrie maintenant ! **Fatima, Anne-Laure** et **Valérie** : le trio infernal de cytométrie ! Merci pour votre expertise et pour avoir pris soin des bébés cytomètres qui en voient souvent des vertes et des fluo (et pour avoir effacer les petits chats que l'on dessinait avec Delphine). Merci pour avoir été là lorsque j'avais des questions idiotes, ou lorsque j'avais oublié de retirer un créneau, mais également pour les discussions à la pause de midi. Merci pour votre écoute, votre bonne humeur et je vous souhaite le meilleur pour la suite. A très bientôt les filles !

Un coucou à mes camarades de promo, **Dan, Andréa, Jéméry** et **Eve**. Au final, on aura tous réussi à surmonter cette épreuve qu'est la thèse. Nous sommes maintenant docteur-e (bientôt pour vous Andréa et Eve mais je ne m'inquiète aucunement pour vous deux, vous allez roxer).

Par ailleurs, je souhaite remercier **Mathilde**, gérante du Podcast « Bien dans ma thèse » et créatrice du discord « PhD Student ». La pandémie due au coronavirus Sars-Cov-2 a touché l'ensemble de la population mais également la communauté scientifique. J'ai une pensée particulière à tout-e-s ces doctorant-e-s et post-doctorant-e-s qui, du jour au lendemain, ont vu leur quotidien bouleversé. Alors à chaque étudiant-e-s en thèse et autres, que ce soient les sciences expérimentales ou SHS, si vous avez besoin de soutiens, n'hésitez pas à rejoindre ce Discord. Il a été ma bouée de sauvetage lorsque le confinement est arrivé de plein fouet en Autriche, où je me suis retrouvée seule loin de ma famille.

Grâce à toi Mathilde, j'ai pu rencontrer des personnes formidables. Et beaucoup de chats. Moults chats. J'ai obtenu du soutien lorsque le moral n'était pas là (merci aux multiples patournées reçues). J'ai pu faire du sport (et souffrir) par caméra interposée (la chance notamment d'avoir des doctorant-e-s en études STAPS, bisous à notre super panda roux **Solène**). J'ai pu travailler en groupe grâce aux sessions Pomodoro. J'ai pu écouter de l'opéra (merci le MET), commenté par une connaisseuse en reconstitution historique (coucou **Beth**), et rire lorsque la mise en scène était de style « contempochiant » (pas merci le MET). La musicienne en moi a donc pu développer ce côté musical que je n'avais su acquérir au fil des années. J'ai pu rire, même pleurer de rire, voir faire pleurer de rire (merci mon tapis, ma cuisine, ma chaise, mon bureau et ma théière qui ont été sources de beaucoup de maladresse de ma part – et de bleus –). J'ai pu faire découvrir le monde de l'Immunologie, et découvrir l'univers de tant d'autre. Vous m'avez tenu hors de l'eau, m'avez encouragé, m'avez aidé. Et vous avez accepté ma manie de vouloir tout cramer quand quelque chose n'allait pas.

Certains membres sont devenus des ami-e-s (et avec qui je pars en vacances 4 mois après les avoir rencontrés pour la première fois, oui oui). **Alix**, merci de ton support, ta drolerie, pour avoir fait partie de la « team de nuit » sur les derniers moments de ma thèse, pour les photos de luna et noctis (que je ne sais toujours pas différencier) et pour m'avoir fait connaître le ginto. **Elisabeth**, très chère connaisseuse en, ben, a peut-être tout en ce qui touche le domaine des Arts je dirais. Merci pour tes conseils que j'essaie d'appliquer au quotidien. Hâte de pouvoir venir te voir à Paris (et te piquer les patrons que tu n'utilises pas). **Eva**, notre raton laveur discordien. Merci pour ta joie, ton humour, tes métaphores de thèse incroyable, et les câlins. Merci d'être là quand j'en ai besoin, merci pour ton amour à transmettre la science. Merci d'être toi, ne change pas (mais je sais que ça ne risque pas) et continue

de profiter de la vie comme elle vient. Un merci spécial à **Ronan** pour les séances de rush avant la soutenance et ton aide pour cette liste d'abréviations !

Il me faudrait encore 10 pages pour remercier chaque membre du discord qui m'ont soutenue alors je vais juste vous dire : Merci à tous et toutes, bon courage à vous, on ne lâche rien !

**Andrea**, the theater director and singer. I thank your love for the theater. Thanks to it, I met you, and played with you on stage. You're an amazing person, and a wonderful scientist. I'm sure we'll keep in touch for a long time. Thank you for your kindness, your patience. And if next time you need to cook a late cake, please call me and I'll be happy to create a song to cheer you on!

A big "HI!" to the CAT team. We did an amazing job.

**Yolla**. Copine de galère, de joie et de tristesse. De sport aussi (et finalement, c'est toi qui as pris bien plus le relais que moi). We went through difficult time, but hey, we're still alive! You did great, you're a lovely person. I'm still thinking I scared you when you arrived in the lab. I'll try my best to avoid this next time with other people (because I hope you are not scared by me anymore!). Little unicorn, I wish you all the best for your life (private and pro) and let's meet again. Thanks Buddy!

**Delphine**, tu as été ma mentor dès mon arrivée au laboratoire. Tu m'as appris, de la plus simple expérience à l'analyse d'imagerie. J'ai été honorée d'être ta chassistante, que je serais pour un bon moment encore. Merci pour m'avoir transmis ton amour des chats (et tu seras la seule et unique catlady du labo à jamais). Merci pour m'avoir transmis ton savoir pendant toutes les années où tu étais présente. Je me souviens encore être assise chez toi dans ton studio, en train de me faire réviser la cascade de signalisation d'activation du TCR. J'ai d'ailleurs encore tes fiches de révisions ! Si jamais elles t'intéressent, elles doivent sûrement être dans un de mes cartons ! Ou encore ce moment où en pleure (de joie évidemment), tu m'as annoncé que tu allais te marier. Tu es une femme merveilleuse, pleine de joie. J'espère que ta vie au Canada se passera bien, et qui sait, je passerai peut-être à Montréal un jour. Des bisous.

Je voudrais remercier particulièrement **Solène Delon** (qui n'a aucune parenté avec Alain Delon pour information). Solène, tu m'as accompagné depuis mon entrée à l'université. Je me souviens encore de notre première conversation, tout à fait banale (spoiler alert : PAS DU TOUT). Nos délires et



nos conversations me sont toujours aussi précieuses et tu comptes énormément pour moi. J'espère que malgré la distance, nous resterons en contact pour encore longtemps.

Jo, camarade de promo de prépa puis camarade de pas promo à l'université. On a galéré ensemble à Auzeville et finalement, on a réussi à trouver chacun notre voie dans nos domaines respectifs. Je te souhaite plein de bonheur à ta femme et toi et j'espère pouvoir vous voir très bientôt.

Un petit mot pour mes ami-e-s à 4 pattes qui m'ont accompagnée depuis mon enfant et/ou pendant ma thèse. Alors voilà, une pensée pour Myrtille, Kiwi, Fantasia (qui sont tous trois maintenant au paradis des animaux), à Madéa, Melody et Biała.

Et finalement, un grand merci à ma famille qui m'a soutenue depuis tant d'année. Merci d'avoir été là, merci de m'avoir poussée à toujours croire en moi. Merci pour votre amour, et votre aide durant toute ces années. Merci à ma maman et ma mamie que j'ai mis un peu sous pression durant les 15 jours précédant la soutenance pour la confection de ma robe.

Je vous aime.

# SOMMAIRE

ABSTRACT .....	1
RESUME .....	3
REMERCIEMENTS .....	4
SOMMAIRE .....	12
LISTE DES FIGURES.....	17
ABBREVIATIONS.....	18
PREAMBULE.....	24
INTRODUCTION .....	27
.....	28
CHAPITRE 1 .....	29
Le cytosquelette d'actine, échafaudage dynamique soutenant l'intégrité et les fonctions cellulaires .....	29
I) Les différents types de polymères composant le cytosquelette .....	30
1. Gènes impliqués dans la formation des polymères .....	30
2. Structure des polymères .....	32
3. Assemblage des polymères et leur régulation .....	33
a. Assemblage.....	33
b. Régulation des polymères tubuline et IFs .....	35
4. Propriétés mécaniques et fonctions des polymères .....	37
II) Les réseaux des microfilaments et leur <i>turnover</i> , ou le jeu du yin et du yang .....	38
1. Les partenaires protéiques des monomères d'actine .....	38
2. Protéines impliquées dans le découpage et la dépolymérisation.....	39
a. La famille ADF/Cofiline .....	40
b. La protéine WDR1 .....	41
c. Autres partenaires protéiques.....	42
3. Protéines impliquées dans le <i>capping</i> des filaments .....	43
4. Protéines impliquées dans la nucléation et polymérisation des filaments.....	43
a. Le complexe Arp2/3.....	43
b. Les protéines de la famille WASP .....	45
(1) Le complexe WIP/(N)-WASP.....	45
(2) Les complexes WAVE1, WAVE2 et WAVE3 .....	47
(3) Autres protéines de la famille WASP.....	47
c. Les formines.....	48
5. Protéines de <i>crosslinking</i> .....	49

6. La régulation de l'actine par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	50
III) Les structures d'actine et compartiments cellulaires .....	51
1. L'organisation de l'actine au sein de la cellule .....	52
a. Les différents réseaux d'actine .....	52
(1) L'actine corticale.....	52
(2) Fibres de stress et points focaux d'adhésions.....	52
b. L'actine associée aux organelles et compartiments cellulaire .....	53
(1) Mitochondrie .....	53
(2) Endosomes .....	53
(3) Le réticulum endoplasmique (RE)-Golgi.....	54
(4) Le centre organisateur des microtubules (MTOC) .....	55
2. Le nucléosquelette .....	56
a. Les lamines .....	56
b. L'actine .....	56
c. Les protéines accessoires .....	57
d. Interaction entre le nucléosquelette et le cytosquelette .....	58
3. Les protrusions membranaires dépendantes de l'actine : moteur des cellules immunitaires .....	59
a. Le lamellipodium et le lamellum .....	60
b. L'uropode .....	61
c. Les crespes .....	62
d. Les filopodes.....	63
e. Les podosomes et invadopodes .....	64
f. Les protrusions dendritiques.....	65
g. Microvillosités.....	65
CHAPITRE 2.....	69
Rôles élémentaires et spécialisés du cytosquelette d'actine dans les cellules immunitaires .....	69
I) Le système immunitaire et ses fonctions.....	70
1. La division cellulaire et la cytodierèse .....	71
a. Les étapes de la division cellulaire.....	71
b. L'anneau contractile .....	72
c. La division asymétrique .....	74
2. La migration, ou l'art de l'exode cellulaire .....	74
a. La notion de chimiotactisme .....	74
b. Migration de masse des leucocytes : "how to avoid traffic jams" .....	76

c. La diapédèse .....	77
3. L'autophagie .....	78
a. Généralité et contexte physiologique .....	78
b. Rôle des régulateurs d'actine dans l'autophagie .....	79
c. Le rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires .....	80
II) Le système immunitaire innée .....	81
1. Phagocytose .....	81
2. Neutrophiles et formation des NETs .....	84
a. Mécanismes d'activation .....	84
b. Le <i>turnover</i> de l'actine comme acteur majeur de la NETose .....	85
3. Activation des inflammasomes .....	86
a. Les inflammasomes : complexe protéique oligomérique .....	87
b. L'actine : régulateur des inflammasomes ? .....	88
III) Le système immunitaire adaptatif .....	90
1. Généralité .....	90
a. Les lymphocytes T .....	90
(1) Développement des lymphocytes T .....	91
(2) De lymphocytes T naïfs à cellules effectrices .....	93
b. Les lymphocytes B .....	96
(1) Activation des LB .....	97
(2) Extraction antigénique par les LBs .....	97
2. La synapse immunologique : aire de contact .....	98
a. Structure .....	98
b. Radeaux lipidiques .....	99
c. Organisation spatiale du TCR via le remodelage du cytosquelette d'actine .....	101
d. Rôle de l'actine dans la régulation de l'intégrine LFA-1 .....	101
e. Le cas de la synapse lytique : sécrétion des molécules lytiques .....	102
CHAPITRE 3 .....	105
Les défauts du cytosquelette d'actine causant des immunodéficiences primaires .....	105
I) Le décryptage des immunodéficiences primaires .....	106
1. Généralités .....	106
2. Classification .....	106
3. Les manifestations cliniques .....	107
4. Traitements .....	108
5. Séquençage de nouvelle génération : le nouvel outil de diagnostic .....	109

II) Impact des déficiences en régulateurs d'actine, ou actinopathies .....	111
1. Les immunodéficiences induisant un défaut plaquettaire.....	112
2. PID liées à des défauts des protéines de nucléation.....	113
a. La déficience en $\beta$ -actine .....	113
b. Les protéines de nucléation WIP, WAS, ARPC1B, Moésine et HEM1.....	114
(1) Les lymphocytes T .....	115
(2) Les lymphocytes B .....	115
(3) La déficience en moésine .....	116
3. PID liées à des défauts dans les protéines de dépolymérisation .....	116
a. PSTPIP1 et WDR1 .....	116
b. Coronine 1A.....	118
4. PID liées à des défauts des protéines de signalisation .....	119
a. Lymphocyte B .....	120
b. Lymphocytes T.....	120
c. Neutrophiles .....	121
d. Immunodéficience combinée.....	122
e. Le cas de l'immunodéficience en CDC42.....	124
5. Autres mutations génétiques associées à des défauts du cytosquelette .....	124
Objectifs de la thèse .....	126
RESULTATS.....	128
Papier #1: « WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly » .....	129
Papier #2: « T cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency » .....	150
Papier #3: « Mutations affecting the actin regulator WD repeat-containing protein 1 lead to aberrant lymphoid immunity » .....	203
Projet #4 - InflamAct : Étude de la relation moléculaire entre le cytosquelette d'actine et l'activation des inflammasomes.....	231
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	238
I) Vers une meilleure compréhension des rôles spécifiques et multiples des régulateurs du cytosquelette d'actine au sein des cellules immunitaires.....	239
II) Adaptation du remodelage du cytosquelette d'actine aux fonctions particulières des différentes cellulaires immunitaires.....	242
III) Mieux comprendre le rôle des régulateurs d'actine dans la mise en place de la réponse inflammatoire.....	245
ANNEXES.....	249

Annexe 1: RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics.....	250
Annexe 2: Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis.....	268
Annexe 3: Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type 1 regulatory T cells.....	298
BIBLIOGRAPHIE.....	310

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Localisation et structure des différents polymères composant le cytosquelette

Figure 2. Assemblage des polymères

Figure 3. Domaines des protéines membres de la famille WASP

Figure 4. Nucléosquelette et les interactions avec les différents polymères cellulaires

Figure 5. Les différentes protrusions membranaires

Figure 6. Les différents leucocytes

Figure 7. Protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et leur action dans la division cellulaire et la cytotéièrèse

Figure 8. Les différentes étapes de la phagocytose

Figure 9. Les différents inflammasomes

Figure 10. Structure de la synapse immunologique et arcs d'actine

Figure 11. Pipeline d'analyse des échantillons de patient PID

Figure 12. Les régulateurs d'actine et leur rôle dans la signalisation

Figure 13. Historique de la microscopie

## ABBREVIATIONS

ABD	actin-binding domains
ABP	Actin-binding proteins
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10
ADF	actin-depolymerizing factor
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AFM	atomic force microscopy
AIM2	absent in melanoma 2-like receptor
AIP1	actin interactin protein 1
AIRE	Auto immune regulator element
AMBRA1	Activating Molecule In Beclin-1-Regulated Autophagy
ARF1	ADP Ribosylation Factor 1
ARHGEF1	GEF de RhoA
ARN	acide ribonucléique
ARP2/3	actin-related protein 2/3 complex
ASC	apoptosis-associated speck-like protein
ATG	Autophagy Related protein
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCR	B-cell receptor
BWCF	Baraitser-Winter cerebrofrontofacial
CARMIL2	Capping Protein Regulator And Myosin 1 Linker 2
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Receptor
CD	cluster of differentiation
CDC42	Cell Division Cycle 42
CG	centres germinatifs
CLASP	Cytoplasmic linker associated protein 1
CMH	complexe majeure d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CR3	récepteurs du complément 3
CRP1	Cystein rich protein 1
cTECs	cellules thymiques épithéliales corticale
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4



CTTN	cortactine
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DAD	Diaphanous autoregulatory domain
DAG	diacylglycerol
DAMP	Dammages-Associated Molecular Pattern
DC	cellules dendritiques
DEF6	Differentially Expressed In FDCP (Mouse Homolog) 6
Dia1	diaphanous-1
DIAPH3	Diaphanous Related Formin 3
DID	Diaphanous inhibitory domain
DN	double négatif
DNase	Deoxyribonuclease
DOCK	Dedicator Of Cytokinesis
DP	double positif
DRF	Diaphanous related formins
Drp1	Dynamin-Related Protein 1
EBV	Eptein-Barr virus
EMR	eitrine, moesine, radixine
Ena/VASP	Vasodilator Stimulated Phosphoprotein
ERGIC	endoplasmic reticulum –Golgi intermediate compartment
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERM	Ezrine Radixine Moésine
ETP	Early T-cell Precursor
EYA3	Eyes Absent Homolog 3
F-actine	Actine Filamentaire
FcR	Fc Receptors
FH	follicular helper
FH2	formin homogy 2
FMF	familial Mediterranean fever
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FOXO3	Forkhead Box O3
G-actine	Actine Globulaire
GBD	GTPase-binding domain
GCPs	$\gamma$ -tubulin complex proteins

GDP	guanine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GPCRs	récepteurs couplés à des protéines G
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GTP	guanine triphosphate
GTPase	guanine triphosphatase
HIV	Virus de l' Immunodéficience Humaine
HLA	human leucocyte antigen
HLH	lymphohistiocytose hémophagocytaire
HSV-1	Herpes simplex virus 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IF	Filament Intermédiaire
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
ILC3	Innate lymphoid cells
IP <sub>3</sub>	inositol trisphosphate
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein
ITGB2	Integrin Subunit Beta 2
IUIS	International Union of Immunological Societies
IVIG	intravenous immunoglobulin
JMY	Junction-Mediating And -Regulatory Protein
LAD	déficit d'adhérence des leucocytes
LAMP1	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
LAT	Linker For Activation Of T Cells
LB	lymphocyte B
Lck	Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LINC	LIInkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton
LIR	LC3-interacting region
LPS	lipopolysaccharides
LRRFIP2	Leucine-Rich Repeat Flightless-Interacting Protein 2
LT	lymphocyte T
LTh	lymphocytes T helpers
LTTC	lymphocytes T cytotoxiques
LT $\gamma\delta$	lymphocytes T gamma et delta

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPs	Microtubule-associated proteins
MICAL	Molecule Interacting with CasL
MPT	modifications post traductionnelles
MRTF	Myocardin-related transcription factor
MST1	Macrophage Stimulating 1
mTEC	Cellules épithéliales thymiques de la medulla
MTOC	Centre Organisateur des MicroTubules
MYH9	Myosin Heavy Chain 9
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nap1	Nucleosome Assembly Protein 1 Like 1
NBS	Nijmegen breakage syndrome
Nck	Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase
NE	neutrophile élastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
nfCfl	non-functional cofilin
NGS	Next generation sequencing
NICD	Notch intracellular domain
NIK	NK- $\kappa$ B-inducing kinase
NK	natural killer
NKT	Natural killer T cells
NLR	nucleoide-binding domain-like receptors
NLRP3	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3
NMIIA	Non musculaire IIA
NOCARH	Neonatal-onset cytopenia with dyshematopoiesis, autoinflammation, rash, and hemophagocytic lymphohistiocytosis
Notch1	Notch intracellular domain
Nox2	NADPH oxidase 2
NPF	nucleation promotion factor
NuMa	nuclear mitotic apparatus protein 1
N-WASP	neural WASP
OLII	organes lymphoïdes secondaires
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAD	Primary Antibody Immunodeficiencies

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAPA	Pyogenic sterile Arthritis, Pyoderma gangrenosum and Acne
PBMC	A peripheral blood mononuclear cell
PDLIM4	PDZ And LIM Domain 4
PFs	ProtoFilaments
Pi	Phosphate
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PID	Primary immunodeficiencies
PIDO	Primary Immunodeficiency Disease Ontolog
PIP2	Prolactin Induced Protein
PKC	Protein Kinase C
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C Gamma 1
PRR	Pattern recognition receptors
PSTPIP1	proline-serine-threonin phosphatase interacting protein 1
Ptcd	peripheral t cell deficiency
PTP-PEST	protein tyrosine phosphatase PEST
RASGRP1	Ras Guanyl-Releasing Protein 1
RE-Golgi	Réticulum Endoplasmique-Golgi
Rho	Ras Homolog Family Member
RIPK3	Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3
RNF2	Ring Finger Protein 2
ROCK	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase
ROR $\gamma$ t	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma
ROS	Reactive oxygen species
SCID	severe combined immunodeficiency
SCIG	Subcutaneous immunoglobulin
SCPR	search capture pull and release
SI	synapse immunologique
SMAC	supramolecular activation cluster
SMAC	cluster d'activation supramoléculaire
SP	simple positif
Spire1C	Spire Type Actin Nucleation Factor 1
Sra1	Steroid Receptor RNA Activator 1
SRF	serum response factor
SSH	Slingshot Protein Phosphatase

STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
STK4	Serine/Threonine Kinase 4
SUN	Sad1 And UNC84 Domain Containing
TBX21	T-Box Transcription Factor 21
TCR	T-cell receptor
TLR	Toll Like Receptor
TRIM27	Tripartite Motif Containing 27
VAPs	VAMP-associated proteins
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA4	very late antigen-4
VPS26	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 26
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome homolog
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous
WDR1	WD Repeat Domain protein 1
WES	whole exome sequencing
WGS	whole genome sequencing
WHAMM	WAS Protein Homolog Associated With Actin, Golgi Membranes And Microtubules
WIP	Wiskott-interacting protein
WRC	WAVE regulatory complex
XLP	X-linked lymphoproliferative syndrome
ZAP70	Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70
$\gamma$ -RuRC	$\gamma$ -tubulin ring complex

# PREAMBULE

Le système immunitaire m'a toujours fasciné. C'est un système complexe, dont l'équilibre entre rôle de protection et potentiel de destruction est finement régulé. En effet, les cellules immunitaires sont nos protectrices et nos armes contre les pathogènes, mais elles peuvent, sous certaines conditions ou à cause de défauts génétiques, se retourner contre nous. Ce que j'ai trouvé d'autant plus intéressant, c'est leur capacité à migrer à travers notre organisme rapidement, à travers différents tissus et d'avoir des fonctions propres à chacune. Ma thèse m'a permis de découvrir un des secrets des « super pouvoirs » des cellules immunitaires : leur cytosquelette. Il existe différents types de cytosquelette, mais je me suis particulièrement intéressée au cytosquelette d'actine, composé de monomères d'actine assemblés entre-eux.

En remontant le temps de plusieurs décennies, nous savons que l'actine a été découverte pendant la deuxième guerre mondiale en Hongrie, par deux chercheurs.euse.s : Brúnó F. Straub et Ilona Banga. C'est d'ailleurs cette même équipe, accompagnée du docteur Albert Szent-Györgyi, qui a découvert dans le même temps le complexe actomyosine, dont je parlerai plus en détail dans cette thèse. Dans cette étude, l'actine a été isolée à partir de fibres musculaires de lapin, me permettant de pointer une autre information à propos du cytosquelette d'actine : c'est une structure ubiquitaire, importante pour chaque cellule eucaryote. On n'identifiera la structure de l'actine que bien plus tard, en 1990. Le cytosquelette d'actine est à l'image du squelette qui compose notre corps : il donne une structure à la cellule. Cependant, il diverge par son aspect dynamique grâce à un jeu de balance entre polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine.

D'un point de vue cellulaire, le cytosquelette d'actine permet de soutenir des fonctions diverses et variées : il est aussi bien impliqué dans des événements cellulaires partagés par l'ensemble des cellules (par exemple la mitose) que dans des événements très spécifiques aux cellules immunitaires (par exemple la phagocytose par les neutrophiles et macrophages). D'un point de vue moléculaire, le cytosquelette d'actine, en plus d'être dynamique, est une structure qui se diversifie grâce à des « réseaux » d'actine spécifiques. Ces réseaux particuliers sont contrôlés par différentes protéines régulatrices, spécifiques de chaque réseau, qui vont agir sur le renouvellement des filaments d'actine. C'est en soit ce qui est le plus complexe et le plus fascinant à décrypter lorsque l'on étudie le cytosquelette d'actine. En effet, certaines protéines régulatrices interagissant directement avec les

monomères d'actine vont avoir des rôles bien spécifiques ; il est cependant plus compliqué de comprendre le rôle des protéines de signalisation, ou des kinases qui agissent en amont des évènements de polymérisation ou de dépolymérisation de l'actine.

Nous avons une évidence directe de l'importance du cytosquelette d'actine au travers des pathologies touchant la structure de ce réseau. C'est le cas des myopathies telle que la myopathie à némaline, où des mutations dans le gène  $\alpha$ -actine induisent une réduction de la taille des filaments fins des muscles causant ainsi des dommages dans la structure des myofibrilles. Les myopathies ne seront pas couvertes dans ma thèse, cependant nous attacherons plus de détails aux pathologies telles que les immunodéficiences primaires (induites par des mutations dans des gènes codant pour des régulateurs du cytosquelette d'actine).

Dans la partie introductive de cette thèse, je vous présenterai tout d'abord en détail ce qu'est le cytosquelette d'actine, sa dynamique et sa régulation d'un point de vue moléculaire. Je détaillerai ensuite les évènements cellulaires généraux puis spécifiques aux cellules immunitaires, dépendant de la dynamique de ce cytosquelette. Enfin je ferai un point plus clinique sur l'importance des régulateurs des filaments d'actine en intégrant les données fondamentales que les immunodéficiences primaires nous ont appris sur les liens existants entre les fonctions des cellules immunitaires et le cytosquelette. L'idée étant de mettre l'emphase sur ce que peut nous apporter les immunodéficiences en termes de biologie fondamentale. La partie « Résultats » s'organise autour des articles auxquels j'ai contribué en tant que première autrice ou en tant que collaboratrice. Ils portent sur la caractérisation des défauts cellulaires de plusieurs immunodéficiences primaires liées au cytosquelette d'actine, peu caractérisées à ce jour. Enfin je présente une partie de discussion sur les enseignements de ce travail et les questions qui restent ouvertes.

Globalement, cette thèse a eu pour vocation à mieux comprendre les immunodéficiences primaires, et particulièrement celles touchant le cytosquelette d'actine. Tout d'abord pour permettre la caractérisation plus fine de ces maladies et ainsi aider les cliniciens et les patients à comprendre les causes moléculaires et cellulaires de ces maladies. Mais également pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux régissant les fonctions des cellules immunitaires, grâce aux modèles uniques que fournissent les cellules de patients.





# INTRODUCTION



***Le compositeur.** Le cytosquelette est une structure déterminante pour les cellules, comme l'est un compositeur pour la musique. Illustration de Edouard Noisette©. Reproduction restreinte au manuscrit de thèse.*

# CHAPITRE 1

## Le cytosquelette d'actine, échafaudage dynamique soutenant l'intégrité et les fonctions cellulaires

Ce chapitre sera dédié au décryptage de ce qu'est le cytosquelette et de comment les différents polymères se forment et s'organisent. Tout au long de cette thèse, le cytosquelette d'actine sera le sujet principal, j'ai cependant voulu explorer dans cette partie les rôles des deux autres polymères qui composent le cytosquelette cellulaire, à savoir les filaments intermédiaires et les microtubules.

## I) Les différents types de polymères composant le cytosquelette

Les cellules eucaryotes sont structurées grâce à trois réseaux de polymère distincts : les filaments d'actine (ou microfilaments), les filaments intermédiaires (ou IFs) et les microtubules. Ces polymères possèdent des structures, des régulations, des interacteurs et des fonctions propres à chacun. Bien que cette thèse soit consacrée au rôle de l'actine et à sa régulation au sein des cellules immunitaires, il me semble important et pertinent d'évoquer l'ensemble des trois réseaux qui compose le cytosquelette. En effet, ces trois réseaux ne sont pas indépendants les uns des autres et interagissent entre eux lors d'événements cellulaires. Comprendre la formation, la régulation et le rôle de l'ensemble des polymères du cytosquelette nous permettra d'apprécier leur importance dans leur soutien aux activités cellulaires.

### 1. Gènes impliqués dans la formation des polymères

Il est intéressant de noter que les trois réseaux de polymères sont exprimés dans toutes les cellules eucaryotes (exception faite de quelques organismes pour les filaments intermédiaires)<sup>1-3</sup>. Différentes isoformes des sous unités composants les polymères sont exprimées de manière différentielle dans les cellules et vont avoir des localisations et/ou des expressions cellulaires spécifiques.

Il est contenu dans le génome humain pas moins de 6 isoformes d'actine, encodées par des gènes séparés<sup>4</sup>. Certaines isoformes d'actine sont exprimées de manière ubiquitaire dans toute les cellules (*Actb* et *Actg1*), d'autre spécifiquement dans les cellules cardiaques (*Actc*), les cellules des muscles lisses (*Acta1* et *Actg2*) ou squelettiques (*Acta1*). Il est intéressant

#### MENTION SPECIALE

L'actine est la protéine dont la séquence est la plus conservée parmi les espèces ! Seuls quelques acides aminés varient entre les algues, les amibes, les fungus et les animaux. C'est également la protéine qui est la plus abondante dans la plupart des cellules, à l'exception des cellules nerveuses (enrichies en tubuline) et les cellules de la peau (enrichies en kératine).

de constater que l'actine est une protéine provenant d'un ancêtre commun de l'ensemble de la vie terrestre, de par sa présence dans différents types d'organismes, tels que les bactéries, les archées et

les eucaryotes. Ces différents gènes vont coder pour différentes protéines d'actine, monomères des filaments d'actine ou microfilaments.

En ce qui concerne la tubuline, il existe 6 familles différentes. Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  vont être les sous unités composants les dimères nécessaires à la formation des protofilaments et donc des microtubules. Ces isoformes vont pouvoir se lier à une molécule de GTP. La  $\gamma$ -tubuline va quant à elle être nécessaire à la nucléation de nouveaux polymères, en s'associant à d'autres protéines au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC). D'autres familles (les tubulines  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ ) vont être plus spécifique de certaines structures/organismes telles que les cils, les flagelles ou encore les corps basaux. Il existe un grand nombre de gènes chez l'homme pour les tubulines  $\alpha$  (15 gènes),  $\beta$  (21 gènes) et  $\gamma$  (3 gènes)<sup>5</sup>. Ces différentes sous unités constitueront ce que nous nommerons microtubules.

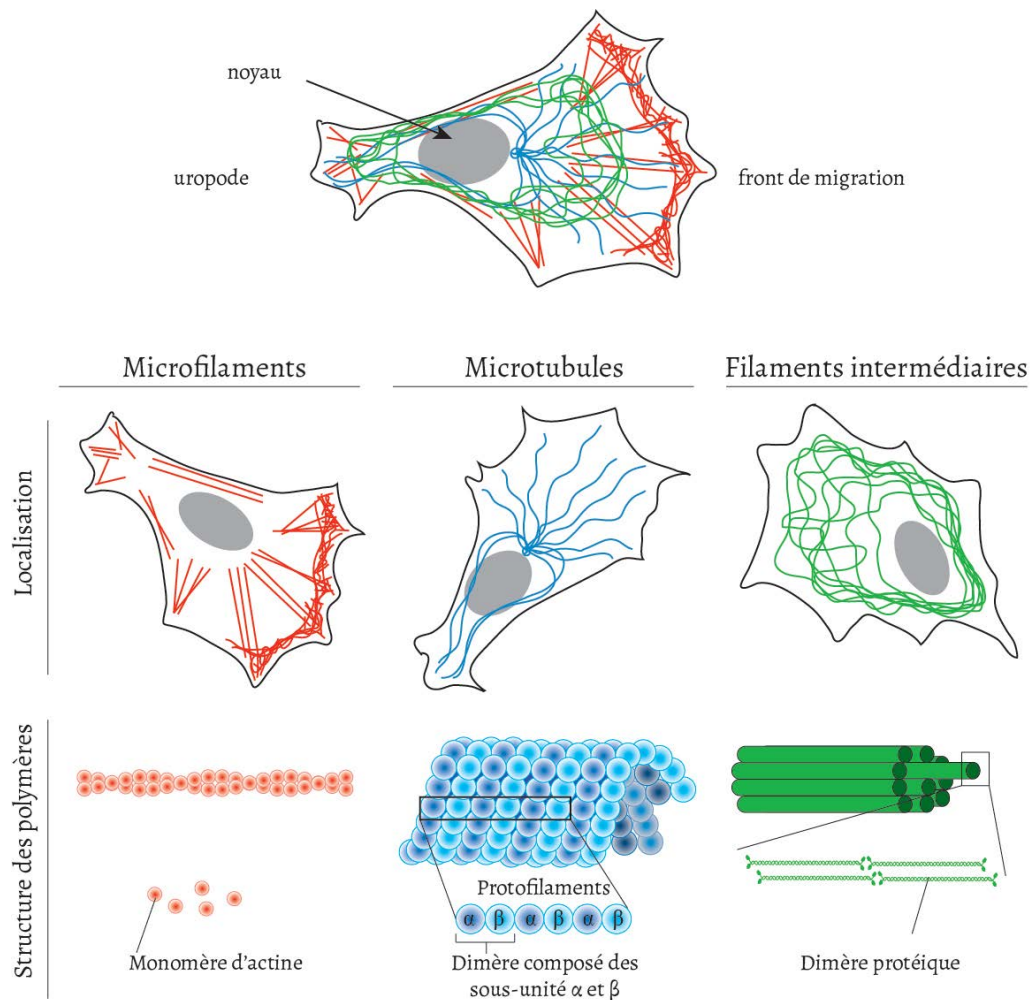


Figure 1. Localisation et structure des différents polymères composant le cytosquelette

Les filaments intermédiaires portent leur nom du fait de la taille de leur structure, qui se situe entre les microfilaments et les microtubules. Le génome humain comporte 65 gènes codant pour les différentes protéines composant les IFs<sup>6</sup>. Il existe 6 types différents de filament intermédiaires, chaque type étant associé à un groupe de protéines avec une localisation tissulaire ou cellulaire spécifique<sup>7</sup>. Les IF de type I et II correspondent respectivement aux kératines acides et basiques, et sont hautement exprimés dans les épithéliums. Les IFs de type III vont regrouper la vimentine et la desmine, et ont la particularité de former des homopolymères ou des hétéropolymères avec d'autres protéines de type III. Les IFs de type IV sont quant à eux exprimés principalement dans les neurones et les muscles. Les IFs de type V sont localisés au niveau du noyau cellulaire et sont composés de protéines de type lamines<sup>8-</sup><sup>11</sup>. Enfin, les IFs de type VI sont pour leur part spécifiques à la lentille oculaire.

## 2. Structure des polymères

Bien que les structures des polymères composant les trois réseaux obéissent à certaines règles communes, ils sont très distincts sur plusieurs points. Leur point commun repose sur l'assemblage de sous-unité, ou monomères, en filaments ou groupe de filaments. Cependant, chaque polymère réarrange ces sous-unités de manière distincte (voir figure 1). De par leur structure différente, la taille des polymères diffère, allant de 7nm environ pour les filaments d'actine, entre 8 et 12nm pour les filaments intermédiaires et 25nm pour les microtubules<sup>12</sup>.

Les filaments d'actine (ou actine filamentaire, F-actine) sont constitués de monomères d'actine globulaire (G-actine). La structure de la G-actine a été caractérisée pour la première fois dans les années 90, sous la forme d'un complexe avec la DNase I, la profiline et la gelsoline<sup>13</sup>. Concernant la structure de la F-actine, différents modèles nous permettent aujourd'hui d'avoir une vision précise de la structure des filaments d'actine<sup>14</sup>. Cette structure est composée de deux chaînes imbriquées en hélice. Les deux extrémités des microfilaments diffèrent de par leur dynamique d'ajout ou de détachement des sous unités. L'extrémité « positive » (aussi nommée *barbed end*) va avoir une dynamique rapide alors que la dynamique du côté « négatif » (ou *pointed end*) est plus lente. Puisque les monomères d'actine sont également polaires (avec eux même une structure composée d'un *barbed end* et *pointed end*), ils vont s'assembler avec une orientation spécifique.

Les composants formant les microtubules sont deux sous-unités formant un hétérodimère, l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline<sup>15</sup>. Ces dimères vont s'assembler en protofilaments (PF) puis se structurer pour former un tube creux constitué d'environ 13 PFs *in vivo* ; ils peuvent cependant être constitués entre 13 et 16 PFs *in vitro*<sup>16</sup>. Le polymère final est polaire, avec une partie positive où la croissance des microtubules est rapide et expose la sous unité  $\beta$  de la tubuline. La partie négative est le plus souvent enchâssée dans le centrosome et expose la sous unité  $\alpha$  de la tubuline.

Les filaments intermédiaires, bien qu'étant diverses en termes de composition protéique, partagent une structure commune. Cette structure consiste en deux polypeptides (dimère) agencés en super hélice (ou *coiled-coil*, c'est-à-dire enroulés l'un autour de l'autre jusqu'à former une hélice  $\alpha$ ). Cette hélice est stoppée par des protéines linker et les extrémités N et C terminal des protéines sont flanquées<sup>17,18</sup>. L'agencement antiparallèle de deux dimères formera un tétramère (ou protofilament) et l'association de deux protofilaments formera une protofibrille. Le filament intermédiaire sera formé par 8 tétramères. La structure interne est cependant toujours assez peu connue.

Toutes les protéines des filaments intermédiaires possèdent une structure protéine tripartite : un domaine central arrangé en hélice  $\alpha$  (*rod domain*) et deux domaines de part et d'autre du domaine central non hélicoïdal (*head domain* et le *tail domain*). Le domaine central est composé de 4 segments hélicoïdaux : 1A et 1B (formant le *coil 1*) et 2A et 2B (formant le *coil 2*). Ces 4 segments en hélice  $\alpha$  sont reliés par des segments liants (*linker*) : L1, L12 et L2. Alors que les microtubules et les filaments d'actine possèdent une polarité (extrémité positive ou négative), une telle caractéristique n'a pas été rapportée pour les filaments intermédiaires.

### 3. Assemblage des polymères et leur régulation

#### a. Assemblage

Le cytosquelette est loin d'être une structure définie et statique. En ce sens l'analogie que l'on pourrait faire avec notre squelette osseux reste limitée. Ainsi, les polymères composant le cytosquelette sont sujets à un constant renouvellement dynamique. En situation physiologique, les trois polymères du cytosquelette s'assemblent de manière spontanée. La figure 2 résume les processus d'assemblage des différents polymères.

Si l'on s'intéresse aux microfilaments, les monomères d'actine vont lier une molécule d'adénosine di-ou triphosphate (ADP/ATP). Un cation divalent ( $Mg^{2+}$ ) va s'associer fermement aux phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP et permettre la polymérisation de l'actine en filament. Les monomères possédant une activité ATPase<sup>13</sup>, une hydrolyse aléatoire va s'effectuer, permettant la libération d'un phosphate (Pi). Cependant, la libération de cette molécule de phosphate- $\gamma$  se fait très lentement, marquant la présence transitoire d'un complexe ADP-Pi-actine. Une fois libérés de leur phosphate, les complexes ADP-actine vont préférentiellement se détacher du polymère. La dépolymérisation va alors libérer les monomères d'actine-ADP dans le cytoplasme, où la molécule d'ADP sera échangée contre une molécule d'ATP pour ainsi relancer le monomère d'actine dans le cycle de polymérisation.

Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la tubuline vont, semblablement aux monomères d'actine, lier une molécule de guanine triphosphate (GTP) pour permettre la polymérisation des microtubules. Les sous-unités de la tubuline ayant également une propriété de GTPase, une hydrolyse aléatoire va s'effectuer de manière rapide après l'incorporation des sous-unités au polymère. L'hydrolyse ne s'effectue cependant que sur les molécules de GTP liées aux sous-unités  $\beta$  de la tubuline, au niveau de la tête du polymère. Cet échange de GTP en GDP influe également sur la structure du protofilament qui, d'une structure droite, va adopter une structure incurvée lorsque les sous unités sont liées au GDP. Les dimères tubuline-GDP étant moins stables, ils vont alors se décrocher du polymère.

Concernant l'assemblage des filaments intermédiaires, les filaments vont pouvoir s'assembler entre eux sans avoir recours aux nucléotides tels que l'ATP ou les GTP<sup>19</sup>. La formation du tétramère s'effectue sous l'influence de cation monovalents mais l'assemblage s'effectue de manière spontanée. Il existe cependant quatre modèles d'association dimère-dimère. Le modèle  $A_{11}$  et  $A_{22}$  correspondent à une association décalée de deux dimères respectivement via leur *coil 1* ou *coil 2*. La vimentine s'apparie par exemple uniquement via le modèle  $A_{11}$ . Le modèle  $A_{12}$  correspond à une association de deux protéines, l'une via son domaine *coil 1*, l'autre via son domaine *coil 2*. Enfin, le modèle  $A_{CN}$  désigne formation d'un dimère par alignement longitudinal des parties C et N terminales des monomères.



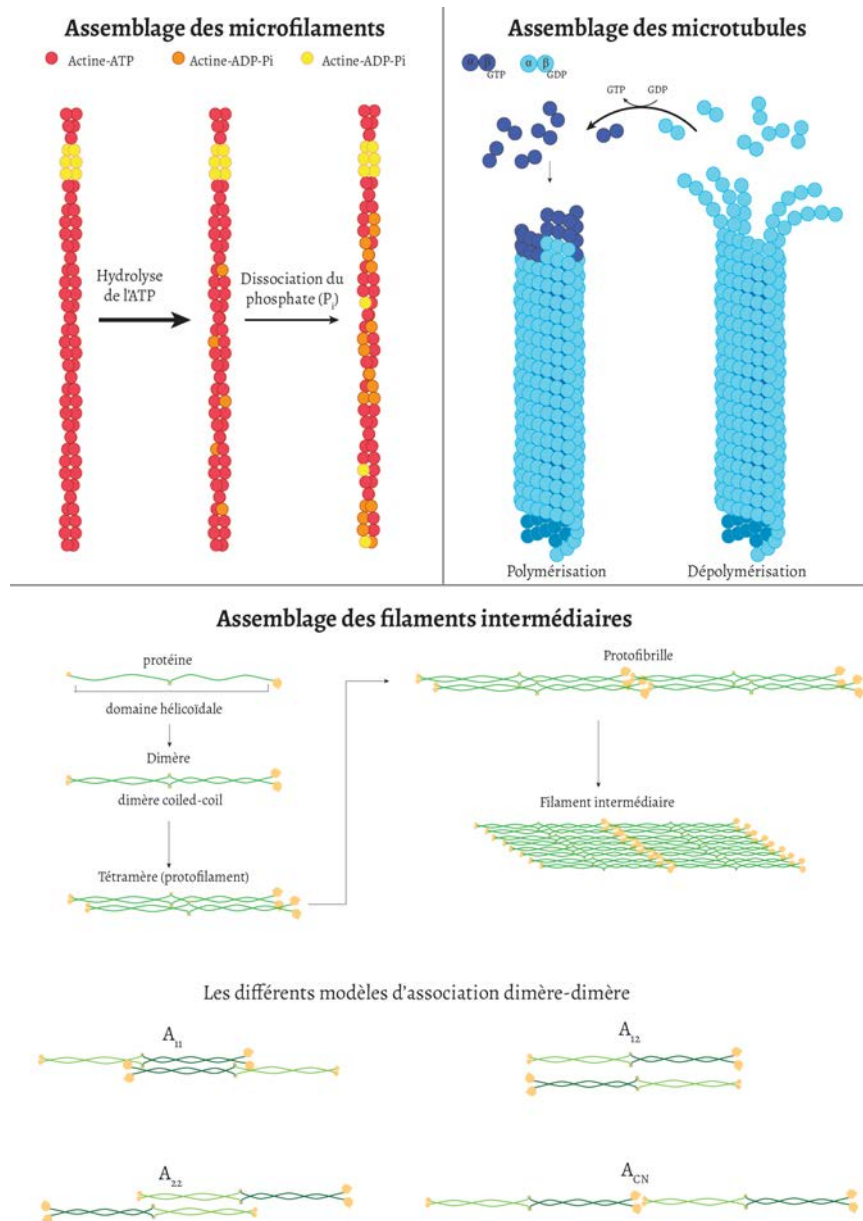


Figure 2. Assemblage des polymères. Adapté de Pollard et al 2016<sup>13</sup>, Pollard et al 2018<sup>20</sup> et Kelemen et al 2017<sup>21</sup>

## b. Régulation des polymères tubuline et IFs

La polymérisation spontanée des microtubules est possible *in vitro*, processus qui cependant requière une grande quantité d'énergie<sup>22,23</sup>. De ce fait, ce processus spontané est très vite limité et l'aide

de protéines de nucléation va être nécessaire pour permettre la nucléation puis l'élongation des microtubules.

Cette nucléation s'effectue principalement à partir du MTOC. La  $\gamma$  tubuline va se complexer avec d'autres protéines (les GCPs, pour  *$\gamma$ -tubulin complex proteins*) pour former le «  $\gamma$ -tubuline microtubule nucleator complex » et vont s'assembler en une structure en anneau qui sert supposément de support et de modèle pour l'arrangement des protofilaments. Cette structure est nommée le  *$\gamma$ -tubulin ring complex* ( $\gamma$ -TuRC) et va permettre la formation de microtubules à 13 protofilaments. Par ailleurs, des protéines régulatrices vont contrôler la dynamique des microtubules, c'est-à-dire agir leur (de)polymérisation ou leur stabilisation. On va retrouver les protéines associées aux microtubules (MAPs, « *Microtubule-associated proteins*) qui vont agir sur la stabilisation des interactions entre les sous unités de tubulines et vont donc promouvoir la nucléation et la formation des microtubules *in vitro*. La protéine CLASP (*Cytoplasmic linker associated protein 1*, faisant parti d'un groupe particulier des MAPs) va plutôt agir sur la stabilisation des microtubules via un évènement de sauvetage. D'autres au contraire, comme la kinesin-13 (et dans une autre mesure la kinesin-8), vont induire la dépolymérisation des microtubules en promouvant l'incurvation des protofilaments.

Les modifications post traductionnelles (MPT) vont ajouter une complexité de régulation supplémentaire. De nombreuses modifications ont été identifiées, depuis 1973, date de l'identification de la première MPT de tubuline (incorporation d'une tyrosine de manière ARN indépendant<sup>24</sup>). Certaines MPTs vont modifier les dimères de tubulines, ou les microtubules, ou peuvent agir sur les deux structures. Les MPTs dont vont être sujet les microtubules sont nombreuses (19 découvertes jusqu'à maintenant<sup>25</sup>) mais on pourrait citer par exemple la (dé)tyrosination de la tubuline (action d'ajouter ou d'éliminer la tyrosine en C-terminal), ou encore la  $\Delta 2$ -deglutamiation (action de retirer le glutamate en plus de la tyrosine en C-terminal).

La régulation des IFs s'effectue par des étapes de MTPs<sup>6</sup> qui vont donner leur propriétés aux IFs. La phosphorylation, qui est l'ajout d'un phosphate sur les acides aminés comportant un groupe alcool -OH (comme la sérine, la tyrosine et la thréonine), va réguler la solubilité et l'organisation des filaments, leur capacité à interagir avec des protéines partenaires ainsi que leur susceptibilité à être dégradés. La transglutamination (formation d'un pont isopeptidique entre la glutamine et la lysine avec relargage d'une molécule d'ammoniac) va être importante pour la formation d'une barrière cellulaire cornifiée (pour les filaments de kératines par exemple) qui contribue à la structure de la

barrière épidermique<sup>26</sup>. D'autres modifications post-traductionnelles vont également réguler ces IFs, comme la glycosylation (ajout d'un glucide) ou la farnésylation (ajout d'une molécule de farnésol au niveau d'une cystéine)<sup>6</sup>.

#### 4. Propriétés mécaniques et fonctions des polymères

Il est logique de penser que la structure des polymères et leur taille vont jouer sur leur plasticité, leur élasticité, leur flexibilité et leurs propriétés mécaniques. La longueur de persistance ( $l_p$ ) est la propriété mécanique la plus couramment mesurée *in vitro* pour évaluer la rigidité des filaments<sup>27,28</sup>. Elle est mesurée le plus souvent grâce à l'AFM (*atomic force microscopy*). Ainsi les filaments intermédiaires sont les plus flexibles (avec une  $l_p$  entre 0.3 et  $1\mu\text{m}$ )<sup>12</sup>, et les microtubules les plus rigides (avec une  $l_p > 1000\mu\text{m}$ ). En ce qui concerne les filaments d'actine, elle se situe autour de  $10\mu\text{m}$ . Les fonctions mécaniques de l'actine seront détaillées dans la prochaine section (Chapitre 1, Section II).

Les filaments intermédiaires sont intéressants de par leur diversité de flexibilité, de structure, d'insolubilité, expliquées par les différentes protéines qui peuvent les composer (cf paragraphe I.1). De plus, il est important de souligner que les IFs ont la propriété de ne pas se rompre sous l'effet d'une force importante, mais au contraire, d'augmenter leur élasticité afin d'y résister<sup>29</sup>. Les raisons de cette résistance mécanique et les régulations moléculaires l'entourant sont cependant encore mal comprises. Cette capacité d'élasticité a permis d'identifier les fonctions cellulaires qui étaient dépendantes des IFs, elles-mêmes dépendantes du type protéique d'IFs. On pourra citer par exemple les études des équipes de Shaw et Schoenenberger qui ont respectivement permis de montrer que la propriété élastique des filaments de vimentine était importante pour le maintien de la morphologie cellulaire<sup>30</sup> des lymphocytes T et la rigidité perinucléaire<sup>31</sup> des fibroblastes.

Les microtubules ont, de par leur longueur de persistance, une rigidité proche du plexiglas<sup>32</sup>. Cela est en accord avec leur fonction de « rails protéiques » qui permet l'acheminement de complexes, de vésicules ou encore de particules ribonucléoprotéiques grâce aux protéines motrices cargo kinésine et dynéine<sup>33</sup>, et qui nécessite de conserver une structure droite et stable. Les microtubules doivent rester rigides également pour effectuer leur fonction de cargo pour des structures plus imposantes, comme le noyau et les chromosomes<sup>34</sup>. Cet aspect est également important pour la morphologie

cellulaire, et plus particulièrement pour la formation d'extensions cellulaires comme les neurites et les axones<sup>35</sup>.

## II) Les réseaux des microfilaments et leur *turnover*, ou le jeu du yin et du yang

Dans cette partie, je vais détailler plus précisément les différentes structures du réseau actine, que l'on pourra retrouver dans les cellules eucaryotes, ainsi que leur régulation par différents régulateurs.

Nous avons vu dans la section précédente ce qu'étaient les microfilaments, la structure du polymère simple et sa régulation au niveau de l'assemblage des monomères. Si l'on observe l'actine au niveau cellulaire dans sa globalité, la réalité est largement plus complexe. En effet, l'actine filamentaire existe sous différents types de réseaux (divergent par leur structure, la ramification des filaments, ou encore le maillage), soutenant différents événements ou fonctions cellulaires et mettant en jeu différents acteurs protéiques.

La dynamique du cytosquelette d'actine est le résultat d'un jeu entre les événements de polymérisation et dépolymérisation, et la rapidité de ces événements : c'est ce que l'on va appeler le *turnover* de l'actine. La nucléation spontanée des microfilaments est faible et est rapidement bloquée par des protéines de *capping*. L'aide d'autre protéine (les protéines de nucléations) est alors nécessaire pour permettre la polymérisation des microfilaments. Les partenaires protéiques des monomères d'actine ainsi que des filaments vont réguler la proportion de monomères disponibles, mais également le turnover des microfilaments. On ne parlera dans cette partie que des protéines liant directement l'actine (*Actin-binding proteins*, ou ABP).

### 1. Les partenaires protéiques des monomères d'actine

Les cellules eucaryotes des organismes supérieurs (e.g. les mammifères) expriment deux protéines majeures maintenant une réserve d'actine globulaire dans le cytoplasme : la profiline et la thymosine  $\beta$ 4.

La profiline a une grande affinité pour les complexes ATP-actine, et compte tenu de la forte concentration cytoplasmique de profiline, la plupart des monomères d'actine non polymérisés vont être associés à la profiline. La profiline va se lier à la partie *barbed end* de l'actine globulaire et filamentaire. La liaison de la profiline aux monomères va empêcher la nucléation de l'actine. Cependant, la capacité de liaison aux complexes ATP-actine filamentaire de la partie *barbed end* est beaucoup plus faible. Cela va alors engendrer une libération de la profiline, permettant ainsi l'élongation du filament. La profiline va également agir sur l'affinité de l'ADP pour les monomères d'actine. En effet, la profiline va catalyser l'échange de nucléotide en dissociant l'ADP des monomères d'actine et permettre la liaison avec une nouvelle molécule d'ATP.

La thymosine  $\beta 4$  fait partie de la famille des thymosines  $\beta$ . Elles ont été pour la première fois décrites dans le thymus, d'où elles tirent leur nom, et ne sont présentes que chez les mammifères<sup>36,37</sup>. Même si la famille comporte plus de 16 protéines, seulement 3 sont exprimées chez l'humain : les thymosines  $\beta 4$ ,  $\beta 10$  et  $\beta 15$ <sup>38</sup>. La thymosine dont nous allons parler plus particulièrement ici est la thymosine  $\beta 4$ . Cette protéine a la capacité, comme la profiline, de se fixer à la partie *barbed end* des monomères d'actine, mais également à la partie *pointed end*<sup>37,39</sup>. Ceci est permis grâce à sa structure comportant une extension protéique, lui apportant une conformation 3D dynamique et flexible<sup>39</sup>. Cette conformation permet à sa deuxième hélice  $\alpha$  d'atteindre le côté opposé du monomère d'actine. Contrairement à la profiline qui permet toujours aux monomères d'être engagé dans la polymérisation d'un polymère, la thymosine  $\beta 4$  séquestre les monomères, empêchant ainsi leur engagement dans tout processus de polymérisation.

Ces deux protéines vont donc maintenir une réserve d'actine monomérique dans le cytoplasme, la thymosine  $\beta 4$  en prévenant la liaison de monomères d'actine à un filament en cours de formation, la profiline en permettant uniquement la polymérisation du côté *barbed end* du polymère<sup>39</sup>.

## 2. Protéines impliquées dans le découpage et la dépolymérisation

La dépolymérisation implique le désassemblage des monomères d'actine constituant les filaments. Cela va passer par des étapes de découpage (ou *severing*), permises grâce à des protéines de découpage des microfilaments (ou *actin filament-severing proteins*). Ce découpage en de petits complexes polypeptidiques va être permis grâce à certaines protéines, telles que les protéines de la famille

ADF/cofiline, la protéine WDR1, les protéines de la famille des gelsolines, mais également deux formines (FRL- $\alpha$  et INF-2).

#### a. La famille ADF/Cofiline

L'ensemble des cellules eucaryotes expriment au moins un membre de la famille *actin-depolymerizing factor* (ou facteurs dépolymérisant l'actine) ou ADF/cofiline<sup>42</sup>. Cette famille comprend notamment la cofiline (cofiline-1 pour les cellules non-musculaires, et cofiline-2 pour les cellules musculaires) et l'ADF, aussi nommée destrine. Les protéines appartenant à cette famille le sont de par leur homologie de séquence (70% d'homologie entre chacune des protéines de la famille)<sup>40</sup>. Un concept intéressant à souligner est que bien que la cofiline ait un rôle de *severing*, donc de découpage des filaments, elle participe indirectement à la polymérisation de nouveaux brins libres. Cela se passe du côté *barbed end* des filaments qui, dans le cas où ils ne sont pas protégés par une protéine de *capping*, vont servir de base à de nouveaux évènements de polymérisation.

Les protéines ADF/cofiline ont la capacité de se lier aux monomères d'actine ou aux microfilaments par l'extrémité *barbed end* et d'exercer une activité de *severing*<sup>41,42</sup>. Fixées aux monomères d'actine, elles vont empêcher l'échange nucléotidique, processus toutefois avorté par la présence de la profiline. En effet, l'étude de Blanchoin et Pollard a démontré que l'actophorine, protéine membre de la famille ADF/cofiline exprimée dans les amibozoaires, entrait en compétition avec la profiline, dont l'affinité pour l'actine monomérique est plus forte que les protéines ADF/cofilines<sup>43</sup>.

Les protéines ADF/cofilines possèdent une affinité plus importante pour les complexes ADP-actine et dans une moindre mesure, les complexes ADP-Pi-actine. Elles vont donc attendre l'hydrolyse de l'ATP par les sous-unités d'actine présentes dans le filament pour pouvoir se fixer aux complexes ADP-actine. Néanmoins, leur capacité à se lier aux complexes ADP-Pi-actine permet un relargage plus rapide du phosphate  $\gamma$ , augmentant la proportion de sous-unités lié à un ADP, et induit donc un *turnover* plus rapide des microfilaments. Un fait intéressant est que le découpage des filaments ne s'effectue qu'en présence d'une concentration modérée d'ADF/cofiline, la saturation des microfilaments par ces protéines entraînant leur stabilisation.

L'activité de *severing* de la cofiline va être régulée par les kinases LIM, qui vont phosphoryler la sérine 3, empêchant ainsi la liaison de la cofiline à l'actine. Les protéines Slingshots (SSH1 et SSH2, démontré par les études des équipes de Mizuno et Uemura<sup>44-46</sup>) et la chronophine<sup>47</sup> sont les phosphatases permettant à la cofiline de retrouver une activité de *severing*.

Les deux formes des cofilines et la protéine ADF sont les protéines jouant un rôle majeur parmi la famille protéine ADF/Cofilines<sup>13</sup>. Il existe cependant d'autres protéines de cette famille jouant un rôle dans l'activité de *severing* des microfilaments. On va ainsi retrouver par exemple la twinfiline, protéine possédant deux domaines homologues à l'ADF (*ADF-homolog (ADF-H) domain*) qui va se lier aux *barbed ends* de l'actine monomérique et filamentaire, prévient la polymérisation, et induit la dissociation des sous-unités<sup>13,48</sup>.

#### b. La protéine WDR1

La protéine WDR1 (*WD-repeat domain protein 1*) est aussi appelée AIP1 pour *actin-interacting protein 1*. Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules eucaryotes et a été découverte en 1999 pour sa capacité à se lier à l'actine<sup>49</sup>. Elle fait partie d'une famille protéique comportant des domaines WD répétés (*WD-repeat domains family*), qui tire son nom de la répétition de motifs composés d'une quarantaine d'acides aminés, terminés par un dipeptide de tryptophane (W) et d'acide aspartique (D). Ces domaines se répètent entre 4 et 16 fois selon les protéines, arrangés en  $\beta$ -*propeller* (arrangement de 4 à 8 feuillets  $\beta$ ). Dans le cas de WDR1, la protéine est composée de sept  $\beta$ -*propeller* circulaires<sup>50</sup>.

Il a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* que WDR1 interagit avec la cofiline mais, également avec l'actine<sup>51-53</sup>. En effet, ces études ont permis de démontrer la présence de deux sites de liaison à l'actine dans la séquence de WDR1 dans les *propellers* situés aux extrémités C- et N-terminales, ainsi que le site de liaison à la cofiline, potentiellement situé entre les deux sites d'actine. D'autres investigations ont permis de décrire que WDR1 agit en coopération avec les protéines de la famille ADF/cofiline pour participer au désassemblage des filaments d'actine<sup>54-58</sup>.

La protéine WDR1 est également régulée, tout comme les protéines de la famille ADF/Cofiline, par des kinases (de la famille des Src) et au moins une phosphatase (la protéine EYA3)<sup>59</sup>. Cette étude a démontré que la tyrosine Y238 était nécessaire à l'activité de la protéine WDR1. Cependant, cet

évènement n'est pas l'unique élément modulateur de l'activité protéique, puisque d'autres sites de phosphorylation peuvent moduler l'activité de dépolymérisation de WDR1.

### c. Autres partenaires protéiques

**La caspase 11.** Une étude menée par l'équipe de J. Yuan chez la souris a permis de décrire un rôle de la caspase 11 dans le processus de désassemblage des microfilaments<sup>60</sup>, en coopération avec WDR1 dans des splénocytes et leucocytes. Deux autres études ont cependant décrit un rôle différent dans les monocytes/macrophages. En effet, dans un contexte d'infection bactérienne, la caspase 11 aurait un rôle modulateur de la dynamique des filaments d'actine en influant, entre autre, la phosphorylation de la cofiline<sup>61,62</sup>, induisant ainsi un arrêt de la dépolymérisation des microfilaments. Les différences entre ces études pourraient être dues à des cascades de signalisation différentes selon le contexte. La caspase 11 n'étant pas exprimée chez l'homme, ce sont les caspases 4 et 5 (caspases orthologues) qui possèdent les fonctions de la caspase 11 murine. Cependant le rôle de ces caspases sur la dynamique d'actine dans les cellules humaines n'est toujours pas élucidé.

**Les protéines de la famille de gelsolines.** La gelsoline et certains membres protéiques de sa famille vont avoir une activité de découpage des filaments. La gelsoline existe sous une forme d'autoinhibition (c'est-à-dire qu'elle n'est pas active sous une certaine conformation 3D). Sous l'effet d'un flux calcique, sa conformation va être modifiée, permettant l'accès aux sites de liaison à l'actine. La liaison à l'actine va se faire grâce à ces domaines gelsoline situés sur des longues hélices  $\alpha$ , induisant le découpage de morceau de filaments l'actine. La gelsoline restera ensuite attachée du côté *barbed end* de ces petits polypeptides d'actine.

**Les formines FRL- $\alpha$  et INF2.** Ces protéines ont de nombreux rôles concernant la dynamique des microfilaments, mais je ne me concentrerai dans cette partie que sur leur activité de *severing*. La protéine FRL- $\alpha$  a été la première formine identifiée comme possédant une activité de *severing ex vivo*, notamment en démontrant la capacité de FRL- $\alpha$  à couper les filaments d'actine<sup>63</sup>. L'étude de l'équipe de Higgs<sup>64</sup> a démontré que la protéine INF2 va ouvrir son domaine FH2 (*formin homogy 2 domain*) pour



encercler les microfilaments, et va induire le découpage des filaments en fonction du relargage des phosphates  $\gamma$ .

### 3. Protéines impliquées dans le *capping* des filaments

Les protéines de *capping* vont se situer au côté *barbed end* des microfilaments, là où la polymérisation est la plus rapide. L'attachement de ces protéines va agir comme un chapeau, et stopper la dynamique des microfilaments en bloquant l'ajout ou le retrait des sous-unités des monomères d'actine<sup>65</sup>.

Les éléments protéiques qui vont permettre l'élongation des microfilaments vont réguler de manière indirecte la protéine de *capping* en entrant en compétition pour les sites de liaison du côté *barbed end*<sup>65</sup>. Les protéines de *capping* sont actives de manière constitutive mais sont régulées par des protéines contenant un domaine de liaison aux protéines de *capping*, comme la protéine CARMIL<sup>65</sup>. Par ailleurs, d'autres molécules comme le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) ou encore V-1 (myotrophine) vont inhiber directement la protéine *capping* en se liant avec elle, l'empêchant ainsi d'interagir avec les filaments. Il est important de noter que certaines protéines de *capping* permettent de stimuler la formation de nouveaux filaments, ou au contraire le *severing* des filaments. Ceci est le cas des gelsolines, précédemment citées pour leur capacité de découpage des microfilaments, qui sont avant tout connues pour leur activité de *capping*<sup>66</sup>. Les protéines de *capping* hétérodimériques, qui sont formées de deux sous unités homologues, se lient avec une forte affinité aux filaments d'actine et promeuvent la nucléation de nouveaux *pointed ends* en stabilisant les oligomères d'actines. On pourra également retrouver la tropomoduline qui interagit avec les filaments d'actine stable comme par exemple dans les cellules musculaires ou encore les globules rouges. Cette protéine agit en synergie avec la tropomyosine, une protéine interagissant tout le long des filaments d'actine.

### 4. Protéines impliquées dans la nucléation et polymérisation des filaments

#### a. Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est un complexe protéique constitué de sept sous-unités : ARPC1 (*actin-related protein complex 1*), ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARP2 et ARP3. Ce complexe a été identifié pour la première fois dans une amibe (*Acanthamoeba castellanii*)<sup>67</sup> et depuis isolé dans différents organismes tels que les levures et les vertébrés<sup>68</sup>. Chez l'humain, la sous-unité ARPC1 existe sous deux isoformes, ARPC1A et ARPC1B (la deuxième étant essentiellement exprimée dans les cellules hémo-poétiques), et est constituée d'une répétition de domaine WD (tout comme la protéine WDR1). Le complexe Arp2/3 ne permet cependant pas de former de nouveau filament de novo. L'intervention de facteur de nucléation (NPF, ou *nucleation promotion factor*) ainsi que d'un brin d'actine déjà existant (brin mère) est nécessaire à la formation d'un nouveau brin fille, dont l'embranchement s'effectue selon un angle à 70°<sup>69,70</sup>. De nombreuses protéines ont été décrites comme des facteurs de nucléation, mais les protéines les plus étudiées font partie de la famille de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (famille WASP)<sup>71</sup>.

L'activation du complexe Arp2/3 passe par un changement de conformation. Le complexe est inactif à l'état basal, et son activation va lui permettre de se lier aux filaments mères d'actine. Cette activation est médiée par plusieurs facteurs, tels que les NPFs<sup>67,72</sup>, le filament mère<sup>73</sup> ainsi que par l'ATP<sup>74</sup> qui vont se lier au complexe et induire un changement de conformation. Il existe différents types de NPFs, classés en deux catégories selon leur mode d'activation du complexe Arp2/3 et de l'effet sur la capacité de branchage des filaments. L'interaction de Arp2/3 avec les NPFs de classe 1 promeut un changement de conformation du complexe et permet son interaction avec un monomère d'actine. Cette succession d'événements permet l'embranchement d'un brin d'actine sur le brin mère. L'interaction avec des NPFs de classe 2 vont quant à eux permettre une meilleure stabilisation des nouveaux filaments polymérisés.

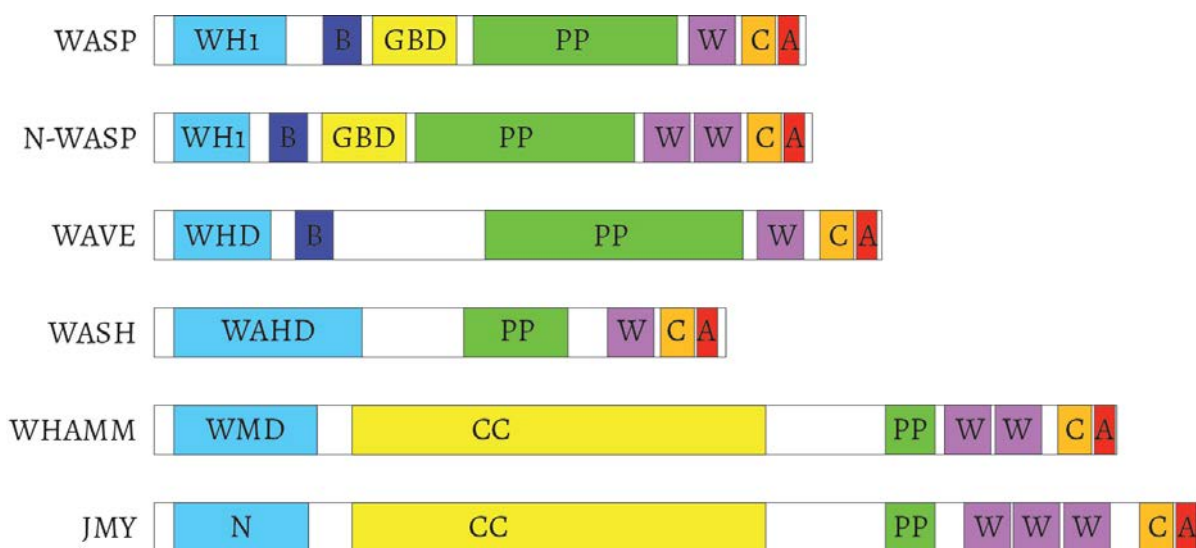


Figure 3. Domaines des protéines membres de la famille WASP. Schéma inspiré de Tyler et al 2016. WHI : WASP homology domain 1; WHD : WAVE homology domain; WAHD : WASH homology domain; WMD : WHAMM membrane interaction domain ; N : N terminal domain; B: Basic region ; GBD : GTPase-binding domain ; CC: Coiled coil region ; P : Proline rich domain; W: WASP homology-2; C: Central domain; A: acidic domain

### b. Les protéines de la famille WASP

Les protéines de la famille WASP sont des protéines qui ont été caractérisées pour leur capacité de nucléation de l'actine<sup>75</sup>. Les cellules eucaryotes des organismes supérieurs (mammifères) expriment 6 protéines appartenant à cette famille. Ces protéines sont regroupées dans une même famille du fait de leur structure protéique. En effet, leur structure du côté N-terminal varie entre les protéines leur conférant différentes capacités de régulation<sup>75</sup>. La partie C-terminale est cependant plus homogène entre les protéines, et est composée d'une région riche en proline, d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'actine homologues à WASP (WH2) ainsi que de différents motifs (domaine central – C - et un domaine acide – A) permettant la liaison au complexe Arp2/3 (voir figure 3).

#### (1) Le complexe WIP/(N)-WASP

Le gène WAS, codant pour la protéine WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), a tout d'abord été découvert comme gène causatif du syndrome de Wiskott-Aldrich<sup>76</sup>. Alors que la protéine WASP est exprimée exclusivement dans les cellules hématopoïétiques, la protéine N-WASP (*neural WASP*) est exprimé de manière ubiquitaire (avec cependant une très faible expression dans les cellules hématopoïétiques). Ces deux protéines possèdent des fonctions similaires et leur structure est pratiquement identique (la protéine N-WASP possède un domaine WH2 supplémentaire). La protéine (N)-WASP possède un domaine WH1 (domaine basique) lui permettant d'interagir avec la protéine WIP<sup>77,78</sup> (*Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein*), protéine chaperonne bloquant la dégradation de WASP<sup>79,80</sup>.

Les protéines (N)-WASP sont présentes principalement sous une forme auto-inhibée dans le cytoplasme, où son domaine VCA interagit avec le domaine GBD (*GTPase-binding domain*). Ce même domaine peut lier la Rho GTPase CDC42, permettant l'ouverture de la conformation de WASP. Ce changement de conformation expose certaines tyrosines dont la tyrosine 291, a des évènements de phosphorylation, évènement clé dans l'activation de la protéine WASP<sup>81</sup>. Une étude *in vitro* a montré également qu'une sérine du domaine VCA (les sérines 483 et 484 pour la protéine WASP et N-WASP respectivement) est également phosphorylée, par la kinase caséine 2, augmentant l'affinité de la protéine WASP pour le complexe Arp2/3<sup>82</sup>. La succession de ces évènements de phosphorylation va permettre à la protéine de sortir de son état d'auto-inhibition et d'être activée de manière optimale. Il a été également démontré que la fixation de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P(2)) sur le domaine GBD<sup>83</sup> de la protéine N-WASP était importante pour promouvoir l'activité de nucléation de la protéine. De manière intéressante, il a été démontré que pour certaines protéines de la famille WASP (comme WAVE que l'on verra dans la section suivante), en plus de l'allostérie, les protéines sont régulées par un état de dimérisation : en effet, l'étude menée par l'équipe de M.K. Rosen décrit que la dimérisation des protéines actives WASP et WAVE1 augmente l'affinité du domaine VCA pour le complexe Arp2/3 de 100 à 180 fois, comparée à un monomère<sup>84</sup>.

Comme cité précédemment, la protéine WIP interagit avec la protéine WASP, et plusieurs études ont montré son importance pour la maintenance de la protéine WASP dans le cytoplasme<sup>79,85</sup>. La majorité des molécules WASP sont d'ailleurs associées à une molécule WIP, permettant de maintenir la protéine WASP disponible. La perte de la protéine WIP induit effectivement la perte de l'expression protéique de WASP, perte réversible par traitement avec des inhibiteurs du protéasome

ou de la calpaine<sup>79</sup>. Cependant, l'effet de l'activation de WASP sur la capacité de liaison de WIP au domaine WH1 reste encore à élucider.

### (2) Les complexes WAVE1, WAVE2 et WAVE3

Les protéines de la famille WAVE (*WASP-family verprolin-homologous*) forment un complexe hétéropentamérique nommé WRC (*WAVE regulatory complex*) composé des protéines WAVE1 (ou ses orthologues WAVE2 et WAVE3), Abi2 (et ses orthologues Abi1 et Abi3), Nap1 (ou ses orthologues comme Hem1), Sra1 (et orthologues) et HSPC300<sup>86-88</sup>. Il existe donc plusieurs complexes WRC, résultant de combinaison protéiques différentes<sup>89</sup>. En réponse à certains signaux, le complexe WRC va être recruté à différents points de la membrane<sup>90</sup>.

Tout comme la protéine WASP, le complexe WRC est présent dans le cytoplasme sous forme auto-inhibée<sup>91-93</sup>. En effet, le domaine VCA est séquestré via de multiples interactions entre les hélices des domaines V et C et les hélices des protéines Sra1 et WAVE<sup>92</sup>. Il va être activé par la Rho GTPase Rac1, induisant un changement de conformation du complexe, qui va permettre la libération du domaine VCA (présent sur la protéine WAVE), interagissant avec le complexe Arp2/3 pour former de nouveaux filaments. C'est la disponibilité spatiale du domaine VCA qui va réguler l'activité du complexe WRC.

Il a été démontré dans plusieurs études que la protéine Rac1 interagissait avec le complexe WRC pour permettre l'activation du complexe<sup>88,92,94</sup>. Deux études ont déterminé que la protéine Rac1 se liait à deux sites de liaison du complexe WRC, tous deux situés sur la protéine Sra1<sup>87,92</sup>. Rac1 n'est cependant pas le seul régulateur du complexe WRC. En effet, d'autres protéines telles que la GTPase Arf1<sup>95</sup>, ou encore les phosphatidylinositols (3,4,5)-triphosphate [PI(3,4,5)P3]<sup>93</sup> vont être nécessaires pour l'activation complète du complexe WRC. Si les GTPases Rac1 et Arf1 peuvent en effet interagir avec le complexe WRC de manière indépendante, les deux sont nécessaires pour le recrutement efficace et stable à la membrane du complexe.

### (3) Autres protéines de la famille WASP

Les 3 autres protéines membres de la famille WASP sont WASH, WHAMM et JMY. Ces protéines se distribuent dans des localisations cellulaires spécifiques et ont *a fortiori*, des implications mécanistiques spécifiques. La protéine WHAMM, régulée par Rab1<sup>96</sup> *in vitro*, va notamment réguler la nucléation de l'actine et est localisée au niveau du compartiment ERGIC<sup>97</sup> (*endoplasmic reticulum -Golgi*

*intermediate compartment*). Ce recrutement membranaire est contrôlé par Rab1<sup>96</sup>. De manière intéressante, selon ses interactions, la protéine WHAMM va pouvoir promouvoir la déformation des membranes<sup>98</sup> (via l'interaction simultanée avec les liposomes et les microtubules) et ou encore permettre l'élongation des tubules membranaires<sup>97</sup> (en interagissant avec le complexe Arp2/3).

La protéine JMY va permettre de générer des filaments d'actine branchés (via son interaction avec Arp2/3) ou non branchés grâce à ses domaines WH2 positionnés en tandem. En plus de sa localisation particulièrement au front de migration, la protéine JMY a la capacité, sous condition de stress comme le dommage à l'ADN, de se transloquer dans le noyau pour permettre l'expression de gènes dépendant de la protéine p53.

La protéine WASH se rapproche des protéines WAVES de par sa structure et conformation, puisqu'elle s'organise également sous forme d'un complexe pentamérique hétérogène<sup>99</sup>. La particularité de la protéine WASH est qu'elle exerce, en plus de son activité de nucléation, une activité de régulation du trafic membranaire de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ <sup>100</sup> ( $\alpha 5 \beta 1$ ) et est impliquée dans le processus de la fission vésiculaire<sup>101-103</sup> (processus que je détaillerai plus tard).

### c. Les formines

Les formines sont des protéines homodimériques caractérisées par un domaine FM2 (*formin homology domain 2*) qui interagit avec le côté *barbed end* des monomères d'actine. Ce sont des protéines recrutées et activées à des localisations cellulaires diverses et vont initier de nouveaux brins d'actine non branchés. Les formines (les plus représentées étant les *Diaphanous related formins* – ou DRF) possèdent différents domaines protéiques, tels qu'un domaine GBD (*GTPase-binding domain*) situé du côté N terminal, un domaine adjacent DID (*Diaphanous inhibitory domain*) et un domaine DAD (*Diaphanous autoregulatory domain*) situé au côté C terminale de la protéine. La plupart des formines possèdent également un domaine FH1, permettant la liaison à la profiline et sont présentes sous une forme autoinhibée (via l'interaction entre les domaines DAD-DID). Seule l'action d'une Rho GTPase<sup>104</sup> (RhoA, CDC42<sup>105,106</sup>, Rac1 ou Rif<sup>107</sup>) lève cette auto inhibition.

Les formines vont pouvoir interagir avec des monomères d'actine libre via les domaines FH2 : les dimères FH2 vont s'organiser en un anneau anti parallèle, leur conférant une forte affinité pour le côté *barbed end* des filaments d'actine, chaque moitié de dimère possédant un site de liaison à l'actine.

Du fait de la diversité des formines, leurs mécanismes d'action sur la nucléation de l'actine sont encore à ce jour en cours d'investigation. Différents modèles ont cependant été proposés. Des études *in vitro* ont supposé une nucléation par capture des dimères d'actine, se formant de manière spontanée, en présence de la seule formine. Plus tard, il a cependant été démontré que la région C terminale des formines lie des monomères d'actine, et que la liaison de la profiline pouvait permettre l'accélération du phénomène d'élongation des filaments d'actine *in vivo*. Divers facteurs d'activation (et ligands) ont pu être décrits comme jouant un rôle plus ou moins important sur l'affinité ou la promotion de la nucléation. Les formines vont permettre également l'élongation des filaments en les protégeant notamment des protéines de *capping*.

Les formines vont, en plus que l'activité de polymérisation des microfilaments, avoir d'autres activités annexes, comme la régulation des microtubules<sup>108</sup> (en interagissant via les domaines FH1 et FH2), le regroupement de l'actine en faisceau (ou *actin bundling*)<sup>63,109</sup> mais également le découpage (*severing*) et/ou la dépolymérisation des microfilaments<sup>104</sup> comme cité précédemment.

#### 5. Protéines de *crosslinking*

Les connexions entre les microfilaments sont permises grâce à des protéines de *crosslinking* et sont importantes pour certaines structures d'actine (les filaments cytoplasmiques d'actine) et certaines modifications membranaires (microvilli, filopodes)<sup>110,111</sup>. Ces connexions sont permises grâce à deux domaines ABD (*actin-binding domains*) présents sur une protéine (ou complexe multiprotéique) permettant ainsi une interaction entre deux filaments distincts<sup>112</sup>. On va ainsi pouvoir retrouver la fascine, la fimbrine, l' $\alpha$ -actinine, la spectrine, ou encore la dystrophine et les filamines. Par leurs différences de conformation 3D et la location de leurs domaines ABD, chaque protéine va raccorder les filaments d'actine de manière spécifique, et va avoir une localisation cellulaire précise. L' $\alpha$ -actinine va par exemple être retrouvée au niveau du réseau d'actine cortical, disposée entre les fibres de stress, mais également sur les points d'adhésions cellulaire<sup>110</sup>.

D'un autre côté, la filamine permet de *crosslinker* les filaments d'actine de manière non parallèle au niveau du cortex, et possède également un rôle d'ancrage. En effet, elle va notamment permettre l'ancrage des intégrines aux filaments d'actine, protéines importantes pour l'adhésion et les interactions cellulaires. D'autres protéines, comme les protéines ERM (nommées d'après les trois

premières protéines de cette famille, à savoir ezrine<sup>113</sup>, radixine<sup>114,115</sup> et moésine<sup>116</sup>) vont *crosslinker* les filaments d'actine à la membrane<sup>117,118</sup>, affectant ainsi les propriétés physiques de l'actine corticale en fonction de la densité de ces protéines. Les protéines ERM sont principalement régulées par un changement de conformation<sup>119</sup>.

Les myosines sont également extrêmement importantes pour leur rôle dans la contractilité cellulaire<sup>120,121</sup>. Cette superfamille comporte plusieurs protéines regroupées en classe et impliquées dans des voies de signalisation distinctes. Les myosines possèdent des sites de liaison à l'ATP, dont sa liaison (ou la liaison de l'ADP) diminue très fortement leur affinité pour l'actine. Les myosines vont avoir des localisations distinctes en fonction de leur type et de leur présence dans une cellule musculaire ou non musculaire. Dans une cellule musculaire, la myosine II musculaire va se multi dimériser pour former un large filament bipolaire composé d'une douzaine de molécules et va se situer au milieu du sarcomère, constitué de filaments d'actine. La capacité de contractilité du complexe actomyosine est impliquée dans plusieurs dizaines d'évènements cellulaires<sup>122</sup>. Cette capacité est fortement influencée par la qualité de *crosslinking* des filaments d'actine en faisceaux<sup>123</sup>. Les myosines sont également importantes pour le cytokinèse, les cargos protéiques ou encore la formation de protrusions<sup>121</sup> (que nous verrons dans la prochaine section).

## 6. La régulation de l'actine par les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

De manière intéressante, le stress oxydatif induit par les espèces réactives de l'oxygène n'a pas qu'un rôle destructeur au sein de la cellule, mais peut agir sur la régulation de l'actine, en induisant des modifications post traductionnelles (voir revue par Varland et al)<sup>124</sup>. Les ROS sont des sous-produits de régulation redox mais sont activement produites par les cellules capables de phagocytose (processus abordé dans la section II), et comportent le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), acide hypochlorique (HOCl) ou encore les espèces réactives azotées comme l'oxide nitrique (NO)<sup>125</sup>. L'actine globulaire possède plusieurs sites susceptibles d'être oxydé/modifié par les ROS (méthionines, cystéines, tyrosines et histidines). La cystéine 374 (Cys374) est la cystéine la plus touchée par l'action des ROS.

Le stress oxydatif induit par les ROS peut induire des ponts disulfures intramoléculaire ou des ponts disulfures avec une molécule de glutathion. La Cys374, sous l'action des ROS, peut former un pont disulfure avec la cystéine 285, induisant un délai dans la dissociation de l'actine avec la spectrine<sup>126</sup>



et diminuant la dynamique de l'actine<sup>127</sup>. Une S-glutathionylation peut également s'effectuer sur la Cys374, processus qui se révèle crucial pour la dissociation de l'actine avec la myosine, permettant ainsi la contractilité cellulaire nécessaire pour la migration, l'étalement cellulaire et la formation des fibres de stress<sup>128</sup>. Le NO va modifier la Cys374 par S-nitrosylation (ajout d'une molécule NO) ce qui aura pour conséquence un défaut de liaison de la profiline-1 avec l'actine, induisant ainsi un défaut de polymérisation des microfilaments<sup>129</sup>. Les espèces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et HOCl vont oxyder la Cys374, ainsi que d'autres cystéines et méthionines qui sont les acides aminés les plus exposés de l'actine globulaire, même une fois celle-ci intégrée dans un filament<sup>130</sup>. Il existe d'autres modifications comme l'intégration d'un groupe nitro NO<sub>2</sub> sur la tyrosine 294<sup>131</sup> ou la carbonylation de certaines histidines<sup>132,133</sup>. Ces modifications perturbent la polymérisation des microfilaments et déstabilisent les faisceaux d'actine<sup>124</sup>. Certaines flavoprotéines monooxygénases, telles que les enzymes MICAL (*Molecule Interacting with CasL*), utilisent le NADPH et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour oxyder les méthionine 44 et 47 de l'actine<sup>134</sup>. Dans le cas de la protéine MICAL, elle se fixe sur les filaments d'actine pour augmenter la capacité catalytique des sous unités d'actine. Via l'oxydation des met44/47, elle va initier le désassemblage des filaments en induisant une modification conformationnel de l'actine et augmentation la sensibilité de l'actine pour la cofiline<sup>135</sup>.

Il est important de noter que lorsque le stress oxydatif est trop important, cela conduit à des modifications irréversibles des sites sensibles. Ce fort stress oxydatif va induire une accumulation de la carbonylation, induisant des agrégats d'actine<sup>136</sup>. Ces modifications irréversibles inhibent la prolifération, la mobilité et la viabilité cellulaire.

### III) Les structures d'actine et compartiments cellulaires

Les différents partenaires protéiques de l'actine ainsi que les multiples régulateurs cités précédemment vont permettre la formation de différentes structures et réseaux d'actine (réseau branché ou parallèle, fibres des stress, etc...). Ces différentes structures vont permettre aux cellules d'adopter différentes morphologies et d'assurer leur fonction selon le contexte biologique et le type cellulaire.

## 1. L'organisation de l'actine au sein de la cellule

### a. Les différents réseaux d'actine

#### (1) L'actine corticale

L'actine corticale compose le réseau d'actine situé sous la membrane plasmique. C'est un réseau dense de microfilaments organisé en deux types de machineries : protrusive et contractile. La machinerie contractile va être composée de longs filaments initiés et assemblés par les protéines de type formines, associés à la myosine II. En ce qui concerne la machinerie protrusive, elle est associée au complexe Arp2/3, permettant une orientation variée de filaments d'actine plutôt courts.

Bien que la première fonction de l'actine corticale soit la maintenance d'une morphologie cellulaire, le changement local de la composition protéiques va induire des contractions et donc des déformations cellulaires permettant d'induire par exemple la migration : les forces contractiles à la queue de la cellule vont être plus fortes, permettant la rétractation du corps cellulaire.

#### (2) Fibres de stress et points focaux d'adhésions

Les fibres de stress sont, avec les points focaux d'adhésions, des structures qui produisent, transmettent et sentent des forces mécaniques. Les fibres de stress sont des faisceaux d'actomyosine (de 10 à 30 filaments d'actine reliés entre eux) et ont un rôle central d'adhésion cellulaire et la morphogénèse. Ce sont des structures que l'on va retrouver dans les cellules épithéliales, endothéliales et dans les myofibroblastes. Toutes les fibres de stress ne ressemblent pas et sont ainsi classées en 4 catégories distinctes. Les fibres de stress dorsales sont ancrées à un point d'adhésion focal, cependant elles ne sont pas associées à la myosine II et n'ont donc pas d'activité contractile. Les fibres de stress ventrales sont composées de faisceaux d'actomyosine et sont les fibres représentant la force contractile majoritaire, du fait de leur ancrage aux deux extrémités à des points focaux d'adhésion. Les arcs transversaux sont des faisceaux de filaments d'actine incurvés associés à l' $\alpha$ -actinine et myosine II,

association typique des faisceaux contractiles d'actomyosine. Ils ne sont pas attachés à des points focaux d'adhésion mais sont au contraire rattachés aux fibres de stress dorsales, leur conférant une certaine activité de contractilité. Enfin on va retrouver des fibres périnucléaires, dont le principal rôle va être de réguler la morphologie du noyau durant l'interphase. Les points focaux d'adhésions sont retrouvés le plus souvent au niveau des extrémités des fibres de stress et sont le lien avec la matrice extracellulaire.

## b. L'actine associée aux organelles et compartiments cellulaire

### (1) Mitochondrie

Les mitochondries sont des organelles hautement dynamiques ayant une grande capacité de mouvement dans le corps cellulaire et alternant les évènements de fission (division d'une organelle en deux ou plusieurs structures indépendantes) et de fusion (évènement inverse)<sup>137</sup>. Ce sont des organelles qui soutiennent plusieurs fonctions cellulaires telles que la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), synthèse de lipides ou encore la génération d'ATP<sup>138</sup>. Selon les fonctions qu'elles exercent, elles vont pouvoir modifier leur architecture rapidement, qui va dépendre de plusieurs facteurs dont leur association avec le cytosquelette d'actine.

En effet, l'actine va jouer un rôle important dans la régulation des mitochondries, mais également sur leur mobilité (via la myosine XIX<sup>139</sup>), leur ancrage aux filaments d'actine (via les myosines V et VI<sup>140</sup>) ou encore leur fission. La fission est effectivement dépendante de plusieurs facteurs dont différents régulateurs d'actine. La principale protéine induisant la fission des mitochondries est la protéine Drp1, dont l'actine permet d'augmenter son activité<sup>141</sup>. Différents travaux ont pu déterminer que l'actine intervenait sur plusieurs étapes de la fission mitochondriale. Tout d'abord, le complexe Arp2/3 a été décrit comme étant important pour le recrutement de la protéine Drp1 à la membrane externe mitochondriale<sup>142</sup>. L'absence d'autres régulateurs tels que la cortactine ou la cofiline induit une mauvaise connexion ER/Mitochondrie, arguant ainsi leur importance dans le processus de fission<sup>142</sup>. Par la suite, les interactions ER/Mitochondrie nécessaires à la fission ont montré être dépendant de la formine INF2<sup>143</sup> en association avec la protéine mitochondriale Spire1C<sup>144</sup>.

### (2) Endosomes

Les endosomes, compartiments cytoplasmiques, sont entourés de structure d'actine dont la polymérisation est contrôlée principalement par le complexe WASH. Ce sont des lieux d'échange où une myriade de protéines transmembranaires aussi nommées cargos vont être recyclés (via le transport tubulo vésiculaire) ou bien être envoyés vers les lysosomes pour y être dégradés<sup>145</sup>.

Cette actine endosomale va avoir pour rôle de réguler la mobilité des protéines cargo. En effet, le complexe WASH va s'associer aux endosomes en interagissant avec la protéine VPS26 (protéine du complexe rétromère, important pour le recyclage des protéines) via la protéine FAM21, et va être régulé par des processus de polyubiquitylation par l'ubiquitine ligase TRIM27<sup>103,146</sup>. La modification de l'activité de TRIM27 ou du complexe WASH induit un défaut du trafic des protéines cargos. Dans un second temps, la cortactine va pouvoir être recrutée au niveau des endosomes via les filaments d'actine précédemment généré par les complexes WASH et Arp2/3<sup>145</sup>. Par ailleurs, le complexe WASH va être impliqué dans l'organisation des sous domaines de récupération des cargos en regroupant les molécules rétromères via la protéine FAM21 et en interagissant avec plusieurs protéines associées au rétromère<sup>101</sup>. Tout comme pour les mitochondries, après avoir stabilisé la formation de tubules endosomales, les microfilaments nucléés par WASH vont exercer une force induisant la fission membranaire des transporteurs endosomaux<sup>102</sup>. Dans un autre registre, la GTPase RhoB (localisée dans les membranes des endosomes côté cytosplasma<sup>147</sup>) impacte la distribution des endosomes, induit la formation d'un manteau d'actine autour des endosomes (bloquant ainsi leur mouvement cellulaire) via son effecteur, la formine Dia1<sup>148</sup>. La protéine endosomale RhoD avait également été décrite précédemment comme régulateur le transport des endosomes via la protéine Dia2C<sup>149</sup>.

### (3) Le réticulum endoplasmique (RE)-Golgi

Dans la section précédente j'ai pu décrire le rôle de la protéine WHAMM dans l'organisation des compartiments inter golgi-réticulum endoplasmique (RE), ainsi que le rôle du complexe WASH dans la régulation de la fission endosomale. Cette activité est permise grâce aux points de contact avec le réticulum endoplasmique et encore une fois, le complexe protéique WASH va jouer un rôle prépondérant dans la formation de ces aires de contact. En effet, le RE va contacter uniquement les endosomes ayant au préalable liés le complexe WASH<sup>150</sup>. Il y a un effet rétroactif du RE notamment par l'interaction des protéines VAPs (protéines du RE) avec une protéine du rétromère sur l'activité de WASH<sup>151</sup>. Les microtubules sont les polymères du cytosquelette qui vont jouer un rôle majeur dans le

transport et la morphologie du RE<sup>152</sup>, cependant quelques études ont pu démontrer un rôle de la filamine dans l'étalement endoplasmique<sup>153</sup>. Dans les cellules neuronales, la myosine V permet le transport des vésicules du RE<sup>154</sup>.

L'appareil de Golgi est une structure centrale contrôlant le trafic subcellulaire et est présent dans toutes les cellules eucaryotes. Tout comme pour le réticulum endoplasmique, les microtubules et les centrosomes sont les régulateurs prépondérants, plusieurs études ont démontré un rôle conjoint des régulateurs d'actine et des microtubules dans la formation et le maintien morphologique du Golgi (via la formine FHDC1 ou la myosine 18)<sup>97,155-157</sup>.

#### (4) Le centre organisateur des microtubules (MTOC)

Le MTOC correspond dans la plupart des cellules au centrosome. Il dirige la nucléation et l'organisation des microtubules dans les cellules animales. C'est une structure importante pour plusieurs fonctions cellulaires : c'est une structure notable pour la division cellulaire ainsi que la division asymétrique des lymphocytes, l'organisation des organelles, la formation des cils ou encore la polarisation cellulaire, par exemple dans le contexte de la synapse immunologique (structure que je détaillerai plus tard)<sup>158-161</sup>.

Dans un lymphocyte en cours d'assemblage de la synapse immunologique, le centrosome va être polarisé grâce à l'action des formines diaphanous-1 et Formin-like-1<sup>162</sup>. Il a également été démontré qu'en situation de repos, il existait une structure d'actine entourant le MTOC, et que les filaments d'actine, dont la nucléation médiée par le complexe Arp2/3, permettaient de lier ce MTOC au noyau<sup>163</sup>. Ce réseau d'actine se déstructure lors de l'activation du récepteur à l'antigène du lymphocyte, permettant la polarisation du MTOC. Une étude a pu démontrer que plus la surface d'adhésion était importante, plus ce réseau centrosomal était déstructuré<sup>164</sup>, ce qui pourrait expliquer cette déstructuration en condition synaptique. Les mécanismes sous-jacents de cette régulation complexe restent peu connus à ce jour.

Il est convenu qu'il existe un lien entre les polymères d'actine et de tubuline, ainsi que le rôle régulateur des structures d'actine sur l'organisation, la stabilisation ou la localisation des microtubules<sup>165</sup>. Cependant cet échange a surtout été observé au niveau de la membrane plasmique, là où l'activité de nucléation des filaments d'actine est la plus importante. Il a été démontré plus tard que

ce *crosstalk* entre filaments d'actine et microtubules était également présent au niveau du centrosome<sup>164</sup>. L'actine présente autour du MTOC va avoir un effet inhibiteur sur la polymérisation du réseau des microtubules.

## 2. Le nucléosquelette

Le nucléosquelette décrit une structure dynamique dans le noyau. Il est constitué d'un réseau de polymères qui associe filaments intermédiaires de type V composés de lamines nucléaires, de courts brins d'actine filamentaire nucléaire et diverses protéines accessoires. Cette structure est importante puisque l'organisation spatiale des compartiments nucléaires régule la fonction de la chromatine.

### a. Les lamines

Les lamines sont, comme décrit précédemment, des protéines composants les IFs perinucléaires<sup>10,166</sup>. Il existe différents types de lamine impliquées dans les structures des IFs, chacune ayant des rôles plus spécifiques. Par exemple, les lamines de type B1 vont jouer un rôle dans la synthèse de l'ARN<sup>167</sup>. En effet, l'absence de lamine B1 réduit la chromatine active disponible, induisant une modification spatiale des territoires chromosomique et une absence d'activation des ARN polymérases de type 1 et 2. D'un autre côté, la lamine A contribue aux fonctions mécaniques du noyau, telles la rigidité et la stabilité de la morphologie nucléaire<sup>168,169</sup>. Le rôle des lamines dans les cellules immunitaires, et plus précisément de la lamine A, sera plus détaillé dans le chapitre 2.

### b. L'actine

Même si leur présence a été longuement controversé, il existe également des petits « fragments » d'actine au sein du noyau, identifiés pour la première fois via extraction nucléaire<sup>170-172</sup>, puis par microscopie électronique<sup>173</sup>. Ce sont principalement des monomères d'actine globulaire, bien que de quelques courts brins d'actine filamentaire soient présents<sup>174</sup>. Cependant leur structure est différente des filaments d'actine cytoplasmique puisqu'ils sont majoritairement sous forme de batonnets<sup>175,176</sup>. Une étude récente (voir revue par Kelsch et al<sup>177</sup>) a permis de décrire l'ensemble des

fonctions de l'actine nucléaire : ainsi ces structures d'actine sont impliquées dans la régulation de la transcription, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN et la structure du noyau. Il y a également des évidence plus récentes d'implication de l'actine nucléaire dans la réplication de l'ADN<sup>178</sup> et l'infection et réplication des adenovirus<sup>179</sup>. D'un point de vue mécanistique, la présence de l'actine est due à la translocation nucléaire d'un complexe actine/cofiline via un facteur de transport, l'importine 9<sup>180</sup>.

### c. Les protéines accessoires

D'autres protéines sont également impliquées dans la rigidité du nucléosquelette ainsi que dans ses propriétés mécaniques. Ces protéines vont interagir de manière directe ou indirecte avec les lamines et ou les monomères d'actine, et vont influencer l'organisation spatiale des lamines ou encore leurs fonctions mécaniques.

On va pouvoir retrouver la titine, protéine élastique, qui est exprimée de manière cytoplasmique<sup>181</sup> et nucléaire<sup>182</sup> dans les cellules musculaires, et est importante pour l'intégrité de l'enveloppe nucléaire<sup>183</sup>. L'enrichissement de la titine dans l'enveloppe nucléaire ainsi que la présence de multiple protéines capable de la lier nous permet de supposer que la titine pourrait être impliquée dans la stabilité, l'élasticité et les fonctions mécaniques de l'enveloppe nucléaire et des chromosomes.

Les spectrines sont importantes pour le noyau puisque leur structure flexible (grâce aux *spectrin-repeat domains*<sup>184</sup>) permet la déformation de la membrane nucléaire puis son retour à leur morphologie initiale. Les spectrines ont la capacité de se *crosslinker* avec des fragments d'actine et la protéine 4.1<sup>185</sup>. Cependant aucune étude n'a pu démontrer la présence nucléaire par microscopie de structure contenant les lamines, les spectrines, et la protéine 4.1.

La protéine NuMa (*nuclear mitotic apparatus protein*) est également abondante dans le noyau<sup>186</sup>. Une étude *in vitro* a démontré que sa structure 3D pourrait suggérer un rôle d'échafaudage permettra l'encrage des chromosomes à la membrane nucléaire et permettre leur organisation dans le noyau<sup>187</sup>. Une précédente étude avait en effet démontré que l'altération de la protéine NuMa induisait une modification de l'organisation de la chromatine et la morphologie nucléaire<sup>188</sup>.

On va également retrouver des isoformes des myosines qui pourraient jouer leur rôle de protéines motrices dans la relocalisation rapide des territoires chromosomiques pendant

l'interphase<sup>174,189</sup>. Par ailleurs, la myosine I et VI sont importantes au même titre que les bâtonnets d'actine, pour la régulation de la transcription de certains gènes régulés respectivement par l'ARN polymérase 1<sup>190</sup> et 2<sup>191</sup>.

#### d. Interaction entre le nucléosquelette et le cytosquelette

Il existe une communication entre le « squelette » du cytoplasme et celui du noyau, du fait de la translocation de certaines protéines du cytoplasme vers le noyau (le complexe cofiline/actine comme cité précédemment). Mais cette connexion s'effectue surtout via les lamines, qui vont être interconnectées à différentes protéines dans et en dehors du noyau<sup>192</sup>. Ainsi, il existe de ce fait des protéines nommées en fonction de leurs fonctions de liens entre cytosquelette et nucléosquelette : les protéines du complexe LINC<sup>193</sup>, pour *Linkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton*. Ces protéines ont été longuement décrites dans les cardiomyocytes<sup>193</sup> et cellules musculaires<sup>194</sup>, de par l'importance pour ces cellules de s'étirer puis de revenir à leur conformation initiale.

Les protéines composant le complexe LINC sont nombreuses dont les nesprines et des protéines SUN (figure 4). Il existe différents types de nesprines, ainsi que plusieurs isoformes différentes. Les isoformes les plus larges des nesprines sont localisées au niveau de la membrane nucléaire externe et vont préférentiellement interagir avec les filaments d'actine ou les microtubules<sup>195</sup>. Les formes les plus petites des nesprines (nesprin-1  $\alpha$ , et nesprin-2 $\beta$ ) vont quant à elles être localisées dans la membrane nucléaire interne et vont interagir directement avec les lamines. On va également retrouver les protéines SUN (pour *Sad1 and UNC-84*) qui se situent au niveau de la membrane nucléaire interne<sup>196</sup> et vont interagir avec des composants structurels tel que les lamines<sup>197</sup>. Les protéines SUN vont également interagir avec certaines nesprines (les formes les plus petites)<sup>198</sup>.



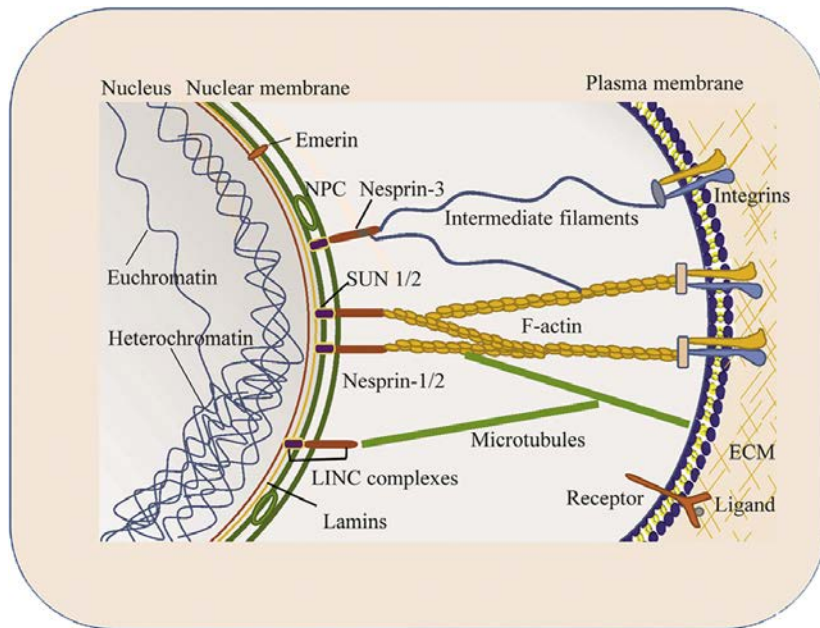


Figure 4. Nucléosquelette et les interactions avec les différents polymères cellulaires. Schéma tiré de la revue de Liu et al.<sup>199</sup>

De manière intéressante, quelques études ont démontré la présence de protéines du complexe LINC dans les cellules immunitaires<sup>200,201</sup>. L'équipe de Olins a notamment démontré qu'uniquement certaines populations immunitaires exprimaient des protéines du complexe LINC comme les macrophages, alors que d'autres granulocytes comme les neutrophiles, en ont été dépourvus<sup>202</sup>. Les rôles des différentes protéines LINC restent cependant encore bien inconnus et des études plus approfondies seront nécessaires pour les décrypter.

### 3. Les protrusions membranaires dépendantes de l'actine : moteur des cellules immunitaires

La formation de protrusions et les modifications membranaires sont des évènements essentiels à certaines cellules comme les cellulaires immunitaires puisqu'elles vont leur permettre de migrer au travers de l'organisme ainsi que d'exercer leurs fonctions cellulaires, telles que l'interaction avec les pathogènes ou cellules cibles (représentées dans la figure 5).

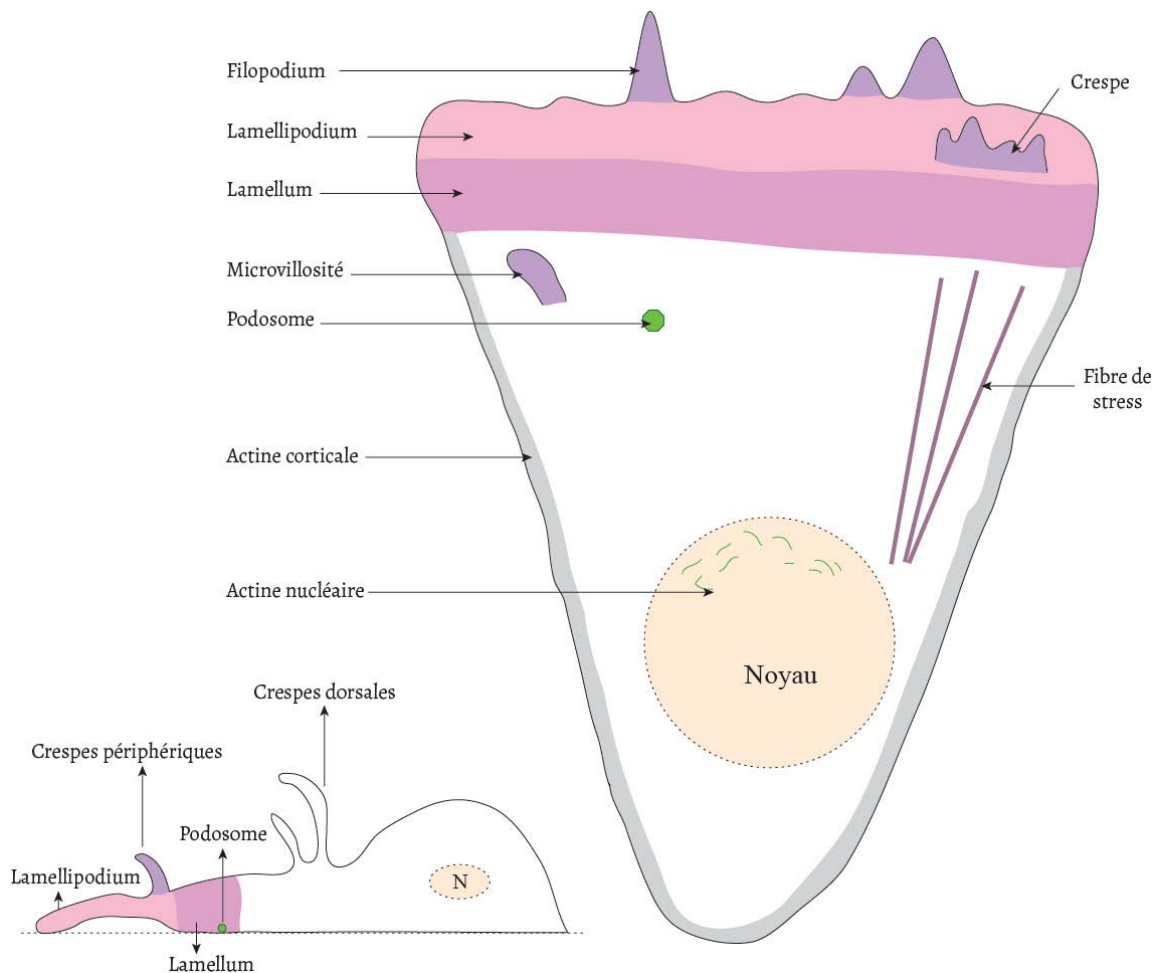


Figure 5. Les différentes protrusions membranaires. Inspiré de Chhabra et al<sup>203</sup>.

#### a. Le lamellipodium et le lamellum

Ces protrusions membranaires sont observées chez les cellules en cours de migration. L'activité de migration va être permise par l'adoption par les cellules d'une morphologie spécifique avec notamment la formation d'un front de migration. La région protrusive localisée au niveau du front de

migration (*leading edge*) est une structure définie comme une protrusion large et étalée. Elle va avoir une fonction directionnelle c'est-à-dire que du fait de sa structure, sa morphologie et les forces physiques protrusives qui entrent en jeu, elle va diriger la cellule vers une direction donnée.

Ce front de migration a été caractérisé dans les fibroblastes par Abercrombie et al<sup>204-207</sup>, comme comportant deux régions : le lamellipode, situé le plus en amont du corps cellulaire, et le lamellum qui s'étend à partir du lamellipode vers le corps cellulaire. La différence entre ces deux structures se rapporte à leur capacité d'adhésion, qui est assez faible pour le lamellipode et augmente à partir de la barrière lamellipode/lamellum. La structure d'actine au niveau du lamellipode est organisée sous la forme d'un réseau de microfilaments branchés jusqu'à la barrière lamellipode/lamellum (de 1 à 3µm), avec un *turnover* plus important qu'au niveau du lamellum. Au niveau du lamellum, les structures d'actine deviennent plus espacées et les points d'adhésion sont fréquents. En ce qui concerne l'assemblage du lamellipode, différentes études ont montré l'implication du complexe Arp2/3, localisé au niveau du front de migration de plusieurs types cellulaires. Cette implication du complexe Arp2/3 a notamment été démontré via l'altération de son activité, par micro-injection d'anticorps au niveau du lamellipode ou encore en diminuant l'expression protéiques des sous unités composant le complexe. La polarisation cellulaire, et donc la formation du front de migration, est permise grâce à plusieurs molécules, telles que PI3K<sup>208</sup>, Rac<sup>208,209</sup>, CDC42<sup>209</sup> et Hemi1<sup>210</sup> (protéine du complexe WAVE1). Alors que Rac va permettre le maintien et l'accumulation de PIP3 au front de migration<sup>209</sup>, CDC42 va permettre la formation d'un unique front de migration orienté vers le chimioattractant<sup>211,212</sup>.

Il est plus complexe de déterminer quelles protéines sont impliquées dans la structure du lamellum. *A contrario* du lamellipode, le complexe Arp2/3 ne semble pas jouer de rôle prépondérant. La formine mDia2 semble en revanche être impliquée dans la nucléation et formation des microfilaments (rôle pouvant être effectué par d'autres formines dans les types cellulaires n'exprimant pas mDia2).

## b. L'uropode

L'uropode est la partie opposée au front de migration, ou queue de migration. Cette structure typiquement observée dans les cellules en migration, telles que les leucocytes. L'uropode possède une forte capacité de contraction grâce à un enrichissement de complexes actomyosine (actine et myosine

II). Plusieurs molécules sont enrichies à l'uropode et vont avoir pour rôle d'induire la rétractation cellulaire ou vont aider à la polarisation de la cellule. L'enrichissement de kinases générant PIP<sub>2</sub> permettent le maintien de la polarisation cellulaire et la migration directionnelle (PIPKI $\beta$ <sup>213</sup>), ainsi que la rétractation de l'uropode (PIPKI $\gamma$ <sup>661</sup><sup>214</sup>). Un facteur d'échange de nucléotide de guanine (GEF) de RhoA, PDZRhoGEF, va agir en coopération avec ROCK, RhoA et la myosine IIA, restreignant la contraction actomyosine à l'uropode<sup>215</sup>.

La myosine IIA va également avoir un rôle important au niveau de l'uropode. En effet, cette protéine va s'associer avec l'intégrine LFA-1 pour permettre le détachement de l'uropode<sup>216</sup>. En effet, inhiber l'association myosineII1/LFA-1 résulte en une élongation de l'uropode, un défaut de détachement de la queue cellulaire ainsi qu'un blocage de la capacité migratoire. Contrairement au lamellipode, LFA-1 est présente de manière inactive au niveau de l'uropode<sup>216</sup>.

D'autres protéines, comme Rac et CDC42, jouent un double jeu en étant importantes à la fois pour la mise en place du front de migration mais également de l'uropode. Alors qu'elles envoient des signaux positifs au niveau du front de migration pour maintenir une polarité cellulaire, elles jouent également à l'uropode un rôle négatif en régulant l'activité de RhoA. La déficience en Rac dans des neutrophiles induit une diminution de l'activation de RhoA et un défaut de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, conduisant à un défaut de détachement cellulaire<sup>217</sup>. Quant à CDC42, elle médie les contractions d'actomyosine<sup>212</sup>, en modulant et contrôlant la distribution de WASP qui elle-même contrôle le clustering de l'intégrine CD11b (permettant la stabilisation de l'uropode)<sup>218,219</sup>.

Le rôle des protéines ERM (ezrine, radixine, moésine) est également important au niveau de l'uropode. Ces protéines vont s'accumuler au bout de l'uropode, et comme décrit précédemment, vont faire les ponts entre les filaments d'actines et les récepteurs de surface. Elles vont également interagir avec la flotilline-1 (protéine d'échafaudage) pour permettre le regroupement des radeaux lipidiques à l'uropode<sup>220,221</sup>. Il a été démontré qu'à l'uropode des neutrophiles, la protéine moésine inhibe la formation de protrusion, permettant le maintien de la polarisation cellulaire, en inhibant l'activation des GTPases Rac, Rho et CDC42<sup>222</sup>.

### c. Les crespes

Ce que je nommerai ici « crespes » (ou *ruffles*) correspond aux protrusions ondulées riche en microfilaments et en cortactine que l'on peut retrouver au niveau du lamellipode ou au niveau apical de la cellule. Décrite pour la première fois en 1958<sup>223</sup>, c'est une structure très mobile qui va former des structures ondulées non adhérentes. Les crespes périphériques vont s'assembler au niveau du front de migration puis se retracter<sup>224</sup>. Il existe un autre type de crespes qui est la crespes circulaire dorsale que l'on va retrouver en dehors de la zone du lamellipode et lamellum. Toutes deux sont des structures transitoires, qui ont des fonctions différentes : les structures en périphérie vont être associés à la motilité cellulaire alors que les crespes dorsales vont être importantes pour l'internalisation des récepteurs et la macropinocytose<sup>225</sup>. Ces crespes vont être régulées tout deux par le complexe Arp2/3, la dynamine 2 et la cortactin<sup>226</sup> mais également par des Rho GTPase (RhoA<sup>227</sup> et RhoG<sup>225</sup>/Rac1<sup>228</sup> pour les crespes périphériques et dorsales respectivement). Des études effectuées sur les cellules HeLa<sup>229</sup> ainsi que des lymphocytes T murins<sup>230</sup> ont permis de décrire le rôle de la formine mDia1 dans la formation des crespes.

#### d. Les filopodes

Les filopodes sont des fines protrusions membranaires qui se forment à partir du lamellipode, et vont avoir une fonction de détecteur, ou *sensing* (détection des chimiokines par exemple)<sup>231,232</sup>. Ces protrusions, présentes dans plusieurs types cellulaires, sont formées grâce à des microfilaments assemblés de manière parallèle au front de migration. Les mécanismes d'initiation des filopodes sont cependant toujours à débat, où deux écoles prédominent<sup>233</sup>. La première soutient un modèle d'élongation convergente, où les filopodes sont formés via la réorganisation du réseau d'actine sous membranaire et sous contrôle du complexe Arp2/3, de formines ou encore de la protéine Ena/VASP. La deuxième propose un modèle de formation par nucléation, où des nouveaux brins sont formés à partir d'un cluster de formines situé au niveau de la membrane plasmique.

Une des protéines importantes des filopodes est la fascine<sup>234</sup>, importante pour la migration et le développement, et est corrélée avec les capacités invasives de plusieurs cellules tumorales dues à la surexpression de cette protéine chez ces dernières<sup>235</sup>. Il a été déterminé que la fascine à un rôle propre dans la formation des filopodes. En effet, en bloquant sa capacité de *crosslink* de l'actine par la mutation de la sérine S274A, la fascine perd sa fonction de *bundling* des filaments d'actine, mais est toujours

capable d'induire la formation de filopodes<sup>236</sup>. Les filopodes sont des protrusions souvent précurseurs à de nouvelles structures. Par exemple, les filopodes peuvent « mûrir » en jonctions cellulaires, ou servent de précurseurs à la formation d'épines dendritiques<sup>237</sup>. Le complexe Arp2/3 a également été décrit comme régulateur de la formation et la dynamique des filopodes dans les cellules neuronales.

#### e. Les podosomes et invadopodes

Les podosomes sont des structures très importantes puisque ce sont des structures d'adhésion surtout observées dans les cellules immunitaires d'origine myéloïdes (cellules dendritiques, macrophages). Ce sont des protrusions riches en actine et enrichies en intégrines, créées pour former des points de connexion avec la matrice extracellulaire. Ces structures permettent la stabilisation du front de migration dans une direction donnée<sup>238,239</sup>. Les invadopodes sont des structures spécifiques aux cellules cancéreuses. Ce sont des protrusions avec une composition et une structure similaires aux podosomes cependant elles sont plus épaisses que les podosomes (environ 2µm de diamètre contre 0,5µm de diamètre pour les podosomes). Les deux structures vont dégrader la matrice extracellulaire via des métalloprotéases.

Plusieurs études ont permis de montrer l'importance des protéines (N-)WASP, WIP et du complexe Arp2/3 dans leur formation et structure. En effet, le complexe Arp2/3 est enrichi au niveau des podosomes et la perte de WASP induit une absence de ces structures dans les macrophages et les cellules dendritiques. Plus particulièrement, nous savons que la protéine WIP joue un rôle particulièrement important. Elle va notamment permettre aux podosomes d'être enrichis en intégrines  $\beta 2$ <sup>240</sup> nécessaire à l'adhérence. Du fait de son rôle de chaperonne de la protéine WASP, WIP empêche la dégradation de WASP par la calpaïne, permettant ainsi un enrichissement de WASP dans les podosomes. L'étude de Chou et al a permis de mettre en lumière un second rôle de WIP dans la formation des podosomes<sup>79</sup>. En effet, des cellules dendritiques *knockout* pour WIP traitées avec un inhibiteur de calpaïne (permettant donc la présence de WASP dans le cytoplasme) n'est pas suffisant pour induire la formation des podosomes. Plus tard, il a pu être démontré que WIP devait se lier à la cortactine pour permettre la formation efficace des podosomes ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaires par les métalloprotéases<sup>241</sup>.

## f. Les protrusions dendritiques

Je vais exposer dans cette section les protrusions que l'on appelle plus communément des « dendrites » dans deux types cellulaires : les neurones et les cellules dendritiques.

Les neurones peuvent former des protrusions membranaires composées d'organelles, nommées dendrites, grâce à l'action coordonnées des microtubules, les filaments neuronaux et des filament d'actine organisés de manière linéaire ou branché<sup>242</sup>. La plupart des protéines ABP citées précédemment sont d'ailleurs nécessaires à la formation des dendrites des neurones<sup>242</sup>. D'autres protéines telles que la protéine CRP1<sup>243</sup> (protéine neuronale comportant une activité de *bundling* des filaments d'actine) ou les petites GTPase<sup>244</sup> (Rac, Rho et CDC42) jouent un rôle primordiale. L'activité de l'actine la plus dynamique est cependant retrouvée au niveau des épines dendritiques, qui sont de très courtes protrusions à contact synaptique. Le complexe Arp2/3 en association avec N-WASP ou WAVE va générer des forces contre la membrane plasmique, mettant en valeur leur rôle dans la maturation des épines dendritiques<sup>245,246</sup>.

On sait un peu moins de chose concernant la formation des « dendrites » formées dans les cellules dendritiques (DC - dont elles tirent leur nom). En effet, la maturation des cellules dendritiques leur confère une morphologie spécifique composée de pseudopodes et dendrites. Cette modification de morphologie est notamment due à l'augmentation de l'expression protéique de la fascine 1, améliorant la capacité de migration de ces cellules<sup>247,248</sup>. De manière intéressante, il a été décrit que la cofiline était différemment régulée dans les DCs matures<sup>249</sup>. Les DCs matures présentent un fort taux de cofiline déphosphorylée, et relocalisée au niveau de la membrane plasmique, où la dynamique de l'actine doit être importante pour permettre la formation des dendrites. Comme il l'a été évoqué précédemment, la cofiline à un double effet sur le *turnover* de l'actine. L'augmentation du nombre de brins due à son activité de *severing* des filaments signifie une augmentation du nombre de brins disponibles pour de nouveaux évènements de polymérisation. Cela corrèle avec l'augmentation du nombre de filaments d'actine sous membranaires dans les cellules dendritiques matures. Ces deux évènements (découpage des filaments et expression de la fascine) sembleraient donc être les deux évènements pionniers pour la formation des dendrites.

## g. Microvillosités

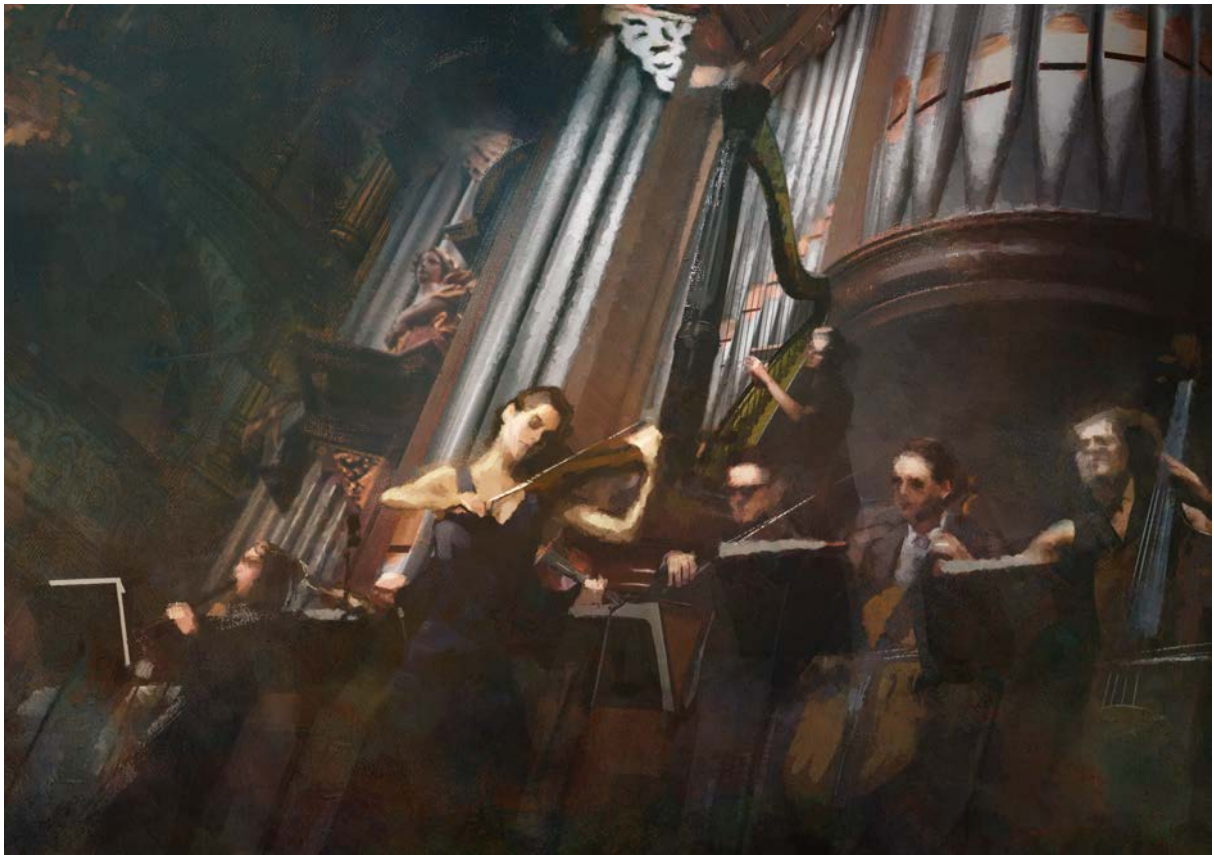
Les microvillosités (ou *microvilli*) sont des structures facilement reconnaissables puisque ce sont de courtes protrusions (avec une longueur autour de 0,5µm) regroupées de manière très dense mais uniformément<sup>250</sup>. On fait le plus souvent référence aux microvillosités présentes au pôle apical des cellules épithéliales de la lumière intestinale et rénale.

Cependant ces protrusions peuvent être retrouvées dans d'autres types cellulaires où elles vont exercer d'autres fonctions. Dans les cellules épithéliales, les microvillosités vont entre autres, être importantes pour augmenter la surface d'absorption de nutriment. Dans les lymphocytes T cependant, elles vont permettre la ségrégation et présentation de certains récepteurs ou des molécules d'adhésion<sup>251-253</sup>. En effet, deux récepteurs importants pour l'adhésion pendant la phase de roulement, la L-sélectine<sup>251,254</sup> et l'intégrine  $\alpha4\beta7$ <sup>255</sup>, sont localisés au bout des microvillosités. En plus de cela, deux études ont pu démontrer que les microvillosités avaient la capacité de sécréter des vésicules<sup>256,257</sup>.

Les microvillosités sont plus courtes aux niveau des lymphocytes T (autour de 0,1µm de long et de 70 à 160nm de diamètre<sup>253</sup>) et sont formées grâce aux microfilaments mais libre de tout organelle. Au contraire des microvillosités des cellules épithéliales qui ont une longueur stable, celles des lymphocytes T sont semblables structurellement aux filopodes, et vont être dynamiques et s'allonger ou se rétrécir en fonction de l'activité de polymérisation des brins d'actine<sup>258</sup>.







***Les musicien-ne-s:** Les cellules immunitaires peuvent être vues comme des musicien-ne-s, jouant de diverses instruments (les protéines) pour exercer leurs fonctions. Illustration de Edouard Noisette©. Reproduction restreinte au manuscrit de thèse.*

## CHAPITRE 2

# Rôles élémentaires et spécialisés du cytosquelette d'actine dans les cellules immunitaires

J'ai présenté dans le chapitre précédent les rôles moléculaires des principaux régulateurs du cytosquelette d'actine de manière globale. L'objectif du chapitre à venir sera d'intégrer ces différents régulateurs et structures dans le contexte du système immunitaire, et d'évoquer les liens qu'il existe entre ces régulations moléculaires et les fonctions cellulaires des leucocytes, comprenant des fonctions cellulaires fondamentales, partagées entre les cellules immunitaires, ainsi que des fonctions très spécialisées.

## I) Le système immunitaire et ses fonctions

Le système immunitaire se compose des leucocytes, (cellules identifiées par les prix Nobel Paul Ehrlich et Ilya Metchnikov et illustré dans la figure 6), et des différents tissus et organes les produisant et servant de support à leur maturation.

Le système immunitaire se distingue par deux groupes de cellules : les cellules du système immunitaire innée et adaptatif. Les cellules du système immunitaire inné vont reconnaître des motifs communs (PAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) et des motifs de danger (DAMP pour *Dammages-Associated Molecular Pattern*) via leurs récepteurs PRR (*Pattern-Recognition Receptor*). Les cellules du système immunitaire adaptatif vont quant à elles être spécifiques d'un antigène donné. L'activation des cellules de l'immunité innée par leur récepteurs PRR va permettre l'activation de leurs fonctions notamment la production de particules antivirales (réponse interféron), de molécules antibactériennes (défensines par exemple) ou encore la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (IL- $1\alpha$ , TNF- $\alpha$  ou encore l'IL-6). Cela va également permettre d'activer le système immunitaire adaptatif via l'action des cellules dendritiques, qui après activation, vont migrer jusqu'à l'organe lymphoïde secondaire le plus proche afin d'activer les lymphocytes T.

Parmi les cellules de l'immunité innée, on va retrouver des cellules résidentes (mastocytes, cellules dendritiques, macrophages) et des cellules circulantes (neutrophiles, monocytes, éosinophiles, basophiles, cellules NK). Le système immunitaire adaptatif lui va comporter les lymphocytes T et les lymphocytes B. Il existe cependant des cellules à l'interface du système immunitaire innée et adaptatif (cellules lymphoïdes innées – ILC – ou les lymphocytes T $\gamma\delta$ ) que je ne détaillerai pas dans cette thèse. Au cours de la réponse inflammatoire induite par l'arrivée d'un pathogène, différentes mécaniques vont être mis en place par toutes les cellules précédemment citées pour contrôler l'infection et permettre un retour à l'état basal.

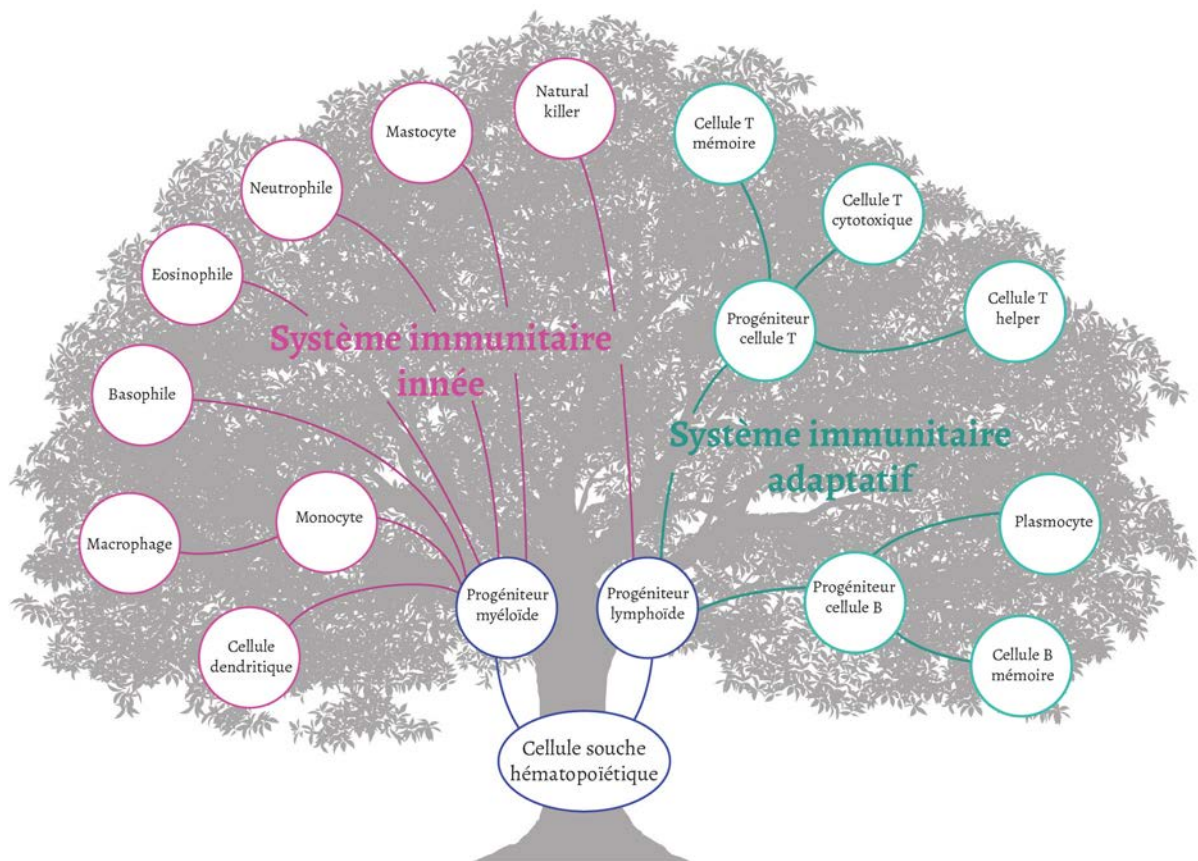


Figure 6. Les différents leucocytes

Les fonctions mises en place sont diverses et certaines sont dépendantes du cytosquelette, ou *a minima* fortement soutenus par le cytosquelette d'actine. Les régulateurs d'actine vont donc jouer des rôles prépondérants et spécifiques pour permettre la mise en place de ces fonctions immunitaires.

### 1. La division cellulaire et la cytotodérèse

#### a. Les étapes de la division cellulaire

Une des conséquences de l'activation du système immunitaire lors d'une infection va être l'induction de la prolifération, notamment des lymphocytes. En effet, lorsque la cellule dendritique va migrer jusqu'à l'organe lymphoïde secondaire pour interagir avec un lymphocyte T naïf, ce dernier va s'activer en réponse à son antigène. Va ensuite démarrer une phase de prolifération, qui est IL-7 dépendant<sup>259</sup>. Il est évident alors de penser que les microfilaments et certains régulateurs vont être nécessaire pour cette étape de prolifération, ou division cellulaire. Le cycle cellulaire est un processus

long, complexe et totalement dépendant du cytosquelette qui a été étudié consciencieusement. C'est pour cela que je ne donnerai ici que les grandes lignes concernant les étapes de la division cellulaire qui seront plus détaillée dans la figure 7.

Le cycle cellulaire comprend différentes phases : la phase de division (la mitose ou phase M) et l'interphase. L'interphase est elle-même composée de différentes sous-phases : la phase G<sub>1</sub> où la cellule va grossir, la phase S où l'ADN va se répliquer et la phase G<sub>2</sub> qui prépare la cellule à entrer en mitose. Lorsque la cellule ne prolifère pas, elle est dans un stade de repos qui est la phase G<sub>0</sub>. La mitose quant à elle, est composée de plusieurs étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Tout au long de ce cycle, une multitude de protéines régulatrices du cytosquelette d'actine vont agir : les protéines liant l'actine, les Rho GTPases ainsi que les protéines régulatrices et effectrices de ces GTPases (voir figure 7).

#### b. L'anneau contractile

Cependant, parmi toutes les étapes de la mitose, la cytotéière est l'étape où les microfilaments et les protéines régulatrices ont le premier rôle. Le but de la cytotéière est d'obtenir deux cellules filles, au patrimoine génétique complet et identique<sup>260</sup>.

La cytotéière démarre par l'invagination des membranes entre les deux aires chromosomiques pour créer un sillon de séparation. Ce sillon va continuer de se rétrécir jusqu'à induire la fusion membranaire et la formation des deux cellules filles. Une structure d'actine particulière va se former, que l'on nomme anneau contractile, composé d'actomyosine et va générer des forces permettant cette rétractation des membranes. Cette structure contractile est transitoire, et nécessite d'être assemblé puis désassemblé pour chaque cycle de division.

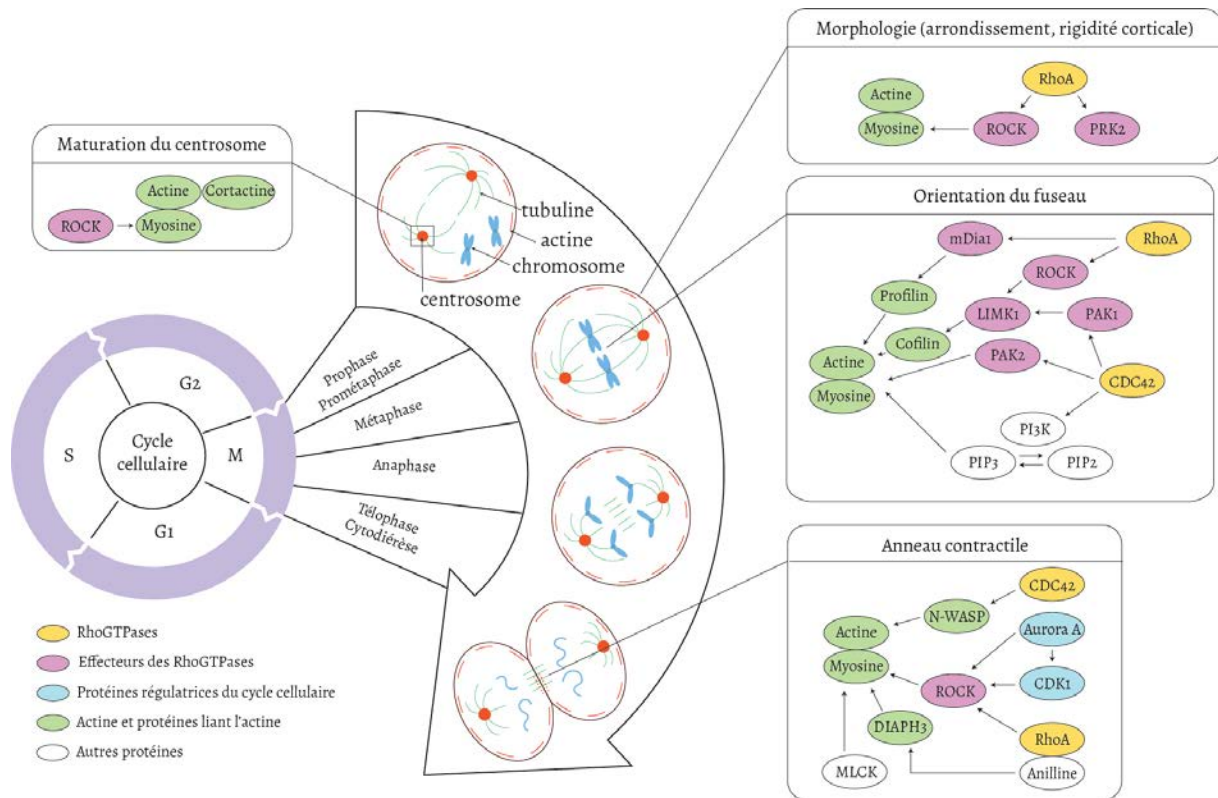


Figure 7. Rôle des régulateurs du cytosquelette d'actine dans le cycle cellulaire. Inspiré de Heng et al<sup>260</sup>.

Plusieurs revues ont regroupé les différentes étapes cellulaires conduisant à l'initiation du sillon puis anneau de contraction<sup>260-262</sup>. Pour résumer, ces étapes requièrent tout d'abord une signalisation via RhoA au niveau du site de division, qui va se situer entre le cortex cellulaire et le fuseau anaphasique. L'activation de RhoA va permettre le recrutement de formines, induire un enrichissement de certains lipides membranaires spécifiques (en induisant l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> par exemple) mais également recruter les complexes d'actomyosine, les microtubules ou encore les septines. L'anniline, protéine d'échafaudage, va avoir un rôle prépondérant dans la formation du sillon, notamment en étant la protéine interactrice entre la membrane plasmique et les différents complexes du cytosquelette. L'anniline permet le recrutement de la formine DIAPH<sub>3</sub> au niveau du sillon de séparation, qui va polymériser des microfilaments non branchés<sup>263</sup>. Plus précisément, l'activation de DIAPH<sub>3</sub> nécessite sa liaison à RhoA et l'anniline potentialise l'interaction avec RhoA permettant une activation complète de DIAPH<sub>3</sub>, améliorant ainsi l'activité de nucléation de la formine.

Les mécanismes induisant la formation du ring d'actine dans les cellules d'organisme supérieur ne sont cependant toujours pas connus. Chez la levure, la formation de l'anneau contractile est lui-même un processus controversée, où trois modèles sont envisagés<sup>264</sup>. Dans les cellules

métazoaires, le modèle le plus probable de division cellulaires serait le modèle SCPR (*search capture pull and release*). Ce modèle propose que l'anneau contractile résulte du rassemblement des « nœuds de cytodièrese » (*cytokinesis nodes*) dispersés dans la cellule, par l'intermédiaire des filaments d'actine et de la myosine II.

### c. La division asymétrique

La division asymétrique se définit par la génération de deux cellules filles au destin différent, et qui possèdent des caractéristiques différentes (taille de la cellule, morphologie, expression génique ou leurs composants cellulaires)<sup>265</sup>. C'est le cas des lymphocytes B<sup>266</sup>. En effet, l'étude de Farina et al a démontré qu'il y avait une augmentation de polymérisation des filaments d'actine pendant l'interphase qui est médiée par les protéines WASH et le complexe Arp2/3<sup>267</sup>. Cette accumulation induit en anaphase une régulation par l'actine de la densité des microtubules centrosomaux<sup>267</sup>.

## 2. La migration, ou l'art de l'exode cellulaire

Une des fonctions les plus spécifiques des cellules immunitaires est leur capacité à migrer entre les différents tissus. La migration cellulaire permet le développement des lymphocytes T (migration des précurseurs dans le thymus), l'activation des lymphocytes (migration entre les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de leur antigène) ou encore permet l'immuno-surveillance des tissus par les cellules de l'immunité innée. Cette migration des globules blancs (que l'on pourrait assimiler à un exode), nécessite une dynamique d'actine importante après l'intégration du signal de migration. En réponse à des chimio attractants, les cellules vont modifier leur morphologie afin de migrer en direction de ce chimio attractant. Pour cela, la cellule va adopter une morphologie dite polarisée et plusieurs structures cellulaires vont pouvoir être observées : formation d'un lamellipodium, uropode et formations de protrusions en fonction du stimulus. Ces formes de protrusions ont déjà été décrites dans le chapitre précédent, mais il est intéressant de définir plus précisément comment les cellules intègrent et régulent les signaux de migration.

### a. La notion de chimiotactisme



Le chimiotactisme est un évènement de migration vital pour différents processus biologiques tels que le recrutement des leucocytes sur les sites infectieux, l'induction de l'inflammation ou sa réparation ou encore la migration des lymphocytes à travers l'organisme. Le chimiotactisme est initié par la liaison de petites molécules, nommées chimiokines, sur des récepteurs couplés à des protéines G (GPCRs). Cette transmission du signal va avoir pour conséquence une activation de plusieurs voies de signalisation induisant la migration cellulaire, mais également la production de cytokines, la dégranulation, l'adhésion, la prolifération et la survie cellulaire<sup>268</sup>. Outre la complexité en termes de diversité de chimiokines et des récepteurs aux chimiokines, se rajoute une complexité d'association chimiokine/récepteurs : en effet, une chimiokine donnée peut se fixer sur différents récepteurs, et un récepteur donné peut fixer plusieurs chimiokines différentes. Dans ces deux situations, des voies de signalisation différentes seront activées.

L'ensemble des voies de signalisation chimiokinique possèdent un schéma commun (revue par D. Legler<sup>269</sup>). Le récepteur chimiokinique pour être fonctionnel doit être associées à une protéine G hétérotrimérique, qui va transmettre le signal d'activation. L'activation du récepteur à la chimiokine induit un échange de GTP/GDP de la protéine G, conduisant au relargage des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces sous unités vont à leur tour activer les protéines PLC (qui va alors produire de l' $IP_3$  et du diacylglycérol – DAG) et PI3K (qui va générer trois phosphoinositides permettant le recrutement à la membrane de protéines possédant un domaine d'homologie à la pleckstrine, comme AKT<sup>270</sup>). Bien que les modules de signalisation soient comparables, chaque couple chimiokine/récepteur induit une signalisation spécifique.

Il n'est pas question ici de décrire toutes les voies de signalisation des chimiokines. Cependant, depuis quelques années se pose la question de comment s'organise les récepteurs aux chimiokines à la surface des cellules. Le *nano clustering* des récepteurs est essentiel pour la transmission des signaux en réponse à un stimulus extracellulaire. Les GPCRs, et donc les récepteurs aux chimiokines, sont également capable de se regrouper en *nano clusters* pour induire une signalisation. Ce *micro clustering* est permis grâce aux protéines transmembranaires, à la composition lipidique de la membrane mais également grâce au cytosquelette d'actine, qui va influencer le positionnement des molécules de signalisation en microdomaines<sup>271,272</sup>. De manière intéressante, il a été démontré que l'actine corticale dans les lymphocytes T était déterminante dans le *clustering* et l'organisation spatiotemporelle des

récepteurs CXCR4 en réponse à CXCL12<sup>273</sup>. En effet, le traitement avec la latrunculine A de lymphocytes T bloque le *nano clustering* de CXCR4 et induit même sa diffusion au niveau de la membrane plasmique. La taille des *nano clusters* joue un rôle sur la signalisation mais aussi la capacité migratoire des lymphocytes T. En effet, bloquer la capacité de clustering de CXCR4 induit une diminution du flux calcique et un défaut de migration<sup>273</sup>.

#### b. Migration de masse des leucocytes : “how to avoid traffic jams”

Les neutrophiles représentent la plus grande proportion leucocytaire dans le sang (70%) et sont les premières cellules recrutées lors d'une infection ou blessure. Ces cellules migrent en masse, sans cependant créer de « bouchon » cellulaire dans les différents tissus ou capillarités. Ceci est permis grâce à un mécanisme de migration altérative et non aléatoire. L'équipe de Irimia a pu démontrer qu'un neutrophile arrivant à une bifurcation (modélisé *in vitro* ou *in vivo* dans un tissu) va choisir une direction donnée, tandis que le neutrophile suivant choisira l'autre voie disponible pour arriver au site d'infection<sup>274</sup>. Cette alternation entre deux voies de migration possible est notamment due à une perturbation du gradient de migration après leur passage, nécessaire à la motilité directionnelle du neutrophile. L'utilisation du modèle de bifurcation *in vitro* a permis de décrire qu'en plus de la perturbation du gradient s'ajoute une augmentation de la résistance hydraulique lors du passage du neutrophile. Le neutrophile suivant aura alors tendance à suivre une voie où la pression hydraulique est moindre<sup>275</sup>. Une telle exploration n'a pas été étudiée dans le cas de la migration des autres leucocytes, mais nous pouvons présupposer qu'un mécanisme similaire puisse être utilisé par les lymphocytes, qui après prolifération, vont également migrer en masse vers le site infectieux.

Les chimiokines sécrétées permettent le recrutement des leucocytes sur le site infectieux. Un fait remarquable est la capacité des lymphocytes à migrer de manière collective. Cette migration collective a tout d'abord été étudiée dans le but d'expliquer la capacité invasive de LT et LB tumoraux<sup>276</sup>. L'étude de Malet-Engra *et al* de notre laboratoire a permis de décrire les caractéristiques migratoires des cellules organisées en cluster vs individuelle. La migration de cellules tumorales seules nécessite une forte concentration de chimiokine (~100ng/mL) pour pouvoir induire leur migration, et une trop forte concentration de chimiokine induit ce que l'on appelle une chimio répulsion (migration dans le sens opposée à la chimiokine). L'avantage de la formation d'un cluster de cellule est l'induction de la

migration en réponse à des doses chimiokines proche des conditions physiologique (~25ng/mL) et d'éviter la chimio répulsion. Cette capacité peut notamment être appréciée lors de l'approche du site infectieux, où la concentration en chimiokine est élevée.

Les lymphocytes vont par ailleurs alterner entre migration individuelle et migration collective<sup>277</sup>. Cette alternance est le reflet d'une adaptation des cellules aux matrices extracellulaires auxquelles elles sont exposées. En effet, l'étude de Rey-Barroso *et al* de notre laboratoire a caractérisé les préférences migratoires des lymphocytes B en présence de différents composants de matrices. Ainsi, les lymphocytes B vont préférentiellement migrer de manière individuelle en présence de fibronectine, et de manière collective en réponse au collagène. L'utilisation d'inhibiteurs tels que CK869 (inhibiteur de ARP2/3) et Y27 (inhibiteur de ROCK1) ont mis en lumière le rôle du réseau d'actine et des complexes d'actomyosine dans le contrôle de la balance entre migration individuelle et collective. En effet, ARP2/3 se révèle être essentiel à la stabilité des interactions cellules-cellules et le maintien des protrusions cellulaires. Le complexe actomyosine (activé par ROCK1) est lui important pour la stabilisation des interactions cellules-matrice.

### c. La diapédèse

Lorsque les leucocytes doivent migrer vers le site infectieux, ils se doivent de passer différentes barrières tissulaires, et notamment passer à travers les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ce mécanisme, nommé migration transendothéliale, s'effectue en plusieurs étapes : le roulement, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, l'étalement et l'activation des leucocytes et enfin la transmigration (ou diapédèse)<sup>278</sup>. Le rôle du cytosquelette d'actine va donc être primordial pour la diapédèse, en permettant la formation de podosomes côté leucocytes, mais également le désassemblage des jonctions adhérentes côté cellules endothéliales.

Lorsqu'un leucocyte va se fixer sur les cellules endothéliales via ses intégrines (interaction LFA1-ICAM1 par exemple), cela va induire différentes cascades de signalisation dans les cellules endothéliales. En effet, le regroupement en cluster des molécules ICAM1 va permettre d'augmenter la liaison des leucocytes à l'endothélium<sup>279</sup>. Ce regroupement en microdomaines va activer la protéine Rac qui, via l'activation de la NADPH oxydase, va induire la production de ROS<sup>280</sup>. Ces ROS vont induire plusieurs modifications dans les cellules endothéliales, et notamment induire un flux calcique<sup>281</sup>. L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire active la calmoduline et certaines kinases (c-Src et PYK2) qui vont phosphoryler les molécules de VE-cadhérines et ses protéines adaptatrices (caténines)<sup>282</sup>. Ces événements de phosphorylation perturbent l'interaction du réseau d'actine avec les VE-cadhérines et déstabilisent les jonctions adjacentes, facilitant la migration paracellulaire des leucocytes<sup>280,283</sup>.

Les leucocytes vont de leur côté former des filopodes, jusqu'à former un pseudopode<sup>282</sup>. Ce pseudopode est maintenu grâce à des GTPases (RAC1/2 et CDC42<sup>284</sup>) et est enrichi en récepteurs aux chimiokines mais également en intégrines (LFA1 et Mac-1<sup>285</sup>) pour permettre respectivement la migration vers les chimiokines et l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, permettant l'activation des voies de signalisation précédemment citées.

### 3. L'autophagie

#### a. Généralité et contexte physiologique

L'autophagie est, en situation physiologique, un processus de protection et de recyclage qui est impliqué dans la dégradation des protéines et organelles anormales, endommagées ou non nécessaires ainsi que des pathogènes intracellulaires<sup>286</sup>. En plus de cette activité de recyclage, l'autophagie est importante pour la sénescence cellulaire ou encore la présentation de l'antigène dans les cellules immunitaires<sup>286</sup>. La dérégulation du processus d'autophagie est liée à l'apparition de cancer (comme les carcinomes), de neurodégénérescence ou encore d'infections<sup>287</sup>. L'autophagie est une succession de différentes étapes : la formation des phagophores (structures membranaires qui vont subir des

évènements d'élongation pour fusionner de part et d'autre pour former une vésicule), la formation des autophagosomes (résultat de l'élongation du phagophore), leur fusion avec les lysosomes créant ainsi les autophagolysosomes. Il a été découvert l'implication de différentes protéines dans des étapes spécifiques de la formation de ces vésicules diverses et sont donc dénommées comme des marqueurs de l'autophagie. Les plus connues sont les protéines Beclin-1, ATG14 ou encore LC3<sup>286</sup>.

#### b. Rôle des régulateurs d'actine dans l'autophagie

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont pu démontrer le rôle des microfilaments dans les différents processus de l'autophagie. Si la première étude a pointé le lien entre microfilaments et formation des autophagosomes par le biais de traitement à la cytochalasine B et D<sup>288</sup>, différents groupes ont pu par la suite déterminer le rôle précis de certaines NPFs et GTPases dans le processus d'autophagie. Il a d'ailleurs été démontré que le *turnover* de l'actine était tout aussi important pour les évènements précoces (formation des phagophores) que pour les évènements tardifs (maturation des autophagosomes)<sup>289,290</sup>.

En ce qui concerne les NPFs, les protéines de la famille WASP, à savoir WHAMM, JMY et WASH, sont les NPFs les plus décrites comme étant importantes dans l'autophagie<sup>291,292</sup>. JMY agit sur les évènements précoces de l'autophagie et va promouvoir la formation des phagophores<sup>292</sup>. Via son domaine LIR (nommée d'après son interaction avec LC3 – *LC3-interacting region*), JYM va interagir avec la protéine LC3 et va induire la nucléation et la polymérisation des microfilaments au niveau des membranes des phagophores<sup>291,293,294</sup>. Cette activité est également régulée par la protéine p300.

WHAMM va avoir une action sur le nombre d'autophagosomes produits et leur mobilité. En outre, les vésicules endocytiques sont associées à une structure d'actine spécifique, appelé queue de comète (*actin comet tail structure*) permettant la motilité des vésicules<sup>295,296</sup>. La protéine WHAMM se localise au niveau du réticulum endoplasmique et des autophagosomes et peut induire la formation de ces comètes d'actine, via l'activation du complexe Arp2/3<sup>297,298</sup>. Bien que l'on retrouve au niveau de ces structures la protéine WHAMM ainsi que des marqueurs d'autophagie comme DFCP1 ou LC3, l'absence de WHAMM n'impacte pas la formation de ces comètes (potentiellement formées grâce à JMY, ou une autre protéine NPFs). Cependant, elle a un impact majeur sur leur nombre, puisque

l'augmentation protéique de WHAMM induit une augmentation de ces comètes d'actine et par la suite, la formation des autophagosomes.

Le rôle du complexe WASH est un peu plus controversé. D'un côté, il a été démontré que WASH avait un rôle de régulateur négatif sur le processus d'autophagie, notamment en bloquant l'ubiquitination de la protéine beclin-1 par la protéine AMBRA1, nécessaire à l'induction de l'autophagie<sup>299</sup>. Cette inhibition s'effectue notamment par le recrutement de la protéine RNF2 qui induit l'ubiquitination de la protéine AMBRA1 et donc sa dégradation<sup>300</sup>. D'un autre côté, la diminution de l'expression protéique des WASH (via l'utilisation de siRNA) induit une diminution du nombre d'autophagosomes, alors que l'on s'attendait à avoir une augmentation de l'activité d'autophagie, ce qui pointerait un rôle de régulateur positif du complexe WASH<sup>301</sup>.

J'ai décrit brièvement dans le chapitre précédent le rôle des GTPases dans la régulation des différentes protéines interactrices de l'actine. Certaines GTPase vont avoir une action de régulation négative sur l'autophagie (Rac3 et Rac1) ou au contraire positive (RalB<sup>302-304</sup> et RhoA<sup>286</sup>). La protéine RalB est une GTPase monomérique, activée par RalGEFs. Une étude récente a démontré la forte présence de RalB et son activateur RGL2 dans les endosomes, et dans une moindre mesure, dans les autophagosomes<sup>302</sup>. La protéine RhoA est importante notamment pour la formation des autophagosomes<sup>289</sup>, de même que sa protéine effectrice ROCK1 qui se lie et phosphoryle Beclin-1. L'absence de la protéine ROCK ou son inactivité inhibe la formation des autophagosomes, la phosphorylation de la Beclin-1 serait alors un élément prépondérant dans la formation de ces vésicules<sup>305</sup>.

### c. Le rôle de l'autophagie dans les cellules immunitaires

Comme j'ai pu l'indiquer en début de section, le processus d'autophagie est important pour la réponse immunitaire innée et adaptative. Il va permettre la dégradation des bactéries (*Toxoplasma gondii* ou *Mycobacterium tuberculosis*), les virus (HSV-1) ou encore des champignons (*Cryptococcus neoformans*)<sup>306</sup>. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules dendritiques est un processus qui requière l'intervention des autophagosomes. En effet, l'absence de la protéine murine *Atg5* (marqueur de l'autophagie) induit un défaut d'activation des lymphocytes T CD4+, notamment

due à un défaut de fusion des phagosomes avec les lysosomes, empêchant la dégradation peptidique et la présentation de l'antigène sur le CMH de classe II<sup>307,308</sup>.

Cependant, peu d'études ont exploré le rôle des microfilaments ou des régulateurs d'actine dans ces fonctions spécifiques d'utilisation de l'autophagie dans les cellules immunitaires.

## II) Le système immunitaire inné

### 1. Phagocytose

L'élimination des substances ou organismes étrangers est permise notamment par l'activité phagocytaire de certains leucocytes, comme les neutrophiles, les cellules dendritiques matures ou encore les macrophages. La phagocytose est le processus qui permet de présenter les antigènes, et donc ainsi initier l'activation du système immunitaire adaptatif. Il existe deux types de phagocytose : la phagocytose directe et indirecte. La phagocytose directe, nommée également phagocytose non-opsonique, est induite par l'engagement des récepteurs mannose ou *scavenger*. La phagocytose indirecte, ou opsonique, est quant à elle induite par l'engagement des récepteurs de PRR solubles (comme les collectines, les pentaxines ou les récepteurs Fc - FcRs) ou encore par les récepteurs du complément (par exemple CR3).

La phagocytose induit un changement morphologique de la cellule par l'émission de pseudopodes. Ces pseudopodes impliquent la formation de nouveaux filaments permettant l'émission de protrusions et sont donc dépendants du cytosquelette d'actine. Il existe cependant une multitude de récepteurs et de ligands induisant la phagocytose et activant des voies de signalisation distinctes, ajoutant un niveau de complexité à l'étude du mécanisme de phagocytose. Pour comparer les deux phagocytoses opsoniques les plus étudiées, la phagocytose via l'engagement du FcγR et la phagocytose via l'engagement du CR3 vont induire différentes voies de signalisation ainsi que différents régulateurs du cytosquelette d'actine. Cette complexité est soulignée également par l'activation et l'inactivation de certaines protéines, comme la protéine Rac1, qui est impliquée dans plusieurs étapes du processus de phagocytose et dont la régulation fine est nécessaire pour le bon déroulement de l'évènement<sup>309</sup>.

Il sera question ici de décrire plus précisément les étapes dirigeant la phagocytose par formation des pseudopodes après activation du récepteur FcγR. C'est en effet le modèle qui est le plus

étudié et connu à ce jour. Il existe plusieurs étapes à la formation des pseudopodes impliqués quand la phagocytose (figure 8). L'ensemble de ces étapes impliquent le cytosquelette d'actine et ses régulateurs, puisque le traitement de macrophages avec des drogues affectant la dynamique du cytosquelette induit des défauts de phagocytose<sup>310</sup>.

Le processus débute en la formation d'une coupe, processus initié par le regroupement en clusters des récepteurs FcγR. Cette coupe phagocytaire est le résultat de l'assemblage de structures riches en actine, permis notamment par les protéines WASP et ARP2/3. D'autres protéines, telles que les formines Dia et IQGAP1 sont impliquées dans l'initiation de la coupe phagocytaire<sup>311</sup>. Les pseudopodes vont s'étendre de manière à entourer la cible, puis les membranes plasmiques de ces pseudopodes vont fusionner, permettant ainsi la formation d'une vésicule, le phagosome.

En ce qui concerne l'extension des pseudopodes, l'état actuel des connaissances démontre que des forces mécaniques sont nécessaires et essentielles pour la formation des phagosomes. Les tensions corticale et membranaire sont deux forces qui vont augmenter pour permettre la bonne extension des pseudopodes<sup>312,313</sup>. Ceci est particulièrement vérifié dans le cas d'ingestion de grosses particules étrangères, qui nécessite l'ajout de portion membranaire par exocytose et augmente ces tensions à mesure que l'aire de surface s'agrandit. Cela va notamment être permis grâce à la force contractile du complexe actomyosine<sup>314</sup>. L'actine et la myosine II sont en effet indispensables à l'extension du pseudopode puisque l'inhibition de la myosine II permet toujours la formation de la coupe phagocytaire mais celle-ci est incapable de s'étendre pour entourer la particule à éliminer. La dépolymérisation de l'actine est également un événement important au bon processus de phagocytose. En effet, Scott *et al* ont démontré que la dépolymérisation de l'actine sous la coupe phagocytaire, médié par l'hydrolyse de PI(4,5)P<sub>2</sub>, médie les événements tardifs de la phagocytose<sup>315</sup>.

La fermeture de la coupe phagocytaire est basée sur l'étude de l'équipe de Silverstein qui proposait un modèle de fermeture en zip autour de la cible<sup>316</sup>. Si les mécanismes précoces induisant la polymérisation de l'actine lors de la formation de la coupe phagocytaire sont plutôt bien décrits, l'implication des régulateurs d'actine dans l'extension des pseudopodes, le maintien des forces et la fusion membranaire restent toutefois plus floue. Deux myosines sont cependant importantes pour l'extension et la fusion des membranes : la myosine 1e et 1f<sup>310</sup>. En effet, la double absence de ces protéines est délétère pour la fermeture de la coupe phagocytaire, notamment en induisant une accumulation désorganisée de clusters d'actine au niveau de la coupe phagocytaire. D'autres protéines



candidates comme la dynamine 2 ou d'autre myosine de classe I sont actuellement en étude concernant leur rôle dans la fusion membranaire permettant la fermeture du phagosome<sup>317</sup>.

Il est important de souligner que le mécanisme de phagocytose par formation de pseudopodes n'implique pas les mêmes régulateurs d'actine en fonction des récepteurs de surface engagés<sup>318</sup>. En effet, les différents récepteurs vont induire une signalisation qui leur est spécifiques, et par cela permettre l'activation de certains régulateurs d'actines plutôt que d'autres. Nous pourrions citer par exemple la vinculine et la paxilline qui sont deux protéines recrutées au niveau du phagosome lors de sa formation après activation des récepteurs FcR ou CR3 mais pas du récepteur mannose. De manière générale, nous pouvons conclure que la formation de protrusions de type pseudopodes est un évènement spécifique à la phagocytose, bien que les mécanismes de formation des pseudopodes, ou de la phagocytose elle-même, peuvent différer selon la voie de signalisation activée<sup>317</sup>. C'est le cas de la phagocytose médiée par le récepteur CR3 (ou  $\alpha M\beta 2$ ) qui combine la formation de fins pseudopodes avec l'affaissement de la particule cible dans le corps cellulaire.

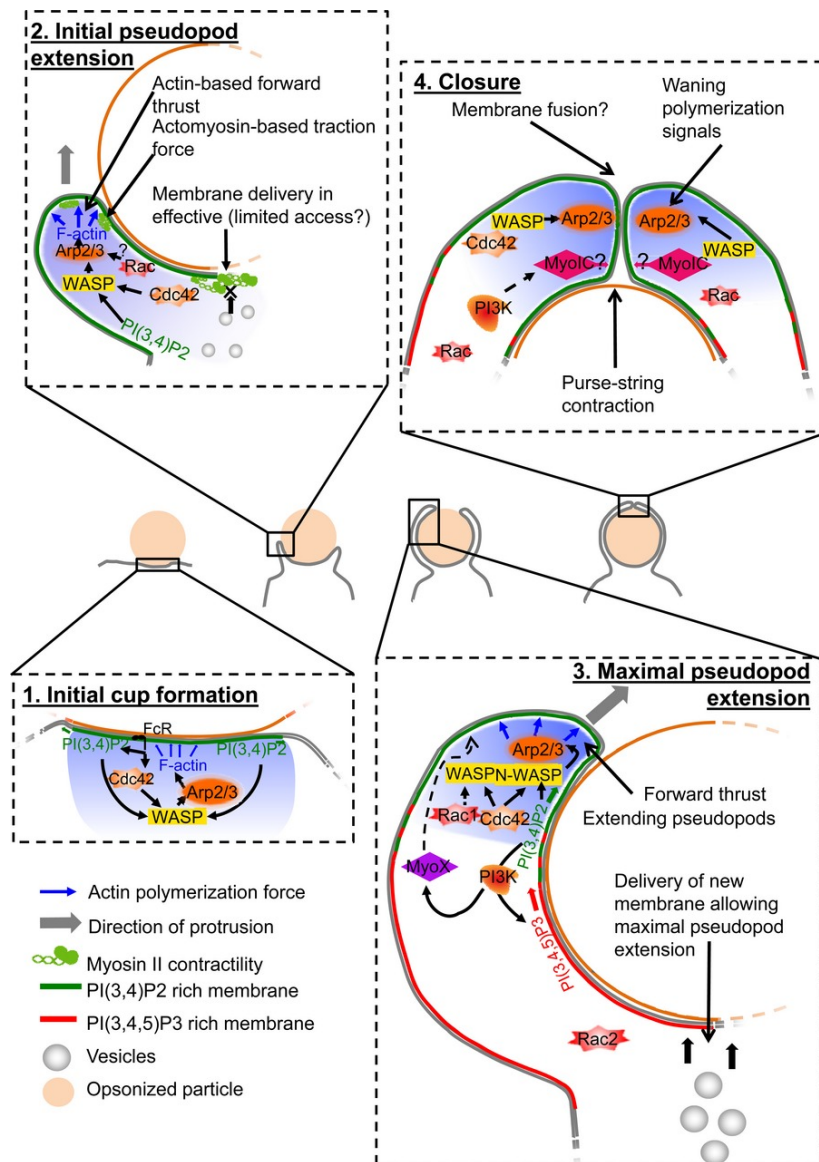


Figure 8. Les différentes étapes de la phagocytose. Schéma provenant de la revue de Rougerie et al<sup>319</sup>.

## 2. Neutrophiles et formation des NETs

### a. Mécanismes d'activation

Les neutrophiles possèdent différentes fonctions pour combattre les pathogènes. Cela inclut la capacité de phagocytose (décrite précédemment), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la dégranulation ou encore la formation de pièges extracellulaires (ou *Extracellular Traps* - ETs) que sont les NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), processus que l'on appelle la NETose<sup>320</sup>. Il est important de souligner que d'autres cellules, comme les mastocytes, les éosinophiles, les macrophages et les monocytes peuvent également former ces pièges extracellulaires<sup>321</sup>. Je me concentrerai cependant sur les neutrophiles dans cette partie pour plus de facilité.

Ces NETs sont composés donc de chromatine décondensée ainsi que des protéines granulaires et cytoplasmiques (comme la neutrophile élastase, la cathepsine G ou encore la myéloperoxydase)<sup>322</sup>. La NETose est un programme de mort cellulaire distinct de l'apoptose ou de la nécrose. Ces deux dernières formes de mort cellulaire sont les plus courantes chez les neutrophiles. L'apoptose est induite via l'activation des caspases 3/7, elles même pouvant être activées par deux mécanismes différents (relargage du cytochrome c mitochondrial après exposition aux UV, ou activation de la voie Fas-ligand/TNF- $\alpha$ ). La nécrose est une mort cellulaire non contrôlée, souvent induite par des stress tels que le choc osmotique ou la chaleur, bien qu'il ait été reporté une induction de la nécrose par activation des PAMP bactériens via les protéines ROPK1 et RIPK3 (mort cellulaire nommée nécroptose).

La NETose a été découverte en 1996 dans les neutrophiles<sup>323</sup> puis décrite plus précisément en 2004<sup>322</sup>, notamment par l'observation d'ADN dans ces pièges. Ce processus implique un *burst* oxydatif médiée par la NADPH oxydase 2 (Nox2), la désintégration de l'enveloppe nucléaire ce qui induit la formation massive de vacuoles et une décondensation de la chromatine pouvant conduire à la formation de NETs<sup>324</sup>. C'est un processus également associé à l'autophagie : en effet, le traitement de neutrophiles humains avec la wortmannine (inhibiteur de PI3K et donc de l'autophagie) n'influence pas la production de ROS, cependant la décondensation de l'ADN est bloquée, condition essentielle pour la formation de NETs<sup>324</sup>.

#### b. Le *turnover* de l'actine comme acteur majeur de la NETose

L'activation de la NETose, et subséquemment la formation des NETs, est régulée par le cytosquelette. En effet, le traitement de neutrophiles avec la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation de l'actine), le nocodazole (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) ou encore

la blebbistatine (inhibiteur de la myosine II) abroge le relargage d'ADN extracellulaire stimulée avec fMLP (stimulation de formation des NETs)<sup>325</sup>.

Neubert *et al* on décrit plusieurs stades de la NETose : la phase 1 où la structure du noyau est toujours intacte, la phase 2 où s'effectue une expansion de la chromatine jusqu'à la membrane nucléaire, et enfin la phase 3 où il y a disruption de la membrane nucléaire et relargage des NETs<sup>326</sup>. Le traitement avec différentes drogues perturbant le *turn over* de l'actine (cytochalasine D, latrunculine A ou encore jasplakinolide) a montré que la dynamique du cytosquelette d'actine était importante dès la phase d'activation (phase 1), avec un effet plus prononcé pour le traitement au jasplakinolide qui abolit totalement la décondensation du noyau. En explorant plus précisément le mécanisme reliant l'actine au processus de NETose, l'importance des kinases ROCK1/2 a été mise en lumière, puisque le traitement Y-27632 (inhibiteur des ROCK1/2) induit également une très forte réduction de la décondensation du noyau. L'équipe de Papayannopoulos a également souligné le rôle prépondérant de la neutrophile élastase (NE), une sérine protéase qui subit une translocation des granules au noyau pour promouvoir la décondensation de la chromatine<sup>327</sup>. La protéine NE est séquestrée dans un réseau d'actine lorsque le neutrophile n'est pas activé. C'est la dépolymérisation de l'actine qui va permettre le relargage de la protéine NE dans le cytoplasme, lui permettant ainsi de se transloquer dans le noyau et agir sur la décondensation de la chromatine<sup>328</sup>.

Ces études ont donc démontré que le processus de NETose nécessitait une dynamique du cytosquelette d'actine complète dès la phase de stimulation des neutrophiles, pour pouvoir s'engager dans les phases suivantes et ainsi relarguer les NETs.

### 3. Activation des inflammasomes

L'inflammation résulte des mécanismes d'alerte mis en place par l'organisme lorsqu'il reconnaît des substances qui lui sont étrangères. Il existe trois phases de l'inflammation : la phase d'initiation (nommée aussi phase vasculaire), la phase d'amplification (ou phase cellulaire) et enfin la phase de résolution permettant la restauration de l'intégrité tissulaire. La phase d'initiation va débiter par l'activation des cellules immunitaires résidentes, tels que les cellules dendritiques ou les

macrophages. Les macrophages, en plus de leur activité de phagocytose décrite précédemment, vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, qui seront perçues comme des signaux d'alerte. Les cytokines pro-inflammatoires comprennent entre autre le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-18, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-1RA). Je vais particulièrement m'intéresser à la régulation de ces dernières. Les cytokines de la famille de l'IL-1 ont la particularité d'exister sous forme de précurseur (pro-cytokine) qui seront par la suite clivés par des enzymes de type caspase (comme la caspase 1). Ce clivage va être permis grâce à l'activation de complexe nommés « inflammasomes ».

#### a. Les inflammasomes : complexe protéique oligomérique

La grande majorité des inflammasomes sont des complexes composés de plusieurs protéines dont un senseur, une protéine adaptatrice (protéine ASC) et la pro-caspase-1<sup>329</sup>. Les senseurs sont les protéines qui vont être capable d'assembler le complexe inflammasome, et vont être activés par des PAMPs et DAMPs. Il existe à ce jour 6 protéines capables d'assembler le complexe inflammasome : les *nucleoide-binding domain-like receptors* (NLRs : NLRP3 NLRP1 NLRC4 NLRP6), *absent in melanoma 2-like receptor* (ALR : AIM2) et pyrine. Ces senseurs vont être activés par différents ligands qui leur sont spécifique (voir figure 9).

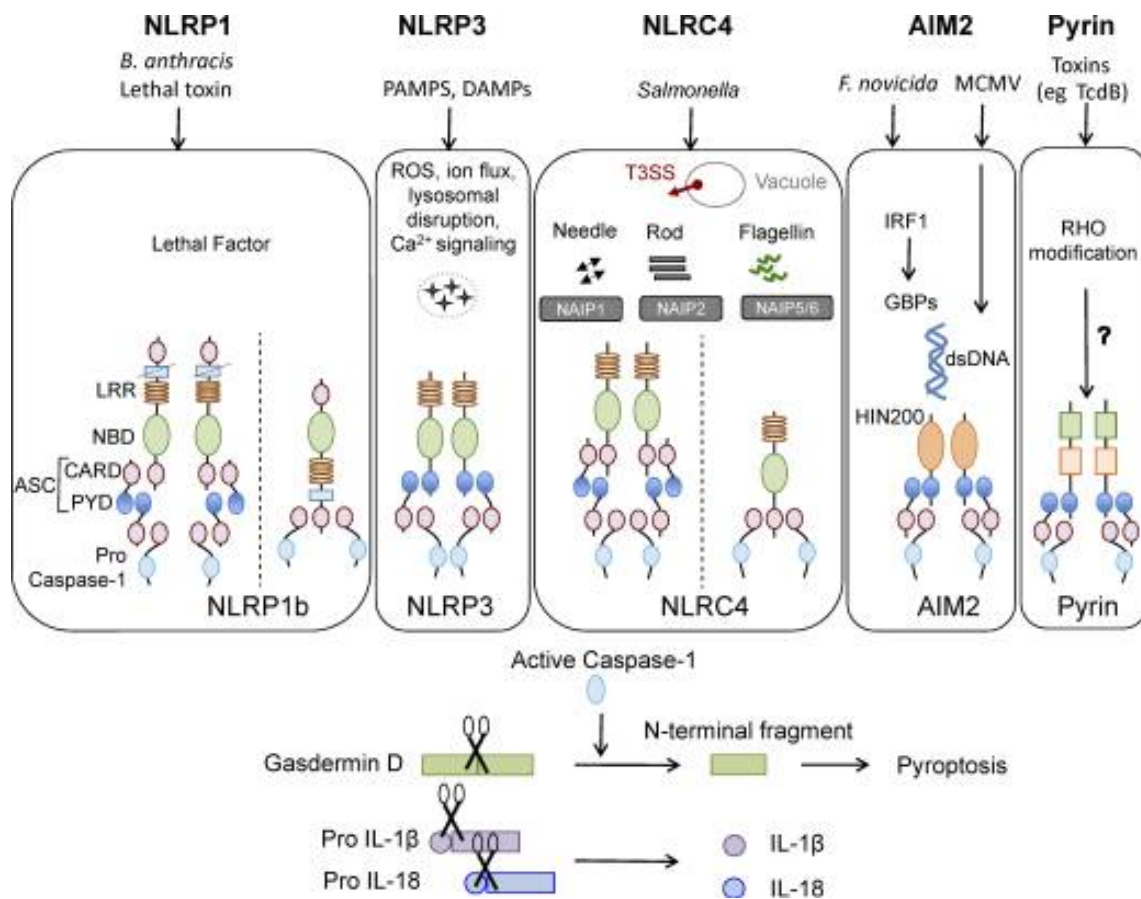


Figure 9. Les différents inflammasomes. Schéma tiré de la revue de Sharma et Kanneganti<sup>329</sup>.

Après l'activation des protéines senseurs, ces derniers vont nucléer la protéine ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) pour former un grain protéique, ou *speck*, permettant subséquemment le recrutement de la procaspase 1. D'après les observations, il semble qu'un seul speck ASC puisse être formé par cellule. La pro-caspase-1, une fois recrutée, va alors s'auto-activer par clivage en un hétérodimère actif, composé des sous unités p10 et p20. La caspase-1 alors active et fonctionnelle va à son tour cliver les cytokines pro-IL1 $\beta$  et pro-IL-18. Par ailleurs, la formation de l'inflammasome va induire la pyroptose, une forme spécifique de mort cellulaire inflammatoire. Un fait intéressant est qu'après à mort cellulaire, les speck ASC s'accumulent dans la lumière extracellulaire et peuvent agir comme activateur sur d'autres cellules<sup>330</sup>. Ces dernières peuvent en effet phagocytter ces specks, induisant l'activation de la caspase 1 et de la maturation de l'IL-1 $\beta$ .

Cependant, alors que l'on connaît de nombreuses voies d'activation des inflammasomes, les voies de régulation négatives sont quant à elles beaucoup moins connues.

#### b. L'actine : régulateur des inflammasomes ?

Plusieurs études récentes convergent à souligner l'importance du cytosquelette dans la mise en place et la régulation de la réponse inflammatoire<sup>331-336</sup>. Outre le rôle essentiel des microtubules (permettant l'interaction entre les protéines ASC et NLRP3<sup>337</sup>), les études *in vitro* ou *in vivo* murins montrent l'importance de certaines protéines liant l'actine dans la régulation négative des inflammasomes pyrine ou NLRP3. Par ailleurs, le traitement de cellules avec la latrunculine B ou la cytochalasine D induit une augmentation de la production de IL-1 $\beta$ <sup>331</sup>. Cette inhibition de NLRP3 par l'actine est dépendant de deux protéines : flightless-1 (protéine de la famille des gelsolines) et LRRFIP2 (régulateur positif de la signalisation TLR)<sup>331</sup>. LRRFIP2 inhibe l'activation de NLRP3 via son interaction avec flightless-1, montrant le rôle particulièrement important de cette dernière dans le rôle de la régulation négative de NLRP3. De plus, dans des macrophages murins *knocked down* pour Flightless-1, une augmentation de l'activation de NLRP3 est induite, relatée par l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ <sup>332</sup>. Cette inhibition est médiée par la séquestration de la caspase-1 par flightless-1 et le cytosquelette d'actine. Cette séquestration est levée par l'activation de la calpaïne, via l'activation de la voie calcique, qui va digérer la protéine flightless-1, permettre le relargage de la caspase-1 et donc la maturation des cytokines pro-inflammatoires telle IL-1 $\beta$ <sup>338</sup>.

L'étude de monocytes provenant de patients souffrant du syndrome de Wiskott-Aldrich (que je décrirai plus longuement dans la section III) a démontré le rôle de WASP dans la régulation négative de l'inflammasome NLRP3<sup>333</sup>. En effet, la stimulation des cellules WASP déficientes par l'ATP ou la nigéricine (tous deux activateurs de l'inflammasome NLRP3) induit une sécrétion plus importante d'IL-1 $\beta$  par rapport au cellules contrôles, associée avec une augmentation du pourcentage de cellules ayant un speck ASC.

Bien que l'on pourrait penser qu'un défaut dans le processus de dépolymérisation des microfilaments induise une inhibition de l'activation des inflammasomes, c'est en tout point le contraire. En effet, la protéine WDR1 est également importante pour la régulation de l'inflammation, et son absence ou sa non-activité induit une augmentation de la sécrétion de cytokine IL-18, conduit par l'activation du l'inflammasome pyrine<sup>334</sup>. Cela a été démontré grâce à deux modèles murins. Puisque le modèle murin basé sur le KO de WDR1 (*Wdr1<sup>kn/kn</sup>*) induisant une létalité embryonnaire, Kile *et al* ont utilisé des souris porteuses d'une mutation hypomorphique dans le gène WDR1 conduisant à un phénotype d'oreille rouge (ou *redear*, rd). Ces souris *Wdr1<sup>rd/rd</sup>* développent de manière spontanée des

lésions inflammation ainsi qu'une thrombocytopénie. Cette mutation dans la protéine WDR1 conduit à la production d'une protéine dont la durée de vie est réduite de moitié et dont la structure 3D est incorrecte, rendant potentiellement la protéine inefficace<sup>334</sup>. Les auteurs décrivent le phénotype auto-inflammatoire lié à la production monocyttaire d'IL-18. De manière intéressante, l'activation de l'inflammasome pyrine n'est pas modifiée dans les cellules monocytaires déficientes en WDR1, mais la production d'IL-18 est fortement augmentée. Par l'utilisation de souris hétérozygote *Wdr1<sup>xn/rd</sup>* (induisant une perte importante de l'expression protéique de WDR1), Kim *et al* ont démontré que la polymérisation d'actine déclenche la formation de speck ASC<sup>334</sup>. En effet, le traitement avec différentes drogues induisant la dépolymérisation des filaments d'actine de monocytes dérivés de foie fœtal *Wdr1<sup>xn/rd</sup>* induit une réduction de la sécrétion d'IL-18.

Il est intéressant de relever que, exceptés les régulateurs d'actine cités ci-dessus, le rôle des autres régulateurs du cytosquelette d'actine dans la régulation et l'activation des inflammasomes n'est que très peu décrit. Or d'après les observations précédentes, il apparaît que la dynamique du cytosquelette soit étroitement associée à l'assemblage des inflammasomes. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que les différents régulateurs du cytosquelette d'actine jouent un rôle de senseur et de médiateur de l'inflammation, en plus de leur activité de modulation de la dynamique des microfilaments.

### III) Le système immunitaire adaptatif

#### 1. Généralité

Comme décrit précédemment dans le préambule de ce chapitre, les cellules du système immunitaire adaptatif diffèrent de celles du système immunitaire inné par leur spécificité à un antigène donné, là où les cellules immunitaires innées vont reconnaître des PAMPs et des DAMPs. Ces récepteurs à l'antigène sont présents à la surface des lymphocytes T et B (noté ci-après LT et LB), et sont respectivement nommé TCR (*T-cell receptor*) et BCR (*B-cell receptor*). Le développement de ces cellules, leur activation et certaines de leurs fonctions sont dépendantes du cytosquelette, et plus particulièrement du cytosquelette d'actine.

##### a. Les lymphocytes T



Les lymphocytes T retrouvés en périphérie sont tous d'origine thymique. Outre leur rôle dans la capacité migratoire des précurseurs lymphocytaires (ETP, pour *Early T-cell Precursor*) puis des cellules T, les régulateurs du cytosquelette d'actine vont être important pour la différenciation des LT.

Il existe une diversité de cellules T, les plus répandues étant les lymphocytes possédant un TCR de type  $\alpha\beta$ , exprimant le corécepteur CD4 ou CD8. On se focalisera dans cette thèse sur ces lymphocytes, ainsi que sur les lymphocytes T exprimant le TCR  $\gamma\delta$ .

### (1) Développement des lymphocytes T

**Les différentes étapes du développement.** Les précurseurs des lymphocytes, provenant de la moelle osseuse, vont migrer dans le thymus grâce à l'expression à leur surface des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CCR9<sup>339</sup>. Leur définition dans le lignage spécifique T est permis grâce à l'expression du facteur de transcription Notch1, puisque son absence conduit à une lymphopénie de T<sup>340</sup>. À ce stade, les thymocytes, bien qu'engagé dans la lignée lymphocytaire T, n'expriment pas encore le TCR : une maturation de ces cellules va être nécessaire pour permettre l'obtention d'un TCR spécifique. Les cellules vont alors traverser différents stades, défini par l'expression extracellulaire des corécepteur CD4 et CD8. Ainsi, au début de leur développement, les thymocytes sont au stade double négatif (DN, donc CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) qui comporte 4 stades (DN1 à DN4). C'est au stade double négatif que va s'effectuer le réarrangement des gènes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR (20% des thymocytes, qui correspondront au LT- $\gamma\delta$ ), les gènes  $\alpha$  et  $\beta$  sans expression des corécepteurs CD4 et CD8 (20% des thymocytes qui correspondront aux cellules NKT) et les gènes  $\alpha$  et  $\beta$  avec expression des corécepteurs CD4 et CD8 (60% des thymocytes, qui correspondront au LT- $\alpha\beta$ ). Ces derniers ont donc acquis le stade de double positif (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) et continueront leur développement.

Une première sélection s'effectue au sein de la population des thymocytes DP, que l'on nomme « sélection positive » (ou sélection vis-à-vis du CMH), qui vise à sélectionner les thymocytes capables de reconnaître les molécules du CMH. Cette sélection positive s'effectue par l'interaction entre le TCR  $\alpha\beta$  des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> avec les molécules du CMH de classe I ou II exprimées par les cellules thymiques épithéliales corticales (cTECs). Si le thymocyte DP est capable de reconnaître la molécule du CMH avec une faible affinité, il va recevoir un signal de survie et être sélectionné positivement. Si le

thymocyte reconnaît la molécule CMH avec une trop forte affinité, ou ne reconnaît pas du tout la molécule de CMH, alors elle ne recevra pas de signal de survie et mourra par négligence.

La mécanique soutenant le choix du lignage simple positif a longuement été sujet à débat. Cependant, depuis plusieurs années, c'est le modèle de signalisation cinétique qui semble prédominer dans la communauté scientifique<sup>341</sup>. Ce modèle décrit un choix de lignage dépendant de la persistance et de la force du signal TCR induit par l'interaction avec le CMH<sup>342</sup>. En plus d'avoir détecté *in vitro* et *in vivo* une sous population de DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>, l'équipe de Singer a démontré que les cellules recevant un signal persistant et fort se différencieront en simple positif CD4 (SP CD4<sup>+</sup>). Les cellules recevant au contraire un signal CMH faible et discontinu vont répondre au signal de la cytokine IL-7, réexprimer le corécepteur CD8 (événement nommé *coreceptor reversal*) ce qui induira des simples positifs CD8 (SP CD8<sup>+</sup>).

Une « sélection négative » (ou sélection vis-à-vis du peptide) va ensuite s'effectuer, où le but sera d'éliminer les lymphocytes T réactifs contre des antigènes du soi. Ceci va être permis notamment par la présentation à la surface des cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) et des cellules dendritiques d'un peptide du soi, grâce au facteur de transcription AIRE (*Auto immune regulator element*).

**Rôle des régulateurs d'actine.** En connaissant l'impact important que les régulateurs d'actine ont sur des événements cellulaires ou des fonctions biologiques, il est pertinent de se questionner sur l'importance de ces protéines dans le développement lymphocytaires T. Plusieurs études ont en particulier révélé l'importance de WASP et de la cofiline dans la thymopoïèse. Le rôle de WASP dans le développement des lymphocytes T (LT) a été suggéré par l'observation de la lymphopénie des patients WAS (que nous aborderons plus en détail dans le chapitre 3). Il a été démontré dans le modèle murin que la protéine WASP jouait un rôle mineur dans la transition du stade DN au stade DP<sup>343</sup>. Cette même étude a montré cependant le rôle coopératif entre WASP et N-WASP dans le développement des LT, puisque le double *knock-out* conditionnel des protéines WASP et N-WASP dans les thymocytes induisait un blocage plus important de ces derniers au stade DN.

La cofiline semble jouer un rôle plus prépondérant que WASP dans le développement des LT. La génération d'une lignée murine exprimant la protéine cofiline non active (Cfl1<sup>nf/nf</sup>; *nf= non-functional cofilin*) a permis de mettre en lumière l'importance de la cofiline dans le développement des LT- $\alpha\beta$ <sup>344</sup>.

De manière intéressante, le développement des lymphocytes de ces souris est bloqué au stade double négatif (plus précisément DN3), induisant une lymphopénie de LT SP CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Ceci est associé avec une accumulation d'actine et un défaut migratoire de ces cellules. Cependant, il n'y a pas de défaut de développement des LT- $\gamma\delta$ . Ce phénotype est similaire au phénotype retrouvé dans des cas de défauts de signalisation du pré-TCR (avec l'accumulation et l'arrêt de développement des cellules au stade DN3<sup>345</sup>), ce qui pourrait s'expliquer par le défaut d'expression à la surface de la chaîne  $\beta$  du TCR dans les DN3 Cfl1<sup>nf/nf</sup>.

Dans le cas d'autre protéine telle que la coronine 1A, leur expression est importante pour la sortie du thymus. La coronine 1A est une protéine interagissant avec le complexe Arp2/3 pour bloquer la nucléation de l'actine<sup>346</sup>. Chez les souris ayant un déficit de lymphocyte T périphériques (souche murine *Ptcd*), les lymphocytes T ont un défaut de migration en réponse à S1P et CXCL12, démontrant un défaut de sortie thymique. Là où les thymocytes s'accumulent chez les souris *Ptcd* (*peripheral t cell deficiency*, due à la mutation E26K de la coronine 1A), il y a une diminution drastique des thymocytes dans les souris *Coro1A*<sup>-/-</sup>, due à une diminution de la survie cellulaire<sup>347</sup>. Le défaut migratoire des LTs<sup>E26K</sup> est dû à une mauvaise localisation de la coronine 1A. En effet, la protéine mutée n'est pas localisée au front de migration, ce qui conduit à la formation de protrusions larges et anormales<sup>348</sup>.

## (2) De lymphocytes T naïfs à cellules effectrices

**Recirculation des lymphocytes T naïfs.** Les thymocytes simples positifs, que l'on nommera désormais lymphocytes T, vont ensuite sortir du thymus et circuler entre les organes lymphoïdes secondaires (OLII), à la recherche de l'antigène pour lesquels ils sont spécifiques. Cette recirculation des LTs est permise grâce à l'expression de différents récepteurs<sup>349</sup> : les récepteurs couplés aux protéines G (de type CCR7) qui permet l'entrée des LTs dans les OLII, et le récepteur S1P1 qui permet leur sortie. Deux études ont permis de rétablir le lien entre l'expression de S1P1, le cytosquelette d'actine et le trafic cellulaire des LTs. En effet, la protéine JMJD3, une déméthylase, va agir sur les promoteurs des gènes codants pour la protéine S1P1<sup>350</sup>, mais également PDLIM4<sup>351</sup>, une protéine impliquée dans le *crosslink* de l'actine et interagissant avec l' $\alpha$ -actinine<sup>352,353</sup>. L'absence de JMJD3 induit une réduction de l'expression de PDLIM4, CCR7 et S1P1 dans les lymphocytes T murins, conduisant à un défaut de migration de ces mêmes LTs<sup>351</sup>. Par ailleurs, cette étude a démontré que PDLIM4 interagissait avec S1P1 à son extrémité C-terminale et avec les filaments d'actine via son domaine LIM situé à l'extrémité N-

terminale. Cette interaction semble nécessaire pour le remodelage du cytosquelette d'actine dans les LT murins puisque l'introduction d'un vecteur permettant l'expression de PDLIM4 dans des LT JMJD3<sup>-/-</sup> rétablit la capacité de migration des lymphocytes T vers dans les organes lymphoïdes secondaires.

**Activation et différenciation.** L'activation des lymphocytes T naïfs s'effectue dans les OLII. Ils vont s'activer en interagissant avec les cellules dendritiques matures qui vont leur présenter l'antigène, leur envoyer des signaux de costimulation et sécréter des cytokines. Le but étant de sélectionner les lymphocytes T spécifiques du pathogène et leur conférer des fonctions effectrices. Les cytokines sécrétées par les cellules dendritiques vont envoyer un signal de polarisation des lymphocytes T, qui incluent les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (ou lymphocytes T helpers, Th) et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (ou lymphocytes T cytotoxiques, Tc). Que ce soient les LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, différents sous-types cellulaires sont selon les pathologies (infections bactériennes, virales, fongiques, auto-immunité, cancer, etc.)<sup>354</sup> (voir Table 2).

La polarisation et l'acquisition des fonctions effectrices des LT dépend de leur facteur de transcription induit par les cytokines produites par les cellules dendritiques. Les modifications épigénétiques jouent également un rôle important dans l'engagement des LTs dans la différenciation vers un sous type spécialisé. La protéine WASP possède une action cytoplasmique (polymérisation des microfilaments) mais également nucléaire, en induisant la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers le phénotype T<sub>H1</sub>. En effet dans des lymphocytes T<sub>H1</sub> primaires humains, WASP est recrutée spécifiquement au niveau du promoteur proximal du gène *TBX21*, codant pour T-bet<sup>355</sup>. Dans le noyau de ces cellules, WASP s'associe avec deux protéines, RBBP5 (H3K4 triméthyltransferase) et JMJD2A (H3K9/H3K36 triméthylase) pour permettre la transcription de T-bet. De manière intéressante, WASP a un rôle à la fois d'activateur mais également de répresseur au sein de la chromatine. Ceci est due à des évènements de SUMOylation, qui fournit une double casquette à la protéine WASP<sup>356</sup>. En effet, bloquer la SUMOylation de WASP dans les LT cultivés dans un milieu T<sub>H1</sub> favorise l'activation ectopique de gènes pro inflammatoires, et induit une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéiques des gènes T<sub>H1</sub> mais une augmentation des gènes T<sub>H17</sub>.

Par ailleurs, alors que la production de cytokine TH2 ne semble pas affecté, la production de cytokine TH1 (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) est défectueuse dans les cellules WASP déficientes<sup>357</sup>. La diminution des ARNm des gènes codant pour ces cytokines s'explique par le fait que ce sont des gènes cible de T-bet.

		<b>Facteurs de transcription</b>	<b>Cytokines effectrices</b>
<i>LT CD4<sup>+</sup></i>	T <sub>H</sub> 1	T-bet, STAT4	IFN- $\gamma$
	T <sub>H</sub> 2	GATA3, STAT6	IL-1, IL-5, IL-13
	T <sub>H</sub> 17	ROR $\gamma$ T, BLIMP1	IL-17 A/F
	T <sub>H</sub> 9	PU.1	IL-9
	T <sub>FH</sub>	Bcl-6	IL-21
	T <sub>H</sub> 22	AhR	IL-22
	iTreg	Foxp3	IL-10 TGF $\beta$
<i>LT CD8<sup>+</sup></i>	T <sub>C</sub> 1	T-bet, EOMES, STAT4	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
	T <sub>C</sub> 2	GATA3, STAT6	IL-1, IL-5, IL-13
	T <sub>C</sub> 9	IRF4, STAT6	IL-9
	T <sub>C</sub> 17	ROR $\gamma$ T, IRF4, STAT3	IL-17 A/F IL-21 IL-22
	T <sub>C</sub> 22	AhR	IL-22, TNF- $\alpha$

Table 1. Polarisation des lymphocytes T. D'après les revues de Paul et Ohashi<sup>354</sup>, et de Wambre et al<sup>358</sup>.

Si Notch1 est essentiel au développement des lymphocytes T à plusieurs niveaux, il est également important pour l'activation des cellules T matures. Le lien entre la signalisation TCR et l'activation de Notch1 reste encore à explorer, même si depuis peu, ce lien semble dépendant du régulateur d'actine coronine1A. En effet, l'étude de Wraith a démontré que la kinase sérine/thréonine PKC $\theta$  induisait la phosphorylation de la coronine1A au niveau de la synapse immunologique, permettant la formation stable du lamellum<sup>359</sup>. La protéine ADAM10 va pouvoir alors être recrutée. Cette dernière est une protéine membranaire, et plus particulièrement une métalloprotéinase, qui va cliver la partie extracellulaire de Notch1. La partie intracellulaire (le domaine NICD), va pouvoir ensuite être transloquer dans le noyau des lymphocytes T.

La signalisation TCR induit également des modifications au niveau de l'actine nucléaire. En effet, la signalisation TCR et le flux calcique vont induire une polymérisation de filaments dans le noyau, polymérisation médiée par le complexe Arp2/3<sup>360</sup>. Cette formation d'actine filamentaire nucléaire est nécessaire pour les fonctions effectrices des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, notamment la sécrétion de cytokine. Cependant, toutes les cytokines ne sont pas affectées par le blocage de l'activité de Arp2/3, suggérant ainsi que la polymérisation des filaments d'actine dans le noyau ne cible que certains gènes.

Ces études démontrant le rôle de différentes protéines régulatrices du cytosquelette d'actine dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T en certains sous type soulèvent l'importance de ces protéines dans le développement et la maturation des cellules immunitaires. Ces études ont pu démontrer que le rôle des régulateurs d'actines n'est pas cantonné à la seule modulation des filaments d'actine, et il serait pertinent de se demander si d'autres protéines régulatrices du cytosquelette d'actine pourraient jouer des rôles au niveau nucléaire.

### b. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les cellules spécialisées dans la production d'anticorps. Ces anticorps vont reconnaître des composés sous leur forme native, c'est-à-dire des protéines, des lipides, des sucres etc. La réaction du centre germinatif est le processus pilier de l'immunité humorale dépendant des LTs<sup>361</sup>, puisqu'il permet la production d'anticorps de haute affinité ainsi de la mise en place de la réponse humorale mémoire.

Le développement des lymphocytes B débute dans la moelle osseuse, où à partir d'un progéniteur, les cellules vont se développer en pro cellules B (où s'effectue la recombinaison VDJ), puis pré cellules B (expression du pré-BCR, exclusion allélique, réarrangement de la chaîne légère VJ) pour donner des lymphocyte B (LB) immature exprimant à la surface des molécules IgM<sup>362</sup>. Ces LB immature vont alors migrer vers les OLII, où ils continuent de se développer en cellules B transitionnels, puis en LB matures. Ces LB matures vont s'organiser dans les centres germinatifs des OLII, et via leur interaction avec des LT CD4<sup>+</sup> de type T<sub>FH</sub>, vont être activés et permettre la mise en place de la réponse humorale.

Le développement des lymphocytes B est dépendant du cytosquelette d'actine. Tout comme les lymphocytes T, les LBs doivent réarranger leur cytosquelette d'actine pour pouvoir migrer au travers de la moelle osseuse, puis jusqu'au OLII. Dès lors, un défaut de capacité migratoire est responsable d'un

#### MENTION SPECIALE

Les centres germinatifs (CG) sont des structures retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires dans lesquelles les lymphocytes B vont subir les hyper mutations somatiques et la recombinaison de classe (nécessaire pour permettre la production d'anticorps spécifiques et l'obtention d'un répertoire BCR diversifié) et la maturation d'affinité pour leur antigène<sup>357</sup>.

développement lymphoïde B défectueux. Ainsi, la protéine WASP est importante sur de nombreux points cellulaires des LB. D'un point de vue du développement, il a été démontré dans un modèle murin que la perte de la protéine WASP induisait un défaut migratoire des LB et *a fortiori* un défaut de *homing* dans les OLIIs<sup>363</sup>. Par ailleurs, la protéine WASP est importante pour la réaction du centre germinatif puisque son absence induit une diminution de LB dans la zone marginale des OLIIs, ainsi qu'un délai et une diminution de la quantité d'anticorps produits<sup>363</sup>. La perte de la protéine WIP induit également une lymphopénie B associée avec une diminution des réponses B<sup>364,365</sup>. D'autres protéines régulatrices du cytosquelette d'actine comme DOCK8<sup>366</sup>, HEM1<sup>367</sup>, ou encore l'eitrine<sup>368</sup> vont être importantes pour le développement des LBs, la formation des centres germinatifs ou encore la production d'anticorps.

#### (1) Activation des LB

Les lymphocytes B n'échappent pas à la règle : leur activation dépend du remodelage du cytosquelette d'actine et de sa dynamique. La dynamique de l'actine corticale est particulièrement importante dans les lymphocytes B. En effet, la clusterisation des molécules BCR induit rapidement une dépolymérisation des microfilaments au niveau cortical, via l'activation de la cofiline<sup>369</sup>. Le blocage de la déphosphorylation de la cofiline conduit à un défaut de la formation de la synapse immunologique, démontrant ainsi que la dynamique d'actine est importante pour l'activation des LBs.

Par ailleurs la signalisation BCR va activer des GTPases, comme CDC42, Rac ou encore RhoA<sup>370</sup>. RhoA est notamment connu pour activer la formine DIAP1, mais également la myosine IIA via son action sur ROCK1. Le rôle de DIAP1 dans les LBs n'est pas encore sujet à étude, cependant cette formine est importante dans les LTs notamment pour la formation de la synapse immunologique, l'adhésion et la polarisation des microtubules. On peut alors prédire les mêmes fonctionnalités de cette protéine dans les LBs.

#### (2) Extraction antigénique par les LBs

Après l'interaction d'un LB avec une cellule présentatrice d'antigène (CPA) et formation de la synapse immunologique, le LB va réarranger son cytosquelette dans l'optique d'extraire l'antigène présenté par la CPA, l'internaliser, puis le présenter lui-même aux LTs. Les molécules de BCR sont rattachées au cytosquelette d'actine et notamment par des filaments d'actomyosine<sup>371</sup>. Lorsque le BCR

va être engagé et se regrouper en cluster, des contractions d'actomyosine répétitives vont permettre l'arrachement de l'antigène à la CPA<sup>372,373</sup>. Si les contractions d'actomyosines sont inefficaces ou l'antigène trop ancré à la CPA, les LBs vont alors sécréter des molécules lysosomales afin de libérer l'antigène<sup>374</sup>. Cette sécrétion de protéase au niveau de l'aire synaptique est permise grâce à une polarisation du MTOC vers l'espace synaptique, permettant le remorquage des vésicules lysosomales contenant les protéases nécessaires à l'extraction. Ce processus nécessite l'action de CDC42 et PKCζ<sup>374</sup>. En effet, l'équipe de Lenon-Duménil a démontré que CDC42 permet la polarisation du MTOC et des lysosomes à la synapse immunologique, mais active également PKCζ qui va permettre la sécrétion des lysosomes.

L'extraction antigénique dépend également des propriétés physiques de la surface portant l'antigène<sup>375</sup>. En effet, une surface rigide déformable permet l'extraction d'antigène de haute affinité, une surface souple et déformable permet d'extraction d'antigène de basse affinité, et une surface rigide non déformable nécessite une extraction par sécrétion enzymatique. L'endocytose qui suit l'extraction de l'antigène va être également dépendant de certains régulateurs d'actine comme WAS, WIP, ou encore le complexe Arp2/3.

## 2. La synapse immunologique : aire de contact

### a. Structure

La synapse immunologique (SI) est une aire de contact et d'échange entre deux cellules. La SI peut s'établir entre un LT/LB et une CPA mais également entre un LT cytotoxique et une cellule cible<sup>376,377</sup>. Cette partie se focalisera sur la régulation de la synapse immunologique dans un lymphocyte T. Cette synapse est médiée par l'interaction TCR-CMH-peptide (*T-cell receptor* et le complexe majeure d'histocompatibilité chargé d'un peptide antigénique) mais également par de nombreuses molécules<sup>377</sup>. L'équipe de Kupfer a décrit trois aires au niveau de la synapse immunologique qui ont été définies comme des clusters d'activation supramoléculaires (SMAC). Le cSMAC correspond à l'aire centrale où se trouvent les molécules TCR/CD3 ou encore la molécule CD28 permettant l'activation des lymphocytes. Le pSMAC périphérique contient entre autres les intégrines comme LFA-1 et va donc jouer un rôle stabilisateur de la synapse. Enfin le dSMAC est l'aire distale comportant les molécules à



longs domaines extracellulaires comme CD43<sup>378</sup> ou CD45<sup>379</sup> (figure 10 : exemple de la synapse immunologique entre un LT et une CPA). C'est également une structure qui va permettre, grâce aux différentes molécules exprimés de part et d'autre des cellules interactrices, d'envoyer un « signal stop » de migration aux lymphocytes<sup>380</sup>.

#### b. Radeaux lipidiques

Trois signaux sont nécessaires à l'activation du lymphocytes T : l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide (1<sup>er</sup> signal)<sup>381</sup>, l'interaction de la molécule co-stimulatrice CD28 avec CD80/86 (2<sup>ème</sup> signal)<sup>382</sup> et la production cytokinique de l'CPA (3<sup>ème</sup> signal). De manière intéressante, les protéines de signalisation nécessaire à l'activation des lymphocytes T (Lck<sup>383</sup>, LAT<sup>384</sup>, PKC $\theta$ <sup>385</sup>) sont retrouvées dans ce que l'on nomme des radeaux lipidiques. Ces radeaux lipidiques sont retrouvés au niveau du cSMAC et sont définis comme des micro domaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, en glycosphingolipides et en protéines ancrées via un groupe GPI<sup>386</sup>. Leur présence donne à la synapse immunologique une composition lipidique très particulière.

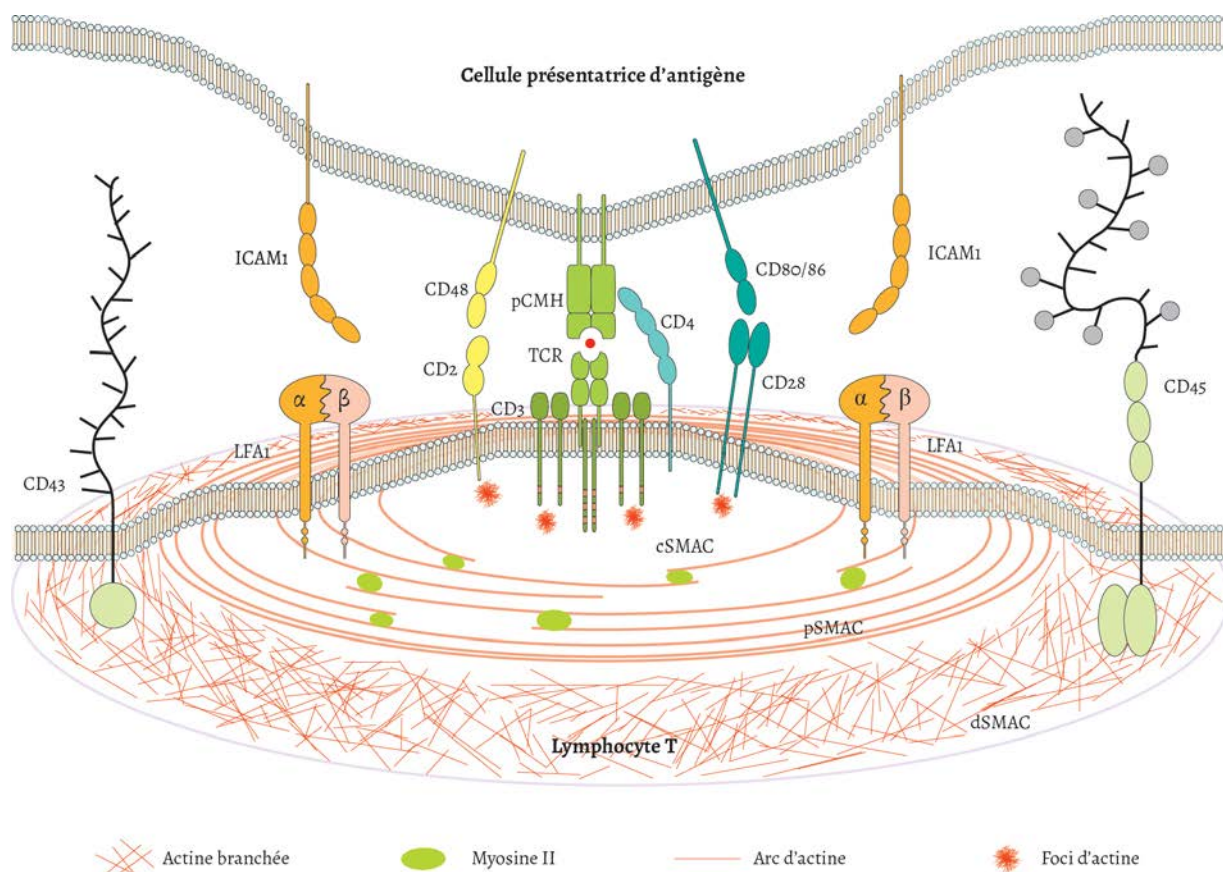


Figure 10. Structure de la synapse immunologique LT/CPA et arcs d'actine. Inspiré de Yokosuka et al<sup>387</sup>, et Roy et al<sup>388</sup>.

Les radeaux lipidiques, qui à l'origine ont été décrits comme des structures flottantes (d'où ils tirent leur nom), sont en réalité connectés au cytosquelette d'actine. L'étude par spectrométrie de masse a pu mettre en lumière l'enrichissement des radeaux lipidiques en protéines ABP<sup>389</sup>. Plus tard, différentes études ont démontré plus précisément les rôles des protéines telles que l'eitrine et la filamine dans le lien entre les radeaux lipidiques et le cytosquelette d'actine. Par ailleurs, mon encadrant avait observé que WASP était recrutée au niveau des radeaux lipidiques et que son absence dans les lymphocytes T de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich était associée à un défaut de regroupement de ces radeaux lipidiques<sup>390</sup>.

L'organisation spatiale des molécules et la morphologie cellulaire est soutenue par une structure typique du réseau de filaments d'actine. L'équipe de J. Hammer a démontré la formation d'arc d'actine circulaires au niveau du pSMAC<sup>391</sup>, riche en myosine IIA, et possédant une capacité de *turnover* plus importante. Ces arcs d'actine, d'abord controversés par le fait d'avoir été observés uniquement dans une lignée lymphocytaire T (Jurkat), sont présents également dans les lymphocytes T primaires, et

semblent soutenue par la myosine II<sup>392</sup>. Leur formation serait d'ailleurs dépendant des formines, qui initierait depuis le dSMAC des filaments qui deviendrait par la suite des arcs d'actine<sup>392</sup>. Le traitement de cellules Jurkat par l'inhibiteur des formines SMIFH2 réduit drastiquement le nombre d'arcs d'actines observables dans le pSMAC par microscopie de super résolution<sup>392</sup>.

#### c. Organisation spatiale du TCR via le remodelage du cytosquelette d'actine

Si les molécules de TCR sont distribuées aléatoirement au niveau de la membrane plasmique dans les lymphocytes T non activés<sup>393</sup>, les récepteurs vont s'organiser en *micro-clusters* lors de la formation de la synapse immunologique. Les arcs d'actine précédemment cités vont d'ailleurs jouer un rôle essentiel dans l'organisation et le regroupement des molécules TCR. Cependant la régulation de ces arcs, et *a fortiori* la formation des clusters de TCR est sujet à controverse<sup>394</sup>. En effet, si l'équipe de Hammer a décrit un rôle de la myosine IIA dans le regroupement des molécules TCR, une autre école propose que ce regroupement en *micro-clusters* serait dirigé par la dynéine et donc dépendant des microtubules<sup>395</sup>. Bien que des études supplémentaires sont nécessaire pour saisir la subtilité des mécanismes de régulations des arcs d'actine, des études ultérieures ont démontré que le réseau d'actine était important pour la centralisation des molécules TCR au centre de la synapse et était nécessaire au maintien de la phosphorylation de la protéine PLC $\gamma$ 1<sup>396</sup>. Les molécules TCR se trouvant entre les arcs d'actine, cette centralisation des molécules TCR pourrait d'effectuer par la poussée de ces molécules par les arcs, vers le cSMAC.

#### d. Rôle de l'actine dans la régulation de l'intégrine LFA-1

Comme il l'a été décrit dans le chapitre précédent, l'actine et ses régulateurs jouent un rôle dans la formation de la synapse immunologique, ainsi que dans la polarisation du centrosome. Comme l'ont décrit Dustin et Cooper, la formation de la synapse immunologique est une succession de différentes étapes

#### MENTION SPECIALE

Les lymphocytes B forment également une synapse immunologique avec une CPA. Cette aire de contact est également dépendante des régulateurs du cytosquelette. Ainsi la signalisation BCR permet l'activation des intégrines LFA-1 et VLA4 permettant l'adhésion du LB à la CPA<sup>404-406</sup>. De la même manière que pour les lymphocytes T, les myosines et la dynéine (et donc les microtubules) sont nécessaires au regroupement des molécules BCR en *micro-clusters* à la synapse<sup>370,407-409</sup>.

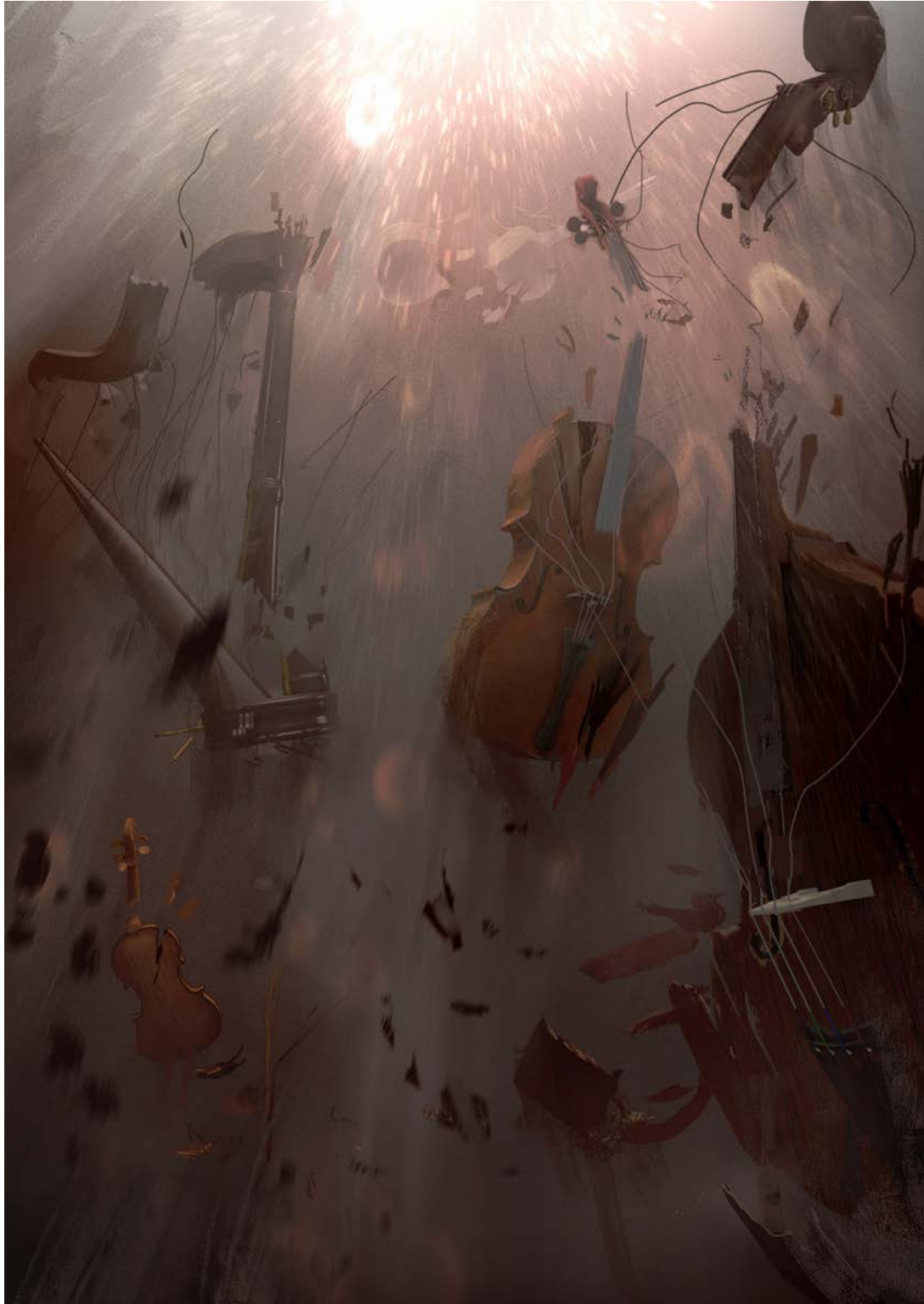
permettant un adhésion stable entre un LT et une CPA<sup>397</sup>. Le premier contact entre un LT et une CPA va être médié par l'intégrine LFA-1 et la molécule CD2. Au contraire de l'intégrine L-selectine qui, comme cité dans le précédent chapitre, se situe au niveau des microvillosités, l'intégrine LFA-1 se situe au niveau du corps cellulaire. Lorsque le LT est au repos, les molécules d'LFA-1 sont maintenue dans une conformation fermée, sont distribuées au niveau de la membrane plasmique<sup>398</sup> et sont reliées aux filaments d'actine grâce à différentes protéines notamment la taline<sup>377</sup>. En condition d'activation, LFA-1 va adopter une conformation de haute affinité lui permettant d'interagir avec son ligand ICAM-1. L'activation et l'organisation des molécules de LFA-1 est fortement régulées par le cytosquelette d'actine. En effet la taline (reliant LFA-1 aux microfilaments) est déterminante dans l'activation de LFA-1 médiée par le TCR, puisque son absence induit un défaut d'adhésion à ICAM1 ainsi qu'un défaut d'activation et de regroupement en cluster de LFA-1<sup>399</sup>. Par ailleurs, l'étude par notre laboratoire de LT déficients pour la protéine WASP a mis en lumière le rôle de cette protéine dans la régulation de la localisation moléculaire de LFA-1 en *nano clusters* au sein de la synapse immunologique<sup>400</sup>. Par ailleurs, il est nécessaire d'avoir un *turnover* d'actine continu pour maintenir la conformation de haute affinité de LFA-1 dans les lymphocytes T<sup>401</sup>.

#### e. Le cas de la synapse lytique : sécrétion des molécules lytiques

Les LTs cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (CTL) sont essentielles à l'élimination des cellules infectées par des virus, ou encore les cellules tumorales. Pour se faire, elles vont former une synapse immunologique

particulière avec les cellules cibles, puis sécréter des molécules lytiques (perforine granulysine et granzymes) qui aura pour conséquence la mort par apoptose des cellules cibles.

La synapse immunologique des cellules cytotoxiques est particulière en sa structure. En effet, elle comporte un domaine de signalisation (similaire au cSMAC) et un domaine sécrétoire/adhésion (où vont converger le MTOC et les molécules lytiques)<sup>402</sup>. La modulation du cytosquelette d'actine est importante pour la lyse cellulaire. En effet, un fort enrichissement d'actine est induit après l'initiation du contact avec la cellule cible, puis une déplétion de l'actine corticale au centre de la synapse va permettre la polarisation du MTOC et la sécrétion des molécules lytiques<sup>403</sup>. Cette polarisation des granules de perforine est un évènement dépendant des protéines WIP, WASP et Arp2/3<sup>404,405</sup>. De plus, il a été démontré dans les cellules *natural killer* (NK) que les granules lytiques été sécrétés au travers du réseau d'actine au niveau de la synapse<sup>406</sup>. L'exocytose des molécules lytiques est également dépendant de la dynamique des microfilaments puisqu'il a été démontré chez les NK l'importance de la protéine UNC-45A (protéine chaperonne de la myosine II) dans l'exocytose des granules lytiques<sup>407</sup>. UNC-45A va notamment permettre l'interaction de la myosine IIA avec l'actine.



***Les immunodéficiences primaires.** Lorsque des maladies génétiques impactent des protéines essentielles des cellules immunitaires, celles-ci sont alors incapables d'exercer leur fonction, à l'image d'instruments brisés, incapable de produire un son. Illustration de Edouard Noisette©. Reproduction restreinte au manuscrit de thèse.*

## CHAPITRE 3

# Les défauts du cytosquelette d'actine causant des immunodéficiences primaires

Les fonctions immunitaires évoquées dans le chapitre 2 montrent la nécessité d'avoir un cytosquelette d'actine fonctionnel. Il est logique de penser que des défauts généralisés d'un régulateur du cytosquelette d'actine puisse affecter le bon fonctionnement du système immunitaire dans sa globalité. Ce chapitre aura pour but de décrire les immunodéficiences primaires qui émergent due à des mutations génétiques touchant les régulateurs du cytosquelette d'actine, et d'apporter une vision plus clinique des défauts du cytosquelette.

## I) Le décryptage des immunodéficiences primaires

Cette section a pour but de donner une vision d'ensemble de ce que sont les immunodéficiences primaires (ou PID), d'expliquer brièvement les différentes catégories de PID, les signes avant-coureurs ainsi que les nouveaux moyens mis en place pour l'aide au diagnostic des patients.

### 1. Généralités

Comme il a pu être souligné par le précédent chapitre, le système immunitaire est un système complexe dont le but est de nous protéger contre les infections par des microorganismes ainsi que des menaces provenant de notre propre corps, comme le cancer. Lorsque le système immunitaire est défectueux ou absent, des immunodéficiences peuvent apparaître. Il en existe de deux types : les immunodéficiences primaires (dû à un défaut congénital) et les immunodéficiences secondaires (défini comme une immunodéficiência acquise). Les immunodéficiences secondaires sont causées par des facteurs environnementaux, comme la chimiothérapie, l'infection virale (par exemple VIH), des irradiations. Les immunodéficiences primaires vont quant à elles être dues à des mutations affectant des gènes particulièrement importants pour le système immunitaire.

Les immunodéficiences primaires regroupent un ensemble hétérogène de maladies rares, dont la prévalence est inférieure à 0,01% (1 cas pour 10 000 naissances). De par la diversité des mutations génétiques et des gènes touchés (354 gènes répertoriés depuis la dernière mise à jour<sup>408,409</sup>), ces maladies possèdent un spectre large de manifestations cliniques et cellulaires. En plus des défauts immunitaires fonctionnels et/ou développementaux, les patients présentant une immunodéficiência primaire sont plus susceptibles aux infections et possèdent une prédisposition aux maladies auto-immunes et aux cancers.

### 2. Classification



Il n'existe pas de classification à proprement défini des différentes immunodéficiences primaires. De manière générale, il existe une classification regroupant les maladies en fonction des perturbations immunologiques qu'elles induisent. Cette classification a été créée conjointement entre l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'*International Union of Immunological Societies* (IUIS)<sup>408</sup>. Les maladies sont donc catégorisées en 8 groupes : (1) les déficiences avec un défaut combiné des lymphocytes T et B ; (2) déficiences en anticorps ; (3) défaut de phagocytose ; (4) défauts génétiques de la régulation immunitaire ; (5) défauts de l'immunité innée intrinsèque : molécules de signalisation et récepteurs ; (6) maladies auto inflammatoires ; (7) déficiences dans la cascade du complément ; (8) autres maladies génétiques caractérisées. L'émergence de nouvelles PID (permise notamment par une amélioration des diagnostics des patients) a augmenté au cours des 20 dernières années et chaque maladie nouvellement décrite peut alors être implémentée dans cette classification. Aucune de ces catégories ne peut contenir l'ensemble des immunodéficiences primaires affectant la régulation du cytosquelette d'actine.

Cette classification peut cependant s'avérer peu adaptée si l'on veut s'en aider pour poser un diagnostic basé sur des signes cliniques ou hématologiques. C'est pourquoi deux autres classifications, plus optimale pour cet usage ont été créées en parallèle<sup>410,411</sup>. La classification PIDO (*Primary Immunodeficiency Disease Ontology*) regroupe les PID en fonction des phénotypes cliniques les plus communément observés par les cliniciens et pédiatres lors du diagnostic<sup>411</sup>. Cette classification est associée au logiciel PIDfinder, dont l'objectif est d'aider à poser un diagnostic en listant les signes cliniques des patients. L'autre classification disponible, basée sur une approche mathématique, permet de regrouper les différentes PID en cluster selon leur caractéristiques partagées après collecte des paramètres cliniques, pathologiques et les caractéristiques biologiques<sup>410</sup>. À cela s'ajoute des indications concernant la sévérité de la maladie, les options thérapeutiques, ou encore les propriétés fonctionnelles des protéines impactées par les mutations.

### 3. Les manifestations cliniques

Le diagnostic des patients atteints d'immunodéficiences est fortement aidé par des signes cliniques à des infections récurrentes ou par des pathogènes opportunistes, une activation constante

du processus inflammatoire ou une auto immunité, ou encore un syndrome lymphoprolifératif bénin/malin associée avec un symptôme tumoral<sup>412,413</sup> (ou une combinaison de ces facteurs cliniques).

En ce qui concerne les infections par des pathogènes, la plupart des immunodéficiences primaires prédisposent à un certain spectre d'infection pathogéniques. C'est la récurrence des infections, qui dans une population saine sont relativement communes, qui peuvent indiquer un défaut immunitaire important.

L'auto-immunité ou un syndrome hyper inflammatoire peuvent également être des signes sous-jacents d'une immunodéficiences primaire. Si l'on prend l'exemple du syndrome de Wiskott-Aldrich, les patients présentes une auto-immunité médiée par des anticorps dans 40 à 70% de cas. En ce qui concerne les épisodes inflammatoires, ils sont souvent caractérisés par des épisodes de fièvre périodique et une activation systémique du système immunitaire innée.

En plus des symptômes infectieux et inflammatoire/auto-immuns, le développement de tumeurs est une caractéristique clinique commune à plusieurs immunodéficiences. Cependant, il est très difficile de prédire l'apparition de cancer pour la plupart des PID. Les études menées dans plusieurs cohortes de patients ont permis d'identifier ce risque cancéreux (le plus souvent un lymphome)<sup>412</sup> dans certaines PID (49% de risque pour le NBS – *Nijmegen breakage syndrome* – 24 à 30% pour le syndrome XLP – *X-linked lymphoproliferative syndrome*, ou encore de 15-19% pour l'ataxie télangiectasie<sup>414</sup>).

#### 4. Traitements

Selon le type d'immunodéficiences détectée chez les patients, différents moyens de thérapie peuvent être utilisés, malheureusement limités. En ce qui concernant les infections, l'administration d'antibiotique reste une des premières lignes de traitement prescrite au patient en attente d'un diagnostic plus précis.

De manière indirecte, la vaccination permet de protéger les patients atteints de PID qui n'auraient pas forcément les bonnes défenses pour se protéger contre les pathogènes en cas d'infections. Il a été cependant question de vacciner directement les patients PID : l'immunisation peut être bénéfique ou au contraire nocive en fonction du type de vaccination utilisée et de

l'immunodéficience. Là où les vaccins inactivés ou à base de sous unités sont inoffensifs (mais potentiellement inefficace), les vaccins atténués présentent un plus gros risque pour le patient.

Les patients souffrant d'un défaut de production ou de maintiens d'anticorps se voit recevoir une thérapie de remplacement des immunoglobulines (IVIG – administration en intraveineux- ou SCIG – administration en sous cutanée), permettant une diminution des infections.

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques à partir de donneurs compatibles a constitué jusqu'à récemment le seul traitement curatif capable de sauver de nombreuses vies (notamment pour les cas sévères, tels les SCID <sup>415</sup>). Cette approche n'est cependant pas sans risque avec des risques liés au conditionnement associé ou au développement de la maladie du greffon contre l'hôte.

Plus récemment, la thérapie génique est devenue un moyen thérapeutique efficace dans le cas de certaines immunodéficiences primaires. Certaines immunodéficiences sont des candidats adaptés à la thérapie génique puisque la mutation est cantonnée aux cellules immunitaire (comme le syndrome de Wiskott-Aldrich). Dans le cadre du traitement du syndrome de Wiskott-Aldrich, bien que la thérapie génique ait permis la restauration des fonctions immunologiques et plaquettaires, le fait d'utiliser des vecteurs rétroviraux confère un risque de développement de cancers lié à la possible insertion virale près de proto-oncogènes. L'utilisation de particules lentivirales possédant le promoteur original du gène *Was* a été mise en œuvre pour optimiser l'efficacité et réduire les risques associés à la thérapie génique

##### 5. Séquençage de nouvelle génération : le nouvel outil de diagnostic

L'identification des gènes causatifs des PID est nécessaire aux patients pour leur permettre un traitement adéquat. Si l'identification se faisait précédemment par validation Sanger, l'arrivée du séquençage nouvelle génération (*Next generation sequencing*, ou NGS) a permis une amélioration en termes de rapidité, de coût mais également d'efficacité dans la détection du défaut génétique. Par ailleurs, l'arrivée des techniques de NGS a permis d'élargir le nombre de gènes susceptibles d'être associés à une immunodéficience primaire. Il existe trois types de séquençage actuellement utilisé

pour identifier les mutations génétiques : le séquençage d'un panel cible de gènes (*panel sequencing*), le séquençage de l'exome (*whole exome sequencing*, WES) ou du génome entier (*whole genome sequencing*, WGS)<sup>416</sup>. Quel que soit la technique NGS utilisée, la poursuite du diagnostic se fera par l'analyse bio-informatiques des variants, leur priorisation, la filtration des variants retenus sur base du phénotype clinique et ensuite la confirmation de la mutation par des expériences (voir figure 11)

Une des premières méthodes utilisées lors de la recherche de cause génétique est *panel sequencing*, se basant sur la capture par hybridation des exons d'un set de gènes pré défini en amont, et customisable selon l'objet du diagnostic. Dans le cas des PID, ce panel de gènes regroupe l'ensemble des gènes à ce jour identifiés comme étant causatif d'immunodéficience. L'avantage à utiliser le *panel sequencing* en première intention est du fait du faible coût par rapport au WES ou WGS, mais également la faciliter d'analyses des données<sup>417</sup>.

Le séquençage d'exome (WES) est lui basé sur le séquençage de l'ensemble des exons du génome, permettant une couverture entre 1 et 2% du génome entier<sup>417</sup>. L'utilisation du WES va permettre tout d'abord de vérifier de potentielles mutations sur les gènes déjà connus comme causatif de maladie. Dans le cas où aucun gène déjà répertorié ne semble muté, la vérification d'autres gènes permettra l'élargissement de l'étiologie des PID. Pour les immunodéficiences primaires, l'utilisation du *Trio Exome Analysis* permet l'identification des variants hérités des parents. De plus, cela n'exclut pas l'identification de mutations *de novo* qui ne sont pas retrouvées chez aucun des deux parents<sup>418</sup>. Cette technique aide à l'exclusion des variants. Dans le cas où le-a patient-e possède des frères/sœurs, l'analyse de l'exome de la fratrie aide également à la filtration des variants.

Le séquençage du génome entier (WGS) va permettre de couvrir les parties non exoniques du génome (99% restant du génome), en plus des exons et permettre l'identification de mutations manquées par le WES comme les mutations introniques, ou encore des mutations de site d'épissage. Ce type de mutation peuvent par exemple modifier les sites de régulations, induisant l'impossibilité pour un facteur de transcription de se fixer.

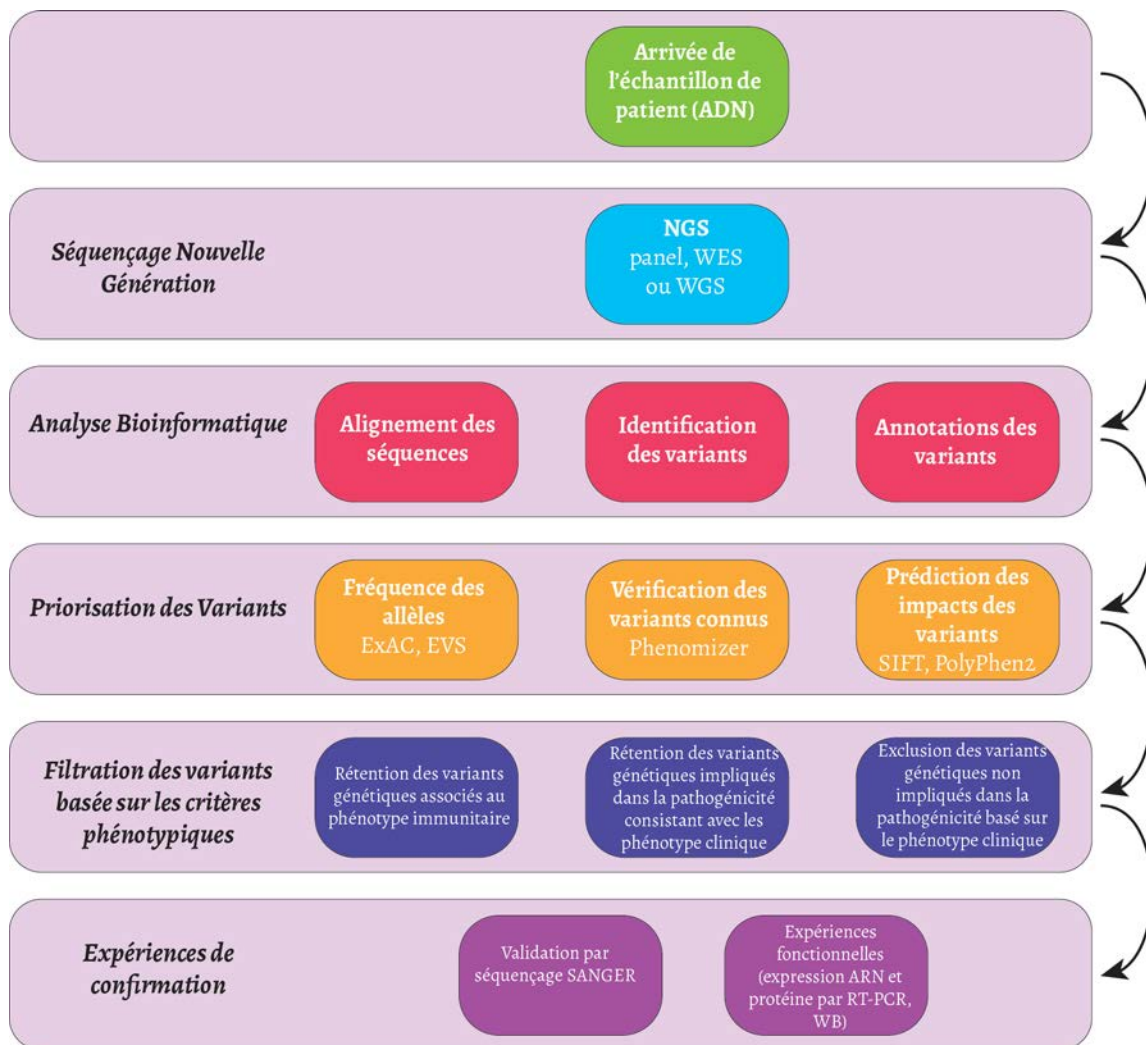


Figure 11. Pipeline d'analyse des échantillons de patient PID.

## II) Impact des déficiences en régulateurs d'actine, ou actinopathies

L'étude des immunodéficiences primaires permet d'enrichir nos connaissances sur le rôle de multiples protéines dans les fonctions des cellules immunitaires. En effet, certaines protéines clés du système immunitaire sont encore inconnues ou peu caractérisées. L'étude de ces maladies nous apporte beaucoup puisque ce sont des modèles naturels qui permettent d'étudier le rôle des protéines chez l'humain.

Au cours des deux précédentes sections, nous avons pu voir au combien le cytosquelette d'actine régule les fonctions des cellules immunitaires. La présence de PID due à des mutations dans les gènes codant pour les régulateurs du cytosquelette d'actine ne semblent alors pas dénuer de sens. À ce jour, 20 immunodéficiences touchant le cytosquelette d'actine ont été décrites (voir table 2).

## 1. Les immunodéficiences induisant un défaut plaquettaire

La thrombocytopénie est un facteur clinique important et partagé par plusieurs PID, expliqué par l'importance des régulateurs du cytosquelette d'actine pour la production et les fonctions des thrombocytes.

On pourra tout d'abord citer la  $\beta$ -actine nécessaire au développement et la maturation des thrombocytes. En effet, les plaquettes des patients porteurs de mutations dans le gène ACTB sont anormalement larges, associé avec un défaut d'organisation du réseau des microtubules<sup>419</sup>. La protéine CDC42 est également importante pour le développement normal des plaquettes, puisque qu'une mutation dans le gène CDC42 induit une thrombocytopénie persistante, et une macro-thrombocytopénie<sup>420</sup>. Bien qu'il n'ait pas pu être décrit dans les plaquettes humaines le rôle précis de CDC42, il a été démontré chez la souris que CDC42 était important pour la survie des plaquettes ainsi que la régulation de la sécrétion de granules  $\alpha$ , granules importants pour le recrutement d'autre plaquettes. Les déficits reliés à MYH9 (due à des mutations dans le gène codant pour la myosine IIA non musculaire NMIIA) possède un phénotype commun étant une macro-thrombocytopénie. Bien que chez les souris la déficience en myosine II1 est associée à plusieurs défauts dans les compartiments lymphocytaires T, NK et B, chez l'homme les mutations touchent les plaquettes<sup>421</sup>. Par ailleurs, il n'y a pas qu'un syndrome associé aux mutations MYH9 : plusieurs maladies comme l'anomalie May-Hegglin, le syndrome de Fechtner ou le syndrome Sebastian ont été reportés comme étant due à des mutations de MYH9<sup>421-423</sup>.

Plusieurs autres immunodéficiences, comme en WASP, ARPC1B, ARHGEF1, MLK1, WDR1 ou WIP, vont induire un défaut plaquettaire<sup>76,422,424-431</sup>. L'observation simultanée des plaquettes de patients déficients pour WAS et ARPC1B a montré des défauts morphologiques similaires. En effet, les deux déficiences induisent une diminution de la taille des plaquettes, une diminution du diamètre de l'anneau de tubuline ainsi que la perturbation de la distribution des granules  $\alpha$  (expression différentielles de P-sélectine et TS1P entre les plaquettes)<sup>431</sup>.

Ces deux immunodéficiences démontrent que deux protéines impliquées dans un même processus cellulaire (polymérisation de filaments d'actine) peuvent avoir les mêmes conséquences dans certains type cellulaire (e.g. les plaquettes), mais des conséquences différentes dans d'autres (comme nous le verrons ci-après).

Gène affecté	Protéine	Expression protéique	Thrombocytopénie	IB	IV
<b>Nucléation</b>					
ACTB	B-actin	Tout tissus			

WAS	WASP	Hématopoïétique	Oui		
WIPF1	WIP	Tout tissus	Oui		
NCKAP1L	HEM1	Hématopoïétique			
ARPC1B	ARPC1B	Principalement hématopoïétique	Oui		
MYH9	Myosine11A	Hématopoïétique et plusieurs tissus	Oui		
<b>Severing/dépolymérisation</b>					
WDR1	WDR1	Tout tissus	Oui		
PSTPIP1	PSPTIT1	Plusieurs tissus (mais forte expression dans le compartiment hématopoïétique)	Non		
CORO1A	Coronin 1A	Hématopoïétique	Non		
<b>Protéines de signalisation</b>					
DOCK8	DOCK8	Tout tissus (mais forte expression dans le compartiment hématopoïétique)			
DOCK2	DOCK2	Hématopoïétique			
RHOH	RHOH	Hématopoïétique			
ARHGEF1	ARHGEF1	Tout tissus			
CDC42	CDC42	Tout tissus	Oui		
MSN	MOESIN	Tout tissus			
RASGRP1	RASGRP1P	Hématopoïétique et cerveau			
CARMIL2	CARMIL2	Hématopoïétique			
RAC2	RAC2	Hématopoïétique			
<b>Kinases/Autres</b>					
STK4	STK4	Tout tissus			
MRTF4	MKL1	Tout tissus	Oui		
MAP3K14	NIK	Plusieurs tissus			

Table 2. Récapitulatif des phénotypes cliniques des patients souffrant d'immunodéficiences primaires dues à des mutations dans des régulateurs du cytosquelette d'actine. IB : infection bactérienne ; IV : infection virale

## 2. PID liées à des défauts des protéines de nucléation

### a. La déficience en $\beta$ -actine

Une étude en 1999 a démontré l'impact d'une mutation dans le gène ACTB conduisant au développement d'une immunodéficiences primaire, caractérisé par des infections récurrentes et un défaut de migration des neutrophiles<sup>432</sup>. Cette étude décrit l'impact de la mutation hétérozygote dans le gène codant pour la protéine  $\beta$ -actine (G>A1174, E364L), induisant un défaut de migration des neutrophiles en réponse

#### MENTION SPECIALE

D'autres patients ont été décrits avec des mutations dans le gène ACTB, cependant, ces derniers ne développent pas de phénotype immunitaire. Les mutations hétérozygotes décrites sont presque toutes associées au syndrome Baraitser-Winter (BWCF), caractérisé par des défauts de développement (malformations physiques, problèmes psychiatriques, neurologiques ou du comportement), et potentiellement de surdité<sup>435,436</sup>.

au chimio attractant fMLP, ainsi qu'un défaut de production de ROS, pouvant expliquer les infections récurrentes. Les cellules de la patiente expriment à la fois la protéine  $\beta$ -actine wt mais également le mutant, suffisant pour induire un défaut de liaison avec la profiline. Une étude plus récente a montré l'impact de mutations hétérozygotes dans le développement des thrombocytes (comme il a été indiqué dans la sous-partie précédente)<sup>419</sup>. Cependant, il n'est pas fait mention de défaut immunitaire, excepté un nombre anormalement bas de leucocytes et d'infections récurrentes. Alors que les plaquettes sont hautement impactées par les mutations, l'étude des fibroblastes isolés de patient montrent une up-régulation de l'ARN messager des gènes ACTG1 et ACTA2, codant pour les formes  $\gamma$  et  $\alpha$  de l'actine. Ceci démontre qu'un potentiel mécanisme de compensation est possible dans les cellules immunitaires.

#### b. Les protéines de nucléation WIP, WAS, ARPC1B, Moésine et HEM1

Avec la protéine MYH9, ce sont les cinq protéines ABP de nucléation reportée à ce jour étant associées à des PID.

WIP est la protéine chaperonne de WASP. Chez les patients WIP déficients, la perte de l'expression de WIP entraîne la perte d'expression de WASP<sup>428,429</sup>. La première étude<sup>428</sup> avait décrit chez le patient un phénotype clinique similaire au syndrome de Wiskott-Aldrich, c'est-à-dire une lymphopénie, de l'exéma, des infections récurrentes et une thrombocytopénie qui est caractéristique du syndrome WAS. Chez les patients ARPC1B déficient, c'est le complexe Arp2/3 qui est affecté, puisque la sous unité ARPC1B est absente ou incapable de s'associer avec les autres sous unités. Quant à Hem1, c'est le complexe WAVE1 qui est affecté.



## (1) Les lymphocytes T

**Migration.** Étant donné l'implication des protéines dans le processus de polymérisation des microfilaments (*a minima* WASP et ARPC1B), on pourrait supposer que les phénotypes cellulaires seraient proches. Or la réalité est tout autre. Si les lymphocytes T de patient WASP présentent un défaut de migration léger en réponse aux chimiokines CXCL12 ou CCL19, les cellules WIP déficientes et ARPC1B déficientes ont un défaut migratoire beaucoup plus prononcé<sup>400,429,433</sup>. L'observation du réseau d'actine sous condition de stimulation chimiokinique a montré un défaut de polarisation et de formation d'un front de migration unique dans les cellules WIP<sup>def</sup>. Ceci est associé à une augmentation de la taille cellulaire de ces mêmes cellules, aussi bien à l'état basale qu'après stimulation. Les LTs Hemi1 déficients présentent un défaut de migration associé à une absence d'accumulation d'actine au front de migration, ainsi que la formation anormale de filopodes et une accumulation de spot d'actine<sup>434</sup>.

**Synapse immunologique et cytotoxicité.** Lorsque l'on examine les capacités cytotoxiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou NK, une fois encore le défaut de cytotoxicité dans les lymphocytes T est plus prononcé dans les cellules ARPC1B<sup>def</sup> que dans les cellules WASP. La déficience en WIP induit un défaut de cytotoxicité intermédiaire, associé à un défaut de dégranulation des molécules lytiques (évalué par l'exposition de LAMP1 à la surface cellulaire). Que ce soit pour la déficience en WIP ou WASP, il a été observé un défaut de polarisation des granules lytiques lors de la formation de la synapse immunologique<sup>400,429</sup>.

D'un point de vue morphologique, l'observation des lymphocytes T WASP<sup>def400</sup>, WIP<sup>def429</sup> et ARPC1B<sup>def435</sup> en condition de synapse immunologique (conjugués avec des cibles réelles, ou sur lames *coatées* avec un anticorps  $\alpha$ -CD3) a permis de mettre en lumière le défaut d'organisation du cytosquelette. Alors que les cellules WIP<sup>def</sup> et WASP<sup>def</sup> montre un défaut de la morphologie et du réseau d'actine (au lieu de la formation typique de la synapse immunologique en chapeau, avec les arcs d'actines), les cellules ARPC1B<sup>def</sup> montrent une augmentation de la formation de projections membranaires semblables à des filopodes.

La déficience en Hemi1 diffère légèrement en terme de défaut cellulaire. En effet, les cellules NK des patients présentent une augmentation de leur activité de sécrétion de granules lytiques (perforine, granzyme A et B) en réponse à l'IL-2 mais *a contrario* leur activité cytotoxique est défectueuse. Cela s'explique par le défaut des cellules cytotoxiques à former des conjugués avec des cellules cibles.

## (2) Les lymphocytes B

Les déficiences humaines en ARPC1B et WIP montre un impact sur la population B (réduction des cellules mémoires et diminution de la commutation de classe). En ce qui concerne la déficience en Hem1, les deux papiers reportés à ce jour décrivent des impacts différents concernant le compartiment lymphocytaire B. En effet, alors que l'étude de Cook et al n'a pas décrit de phénotype particulier dans le compartiment B, l'étude de Salzer et al a décrit de rôle particulièrement important de Hem1 dans le développement des lymphocytes B<sup>434,436</sup>. Cette dernière étude a démontré l'importance de Hem1 dans le développement des LBs. En effet, les patients présentent une augmentation d'un sous type cellulaire B, associé à l'auto-immunité. Le modèle murin Hem1<sup>-/-</sup> montre en effet un développement spontané d'auto-immunité systémique. Les souris Hem1<sup>-/-</sup> présentent également une augmentation de plasmocytes productrices d'anticorps potentiellement auto-réactifs et présentent dans leur sérum une quantité anormalement élevée d'autoanticorps dirigés contre l'ADN double brins.

### (3) La déficience en moésine

Parmi les protéines ERM, seule la déficience en moésine a été observée chez l'humain<sup>437</sup>. Le phénotype cellulaire principal observé chez les patients est un défaut de prolifération et de migration de LT. Cette déficience spécifique au compartiment T peut s'expliquer par la perte d'expression uniquement dans les lymphocytes T, alors que les LB, monocytes, granulocytes et plaquettes montrent une expression normale de la moésine. Par ailleurs, les lymphocytes présentent une augmentation de l'adhésion cellulaire en réponse à VCAM-1 (dont le ligand est l'intégrine  $\alpha4\beta1$ )<sup>437</sup>. Cependant, l'adhésion des lymphocytes T en réponse à la fibronectine est comparable aux cellules contrôles (ligand  $\alpha5\beta1$ ), ce qui entre en contradiction avec les études chez la souris démontrant que la moésine est importante pour l'adhésion cellulaire en réponse aux ligands de la sous unité  $\beta1$  des intégrines (dont fait partie la fibronectine)<sup>438</sup>

## 3. PID liées à des défauts dans les protéines de dépolymérisation

### a. PSTPIP1 et WDR1

Les protéines impliquées dans la dépolymérisation de l'actine sont aussi sujettes à induire des PID lorsqu'elles sont mutées. Tout comme les déficiences en WASP et ARPC1B, les patients ayant une déficience

en WDR1 ou CD2BP1 (PSTPIP1 - orthologue murin) développent une immunodéficience primaire pouvant être associée à des maladies auto-inflammatoires.

PSTPIP1 (*proline-serine-threonin phosphatase interacting protein 1*) est connu pour ses mutants induisant le syndrome PAPA (*Pyogenic sterile Arthritis, Pyoderma gangrenosum and Acne*)<sup>439,440</sup>. C'est une protéine également associée au syndrome FMF (*familial Mediterranean fever*). Le syndrome PAPA se caractérise par l'inflammation des articulations (induisant une arthrite érosive), de la peau et des muscles<sup>441</sup>. Ceci est associé à une infiltration de leucocytes importante (et particulièrement de neutrophiles), ainsi qu'un fort taux d'IL-1 $\beta$  (cytokine pro-inflammatoire) dans le sérum des patients. PSTPIP1 interagit avec les protéines WASP<sup>442</sup>, CD2<sup>443</sup> et c-Abl<sup>444</sup> via son domaine SH2 et la protéine PTP-PEST<sup>445</sup> via son domaine CDC15. Ces différentes interactions permettent de réguler la formation des podosomes, des filopodes et ainsi que de stabiliser la synapse immunologique<sup>446-449</sup>. Chez les macrophages, il a été démontré que PSTPIP1 régule négativement la formation des podosomes et la dégradation de la matrice extracellulaire. Chez les patients porteurs de la mutation R405C (située dans le domaine SH3 de la protéine PSTPIP1), il y a perte de liaison entre WASP et PSTPIP1, induisant une activation constante de WASP. Cela conduit à une dérégulation de la transition filopode/podosomes, les conséquences étant une augmentation de nombres de filopodes ainsi qu'une augmentation de la dégradation de la matrice<sup>448</sup>.

La modulation de WASP par PSTPIP1 dans les LTs va être importante pour la régulation de la synapse immunologique. PSTPIP1 est recrutée au niveau des molécules CD2 exprimées à la surface des LTs. Il a été démontré chez la souris que le complexe PSTPIP1/PTP-PEST induit la déphosphorylation de la tyr291 de WASP. Chez l'homme, une étude a décrit une déficience en PSTPIP1 non associée au syndrome PAPA<sup>449</sup>. Les deux patients présentent un profond défaut dans le compartiment lymphocytaire T. Les LT CD4<sup>+</sup> d'un de ces patients possèdent un état de pré-activation, avec un contenu de F-actine supérieur aux cellules contrôles. Ceci est associé avec une augmentation du niveau basal de calcium dans les LT CD4<sup>+</sup>. Cette augmentation de la quantité d'actine filamenteuse est expliquée par une capacité migratoire basale accrue en comparaison des cellules contrôles. Cet état de pré-activation due à cette activité migratoire induit alors un défaut de formation de la synapse immunologique. En effet, les cellules d'une part sont incapables de remodeler leur cytosquelette d'actine en réponse à une stimulation CD3 ou CD2 et d'autre part présentent un défaut d'activation de la voie calcique après stimulation avec un anticorps  $\alpha$ -CD3.

La formation de structure ressemblant à des podosomes a également été observée dans des macrophages isolés de patients porteurs de mutation dans la protéine WDR1<sup>427,450</sup>. Les cellules de patients

porteurs de mutation dans le gène WDR1 possèdent une dérégulation de la polymérisation du cytosquelette d'actine, induisant une augmentation du contenu d'actine filamentaire dans les neutrophiles, monocytes, et les lymphocytes<sup>426,427,450</sup>. Les mutations WDR1 ont tout d'abord été associées chez l'homme à des déficits du système immunitaire inné. En effet, les neutrophiles des patients sont particulièrement touchés : les mutants WDR1 induisent des défauts de migration, des défauts de phagocytoses, et la particularité de cette PID est l'exnucléation du noyau des neutrophiles en dehors même du cytoplasme (phénotype partagé par l'ensemble des patients reportés à ce jour)<sup>426,427,450</sup>. Certains patients présentent également un syndrome d'hyper inflammation, ou d'auto inflammation, expliqué par une surproduction d'IL-18 par les cellules dendritiques et neutrophiles<sup>450</sup>. De manière intéressante, le système immunitaire adaptatif des patients WDR1 déficients n'avait pas été étudié dans les deux premières études décrivant cette nouvelle PID. Plus tard, nous avons pu décrire une importance de WDR1 dans le développement des lymphocytes B. Contrairement aux neutrophiles, la capacité migratoire des LTs est similaire aux cellules contrôles, de même que leur capacité à réguler leur TCR à la surface ou encore leur activité cytotoxique<sup>427</sup>.

#### b. Coronine 1A

La coronine 1A est une protéine hautement exprimée dans le compartiment hématopoïétique, et interagit avec le complexe Arp2/3 pour bloquer la nucléation de l'actine<sup>346</sup>. Par ailleurs, outre son action de blocage de nucléation de l'actine, la coronine 1A va agir conjointement avec la cofiline et WDR1 pour induire le désassemblage des microfilaments<sup>451</sup>.

Chez l'humain, les mutations affectant la protéine coronine 1A conduit au syndrome SCID (déficit immunitaire combiné sévère) caractérisé par un défaut de production de LTs, mais des LBs et cellules NK normales (phénotype T<sup>-</sup>B<sup>+/low</sup>NK<sup>+</sup>)<sup>348,452-456</sup>. Les patients présentent des infections auriculaires, des sinus et des voies respiratoires<sup>456</sup>. Chez les patients, selon les mutations, le degré de sévérité dans le compartiment T est variable. Cependant chez tous les patients les LTs et plus particulièrement les LTs naïfs ont un défaut de prolifération. Contrairement aux autres patients SCID, le thymus est visible chez les patients déficients en coronine 1A. Une étude a démontré que les NK d'un patient déficient en coronine 1A présentaient un défaut de capacité cytotoxique associé à une architecture de l'actine aberrante<sup>453</sup>. Les analyses par microscopie des cellules NK de patients ont montré une diminution de l'étalement cellulaire sur une surface *coâtée* avec des anticorps  $\alpha$ -CD18 et  $\alpha$ -NKp30 (condition de formation de la synapse immunologique). De plus, les cellules

NK des patients présentent un défaut de sécrétion de granules lytiques, probablement la raison pour laquelle leur cytotoxicité est fortement impactée.

Comme expliqué dans la section précédente (chapitre 2, développement des lymphocytes T), il a été démontré que les LTs des souris *Ptcd* présentaient un défaut de sortie du thymus dû à un défaut dans la signalisation de S1P<sup>348</sup>. Puisque chez les patients le thymus est toujours détecté, on pourrait supposer une anomalie similaire chez l'humain, pouvant expliquer la lymphopénie périphérique.

#### 4. PID liées à des défauts des protéines de signalisation

Comme nous avons pu le voir dans les sections précédentes, les protéines de signalisation, via la régulation des protéines ABP, régulent également le cytosquelette. Les différents PID touchant les protéines de signalisation nous renseignent sur la régulation des protéines ABP (voir figure 12). Par ailleurs, les PID nous renseignent sur l'importance de certaines protéines de signalisation dans les fonctions immunitaires, comme la migration cellulaire (RASGRP1, CARMIL2<sup>457,458</sup>) ou la production de ROS (cas de la déficience en Rac2<sup>459,460</sup>).

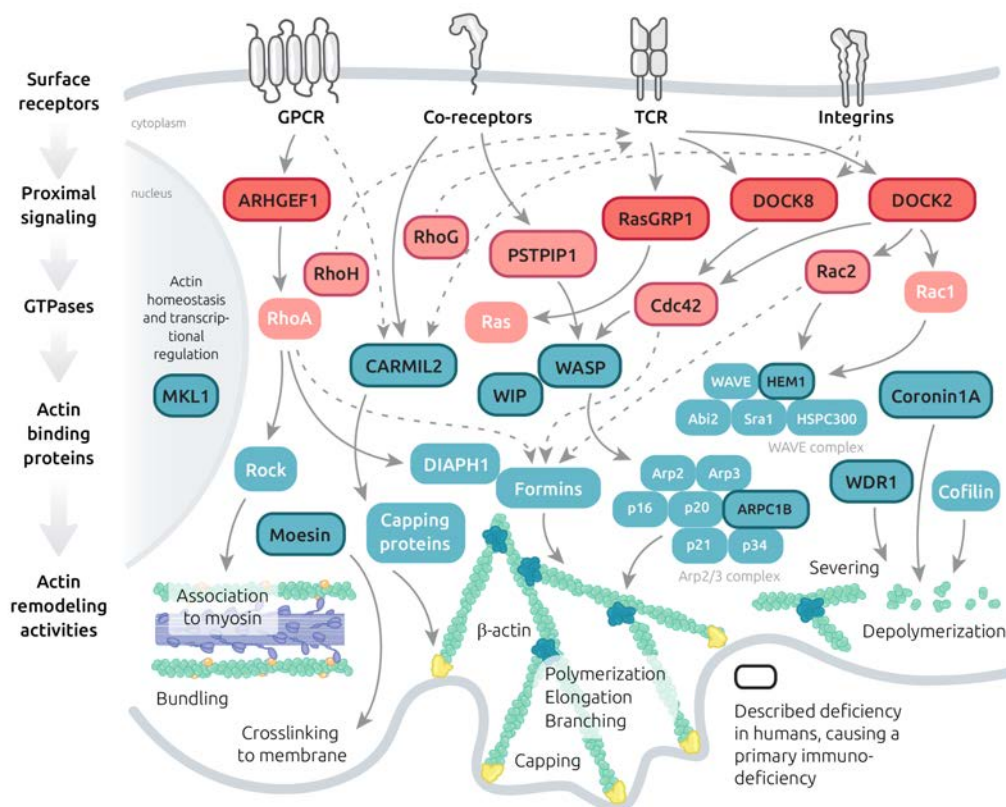


Figure 12. Protéines de signalisation (tons rouges) associées à des immunodéficiences primaires. Figure provenant de la revue Dupré, Boztug et Pfajfer, 2021<sup>461</sup>

### a. Lymphocyte B

Les immunodéficiences touchant particulièrement le compartiment B sont nommées PAD (*Primary Antibody Immunodeficiencies*) et est la forme la plus commune de PID. Les PAD regroupent l'ensemble des déficiences induisant un défaut de développement des lymphocytes B, un défaut de différenciation des lymphocytes B, un défaut de maturation des anticorps et/ou un défaut de développement des lymphocytes T. La déficience en ARHGEF1 (GEF de RhoA) est, à ce jour, la seule maladie pouvant être incluse dans les PAD et qui soit due à une mutation dans un gène codant pour une protéine régulatrice du cytosquelette d'actine.

ARHGEF1 est une protéine exprimée dans le compartiment hématopoïétique et les études chez la souris ont pu déterminer son rôle dans le développement des lymphocytes B dans les zones marginales des centres germinatifs. La déficience humaine, due à des mutations hétérozygotes composites dans le gène correspondant, conduit à une perte de l'expression protéique de ARHGEF1 et un défaut d'activation de la GTPase RhoA. Cette perte d'expression (aussi bien dans les LT, que les LB transformés EBV) induit un défaut de développement des lymphocytes B, ceux-ci étant bloqué au stade transitionnel. Les auteurs décrivent également un défaut dans la réaction des centres germinatifs (*germinal center reaction*), démontrée par une réduction du nombre absolu de lymphocytes B dans le sang, réduction des B mémoires et une augmentation des plasmocytes. Il a été démontré dans les lymphocytes T blastiques de patients une augmentation de l'activation de la protéine AKT, normalement inhibée par RhoA. Cette absence d'inhibition d'AKT suppose une activation de mTOR1, kinase régulant positivement la formation des plasmocytes<sup>462</sup>. Il est alors tout à fait possible de supposer un défaut d'inhibition de la voie AKT/mTOR dans les lymphocytes B, expliquant ainsi la forte proportion de plasmocytes et le faible taux de lymphocytes B mémoires.

### b. Lymphocytes T

La protéine CARMIL2 (ou Rltpr chez la souris) est une protéine de capping de l'actine exprimée dans le compartiment lymphoïde (lymphocytes T, B et NK principalement). En accord avec le modèle murin, la déficience en CARMIL2 humaine induit une diminution des T<sub>reg</sub>, cependant les patients ne développent pas de maladie auto-immune. Tout comme les études effectuées chez la souris, CARMIL2 est nécessaire pour la signalisation CD28<sup>457,463</sup>. Les auteurs ont décrit que bien qu'une stimulation CD3/CD28 induit une phosphorylation normale de la voie proximale du TCR (phosphorylation de ZAP70 et PKC), les cellules

CARMIL2 déficientes présentent un défaut de dégradation de  $I\kappa B\alpha$  et de la phosphorylation de p65. Ceci montre un défaut de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B de manière CD28 dépendant. Par son activité de capping, CARMIL2 est importante pour la dynamique du cytosquelette d'actine, révélée par le défaut de migration des cellules de patients CARMIL2 déficients. Cette migration défectueuse est caractérisée par une augmentation de la vitesse de migration (médiée par LFA-1), ainsi qu'un défaut de directionnalité. Par ailleurs, au défaut de polymérisation de l'actine au front de migration s'ajoute un défaut du réseau de tubuline, dont les microtubules semblent réarranger de manière désordonnée.

Bien que la protéine CARMIL2 soit exprimée dans le compartiment lymphoïde, seule les LT semblent être affectés par l'absence de la protéine chez l'homme. La préservation du signal TCR proximal dans les LT CARMIL2 déficients permet *a minima* un développement thymique normal des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs. Le signal de costimulation CD28 étant cependant nécessaire à leur activation compétente et leur prolifération, les fonctions effectrices des LTs sont compromises. La déficience humaine et les modèles murins montrent l'importance de cette protéine dans le développement des LT régulateurs, où d'ailleurs cette protéine est fortement exprimée<sup>464,465</sup>. Bien que l'absence de CARMIL2 ne semble pas avoir d'effet sur le compartiment B et NK (probablement via un mécanisme compensatoire), le rôle de cette protéine reste à élucider dans ces cellules.

Là où CARMIL2 agit sur la signalisation de CD28, RhoH (Rho GTPase) médie la signalisation du TCR<sup>466-469</sup>. À ce jour, une seule étude a décrit une immunodéficience humaine due à une déficience en RhoH<sup>470</sup>. Chez ces patients, le compartiment T est particulièrement touché, avec une diminution de la phosphorylation de ZAP70 après stimulation du TCR. Par ailleurs, les lymphocytes T de ces patients présentent un défaut de *homing* dans la peau (absence d'expression du marqueur CLA, CCR4 et CCR6, marqueur de *homing* de la peau), ce qui pourrait expliquer les infections EV-HPV récurrentes. Des études ultérieures ont démontré que RhoH était important pour la polarisation des LT helpers, et en particulier le lignage T<sub>H</sub>17, important pour combattre les infections au niveau des muqueuses, dont la peau<sup>471</sup>. En effet, RhoH est importante pour la régulation du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, nécessaire au lignage T<sub>H</sub>17<sup>472</sup>. Dans le cas du psoriasis, un niveau d'expression de RhoH bas est associé à une sévérité plus importante de la maladie<sup>472</sup>.

### c. Neutrophiles

La déficience en Rac2 est principalement décrite comme induisant un défaut de la fonction des neutrophiles<sup>459,473-475</sup>. Rac2 a été en tout premier lieu décrite comme étant important pour la production de ROS, en régulation l'activité de la NADPH oxydase dans les neutrophiles<sup>476</sup>. La perte de l'expression de Rac2 entraîne chez l'humain des abcès ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité aux infections<sup>459</sup>. Cette déficience induit notamment une leucocytose et une neutrophilie. Cette immunodéficiência se caractérise par un défaut des neutrophiles. Effet, plusieurs fonctions des neutrophiles sont affectées, dont la migration, la sécrétion des granules azurophiles, ou encore leur capacité de phagocytose. Bien que les modèles murins montrent des défauts dans le compartiment lymphocytaire B<sup>477</sup>, seuls deux patients décrits à ce jour présentent des défauts de production d'anticorps.

#### d. Immunodéficiência combinée

Nous évoquerons dans cette partie le cas de 3 immunodéficiencies, dues à des mutations dans les gènes codant pour les protéines DOCK2, DOCK8 et RASGRP1. Certaines immunodéficiencies primaires, plutôt que d'affecter en particulier un type cellulaire, vont toucher l'ensemble des cellules du système immunitaire. Et c'est le cas des 3 immunodéficiencies précédemment citées. Les patients sont sujets à des infections bactériennes de manière récurrente, et particulièrement des infections touchant des voies respiratoires hautes et basses (e.g. sinus et poumons). Les protéines DOCK2 et DOCK8 font parties de la même famille de protéine GEFs et vont activer les Rho GTPases tels que CDC42 ou encore Rac1<sup>478</sup>, tandis que RASGRP1 est une GEF pour la protéine Ras.

Bien que le principal signe clinique de la déficience en DOCK8 soit le développement d'un syndrome d'hyper-IgE (surproduction d'anticorps IgE), les LTs sont également touchés, cela étant expliqué par l'expression protéique de DOCK8 principalement dans le compartiment lymphocytaire. Les patients présentent de l'eczéma, des infections respiratoires récurrentes, et sont sujets à des infections virales récurrentes.

La déficience en DOCK8 impacte les fonctions de plusieurs cellules immunitaires. Par exemple, l'absence de DOCK8 induit un défaut de formation de la synapse immunologique dans les LTs, LBs et les cellules NK. En effet, DOCK8 est activée après l'engagement du TCR et active CDC42. DOCK8 va former un complexe avec la taline, WIP, WASP et CDC42 permettant la polymérisation des filaments d'actine ARP2/3 dépendant. En parallèle, DOCK8 s'associe avec la taline et CDC42 en réponse à la signalisation LFA-1. Par



ailleurs, d'autres études ont démontré l'importance de la protéine DOCK8 dans la signalisation cellulaire, le contrôle de l'activité de transcription (STAT3) ou encore la production de cytokine (revue de Kearney et associés<sup>479</sup>). La différenciation des LTs vers la lignée TH17 est profondément impactée dû à un défaut dans la signalisation STAT3<sup>480</sup>. Ce défaut de signalisation a également été observé dans les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3)<sup>479</sup>. Chez les patients porteurs de mutations dans le gène DOCK8, un défaut de phosphorylation de la protéine STAT3 conduit à un blocage de sa translocation dans le noyau.

La déficience en DOCK2 induit chez les patients une lymphopénie lymphocytaire T et B, associée à un défaut de prolifération des LTs. Par ailleurs, les patients présentent des infections respiratoires récurrentes et plusieurs épisodes de pneumonie. Le modèle murin déficient en DOCK2 a démontré un défaut dans l'activation de Rac1 en réponse à l'activation du TCR associé à un défaut de migration<sup>481,482</sup>. De la même manière chez l'humain, la déficience en DOCK2 conduit à un défaut d'activation de Rac1 dans les LTs, ainsi qu'à un défaut de migration des LTs et LBs. La capacité de polymérisation des microfilaments est également affectée dans ces deux populations cellulaires ainsi que dans les cellules NKs<sup>483</sup>.

Pour terminer, la protéine RASGRP1 a également été associée à une PID. En effet, les patients présentant des mutations dans le gène RASGRP1 présentent des infections récurrentes<sup>458,484</sup>. Les trois patients publiés présentent une augmentation de la population cellulaire LT $\gamma\delta$ , ainsi qu'un inversement du ratio LT CD4<sup>+</sup>/LT CD8<sup>+</sup>. La protéine RASGRP1 agit en aval des récepteurs à l'antigène de lymphocytes. L'activation du TCR/BCR va permettre la génération de DAG qui va lui-même activer RASGRP1<sup>485</sup>. Les deux études publiées ont montré un défaut d'activation de la voie MAPK, caractérisé par un défaut de phosphorylation de Erk. L'activation des LTs est défectueuse induisant notamment un défaut dans la capacité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup><sup>458</sup>, bien que le niveau d'expression de perforine et granzyme B soit plus élevé que dans les cellules contrôles. En ce qui concerne le compartiment LB, l'étude menée par Salzer et al décrit une augmentation des LB transitionnels, et une augmentation de production d'IgA. Par ailleurs, les LBs souffrent d'un défaut d'activation (diminution de l'expression des marqueurs d'activation en réponse à CD40L et IL-4) conduisant à une prolifération défectueuse. La recombinaison de classe est également affectée par l'absence de RASGRP1.

Tout comme les LT CD8<sup>+</sup>, les cellules NK présentent un défaut de cytotoxicité, dû à une formation anormale de la synapse immunologique, un défaut d'accumulation d'actine au niveau de l'aire de contact, ainsi qu'un défaut de polarisation du MTOC et des granules lytiques. Ces granules lytiques présentent un

défaut de mobilité dans les NKs. Outre son rôle de régulateur du cytosquelette d'actine, RASGRP1 est également associé au microtubule via son interaction avec la dynéine ce qui pourrait expliquer le défaut de transport des granules lytiques vers le MTOC<sup>486</sup>.

#### e. Le cas de l'immunodéficience en CDC42

L'immunodéficience en CDC42 est associée à un large spectre de phénotype clinique. En effet, certains patients présentent des symptômes similaires au syndrome de Takenouchi-Kosaki (dysmorphie, retard de développement, macro thrombocytopenie), alors que certains patients développent un syndrome NOCARH (*Neonatal-onset cytopenia with dyshematopoiesis, autoinflammation, rash, and hemophagocytic lymphohistiocytosis*)<sup>420,487-493</sup>. Les patients présentant le syndrome NOCARH possèdent des cellules NK dont les fonctions de cytotoxicité, de migration et de formation de conjugués sont déficientes<sup>494</sup>. Par ailleurs, les cellules provenant de ces patients surproduisent des cytokines pro-inflammatoires. Outre le syndrome NOCARH, la déficience en CDC42 peut conduire au développement de maladie auto-inflammatoire ou au développement de syndrome HLH (lymphohistiocytose hémophagocytaire). À ce jour, le pourquoi de ces différences phénotypiques cliniques reste sans réponse.

#### 5. Autres mutations génétiques associées à des défauts du cytosquelette

D'autres protéines n'étant ni des protéines ABP, ni des protéines régulant l'activité des protéines ABP peuvent induire des PID et impacter le cytosquelette d'actine. Je traiterai ici de 3 immunodéficiences impactant le cytosquelette d'actine : les déficiences en MKL1, NIK et STK4.

Les protéines MRTF (*Myocardin-related transcription factor*), dont fait partie MKL1, sont des protéines séquestrées dans le cytoplasme lorsqu'il y a une forte concentration d'actine globulaire (G-actine)<sup>495,496</sup>. L'activation des voies de signalisation conduisant à la polymérisation des microfilaments réduit la quantité d'actine globulaire disponible dans le cytoplasme. Les protéines MRTF, libres de G-actine, peuvent alors se transloquer dans le noyau, s'associer avec la protéine SRF (*serum response factor*)<sup>495,497</sup>. Le complexe ainsi formé peut se fixer sur les gènes cibles SRF, comme l'actine, la gelsoline, ou la vinculine. MKL1 est importante pour la formation de plaquette chez la souris<sup>498,499</sup>, bien que chez l'homme, la déficience en MKL1 ne conduit qu'à une thrombocytopenie intermédiaire<sup>425</sup>. En revanche les compartiments myéloïde et lymphoïde sont

fortement impactés par l'absence de cette protéine, cela étant associé avec une forte diminution du niveau de F-actine. Les neutrophiles de patients *MKL1* déficients montrent un défaut de phagocytose ainsi qu'un défaut migratoire, caractérisé par une diminution de vitesse (la capacité de migration directionnelle est préservée). Les cellules dendritiques dérivés des PBMCs de patient montrent un défaut d'étalement sur la fibronectine, associé à une diminution voire absence de formation de podosomes. Puisque les protéines MRTF agissent sur la transcription de certains gènes, Record *et al.* ont voulu étudier quels sont les gènes cibles de *MKL1*. Dans la lignée dHL-60 *MKL1*<sup>-/-</sup>, l'absence de cette protéine induit une augmentation de la transcription de gènes tels que *ARHGEF11*, *ARCP1B*, *ARPC4*, *RAC1*, *WASP* et *N-WASP* ainsi que la diminution de la transcription des gènes *ACTB* et *CTTN* (cortactine) notamment<sup>425</sup>. Ainsi, cette étude a permis de démontrer l'impact qu'a la protéine *MKL1* sur la dynamique du cytosquelette d'actine.

Il a été démontré que le cytosquelette d'actine agit sur l'activation de la voie *NK- $\kappa$ B* via la voie de signalisation NADPH oxydase<sup>500</sup>. Une perturbation de la voie *NK- $\kappa$ B* peut également impacter la dynamique des microfilaments. En effet, la déficience en *NIK* (*NK- $\kappa$ B-inducing kinase*) se traduit chez les patients par une lymphopénie B, une diminution des populations cellulaires *NK*, *T<sub>FH</sub>* et *T<sub>EM</sub>* (LTs effecteurs mémoires). Les patients souffrent d'infections virales et bactériennes récurrentes. Que ce soit la voie canonique ou non-canonique de *NK- $\kappa$ B*, les deux sont impactées par l'absence de la protéine *NIK* (démontré par un défaut de translocation de *p52* et *p50* dans le noyau). Par ailleurs, les cellules *NK* présentent un défaut du remodelage du cytosquelette d'actine lors de la formation de la synapse immunologique, associés à un défaut de polarisation des granules lytiques.

La protéine *STK4* (précédemment nommée *MST1*) joue un rôle dans l'apoptose (rôle pro et anti-apoptotique). Chez l'humain, la déficience en *STK4* est une immunodéficience primaire autosomale récessive caractérisée par une lymphopénie de LT *CD4*<sup>+</sup> et des infections récurrentes<sup>501-507</sup>. Les lymphocytes T sont particulièrement marqués par cette déficience puisque l'absence de *STK4* induit une diminution de leur prolifération, augmente leur susceptibilité à l'apoptose et induit la dérégulation du facteur de transcription *FOXO3*.

## Objectifs de la thèse

Les PID offrent un terrain d'étude unique pour élucider le rôle de protéines essentielles aux fonctions immunitaires chez l'homme. De telles études ont notamment permis de mettre en lumière de nombreuses protéines convergeant vers la régulation du cytosquelette d'actine comme support crucial à la mise en place de multiples étapes dynamiques de la vie des cellules immunitaires. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de me focaliser sur certaines de ces pathologies encore très peu étudiées, essentiellement les déficiences en WIP, ARPC1B et WDR1, pour en élucider les défauts cellulaires. Au travers de la caractérisation de cellules de patients, j'ai voulu répondre à 3 questions fondamentales :

- 1- Les carences en protéines contrôlant un même processus de remodelage de l'actine (*branching*) conduisent-elles à des défauts cellulaires et à une pathologie similaire ?
- 2- Un processus donné de remodelage de l'actine (*severing*) participe-t-il au soutien à des fonctions variées au sein de différents sous-types de cellules immunitaires ?
- 3- Au-delà du rôle des régulateurs du cytosquelette d'actine dans l'immunité anti-infectieuse, contribuent-ils au processus inflammatoire observé dans certains PID via l'activation de l'inflammasome ?

Dans un premier temps, j'ai eu l'occasion de travailler sur la déficience très rare en WIP au travers de l'étude d'un patient. Sur la base des travaux précédents de l'équipe d'accueil sur la déficience en WASP, j'ai employé différents tests fonctionnels et des approches d'imageries cellulaires pour caractériser les effets de la déficience en WIP dans les lymphocytes B et les lymphocytes T. J'ai ensuite appliqué une partie de ces approches à l'étude des lymphocytes T de patients déficients en ARPC1B (sous-unité du complexe ARP2/3, en aval de WASP et de WIP). Au-delà des résultats présentés sous forme d'articles publiés, je développerai dans la discussion mon analyse des similitudes et différences de ces déficiences naturelles de la polymérisation d'actine, ainsi que ma vision de la nécessité d'analyses plus systématiques et comparatives de ce type de pathologies.

Durant la seconde partie de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier une cohorte de patients porteur de mutations dans le gène *WDR1*, contrôlant le processus de *severing* des filaments l'actine. Ceci a été pour moi l'occasion de tester le rôle de *WDR1* au sein de multiples types cellulaires : neutrophiles,

monocytes, lymphocytes B et lymphocytes T. Le travail publié montre que la déficience en WDR1 a des impacts très variés sur les différents types cellulaires. J'élaborerai ensuite dans la discussion la capacité du cytosquelette d'actine à soutenir des activités très variées au sein des cellulaires immunitaires.

Dans la partie finale de ma thèse, je me suis intéressée au lien entre cytosquelette d'actine et inflammasome. En effet, dans le cas de la déficience en WDR1, mais également celles en WASP et ARPC1B, les patients sont sujets à développer des inflammations chroniques et des phénomènes auto-inflammatoires. Bien que ces épisodes inflammatoires pourraient être le résultat de la combinaison d'infections récurrentes avec un défaut de clearance des pathogènes, les récentes études montrant l'impact de protéines du cytosquelette dans l'activation des inflammasomes laissent à penser qu'un lien moléculaire existe entre les régulateurs du cytosquelette d'actine et les inflammasomes. Je présenterai les résultats préliminaires obtenus, puis indiquerai dans la partie discussion les perspectives à ce projet non finalisé.

Mon manuscrit de thèse se conclut par la présentation sous forme d'annexes des travaux additionnels auxquels j'ai pris part lors de mes séjours dans les laboratoires du LBI-RUD et du CPTP. Il s'agit des articles publiés sur la déficience en RASGRP1 et la déficience en DEF6. Enfin il s'agit d'une étude de caractérisation des mécanismes d'action de lymphocytes régulateurs thérapeutiques.

# RESULTATS

**Papier #1: « WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly » - 1<sup>er</sup> auteur**

Lettre, publiée dans « Blood », 2017

Résumé

La protéine WIP (Wiskott-Aldrich syndrome protein –interacting protein ; WASP-interacting protein) est un régulateur clef dans la dynamique de l'actine. Chez l'homme, la déficience en WIP a été étudiée au niveau d'un patient unique, révélant une immunodéficiência liée à des défauts dans la motilité des lymphocytes et de cytotoxicité des cellules NK.

Par notre étude plus poussée d'un nouveau patient WIP déficient, nous avons pu explorer quelles altérations du cytosquelette d'actine étaient sous-jacentes aux défauts lymphocytaires. Le patient est porteur d'une mutation *WIPF1* non-sens homozygote induisant la perte d'expression protéique de WIP et WASP. Des lymphocytes périphériques ainsi que des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de la mère HLA compétente ont été infusées séquentiellement, permettant une greffe de lymphocytes T continue. En accord avec son rôle dans le chimiotactisme, WIP est localisée au niveau du lamellipode riche en actine, et stabilise cette structure pour permettre une migration directionnelle continue vers le gradient de chimiokine. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> WIP déficient montrent une diminution drastique de leur capacité cytotoxique associée à un défaut de formation de la synapse immunologique. Ce défaut est caractérisé par un étalement cellulaire non radial et de longues fibres d'actine. En accord, WIP se distribue en clusters parmi la structure d'actine en périphérie de la synapse immunologique.

En conclusion, nous avons montré dans cette étude que WIP contrôle l'ultrastructure et la dynamique du réseau d'actine requis pour l'assemblage des protrusions au niveau du lamellipode lors d'évènements tels que la migration ou la formation de la synapse lytique.

### Contribution à l'article

J'ai pris part à l'élaboration du projet, son exécution expérimentale ainsi qu'au travail de réflexion et d'écriture de l'article. J'ai en outre coordonné et centralisé l'ensemble des données des différents collaborateurs cliniques et scientifiques.

Concernant le travail expérimental, J'ai pris soin de générer et de cultiver l'ensemble des modèles cellulaires (lymphocytes T primaires, cellules dendritiques, lymphocytes B-EBV, transductions lentivirales). Concernant les données présentées dans les figures, j'ai généré les données suivantes :

- Figure 1 :
  - o Western blot de l'expression protéique de WIP et WASP (A)
  - o Exécution et analyse des expériences de migration (D)
  - o Exécution et analyse de la stimulation chimiokinique (E-H)
  - o Expérience de sauvetage d'expression protéique de WIP, exécution et analyse des expériences de migration des cellules B-EBV (I)
- Figure 2 :
  - o Exécution (B, C, D, G) et analyse (B-E, H)
- Exécution et analyse des figures annexes S1, S2, S3



To the editor:

### WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly

Laurène Pfajfer,<sup>1,4,\*</sup> Markus G. Seidel,<sup>5,\*</sup> Raïssa Houmadi,<sup>3,4</sup> Javier Rey-Barroso,<sup>3,4</sup> Tatjana Hirschmugl,<sup>1,2</sup> Elisabeth Salzer,<sup>1,2</sup> Inés María Antón,<sup>6,7</sup> Christian Urban,<sup>5</sup> Wolfgang Schwinger,<sup>5</sup> Kaan Boztug,<sup>1,2,8,9,†</sup> and Loïc Dupré<sup>1,4,†</sup>

<sup>1</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria; <sup>2</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria; <sup>3</sup>INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; <sup>4</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; <sup>5</sup>Division of Pediatric Hematology-Oncology, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Research Unit for Pediatric Hematology and Immunology, Medical University of Graz, Graz, Austria; <sup>6</sup>Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; and <sup>9</sup>St. Anna Kinderspital and Children's Cancer Research Institute, Department of Pediatrics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

The high motility of immune cells and their ability to establish cell-to-cell contacts depend on a tight regulation of actin cytoskeleton dynamics. Murine studies have identified the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) as a key regulator of actin dynamics in immune cells.<sup>1-7</sup> Correspondingly, a previously identified WIP-deficient patient suffered from lymphopenia and harbored defects in T-cell proliferation, chemotaxis, and natural killer-mediated cytotoxicity.<sup>8</sup>

We investigated a 2-year-old patient, who had bronchiolitis and viral pneumonia in his first month of life. At 3 months, he developed pneumonitis requiring mechanical ventilation. Cytomegalovirus (CMV) was detected in all tested body fluids. Intermittent episodes of bloody diarrhea suggestive of inflammatory bowel disease or recurrent intussusception required platelet and red blood cell transfusions. The patient exhibited psychomotor delay without evidence of encephalitis. He had hypergammaglobulinemia and a reduced proportion of memory B cells (supplemental Table 1; supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site). Profound CD4<sup>+</sup> T-cell lymphopenia was associated with skewing toward an effector memory phenotype. Relative proportions of blood TCRγδ<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were increased (supplemental Figure 1), most CD8<sup>+</sup> T cells also displaying an exhausted effector memory phenotype. In line with the lack of naïve T cells, thymic development appeared abnormal as supported by thymus involution and low T-cell receptor excision circles and thymic emigrants. T-cell proliferative responses were reduced to borderline normal (supplemental Table 1). As the clinical situation of the patient was deemed too severe for a fully conditioned allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) as performed recently for WIP-deficient patients,<sup>9</sup> sequential infusions of peripheral lymphocytes and stem cells from the HLA-identical mother were performed at the 10th to 13th month of life (Figure 1A), resulting in sustained T-cell engraftment, CMV elimination from peripheral blood, and severe infection cessation until the last follow-up at 2 years of age. Applying a next-generation sequencing (NGS)-panel covering >250 causative primary immunodeficiency genes,<sup>10,11</sup> we identified a homozygous stop-gain mutation in the *WIPF1* gene (c.C373T, p.R125X; Figure 1B), resulting in loss of WIP and WASP expression (Figure 1C), supporting a role for WIP in stabilizing WASP.<sup>2</sup>

Given the rarity of this disease, we aimed to further explore actin dynamics and ultrastructure in human WIP-deficient leukocytes to

provide insight into molecular pathomechanisms. WIP-deficient T cells displayed severely impaired migration toward CCL19 and CXCL12 (Figure 1D). Although the migration defect toward CCL19 might in part result from reduced CCR7 expression (supplemental Figure 2), the defect toward CXCL12 was independent of reduced CXCR4 expression, suggesting an intrinsic defect. We further investigated whether actin polarization abnormalities may underlie impaired migration of WIP-deficient T cells. On poly-L-lysine, patient T cells appeared abnormally large, harbored aberrant shapes, and reduced roundness (Figure 1E-F). Upon chemokine stimulation, these cells emitted multiple actin-rich structures, but failed to elongate and to assemble distinct leading and trailing edges (Figure 1E-F). The morphological abnormalities of WIP-deficient T cells were further confirmed by examining side-by-side T cells from patient and donor origin in a blood sample recovered post-DLI. Indeed, residual WIP-negative patient T cells displayed aberrant morphology and reduced ability to elongate (Figure 1G-H).

To assess the role of WIP in B-cell chemotaxis and to verify that the migration defects were a direct consequence of WIP deficiency, we established 2 complementary cellular models. First, WIP expression was knocked down in normal Epstein-Barr virus (EBV)-immortalized B cells (WIP-KD), leading to concomitant loss of WASP expression (supplemental Figure 3A). Second, a tagged WIP construct was stably introduced in patient EBV-immortalized B cells, restoring WIP expression (supplemental Figure 3A). When exposed to a CCL19 gradient in dedicated chambers,<sup>12</sup> WIP-KD cells failed to migrate toward CCL19, as depicted on the tracking maps (supplemental Figure 3B). Accordingly, patient cells failed to migrate toward CCL19, whereas restoration of WIP expression rescued directional migration. Further analysis of cell motility parameters in both models revealed WIP as key regulator of both speed and orientation along the chemokine gradient (Figure 1I). We then studied how WIP deficiency might affect the universal coupling between cell speed and cell persistence. This rule states that fast cells are more directional, because speed promotes actin-dependent maintenance of polarity.<sup>13</sup> We first established that this rule applies to normal B cells exposed to a chemokine gradient, as indicated by the positive correlation between speed and forward migration index (Figure 1J). The slope of this correlation was clearly affected in WIP-KD B cells, indicating that increased speed poorly translated into a gain in directionality and suggesting that WIP controls cell polarity. Indeed, following introduction of LifeAct-GFP in WIP-KD B cells,

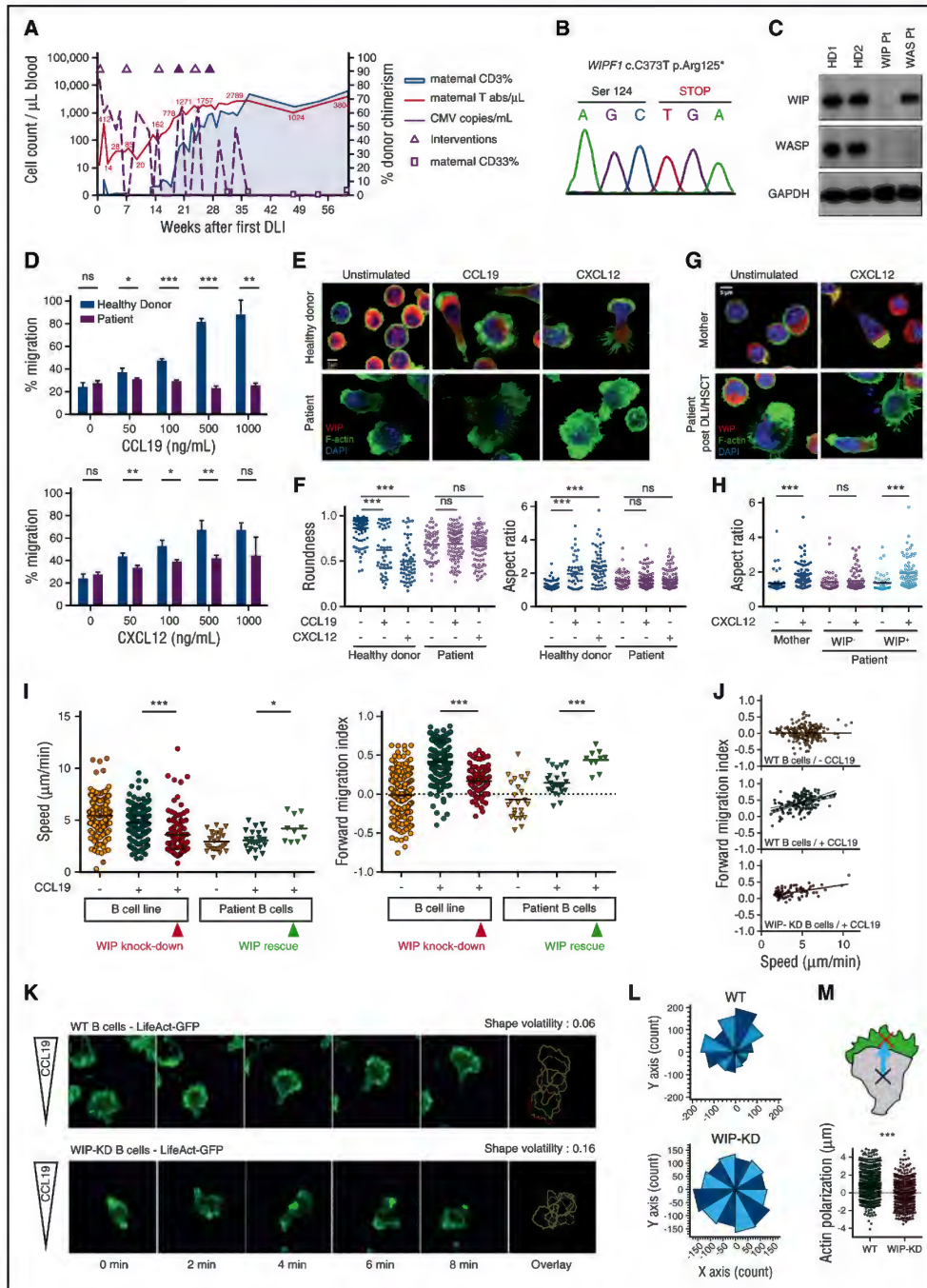
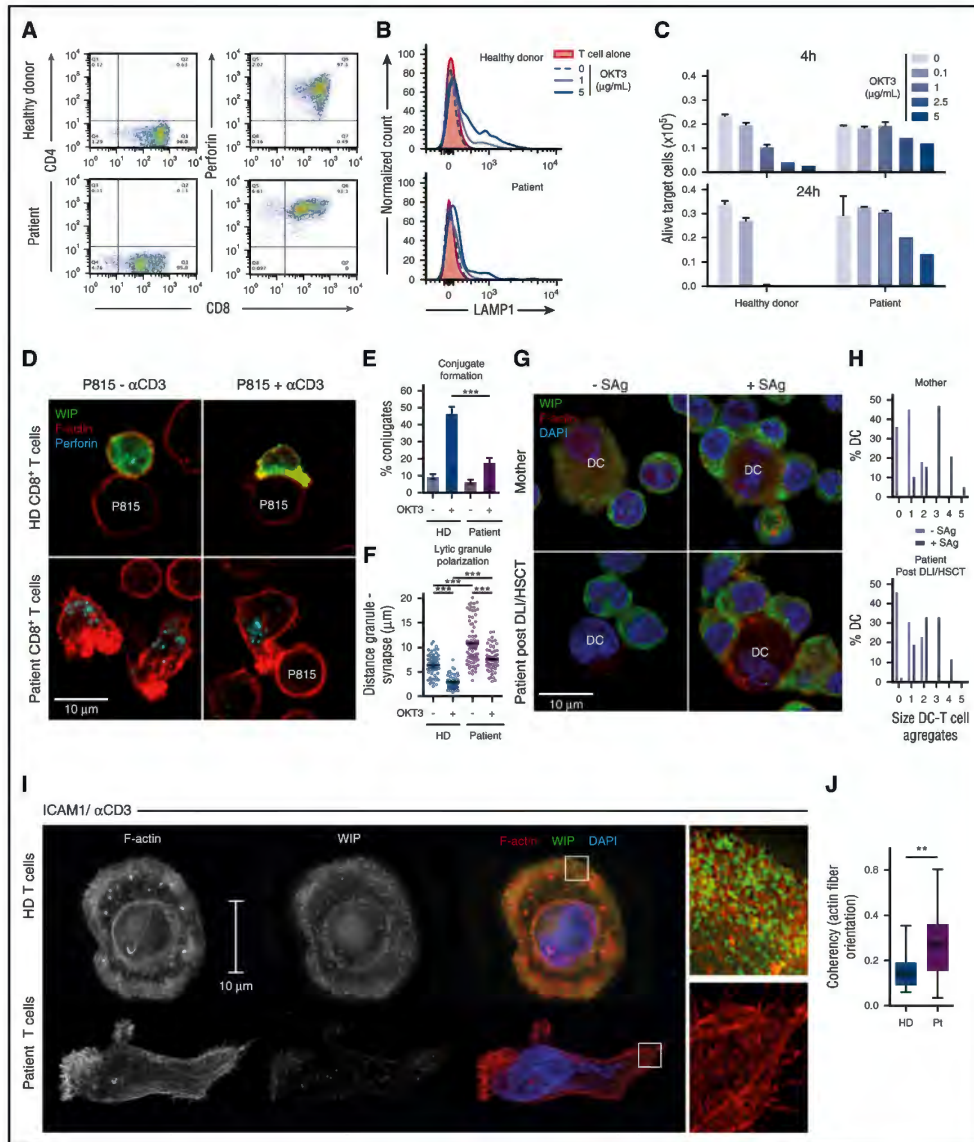


Figure 1.

Downloaded from https://ashpublications.org/blood/article-pdf/130/17/1948/4029144/blood77393.pdf by guest on 28 July 2020





**Figure 2.** WIP controls CD8<sup>+</sup> T lymphocyte cytotoxicity and actin meshwork ultrastructure at the IS. (A) Flow cytometry analysis of CD4, CD8, and perforin expression in purified CD8<sup>+</sup> T cells expanded from a healthy donor and the WIP-deficient patient. (B) LAMP-1 expression at the surface of CD8<sup>+</sup> T cells upon incubation with P815 cells coated with the indicated concentrations of αCD3 antibody. (C) CD8<sup>+</sup> T-cell cytotoxic activity assessed by counting the residual live P815 target cells after 4 or 24 hours. (D) Representative pictures of healthy donor CD8<sup>+</sup> T cells and patient CD8<sup>+</sup> T cells forming conjugates with P815 cells coated or not with αCD3 antibody. Fixed conjugates were stained for WIP, F-actin, and perforin. (E) The proportion of T cells forming a synaptic contact with P815 cells was assessed from confocal images. At least 300 cells were analyzed per condition. (F) The distance from lytic granules to the T cell-P815 cell interface was calculated from confocal images. (G) Representative pictures of conjugates formed between T cells and DCs pre-coated or not with a cocktail of superantigens. Cells were isolated from the blood of the mother or the patient post-DLI/HSCST, as indicated. Fixed conjugates were stained for WIP, F-actin, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (H) The distribution of the number of T cells captured per DC is represented for each indicated condition. (I) Reconstructed structured illumination microscopy images of healthy donor and patient CD8<sup>+</sup> T cells spreading over ICAM-1/αCD3. Staining for WIP, F-actin, and DAPI is shown for a ventral section of 110-nm thickness. Zoomed areas reveal actin meshwork architecture and WIP distribution. (J) The quantification of actin fiber coherency corresponds to the analysis of 20 zoomed areas per condition. DC, dendritic cell; HD, healthy donor; SAg, super-antigens. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001.

Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Lazarettgasse 14 AKH BT 25.3, A-1090 Vienna, Austria; e-mail: kaan.boztug@rud.lbg.ac.at.

## References

1. Antón IM, de la Fuente MA, Sims TN, et al. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity*. 2002;16(2):193-204.
2. Chou H-C, Antón IM, Holt MR, et al. WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol*. 2006;16(23):2337-2344.
3. Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 $\alpha$ . *Int Immunol*. 2006;18(2):221-232.
4. de la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):926-931.
5. Banon-Rodriguez I, Saez de Guinoa J, Bernardini A, et al. WIP regulates persistence of cell migration and ruffle formation in both mesenchymal and amoeboid modes of motility. *PLoS One*. 2013;8(8):e70364.
6. Massaad MJ, Oyoshi MK, Kane J, et al. Binding of WIP to actin is essential for T cell actin cytoskeleton integrity and tissue homing. *Mol Cell Biol*. 2014;34(23):4343-4354.
7. Fried S, Matalon O, Noy E, Barda-Saad M. WIP: more than a WASP-interacting protein. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):713-727.
8. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, et al. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med*. 2012;209(1):29-34.
9. Al-Mousa H, Hawwari A, Al-Ghonioum A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation corrects WIP deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):1039-1040.e4.
10. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, et al. Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica*. 2015;100(6):e216-e219.
11. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, et al. NF- $\kappa$ B1 haploinsufficiency causing immunodeficiency and EBV-driven lymphoproliferation. *J Clin Immunol*. 2016;36(6):533-540.
12. Malet-Engra G, Viaud J, Ysebaert L, et al. CIP4 controls CCL19-driven cell steering and chemotaxis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2013;73(11):3412-3424.
13. Maiuri P, Rupprecht J-F, Wieser S, et al. Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence. *Cell*. 2015;161(2):374-386.
14. Krzewski K, Chen X, Strominger JL. WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(7):2568-2573.
15. Vasconcelos Z, Müller S, Guipouy D, et al. Individual human cytotoxic T lymphocytes exhibit intraclonal heterogeneity during sustained killing. *Cell Reports*. 2015;11(9):1474-1485.
16. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(5):529-533.
17. Benvenuti F, Hugues S, Walmsley M, et al. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science*. 2004;305(5687):1150-1153.
18. Bouma G, Mendoza-Naranjo A, Blundell MP, et al. Cytoskeletal remodeling mediated by WASP in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood*. 2011;118(9):2492-2501.

DOI 10.1182/blood-2017-04-777383

© 2017 by The American Society of Hematology

## To the editor:

### Origins of myelodysplastic syndromes after aplastic anemia

Eiju Negoro,<sup>1,2</sup> Yasunobu Nagata,<sup>1</sup> Michael J. Clemente,<sup>1</sup> Naoko Hosono,<sup>2</sup> Wenyi Shen,<sup>3</sup> Aziz Nazha,<sup>1</sup> Tetsuichi Yoshizato,<sup>4</sup> Cassandra Hirsch,<sup>1</sup> Bartłomiej Przychodzen,<sup>1</sup> Reda Z. Mahfouz,<sup>1</sup> Teodora Kuzmanovic,<sup>1</sup> Mikkael A. Sekeres,<sup>1</sup> Hideki Makishima,<sup>4</sup> Seishi Ogawa,<sup>4</sup> and Jaroslaw P. Maciejewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; <sup>2</sup>Department of Hematology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan; <sup>3</sup>Department of Hematology, The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing, China; and <sup>4</sup>Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

The course of aplastic anemia (AA) is often complicated by the development of clonal disorders such as paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and secondary myelodysplastic syndromes (sMDS).<sup>1-5</sup> Identification of patients at risk for development of sMDS following AA, and distinguishing them from those with primary hypoplastic MDS (hypo-MDS) resembling AA, is important for the timely initiation of appropriate therapy. To determine potential discriminating features, we compared mutational disease evolution patterns among patients with AA, PNH, sMDS, hypo-MDS, and typical primary normo/hypercellular MDS (hyper-MDS).

Bone marrow and/or blood samples were collected from 258 AA and 59 PNH cases at Cleveland Clinic and University Hospital Basel (supplemental Tables 1 and 2, available on the *Blood Web* site). Among them, 35 patients whose initial AA or PNH progressed to sMDS were identified (Table 1; supplemental Tables 1, 2B, and 3). For comparison, we assembled a cohort of 853 patients with primary MDS (pMDS) that included 28 hypo-MDS and 825 hyper-MDS

(supplemental Tables 1 and 2A; for details, see supplemental Materials and methods).<sup>6,7</sup> We assessed copy number alterations by single nucleotide polymorphism (SNP) array karyotyping<sup>8,9</sup> and somatic mutations by whole exome sequencing (supplemental Figure 1) and targeted deep sequencing (supplemental Table 4).

First, we analyzed all AA and MDS comparison groups serving as disease controls by targeted deep sequencing (supplemental Table 4). Somatic mutations were detected in 69/133 AA patients (32/71 at presentation vs 42/74 cases after IST; 12 cases were included in both cohorts). In contrast, acquired alterations were detected in 15/23 sMDS patients and in 657/853 pMDS patients (supplemental Figure 2A). As previously shown,<sup>5</sup> most sMDS patients (63%) were characterized by  $-7/\text{del}(7q)$  evolution (Figure 1A; supplemental Table 3). By comparison, only 14% of pMDS patients had  $-7/\text{del}(7q)$ , as assessed by both metaphase cytogenetics and SNP arrays. The average number of somatic mutations by targeted sequencing was 0.8, 1.0, 1.5, 1.5, and 2.0 in PNH, AA, sMDS, hypo-MDS, and

**WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly**

***Supplemental section :***

***- Material and methods***

***- Table S1***

***- Figures S1 – S4***



## Material and methods

### Patient

The studies including immunologic diagnostic procedures and genetic analyses were performed in accordance with guidelines of good clinical practice, the current version of the Declaration of Helsinki, with written informed consent from the patient's legal representatives, and with approval from the appropriate Institutional Review Boards of Medical Universities of Graz and Vienna. Routine clinical data were obtained by retrospective chart review.

Sequential donor lymphocyte infusions with HLA-identical maternal blood were performed from the 10<sup>th</sup> month of life onwards, accompanied by sirolimus treatment during the first month. A total of four donor lymphocyte infusions at increasing doses (from  $1 \times 10^6/\text{kg}$  to max  $1 \times 10^7/\text{kg}$  CD3<sup>+</sup> cells) and two peripheral stem cell donations ( $2 \times 10^7/\text{kg}$  CD34<sup>+</sup> plus  $2 \times 10^7/\text{kg}$  CD3<sup>+</sup> cells) were given until the 13<sup>th</sup> month of life, leading to elimination of CMV from peripheral blood (from  $>10^4/\text{mL}$  to permanently negative tests) and complete clinical stabilization regarding infections until the last follow-up at two years of age. This procedure led to sustained donor T-cell and NK-cell engraftment (CD3<sup>+</sup> cells: 61.5%; CD56<sup>+</sup> cells: 41.3% donor chimerism), but reduced donor B cells and myeloid cell engraftment (CD19<sup>+</sup> cells: 1.9%; CD33<sup>+</sup> cells: 0.4% donor chimerism).

Shortly before the scheduled dismissal from ICU at 11 months of age, he developed volvulus and subtotal intestinal necrosis, making bowel resection necessary. From then on, although already weaned, he has been requiring total parenteral nutrition due to short bowel syndrome. Because of severe thrombocytopenia, the patient has been requiring platelet support by thrombopoietin receptor agonist treatment and sporadic platelet infusions.

**Primary cells and cell lines**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the WIP patient and healthy donors were isolated by Ficoll gradient. T cells were expanded by stimulation of the PBMCs with irradiated PBMCs and EBV-immortalized B cells (B-EBV, JY cells), IL-2 (100U/mL) and IL-15 (5ng/mL) in RPMI medium containing 5% human serum. This stimulation was repeated every two weeks for further expansion. A B-EBV line was generated from the patient following EBV virus infection of PBMCs. Monocytes-derived dendritic cells (MDDC) were generated by cultivating adherent PBMC during 6 days in RPMI 1% human serum supplemented with Penicillin/Streptomycin, HEPES, 750 U of GM-CSF and 100 U of recombinant IL-4 (Peprotech). Then, MDDCs were matured overnight with 1µg/mL LPS. The purity and maturation stage of the MDDCs were checked by flow cytometry using CD14-APC, CD11c-V450, CD80-PE, CD86-PC7 and HLA-DP/DQ/DR-FITC Abs. The WASP-deficient B-EBV line was derived from the WAS2 patient described previously<sup>1</sup>. WIP expression knock-down was obtained by transducing JY cells with a *WIPF1* shRNA-encoding lentiviral vector (Sigma Aldrich) followed by puromycin selection. The B-EBV cells from the patient and a healthy donor were transduced with a lentiviral vector encoding Lifeact-GFP (Ibidi) to visualize actin dynamics or encoding mCherry-WIP to rescue WIP expression<sup>2</sup>.

**Targeted Exome Sequencing**

Genomic DNA of patient was enriched using HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies Inc.) as previously described<sup>3,4</sup>. Exome sequencing was performed on Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc.) Sequencer running on HiSeq Control Software (HCS) 1.4.8, Real time Analysis Software (RTA) 1.12.4.2. Variants with a minor allele frequency of more than 0.01 were excluded and lists were further filtered for rare variants within the exons of the targeted



genes. Primers of candidate variants were designed for PCR amplification and capillary sequencing, as previously described<sup>5</sup>.

### **Lentiviral vectors**

Lentiviral vectors were produced in HEK293T cells by co-transfecting the mCherry-WIP transfer vector<sup>2</sup>, the envelope plasmid pMD.2G and the packaging plasmid pCMVR8.91, as previously described<sup>6</sup>. Lentiviral particles were harvested 48 and 72h post transfection, filtered and stored at -80°C until use. B-EBV cells were spinoculated with a 1/5 dilution of the virus stock in the presence of polybrene.

### **Immunophenotyping**

Antibodies were added on  $1 \times 10^6$  PBMCs from the patient and two normal donors and incubated 30min on ice in the dark. After antibody incubation, the cells were washed in PBS and analyzed on a Fortessa cytometer (BD Biosciences). The following antibodies were used: CD3-APC-H7, CD4-BV605, CD8-FITC, CD45RA-AF700, CD27-V450, CCR7-CF594, CD95-PeCy7, CD244-PE, CD19-PerCPCy5.5, IgD-FITC, CD27-V450, CD21-PE, CD38-PE-Cy7, IgM-APC, TCR $\nu\beta$ 11-FITC, TCR $\nu$ 24-PE-Cy7, CD4-PE, CD8-V450, CD45RA-AF700, CCR7-BV421, CXCR4-PE-Cy5, CD31-APC from BD Biosciences and Beckman Coulter.

### **Western blotting**

Cell lysates from B-EBV cells were prepared using lysis RIPA buffer, loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. Proteins were detected using rabbit polyclonal anti-WIP antibody (H-224, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-WASP antibody (H-250, Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-GAPDH

antibody (Santa Cruz Biotechnology). HRP-coupled secondary antibodies were added and developed with an ECL Kit.

#### **Transwell Assay**

T cells were resuspended in RPMI 0.5% BSA medium and deposited ( $0.25 \times 10^5$  cells/50 $\mu$ L) on the filters of a 5- $\mu$ m pore size 96-well transwell plate (Corning). CCL19 or CXCL12 (Peprotech) were added at the indicated concentrations to the lower chamber. After 4h of incubation at 37°C, the transmigrating cells were collected, transferred into a U-bottom 96-well plate and counted with a Fortessa cytometer equipped with a plate sampler (BD Biosciences). The proportion of migrating cells was normalized to the initial input.

#### **Real-time chemotaxis**

The central channel of collagen coated chemotaxis 3D  $\mu$ -slides (IBIDI) were seeded with B cells in RPMI 0.5% BSA medium. CCL19 was added in one of the 2 reservoirs to establish a 0 to 100ng/mL gradient over the central channel. Cell migrating within the central channel of the  $\mu$ -slides were imaged at 37°C/5%CO<sub>2</sub> with a Zeiss LSM780 confocal microscope equipped with a Plan-Apochromat 63x objective (1.4NA, oil immersion) using 2 PMTs and a GaAsP detector. Cell polarity was plotted as a wind-rose graph representing orientation of major cell axis. Actin polarization was measured as a vector between the center of mass of the cell and that of its F-actin. This vector was projected along the Y-axis (chemokine gradient), yielding positive or negative values (in  $\mu$ m) depending on the cell orientation.

**Cytotoxicity assay**

The cytotoxicity assay was adapted from a redirected killing assay described previously<sup>7</sup>. In brief, GFP-expressing P815 cells were preloaded with different concentrations of  $\alpha$ CD3 Ab (OKT3 clone, eBioscience) and pretreated with 0.2 $\mu$ g/mL aphidicolin (Sigma Aldrich) to prevent their proliferation. Purified CD8<sup>+</sup> T cells (MagneSort Human CD8<sup>+</sup> T-cell Enrichment Kit, eBioscience) were incubated for 4 or 24h with P815 cells at different ratios in a U-bottom 96-well plate. 7-AAD (BD pharmingen) was added to the cell suspensions prior to analysis on a Fortessa flow cytometer equipped with an automated plate reader device (BD Bioscience) to count absolute numbers of residual alive P815 cells (GFP<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>).

**Confocal microscopy**

To assess T cell polarization upon chemokine stimulation, expanded T cells were resuspended in RPMI 0.5% BSA, containing 100 $\mu$ g/mL CCL19 or CXCL12 and transferred onto poly-L-lysine coated slides. After 10min of incubation at 37°C, T cells were fixed with 3% PFA and stained with Phalloidin-AF546 (Life Technology) and WIP rabbit polyclonal Ab (H-224, Santa Cruz Biotechnology) in permeabilization buffer (eBioscience). Zenon  $\alpha$ -rabbit AF488 IgG (Life Technology) was used to reveal the WIP staining. Stained cells were mounted between slides and coverslips using DABCO mounting medium. They were imaged on a Zeiss LSM700 confocal microscope with a Plan-Apochromat 40x Objective (1.3NA, oil immersion) and 2 detectors with short and long pass filters (PMT 1: SP 490, SP 555, SP 640 nm and PMT 2: LP 490, LP 560, LP 640 nm). Analysis of roundness and aspect ratio was performed on the F-actin mask with the ImageJ software.

To assess immunological synapse formation, expanded T cells were conjugated with either  $\alpha$ CD3-coated P815 cells (10 $\mu$ g/ml OKT3 clone, eBioscience) or super-antigen-coated monocyte-derived DC (100ng/ml of a cocktail of TSST-1, SEA, SEB and SEE, Toxin Technology) at a 2:1 ratio for 10min on poly-L-lysine coated slides. Following fixation with 3% PFA, cells were stained with Phalloidin-AF546 (Life Technology), WIP rabbit polyclonal Ab (H-224, Santa Cruz Biotechnology) and perforin Ab (dG9 clone) in permeabilization buffer (eBioscience). WIP and perforin were revealed with AF647- and AF488-coupled secondary Abs (Life Technology). Stained cells were mounted between slides and coverslips using DABCO mounting medium. They were imaged on a Zeiss LSM780 confocal microscope with a Plan-Apochromat 63x objective (1.4NA, oil immersion) using 2 PMTs and a GaAsP detector. Conjugate formation was calculated as the percentage of T cells engaged with P815 cells. Lytic granule polarization was assessed by measuring with the line tool of ImageJ the distance of individual perforin positive granules to the center of the T cell to P815 contact area. The ability of DC to form conjugates with T cells was measured by counting the number of T cells captured by individual DC.

#### **Structured illumination microscopy**

CD8<sup>+</sup> T cells were seeded on 1.5H coverslips precoated with poly-L-lysine or a combination of 4 $\mu$ g/ml recombinant ICAM-1/Fc chimera (R&D Systems) and 10 $\mu$ g/ml OKT3. Cells were fixed with 4% PFA and stained in permeabilization buffer with Phalloidin-AF546 and WIP rabbit polyclonal Ab (H-224, Santa Cruz Biotechnology), followed by AF488-labelled  $\alpha$ -rabbit Ab (Life Technology). Coverslips were mounted in Vectashield H-1000 (Vector lab). 3D-SIM images were acquired with a Zeiss Elyra PS1 SR-SIM equipped with a Plan-Apo 63x/1.40NA oil DIC immersion objective using a sCMOS camera (Hamamatsu) and a 1.60x tube lens. A

multicolor SR-SIM image (green, red channels) was obtained with the 488nm and 561nm laser excitation, using respectively the 28 $\mu$ m and 32 $\mu$ m optical grids. For each acquisition, the grid was rotated to three pre-aligned angles. At each rotation the grid was translated five times to collect images with five phases. Acquisition of z-stacks was implemented with a step of 110nm between axial planes to cover a maximum of 10 $\mu$ m depth. The lateral pixel size was 65nm in the acquired images and 32nm in the reconstructed images. The 3D-SIM images were reconstructed with the Zeiss ZEN software and further verified with SIMcheck (Image J, plugin). Actin meshwork organization was analyzed with the coherency parameter from the OrientationJ plugin of ImageJ.

#### **Statistical analysis**

Data sets were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test or a Student-t-test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### Supplemental references

1. Meester JD, Calvez R, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(5):1031–1040.
2. Banon-Rodriguez I, Guinoa JS de, Bernardini A, et al. WIP Regulates Persistence of Cell Migration and Ruffle Formation in Both Mesenchymal and Amoeboid Modes of Motility. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e70364.
3. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, et al. Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica*. 2015;100(6):e216–e219.
4. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, et al. NF- $\kappa$ B1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J. Clin. Immunol.* 2016;36(6):533–540.
5. Willmann KL, Klaver S, Doğu F, et al. Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat. Commun.* 2014;5:5360.
6. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):871–875.
7. Vasconcelos Z, Müller S, Guipouy D, et al. Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* 2015;11(9):1474–1485.

## Supplemental figure legend

**Figure S1. Phenotyping of the patient PMBCs.** Frozen PBMCs from a healthy donor and the patient were thawed and immediately phenotyped using different antibody panels: **(A)** CD4, CD8; **(B)** CD45RA, CCR7; **(C)** CD31, CD45RA; **(D)** CD19, CD3; **(E)** CD27, IgD.

**Figure S2. Expression of CCR7 and CXCR4 by expanded T cells.** Flow cytometry analysis of CCR7 and CXCR4 at the surface of T cells expanded from the WIP-deficient patient and a healthy control.

**Figure S3. WIP controls human B-cell chemotaxis.** **(A)** Western blot analysis of WIP and WASP expression in JY cells, either untransduced, transduced with a scramble shRNA or a shRNA targeting *WIPF1* (top panels); Western blot analysis of WIP expression in B-EBV cells from the patient transduced with a mCherry-WIP encoding lentiviral vector (bottom panels). **(B)** Thirty-minute trajectories of the wildtype or shWIP JY cells, or EBV-transformed B cells from the patient untransduced or transduced with the mCherry-WIP encoding lentiviral vector upon exposure to a CCL19 gradient.

**Figure S4. Spreading of WIP-deficient CD8<sup>+</sup> T lymphocytes over poly-L-lysine.** **(A)** Reconstructed SIM images of healthy donor and patient CD8<sup>+</sup> T cells spreading over poly-L-lysine. Staining for WIP, F-actin and DAPI is shown for a ventral section of 110nm thickness. Zoomed areas revealing actin meshwork architecture and WIP distribution. **(B)** The

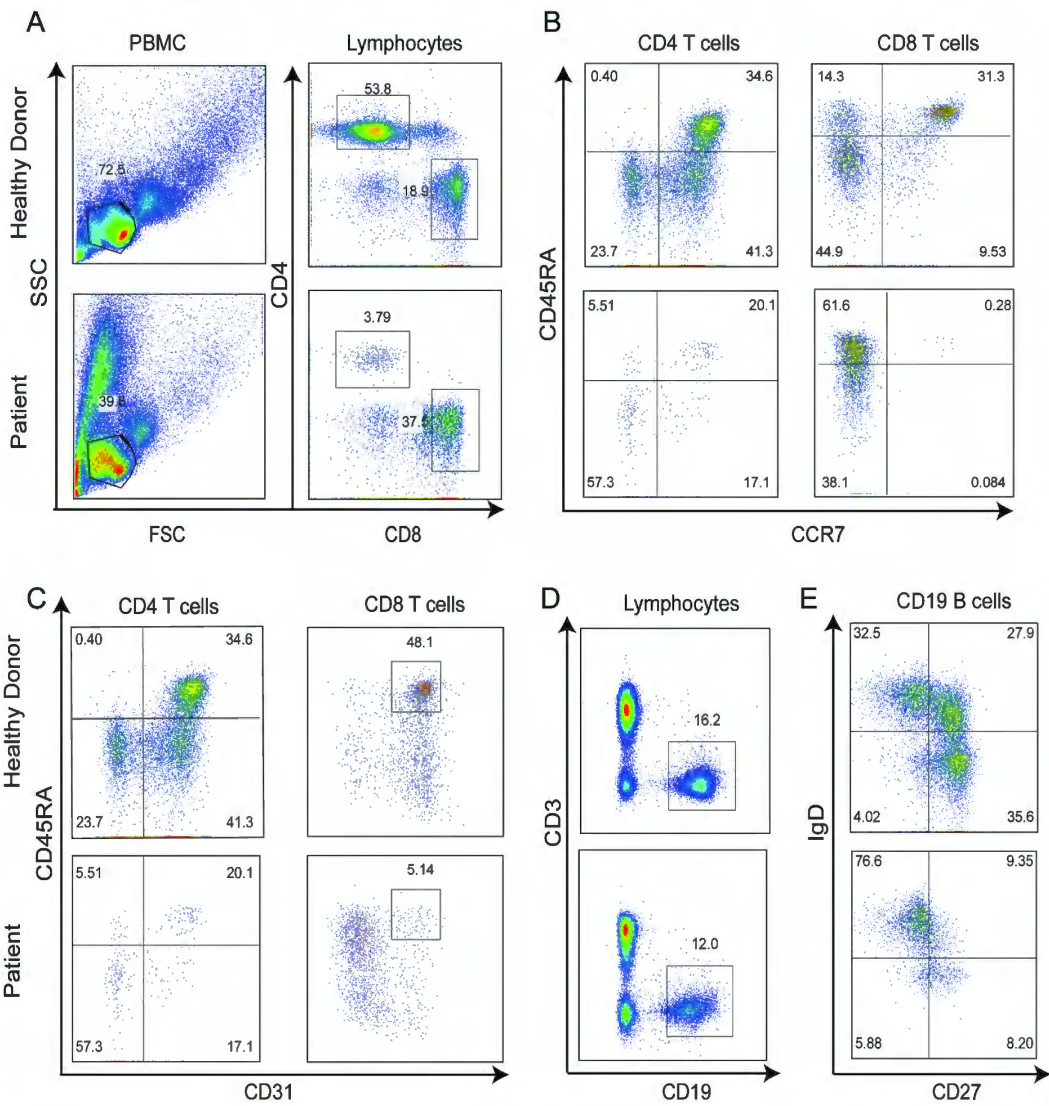
quantification of actin fiber coherency corresponds to the analysis of 20 zoomed areas per condition.



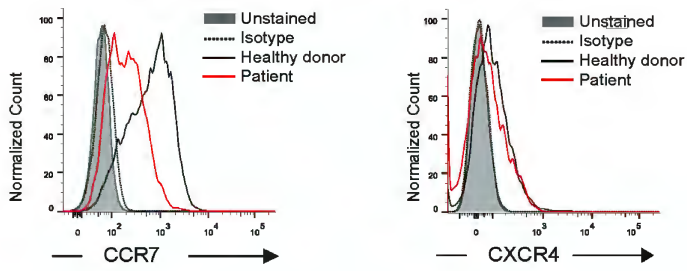
<b>Table S1 : Clinical and immunological characteristics of the patient</b>					
<b>Clinical manifestations</b>					
Failure to thrive					
Recurrent bacterial and viral infections (CMV pneumonitis, systemic CMV infection, Klebsiella sepsis)					
Cytopenia, predominantly thrombocytopenia					
Hepatosplenomegaly					
<b>Immunological characteristics</b>					
Variable	Patient values				Reference range
	12 weeks	15 weeks	18 weeks	41 weeks	
Monocytes (cells/ $\mu$ L)	2358	2318	565	125	400-1000
Leukocytes (cells/ $\mu$ L)	3.38	2.495	0.653	0.6	6,0 - 14
Thrombocytes (cells/ $\mu$ L)	66	nd	nd	nd	140-440
Neutrophils (cells/ $\mu$ L)	1.9	1.2526	0.4324	0.2197	1.0-8.5
Eosinophils (cells/ $\mu$ L)	0,2	nd	nd	nd	0-0.7
Basophils (cells/ $\mu$ L)	0.1	nd	nd	nd	0-0.2
CD34 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	nd	332	12	nd	
T lymphocytes					
CD3 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	6062	5955	803	683	1700-3600
CD4 <sup>+</sup> cells / $\mu$ L	844	827	248	195	1700-2800
CD25 <sup>+</sup>	2.82%	nd	nd	nd	
HLADR <sup>+</sup>	1.52%	nd	nd	nd	
CD45RA <sup>+</sup>	5.83%	199	66	40	
CD45RO <sup>+</sup>	8.17%	nd	nd	nd	
FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	0.14%	nd	nd	nd	
CD8 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	3651	3576	450	421	800-1200
CD25 <sup>+</sup>	0.17%	nd	nd	nd	
HLADR <sup>+</sup>	15.97%	nd	nd	nd	
CD45RA <sup>+</sup>	30.48%	nd	nd	nd	
CD45RO <sup>+</sup>	12.84%	nd	nd	nd	
CD4/CD8 ratio/ $\mu$ L	0.23	nd	nd	nd	1.5-2.9
TRECS / $1 \times 10^5$ CD3 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup>	1860 (1.86%)	nd	nd	nd	
TRECS / $1 \times 10^5$ CD3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	3820 (3.80%)	nd	nd	nd	
T-cell proliferation / PHA (cpm)	7279	nd	nd	nd	14218-39235
T-cell proliferation / ConA (cpm)	11046	nd	nd	nd	4928-29519
T-cell proliferation / $\alpha$ -CD3/CD28 (cpm)	12868	nd	nd	nd	12181-31490
CD3 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> Ki67 <sup>+</sup> / $\mu$ L peripheral blood	347	nd	nd	nd	
NK / NKT cells					
CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	2455	nd	nd	nd	300-700
CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	1534	nd	nd	nd	30-140
B lymphocytes					
CD19 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	768	796	218	259	500-1500
Immunoglobulins					
IgG (g/L)	22.58	nd	nd	nd	1.62-7.30
IgA (g/L)	0.65	nd	nd	nd	0.07-2.92
IgM (g/L)	4.05	nd	nd	nd	0.17-0.80

nd : not determined

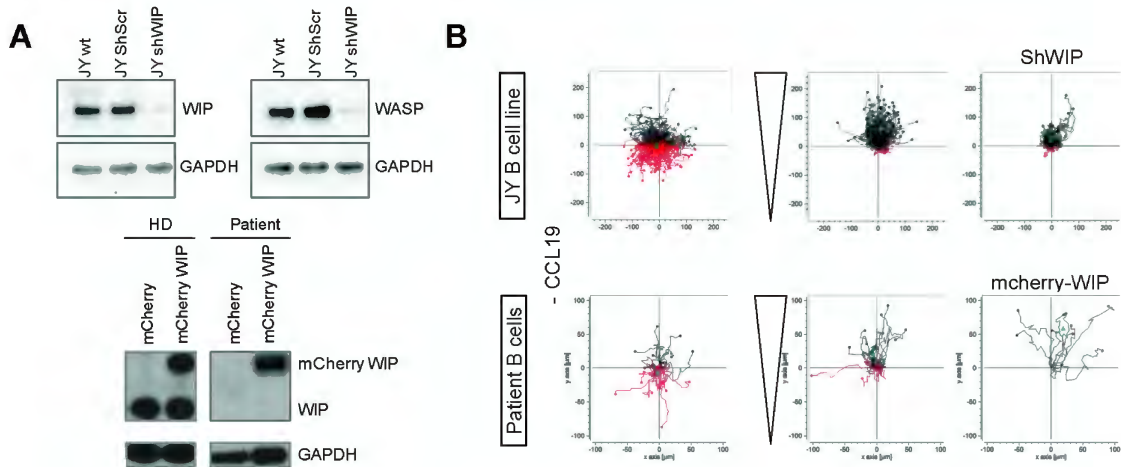
Pfajfer *et al.*, Figure S1



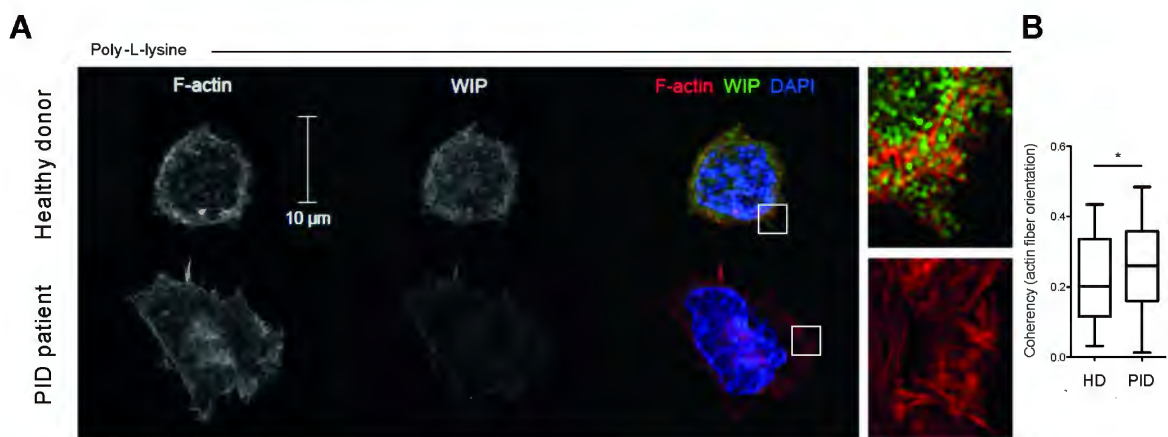
Pfajfer *et al.*, Figure S2



Pfajfer *et al.*, Figure S3



Pfajfer *et al.*, Figure S4



## Papier #2: « T cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency » - Contribution

Article Original, publié dans Blood, 2018

### Résumé

La protéine ARPC1B est une protéine clef dans l'assemblage et la maintenance du complexe ARP2/3, impliqué dans le branchement d'actine à partir d'un filament d'actine préexistant. Ce complexe est notamment régulé par l'axe protéine WIP/WASP/CDC42, dont l'activation va induire la génération de nouveau filament d'actine. Il a été démontré précédemment que la déficience en ARPC1B avait un impact majeur sur les fonctions des cellulaires immunitaires innées et des plaquettes. L'impact des mutations sur le système immunitaire adaptatif ayant été peu étudié, nous avons concentré notre étude sur le compartiment T, dont la déficience fonctionnelle permettrait d'expliquer le phénotype clinique des patients.

Nous avons pu étudier 6 nouveaux patients porteurs de mutations bialléliques dans le gène *ARPC1B*, induisant une altération de l'expression protéique dans les PBMCs. Les mutations induisent dans le compartiment T un défaut de formation de la synapse immunologique, due à une capacité d'étalement réduite, et la formation de filopodes provenant du cortex cellulaire. Ce défaut de synapse résulte en une altération des capacités de conjugaison avec des cellules cibles, qui sont fortement diminuées. Le traitement avec un inhibiteur des formines, principaux acteurs de la formation de filopodes, n'a pas permis l'instauration d'une synapse immunologique efficace. La capacité migratoire et proliférative des lymphocytes T est également diminuée.

De manière intéressante, deux patients possèdent une certaine proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant la protéine ARPC1B par réversion somatique de la mutation. Ces cellules montrent une capacité migratoire proche des cellules contrôles. En conclusion, cette étude nous a permis de définir. Le rôle de ARPC1B dans la formation de la synapse immunologique, la dynamique du cytosquelette d'actine ainsi que la migration cellulaire.

### Contribution à l'article

J'ai pris part à l'exécution expérimentale du projet, ainsi qu'au travail de réflexion et d'écriture de l'article. J'ai contribué aux échanges scientifiques avec les auteurs.

Concernant le travail expérimental, j'ai pris soin de générer et cultiver les lymphocytes T primaires.

Concernant les données présentées dans les figures, j'ai généré les données suivantes :

Figure 3 :

Exécution et analyse des expériences (A-E)

Figure annexe 6 :

Exécution et analyse





IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY

# T-cell defects in patients with *ARPC1B* germline mutations account for combined immunodeficiency

Immacolata Brigida,<sup>1</sup> Matteo Zoccolillo,<sup>1,2</sup> Maria Pia Cicalese,<sup>1,3,4</sup> Laurène Pfajfer,<sup>5-9</sup> Federica Barzaghi,<sup>3,2</sup> Serena Scala,<sup>1</sup> Carmen Oleaga-Quintas,<sup>10,11</sup> Jesus A. Álvarez-Álvarez,<sup>12,13</sup> Lucia Sereni,<sup>1</sup> Stefania Giannelli,<sup>1</sup> Claudia Sartirana,<sup>1</sup> Francesca Dionisio,<sup>1</sup> Luca Pavesi,<sup>14</sup> Marta Benavides-Nieto,<sup>15,16</sup> Luca Basso-Ricci,<sup>1</sup> Paola Capasso,<sup>1</sup> Benedetta Mazzi,<sup>17</sup> Jeremie Rosain,<sup>10,11,18</sup> Nufar Marcus,<sup>19</sup> Yu Nee Lee,<sup>20</sup> Raz Somech,<sup>20</sup> Massimo Degano,<sup>21</sup> Giuseppe Raiola,<sup>22</sup> Roberta Caorsi,<sup>23</sup> Paolo Picco,<sup>23</sup> Marcela Moncada Velez,<sup>12</sup> Joelle Khourieh,<sup>10,11</sup> Andrés Augusto Arias,<sup>12,24</sup> Aziz Boufifa,<sup>25</sup> Thomas Issekutz,<sup>26</sup> Andrew Issekutz,<sup>26</sup> Bertrand Boisson,<sup>10,11,27</sup> Kerry Dobbs,<sup>28</sup> Anna Villa,<sup>1,29</sup> Angelo Lombardo,<sup>1,4</sup> Benedicte Neven,<sup>15</sup> Despina Moshous,<sup>15,16</sup> Jean-Laurent Casanova,<sup>10,11,15,27,30</sup> José Luis Franco,<sup>12</sup> Luigi D. Notarangelo,<sup>28</sup> Cristina Scielzo,<sup>14</sup> Stefano Volpi,<sup>23,31</sup> Loïc Dupré,<sup>5-9</sup> Jacinta Bustamante,<sup>10,11,18,27</sup> Marco Gattorno,<sup>23,32,\*</sup> and Alessandro Aiuti<sup>1,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; <sup>2</sup>Department of Systems Medicine, Tor Vergata University, Rome, Italy; <sup>3</sup>Pediatric Immunohematology, IRCCS, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; <sup>4</sup>Vita-Salute San Raffaele University, Milan, Italy; <sup>5</sup>INSERM, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; <sup>6</sup>Centre national de la recherche scientifique, UMR5282, Toulouse, France; <sup>7</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; <sup>8</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria; <sup>9</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria; <sup>10</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Paris, France; <sup>11</sup>Paris Descartes University, Imagine Institute, Paris, France; <sup>12</sup>Group of Primary Immunodeficiencies, Department of Microbiology & Parasitology, School of Medicine, University of Antioquia (UdeA), Medellín, Colombia; <sup>13</sup>IPS Universitaria, Health Services of University of Antioquia, Medellín, Colombia; <sup>14</sup>Division of Experimental Oncology, Unit of B-Cell Neoplasia, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; <sup>15</sup>Pediatric Hematology-Immunology Unit, Necker Hospital for Sick Children, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; <sup>16</sup>Genome Dynamics in the Immune System, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris, Paris, France; <sup>17</sup>Immunogenetics Laboratory, HLA & Chimerism, Department of Immunohematology & Blood Transfusion, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italy; <sup>18</sup>Center for the Study of Primary Immunodeficiencies, AP-HP, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France; <sup>19</sup>Kipper Institute for Allergy and Immunology, Schneider Children's Medical Center of Israel, Petach Tikva, affiliated with Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; <sup>20</sup>Pediatric Department A and the Immunology Services, "Edmond and Lily Safra" Children's Hospital, Jeffrey Modell Foundation Center, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, affiliated with Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; <sup>21</sup>Division of Immunology, Transplantation, and Infectious Diseases, Biocrystallography Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; <sup>22</sup>Unità Operativa Complessa di Pediatria, Azienda Ospedaliera "Pugliese-Ciaccio" di Catanzaro. <sup>23</sup>Unità Operativa Clinica Pediatrica e Reumatologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy; <sup>24</sup>School of Microbiology, University of Antioquia (UdeA), Medellín, Colombia; <sup>25</sup>Clinical Immunology Unit, Department of Pediatrics, King Hassan II University, Ibn-Rochd Hospital, Casablanca, Morocco; <sup>26</sup>Department of Pediatrics & Department of Microbiology-Immunology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada; <sup>27</sup>St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY; <sup>28</sup>Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <sup>29</sup>Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Milan Unit, Milan, Italy; <sup>30</sup>Howard Hughes Medical Institute, New York, NY; <sup>31</sup>Università degli Studi di Genova, Genova, Italy; <sup>32</sup>Unità Operativa Semplice Dipartimentale Centro Malattie Autoinfiammatorie e Immunodeficienze, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

**KEY POINTS**

- **ARPC1B deficiency alters T-cell proliferation, cytoskeleton dynamics, cell migration, and immunological synapse assembly.**
- **Functional defects are corrected in naturally revertant and ex vivo transduced T cells.**

**ARPC1B is a key factor for the assembly and maintenance of the ARP2/3 complex that is involved in actin branching from an existing filament. Germline biallelic mutations in ARPC1B have been recently described in 6 patients with clinical features of combined immunodeficiency (CID), whose neutrophils and platelets but not T lymphocytes were studied. We hypothesized that ARPC1B deficiency may also lead to cytoskeleton and functional defects in T cells. We have identified biallelic mutations in ARPC1B in 6 unrelated patients with early onset disease characterized by severe infections, autoimmune manifestations, and thrombocytopenia. Immunological features included T-cell lymphopenia, low numbers of naïve T cells, and hyper-immunoglobulin E. Alteration in ARPC1B protein structure led to absent/low expression by flow cytometry and confocal microscopy. This molecular defect was associated with the inability of patient-derived T cells to extend an actin-rich lamellipodia upon T-cell receptor (TCR) stimulation and to assemble an immunological synapse. ARPC1B-deficient T cells additionally displayed impaired TCR-mediated proliferation and SDF1-α-directed migration. Gene transfer of ARPC1B in patients' T cells using a lentiviral vector restored both ARPC1B expression and T-cell proliferation in vitro. In 2 of the patients, in vivo somatic reversion restored ARPC1B expression in a fraction of lymphocytes and was associated with a skewed TCR repertoire. In 1 revertant patient, memory CD8+ T cells expressing normal levels of ARPC1B displayed improved T-cell migration. Inherited ARPC1B deficiency therefore alters T-cell cytoskeletal dynamics and functions, contributing to the clinical features of CID. (*Blood*. 2018;132(22):2362-2374)**

Downloaded from https://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/22/2362/1748065/blood.2018.11.322222362.pdf by guest on 31 July 2020

## Introduction

Actin cytoskeleton remodeling drives a number of dynamic processes, which are key to many aspects of cell biology. It relies on the rapid turnover of filaments and the assembly of large-scale meshworks. These tightly regulated mechanisms are governed by a molecular machinery composed of a set of more than a hundred actin-binding proteins.<sup>1</sup> These proteins are endowed with different actin remodeling activities likely nucleation, elongation, capping, severing, depolymerization, and cross-linking of actin filaments. Because of the key role of actin cytoskeleton remodeling in immune cell function, its perturbation can result in autoimmunity or primary immunodeficiency (PID).<sup>2,4</sup> In particular, the ARP2/3 complex plays an important role in actin nucleation and polymerization in blood cells. Loss of ARP2/3 complex results in decreased lamellipodia formation, defective chemotaxis, and cell migration,<sup>5</sup> leading to abnormalities of innate and adaptive immunity and contributing to immune dysregulation. The ARP2/3 complex is activated by the WASP/WIP/CDC42 axis to induce actin polymerization and generate new branched actin filament networks in the context of cell migration, endocytosis, vesicular trafficking, and cytokinesis.<sup>6-11</sup> Among its 7 subunits, ARPC1, a  $\beta$ -propeller protein with 7 blades, acts as a potential contact between the complex and an actin subunit in either the mother or the daughter filament. Two isoforms of ARPC1 have been described in humans, sharing 68% sequence identity. ARPC1B expression is restricted to hematopoietic cells,<sup>12</sup> where it exerts a regulatory role for the assembly and maintenance of the ARP2/3 complex<sup>1,8,13,14</sup> in driving the generation of a new actin filament from a preexisting filament.

Similarly to patients with loss-of-function mutations in the *WAS* gene, characterized by microthrombocytopenia, immunodeficiency, eczema, increased risk of malignancies and of autoimmune manifestations,<sup>15</sup> dysfunctions and impaired regulation of ARPC1B may lead to immune dysregulation. Recently, 6 unrelated patients carrying distinct homozygous mutations in the *ARPC1B* gene were described with symptoms of infections, immune dysregulation, vascular lesions, and variable degree of bleeding.<sup>12,16,17</sup> Platelets showed morphological and functional alterations because of impaired actin dynamics,<sup>12,16</sup> and defects in neutrophil motility and chemotaxis with leukocytosis and bleeding tendency were documented.<sup>16</sup> *Arcp1b*<sup>-/-</sup> mice display susceptibility to infections and mild vessel inflammation<sup>16</sup> but no major T-cell alterations, and zebrafish mutants showed altered development of T cells and thrombocytes.<sup>17</sup> Several open questions remain regarding the effects of mutations in the *ARPC1B* gene and the mechanisms affecting T-cell development and function in ARPC1B-mutated patients. We hypothesized that ARPC1B deficiency may lead to cytoskeleton, developmental, and functional defects in T cells, contributing to the clinical manifestations of the condition. Here we studied 6 patients of different ethnicities with combined immunodeficiency (CID) and immune dysregulation because of novel distinct homozygous mutations in the *ARPC1B* gene.

## Methods

### Patients and cell lines

Peripheral blood was obtained in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or ethical standards. Informed consents were approved by the Institutional Ethical Committee of San Raffaele Hospital (TIGET06, TIGET09), Ospedale Gaslini

and Sheba Medical Center, National Institutes of Health Institutional Review Board–approved protocol 16-I-N139, and Institutional Review Board–approved protocol 16-08-717 (CBE-SIU Universidad de Antioquia). See details of in vitro migration assay, T-cell proliferation, and transduction in the supplemental Methods (available on the Blood Web site).

### Next-generation sequencing (NGS)

Targeted sequencing (Haloplex custom kit of 200 bp; Agilent, Santa Clara, CA) was performed on 630 genes among those described for PID and candidate genes<sup>18,19</sup> in patient 1 (P1) and the family. Sequencing was performed with a MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) on Illumina MiSeq machine. Whole exome sequencing was performed in patients 2 to 6 (P2, P3, P4, P5, and P6) was sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator (Covaris). See supplemental Methods for bioinformatics analysis.

### Flow cytometry for ARPC1B

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or phytohemagglutinin (PHA) T-cell blasts<sup>20</sup> were stained for lymphocyte surface markers (BD Bioscience), and intracellular staining for ARPC1B was performed after fixation and permeabilization according to described methods<sup>21,22</sup> (see supplemental Methods). DNA was extracted from sorted subpopulations and sequenced for *ARPC1B* c.64+1G>C mutation. Results were analyzed by 4Peaks Electropherogram analyzer tool (Mekentosj, Amsterdam, the Netherlands). See supplemental Methods for Vbeta repertoire and modeling of ARPC1B protein mutants.

### Confocal microscopy and immunological synapse (IS) assembly

Freshly isolated PBMCs were stained as described<sup>23</sup> with ARPC1B, phalloidin, and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and acquired with a Leica TCS SP8 confocal microscope (supplemental Methods). For IS PHA T-cell blasts were seeded on slides with preformed reaction wells (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), coated with 2  $\mu$ g/mL recombinant ICAM-1/Fc chimera (R&D Systems) and 10  $\mu$ g/mL anti-CD3 antibody (Ab) (OKT3, eBioscience). SMIFH2 pan-formin inhibitor was used at a final concentration of 50  $\mu$ M. Slides were examined with LSM 710 confocal microscope ( $\times$ 63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective; Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Images of randomly selected cells were acquired and analyzed by ImageJ software (supplemental Methods).

### Conjugate formation

PHA T-cell blasts were stained with CellTrace Violet (ThermoFisher Scientific) and tested for conjugate formation against anti-CD3 (OKT3, 10  $\mu$ g/mL) coated/not P815 cells. The percentage of conjugates formation was analyzed by FlowJo software (supplemental Methods).

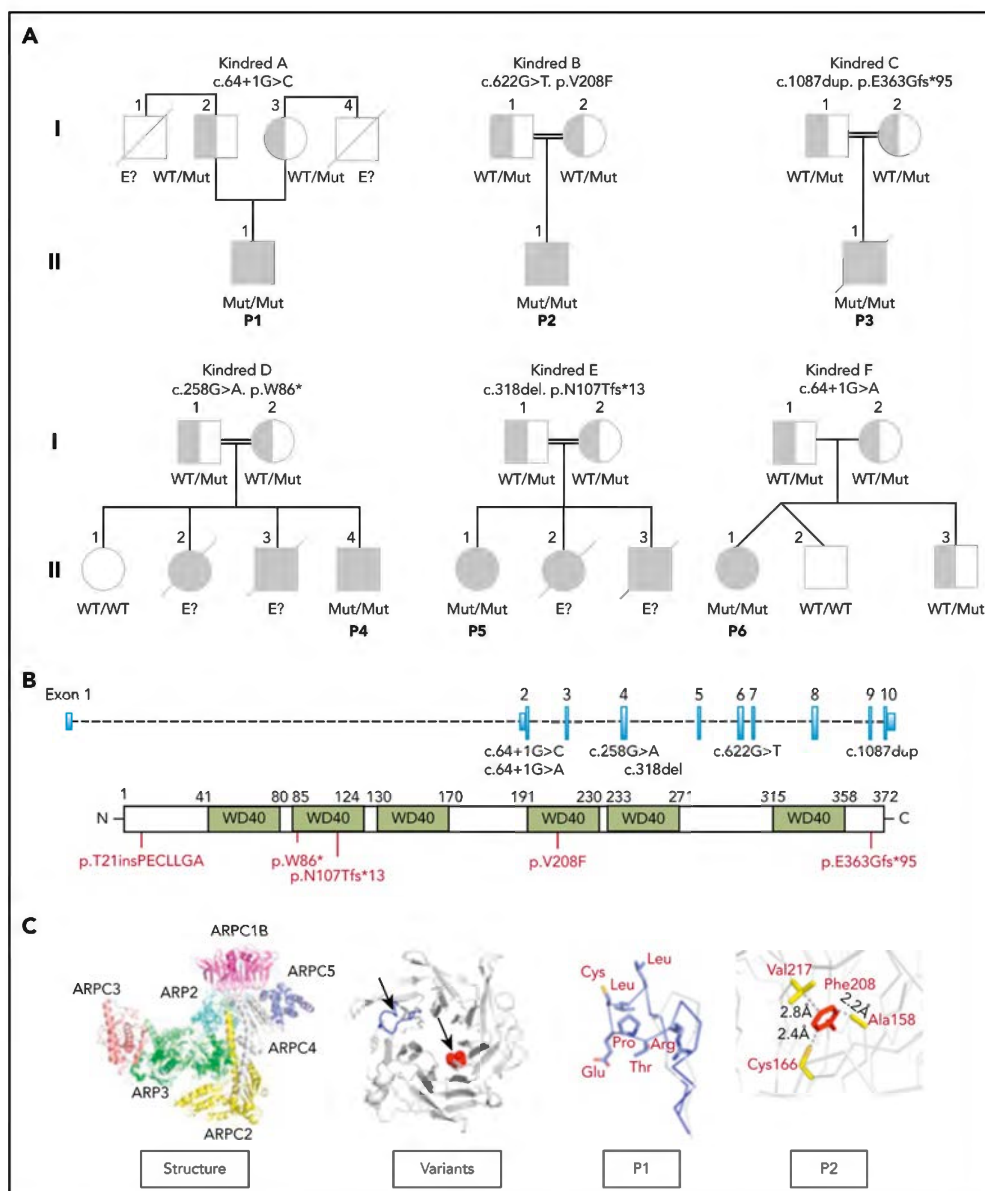
### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or median and analyzed with Graph-Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, la Jolla).

## Results

### ARPC1B mutations in patients with CID

We carried out NGS in 6 patients from unrelated families from Italy (P1 and P2), Canada (P3), Colombia (P4), Morocco (P5), and

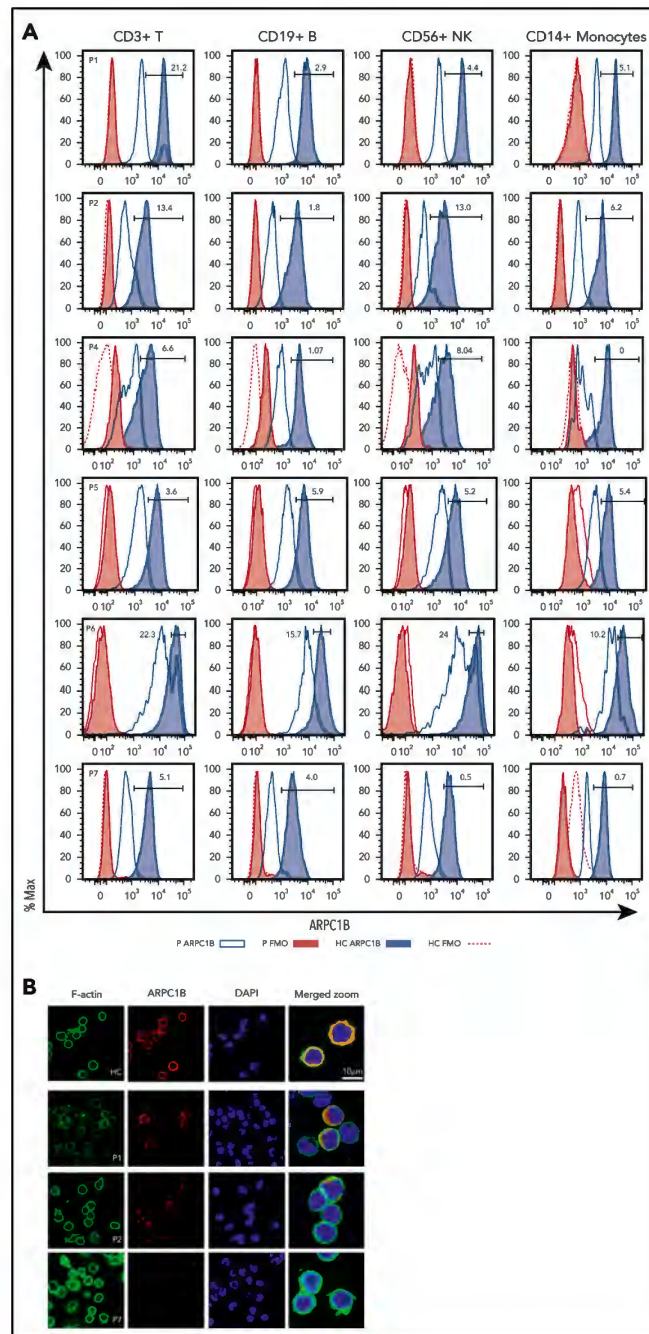


**Figure 1. Pedigree of ARPC1B-deficient patients.** (A) Genetics and pedigree of families included in the study with reported mutations. Squares: male subjects; circles: female subjects; black filled symbols: patients with mutation; crossed-out symbols: deceased subjects. Each generation is designated by a roman numeral (I-II). No genomic DNA was available for testing for siblings labeled "E?". (B) Nucleotide positions of mutations identified in index patients and representation of amino acid change caused by the mutations. (C) Crystal structure of the ARP2/3 complex from *Bos taurus* (access protein data bank: 1K8K), location of variants in the ARPC1B structure and modeling of c.64+1G>C splice donor and p.Val208Phe missense variants in P1 (blue) and P2 (red).

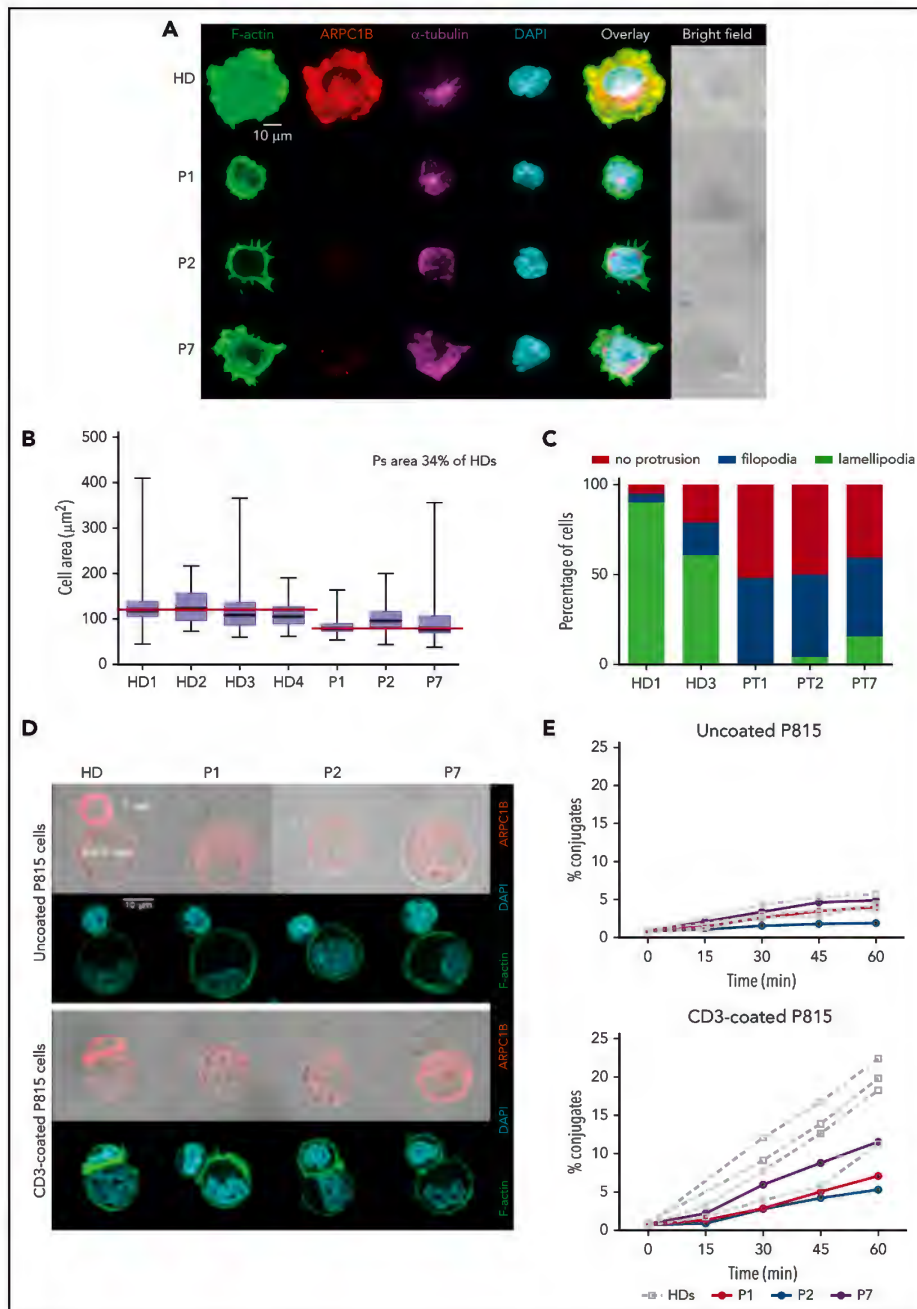
Turkey (P6) with CID. Clinical manifestations started in most patients within the first 2 months of life (supplemental Table 1) including infections, eczema, vasculitis, hepatosplenomegaly, and enterocolitis (supplemental Figure 1 and supplemental Methods). All patients show T-cell lymphopenia and reduced numbers of naïve T cells; reduced platelets counts were



**Figure 2. Phenotypical characterization of ARPC1B-deficient patients.** (A) Histograms showing ARPC1B expression in T, B, NK cells, and monocytes in patients included in the study (blue lines) and their healthy controls (HC; blue tinted lines) determined by flow cytometry. Red filled lines: negative controls of patients. Red dashed lines: negative controls of HC. Percentage of ARPC1B<sup>+</sup> in patients' cells is indicated. (B) Confocal microscopy of ARPC1B, F-actin, merged with nuclei (DAPI) in a representative field of HC, P1, P2, and P7 (ARPC1B-null patient) peripheral blood lymphocytes. Bar represents 10  $\mu$ m. Arrows indicate positive staining for ARPC1B and F-actin.



Downloaded from https://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/22/2362/1746065/blood.2018.2362.pdf by guest on 31 July 2020



**Figure 3. Defective assembly of the IS in ARPC1B-deficient T lymphocytes.** (A) Confocal images of T cells from a HC and P1, P2, and P7 adhering to ICAM1/anti-CD3 Ab-coated slides and stained for F-actin, ARPC1B,  $\alpha$ -tubulin, and DAPI. Images representative from 1 out of 3 experiments. (B) Quantification of the area of individual cells interacting with ICAM1/anti-CD3 Ab. Median bar with minimum-maximum. Red lines: median average for HD and patients. %: Mean percentage of the medians between

present in 5 patients (supplemental Figure 2 and supplemental Tables 1-2). In P1 and P2, platelets abnormalities included reduced platelet size (P2) and a severe defect in PAC1 upregulation upon stimulation with adenosine-5'-diphosphate, thrombin, and collagen, whereas CD62P activation was normal (supplemental Figures 3-4 and supplemental Methods). A comparison between clinical manifestations of the disease in our patients and previously reported works<sup>12,16,17</sup> is summarized in supplemental Table 3. Patient 7 (P7) was recently described<sup>17</sup> and included as an *ARPC1B*-null patient for comparisons.

DNA was tested in the families by either targeted (P1) or whole exome sequencing (P2 to P6). Variants were sorted according to models of inheritance (autosomal recessive, autosomal dominant, X-linked, or de novo mutations)<sup>24</sup> and for their presence in well-known PID genes or in new candidate genes.<sup>19,25</sup> Novel rare homozygous variants were found in the *ARPC1B* gene that has been recently associated with CID and platelet defects.<sup>12,16,17</sup> P1 carries a homozygous splice donor variant c.64+1G>C (rs111297226, minor allele frequency <0.0001) predicted as damaging (combined annotation dependent depletion [CADD]: 27.2),<sup>26-29</sup> which inserted 21 nucleotides deriving from intron 2 (Figure 1A-B), leading to the usage of an alternative splice site with partial intron retention and maintenance of the reading frame. P2 carries a homozygous substitution at c.622G>T in exon 6, resulting in p.Val208Phe (rs371760619, minor allele frequency <0.01), predicted as a novel damaging missense mutation (combined annotation dependent depletion [CADD]: 28.9). P3 carries a private homozygous duplication in exon 10, c.1087dup predicted as p.Glu363Glyfs\*95 (CADD:35). In P4, a nonsense mutation in exon 4 (c.258G>A) results in an early stop codon (p.Trp86\*) predicted as damaging (CADD:37). P5 carries a homozygous variant in exon 4 (c.318del) predicted as p.Asn107Thrfs\*13. P6 carries a rare homozygous splice donor variant c.64+1G>A predicted as damaging (CADD:26.7). All variants were verified by Sanger, and we confirmed that both parents of the 6 cases were carriers of the respective mutations in heterozygous state, except for P5, where only the mother could be tested and no genetic material was available for the siblings.

Structural modeling for the c.64+1G>C and the c.64+1G>A splicing site mutations on the crystal structure of ARP2/3 complex<sup>30</sup> showed an insertion of 7 additional hydrophobic amino acids at the loop between the first 2  $\beta$ -strands in P1 and P6 (Figure 1C; supplemental Figure 5), which might be exposed to the solvent interfering with protein folding and changing protein aggregation with other subunits, leading to novel protein-protein interactions. An unpaired cysteine on the edge of the loop might be subjected to oxidation, leading to non-specific aggregation through the formation of a disulfide bridge. The p.Val208Phe mutation (P2) is located in the tightly packed hydrophobic core of the protein and could destabilize the *ARPC1B* structure, leading to an incorrect folding.

### Altered expression of *ARPC1B* protein in PBMCs

We next carried out detailed immunological investigations in patients, according to availability of blood samples. We first set up an intracellular flow cytometry staining in PBMCs<sup>31</sup> to investigate whether *ARPC1B* mutations in these patients affect protein expression. As shown in Figure 2, we observed severely reduced levels of *ARPC1B* in T, B, NK cells, and monocytes of *ARPC1B*-mutated patients as compared with pediatric healthy controls (HC) and to P7, completely *ARPC1B* negative. P1 had a subpopulation (21%) of T cells expressing normal levels of *ARPC1B*, which was clearly distinct from the *ARPC1B*-negative population. In P2, 13% of T and NK cells expressed low levels of *ARPC1B*. In P4 and P5, the *ARPC1B* expression was low in all subpopulations, whereas in P6 a subpopulation of T (22%) and NK (24%) cells express normal levels of *ARPC1B*. Fresh PBMCs from available patients and controls were stained for *ARPC1B* and F-actin, nuclei counterstained with DAPI, and analyzed by confocal microscopy (Figure 2B). In P1, a normal *ARPC1B* expression was found in ~20% of leukocytes as compared with HC and P7, in which no detectable *ARPC1B* was found. In P2, some cells appear to express reduced levels of *ARPC1B* that accumulates in large patches around the cell periphery and does not distribute evenly along the actin cortex.

### *ARPC1B*-deficient T cells emit aberrant filopodia and fail to spread radially

We therefore investigated whether *ARPC1B* mutations might affect the assembly or the structure of the IS. PHA T-cell blasts were deposited on stimulatory glass coverslips with adsorbed ICAM-1 and anti-CD3 Ab for IS assembly. In HC, the IS formation over ICAM-1/anti-CD3 involved a radial spreading, with distribution of F-actin into a wide peripheral lamellipodia that extended well beyond the cell body (Figure 3A). Upon IS assembly, *ARPC1B* polarized to the peripheral lamellipodia where it colocalized with F-actin. As expected, the microtubules converged toward the stimulatory surface in a rather central position of the synapse. In contrast, *ARPC1B*-deficient T cells in P1, P2, and P7 failed to spread radially. We observed a reduced surface over the stimulatory surface in *ARPC1B*-deficient T cells by image quantification, confirming the inability in assembling the IS (Figure 3B). Instead of disrupting the cortical actin to assemble a peripheral circular lamellipodia, *ARPC1B*-deficient T cells from the 3 studied patients emitted thin filopodia that stemmed from the cell cortex (Figure 3A,C). Interestingly, some T cells from P7 displayed a partial disruption of cortical actin with emission of erratic pseudopodia decorated with short filopodia. Whereas the remodeling of the actin cytoskeleton was profoundly affected in the patient's T cells, microtubules organization appeared normal (Figure 3A). These observations are in agreement with previous experiments in Jurkat T cells inhibited for Arp2 or Arp3 with short hairpin RNAs.<sup>32</sup>

Because Arp2/3 inhibition in Jurkat T cells results in the emission of formin-dependent actin spikes,<sup>33</sup> we reasoned that the aberrant filamentous structures assembled at the periphery of

**Figure 3 (continued)** Patients and HDs. Results of 2 independent experiments. (C) Distribution of T-cell morphologies according to the indicated subtypes: cell without protrusion, emission of filopodia, or assembly of a circular lamellipodia. (D) Representative confocal images of control T cells or T cells from P1, P2, and P7 upon interaction with P815 that have been precoated or not with anti-CD3 Ab. Fixed conjugates were stained for F-actin, *ARPC1B*, and DAPI. Representative images from 1 out of 2 experiments. (E) Quantification of the proportion of T cells engaged in conjugates with P815 targets precoated or not with anti-CD3 Ab. Conjugate formation was assessed at the indicated time points upon cell mixture. Results of 2 independent experiments.

ARPC1B-deficient T cells might arise from an imbalanced actin remodeling in favor of formins. To test this hypothesis, T cells were treated with the pan-formin inhibitor SMIFH2 prior to and during interaction with coverslips with adsorbed ICAM-1/anti-CD3. We observed a collapse of the filopodia from the surface of patient-derived T cells (supplemental Figure 6A), indicating that the actin-rich filamentous structures emitted by patients' T cells are under the control of formins. However, formin inhibition did not allow the ARPC1B-defective T cells to assemble a normal synapse, as indicated by lack of spreading (supplemental Figure 6B), confirming the driver role of the Arp2/3 complex in the formation of the IS.

#### ARPC1B-deficient T cells fail to assemble an IS

To further assess the consequence of ARPC1B deficiency in assembling the T-cell IS upon interaction with antigen-presenting cells, expanded T cells were incubated with anti-CD3-coated P815 cells and examined.<sup>34</sup> Upon contact with uncoated P815 cells, control T cells established a narrow contact without major ARPC1B or F-actin enrichment. Upon interaction with anti-CD3-coated target cells, control T cells assembled an IS characterized by cell flattening and enlargement of the contact area, which accumulated polymerized actin (Figure 3D). In agreement with previous data (Figure 3A), ARPC1B polarized to the IS where it colocalized with F-actin. As compared with the control T cells, ARPC1B-deficient T cells displayed reduced spreading over the surface of the stimulatory P815 cells and very limited enrichment of F-actin at the site of contact (Figure 3D). Although filopodia were detected at the surface of patients' T cells, these structures were less prominent than over ICAM-1/anti-CD3 Ab. The defective actin remodeling at the IS was associated with a reduced ability to stabilize contacts with the P815 cells. Indeed, the ARPC1B-deficient T cells displayed a reduced ability to form conjugates with the anti-CD3 Ab-coated P815 cells, as measured in parallel by flow cytometry (Figure 3E). Together, T cells from ARPC1B-deficient patients harbor a major defect in the organization of the IS, in agreement with the location of ARPC1B at the actin-rich synaptic lamellipodia in control cells.

#### Functional defects in lymphocytes of ARPC1B-mutated patients

To dissect the role of ARPC1B in lymphocyte cytoskeleton remodeling, we tested freshly isolated PBMCs from P1 and P2 in an *in vitro* migration assay in response to SDF1- $\alpha$  (CXCL12)<sup>35</sup> (Figure 4A). Lymphocytes from ARPC1B-mutated patients failed to migrate or responded poorly to increasing doses of SDF1- $\alpha$ . Moreover, spontaneous migration was 3.7- and 2.6-fold lower than the controls (Figure 4B).

To assess T-cell receptor (TCR)-driven proliferation, total PBMCs from available samples were stained with CellTrace dye and stimulated for 3 days in the presence of increasing doses of plate-bound anti-CD3 Ab. T-cell proliferation was reduced at lower concentrations of anti-CD3 Ab (0.1  $\mu$ g/mL) but was normal at higher concentrations or after the addition of anti-CD28 Ab (Figure 4C-D). This might correlate with improved induction of actin rearrangement that is observed after TCR costimulation.<sup>36</sup> To determine if the expression of a normal ARPC1B corrects the proliferation defect observed in patients' cells, PHA T-cell blasts of P2 and a HC were transduced with lentiviral vectors encoding either ARPC1B<sup>+</sup> and mCherry or

GFP and mCherry. The percentage of ARPC1B<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> T cells was 18% (supplemental Figure 7A). Bulk T-cell lines were sorted according to mCherry expression and stimulated for proliferation. Only the mCherry<sup>+</sup> T cells expressed ARPC1B at higher levels (supplemental Figure 7B-C) and proliferated at similar levels than controls and mock-transduced sorted samples (Figure 4E).

#### Altered T-cell repertoire and somatic reversion in CD8<sup>+</sup> memory T cells

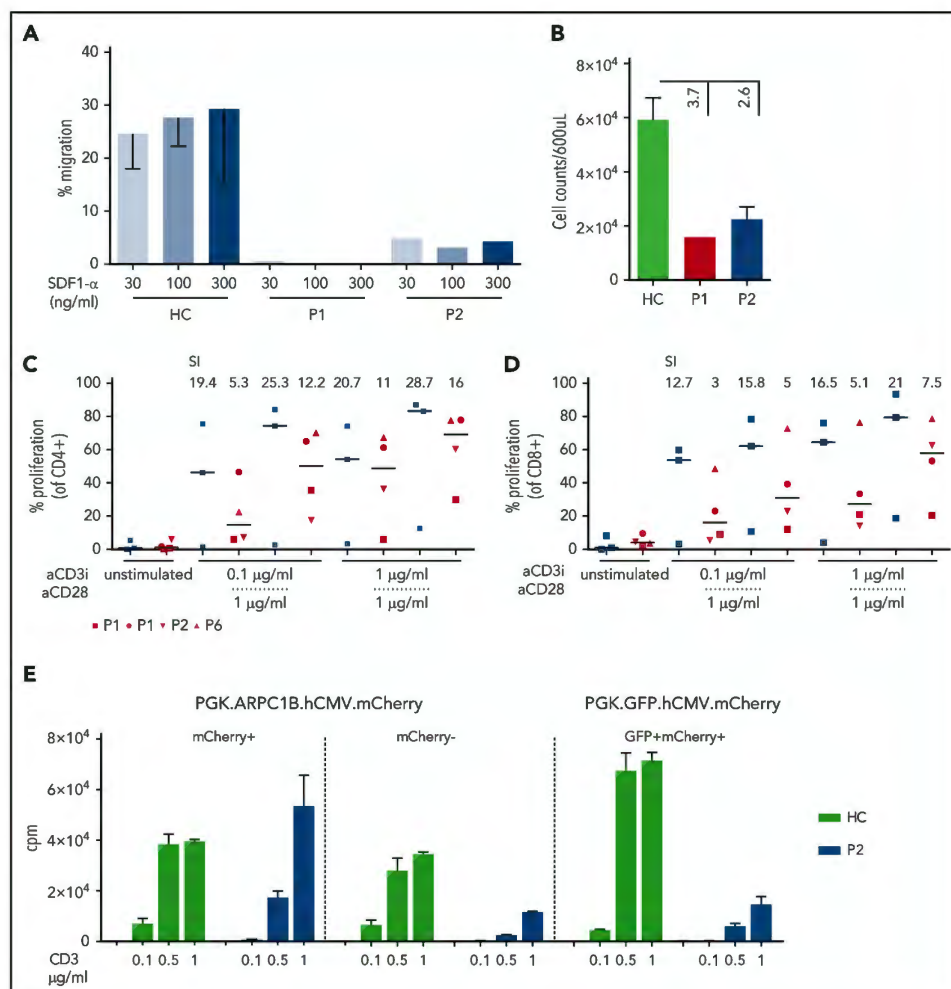
We next asked if an ARPC1B<sup>+</sup> population in the T-cell compartment of P1 and P6 could be because of a somatic reversion as observed frequently in WASP-deficient patients.<sup>37-39</sup> High throughput sequencing on whole blood revealed 3.17  $\pm$  0.01374% of wild-type sequence in P1 and 1.96%  $\pm$  0.10684% in P6 (supplemental Table 4), and in both patients reversion of the variant could be observed. ARPC1B was expressed in CD8<sup>+</sup> T cells (34.7% in P1 and 30.6% in P6, respectively), whereas it was absent in CD4<sup>+</sup> T cells and B cells. In P6, 24% of NK cells were ARPC1B<sup>+</sup>. In P1, ARPC1B<sup>+</sup> cells were present only in TEMRA (T effector memory-RA<sup>+</sup> cell), effector memory (EM), and T memory stem cell (TSCM) compartments, but no ARPC1B<sup>+</sup> cells were detected in naive and central memory T cells (Figure 5A). TCR V $\beta$  repertoire was polyclonal, with some skewing in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (supplemental Figure 8). Indeed, NGS of the immunoglobulin (IGH) and TCR- $\beta$  (TRB) and TCR- $\gamma$  (TRG) transcripts in circulating lymphocytes of P1 showed a significantly reduced Shannon's index and high junctional diversity levels, measured by the germline index<sup>40</sup> (supplemental Methods and supplemental Figure 9). We found 43% of P1 ARPC1B<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells that is mainly represented by 2 V $\beta$  families (V $\beta$ 16 and V $\beta$ 17). Among 14% of ARPC1B<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in P6, the V $\beta$ 13.1 was the main representative (Figure 5B).

To determine if the revertant CD8<sup>+</sup> T cells restore normal gene sequence, P1-derived PHA T-cell blasts were sorted according to CD4, CD8, and ARPC1B expression. Only ARPC1B<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were heterozygous at the site of donor splice site mutation, as a consequence of a secondary spontaneous mutational event. In contrast, sorted ARPC1B<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells were homozygous for the c.64+1G>C mutation (Figure 6A). Engraftment of maternal cells was excluded by HLA chimerism analysis (data not shown). We next tested if ARPC1B<sup>+</sup> T cells behaved differently than ARPC1B<sup>-</sup> cells in a migration assay (Figure 6B). Unlike freshly isolated PBMCs, PHA T-cell blasts from P1 migrated to SDF1- $\alpha$ , although at lower levels of controls (data not shown). Interestingly, an enrichment for ARPC1B<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in the migrating population was found, suggesting a preferential advantage for ARPC1B<sup>+</sup> expressing cells.

## Discussion

We report herein that ARPC1B is a key molecule driving cytoskeletal dynamics in human T cells. Biallelic mutations in the ARPC1B gene altering protein structure result in complete autosomal recessive ARPC1B deficiency characterized by CID and with impaired T-cell migration and proliferation. ARPC1B gene transfer restored protein expression and T-cell proliferation *in vitro*. The occurrence of reversion in CD8<sup>+</sup> T cells in 2 patients led to *in vivo* selection of ARPC1B-expressing cells and preferential migration ability.

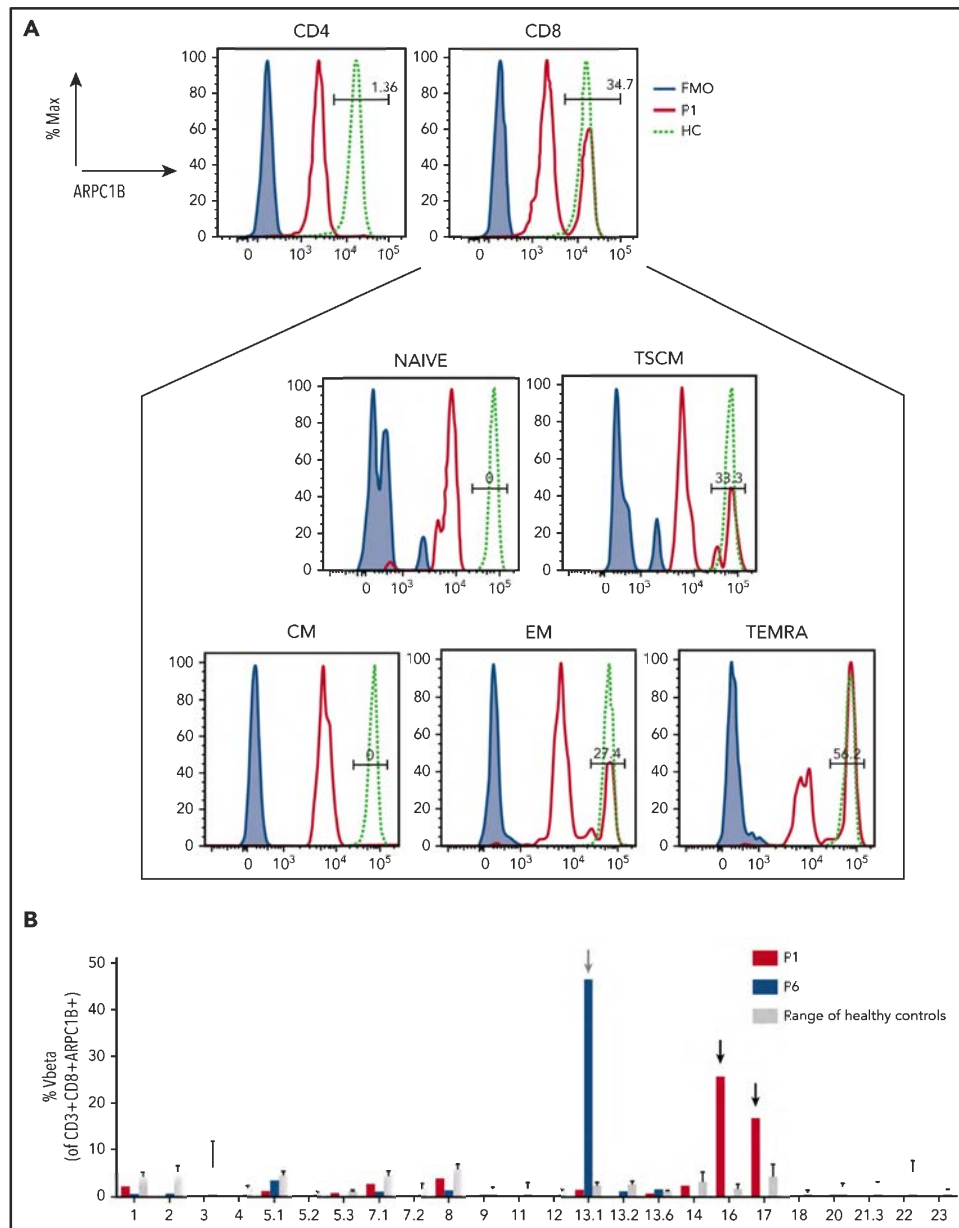




**Figure 4. Impaired migration and proliferation of peripheral blood lymphocytes.** (A) Percentage of migrated freshly isolated lymphocytes after 3 hours of stimulation with increasing concentrations of SDF1- $\alpha$  in P1 and P2 as compared with HC (n = 6). Mean  $\pm$  SEM. (B) Spontaneous migration in P1 (red bar), P2 (blue bar), and HC (n = 6; green bar). Mean  $\pm$  SEM. (C-D) Percentage of proliferation determined by cell trace dilution in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells for HC (blue, n = 3) and patients P1, P2, and P6 with anti-CD3 alone or in combination with anti-CD28. Median (bar) and patients' symbols are indicated. Stimulation index: ratio between stimulated and unstimulated cells. (E) Restoration of proliferation in transduced PHA T-cell blasts of P2 and a HC. T cells were stimulated with increasing doses of plate-bound anti-CD3. Graph summarizes the proliferation of T cells sorted according to mCherry or GFP expression. Vectors used for transduction are indicated. Mean  $\pm$  SEM. cpm, counts per minute.

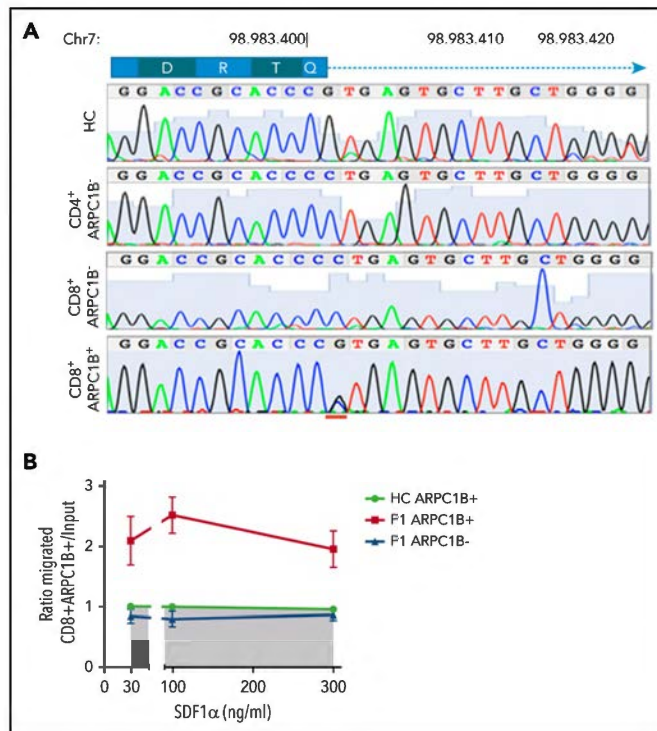
NGS was a fundamental tool to identify the causative mutations in *ARPC1B* gene<sup>12,16,17</sup> in 6 newly described patients from 6 unrelated kindred with a variable phenotype ranging from a clinical picture clearly consistent with a Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)<sup>15,41</sup> to a predominant inflammatory picture dominated by severe flares of systemic inflammation and lymphoproliferation. Thrombocytopenia with low platelet volume, mild T-cell lymphopenia, vasculitis, and failure to thrive were common findings in all patients. To our knowledge, 6 other cases of complete autosomal recessive *ARPC1B* deficiency have been described<sup>12,16,17</sup> and reported with variable degree of immune

dysregulation. It is possible that several cases of *ARPC1B* deficiency exist that are still unrecognized or incorrectly diagnosed with WAS-like disease or CID, associated with platelet dysfunction, vasculitis, and systemic inflammation. Interestingly, all *ARPC1B*-mutated patients presented variably degrees of inflammation indicating the possible role of the ARP2/3 complex in the regulation or activation of the inflammatory response. In this regard, the impact of *ARPC1B* mutations on monocyte and macrophage subsets will shed light on the severe inflammatory phenotype observed in some patients, such as in P2.



**Figure 5. Characterization of revertant CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Histograms showing the presence of a revertant ARPC1B<sup>+</sup> population in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> compartments in freshly isolated PBMCs of P1 (red line) as compared with HC (dashed line). Blue line: negative control. Box represents the percentage of ARPC1B<sup>+</sup> cells in naive, central memory (CM), TSCM (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>), EM (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>), and TEMRA (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) gated on CD8<sup>+</sup> T cells. P1, black line; HC, dashed line; negative control, blue line. (B) Determination of Vβ in gated CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ARPC1B<sup>+</sup> T cells in P1 (red bars) and P6 (blue bars) as compared with HC (gray bars, n = 3). Mean ± SD. Arrows indicate relative expansion of Vβ.

**Figure 6. Preferential migration of revertant CD8<sup>+</sup> T cells.** (A) Electropherograms showing homozygous peaks in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>ARPC1B<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ARPC1B<sup>-</sup> and heterozygous peak in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ARPC1B<sup>+</sup> in sorted subpopulations in PHA T-cell lines of P1 as compared with bulk population in a HC. The site of second mutation is indicated in red. (B) Ratio of migrated ARPC1B<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (red) and ARPC1B<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (blue) T cells at to SDF1- $\alpha$  as compared with HC (n = 6, shaded area). Mean  $\pm$  SEM. Input: percentage of T cells expressing ARPC1B before migration.



Platelet abnormalities were reported in a single patient by Kuijpers et al<sup>16</sup> describing mild bleeding tendency, a very mild platelet dysfunction and aggregation defect, a nearly normal PAC1 expression, and slight reduction of CD62P and CD63. Kahr et al<sup>12</sup> found defects in platelets size and morphology in 3 ARPC1B-mutated patients, with reduction of calcium-rich platelets dense granules and inability to form lamellipodia, for a profound loss of actin branching. No defects were observed in this work for aggregation and platelets spreading. We documented bleeding in 3 patients, restricted to the gastrointestinal tract (bloody diarrhea, 2/3) or because of gingival bleeding (1/3). Patients reported here share some of the characteristic platelet abnormalities reported in WAS,<sup>41,42</sup> including altered morphology, reduced dense granule content, and decreased surface expression of PAC1 especially after thrombin stimulation. Despite an increased activation of CD62P/PAC1 was reported in a cohort of WAS patients,<sup>43</sup> we observed reduced levels of PAC1, similarly to patients with immune thrombocytopenia and high bleeding score.<sup>44</sup>

T-cell proliferation defects resemble what previously described in WAS and suggest that defects in cytoskeletal dynamics mediated by ARPC1B deficiency may cause impaired signaling through the TCR and costimulatory molecules.<sup>21,41,45</sup> Indeed, revertant T cells observed in P1 displayed normal TCR-driven proliferation even at low-dose anti-CD3, sustaining the hypothesis of a selective advantage for revertant T cells in vivo. To our knowledge, no defects in B, NK, and monocytes were

described so far. We observed a residual ARPC1B expression in NK cells. In WAS patients, NK cells were defective in cytotoxic function and F-actin content at the IS.<sup>46</sup> Recently, Carisey et al<sup>47</sup> showed that loss of the ARP2/3 complex related to impaired F-actin dynamics, as a critical component to secretory function needed for cytotoxicity. We cannot exclude that NK cells with residual expression of ARPC1B might be affected, and this function may be further studied, especially in P6 where a high percentage of revertant cells has been found.

We found that the ARPC1B mutations cause altered cellular morphology and aberrant filopodia and fail to spread radially with defective IS and conjugates formation. The inhibition of formins in favor of ARP2/3 activation and formation of filopodia results in their collapse in patients' cells with decreased IS, which was also observed in controls, demonstrating a driver role of the ARP2/3 complex in the formation of this cellular structure. Together, our data demonstrate that ARPC1B-deficient T cells harbor a major defect in the organization of the IS, in agreement with the location of ARPC1B at the actin-rich synaptic lamellipodia in control cells. Defective chemokine-induced T-cell migration may be because of the impaired intracellular cytoskeletal machinery as the result of inability to activate the ARP2/3 complex. SDF1- $\alpha$  signaling involves the CDC42-WASP pathway to induce chemotaxis and activation of the ARP2/3 complex.<sup>3</sup> Defects of T-cell activation and migration have been described in other conditions because of mutations in genes interacting with the ARP2/3 complex or involved in

activation of this pathway. Indeed, in WAS patients defective chemotaxis was reported for T and B cells.<sup>3,48</sup> In WIPF1-deficient mice and patients, an aberrant F-actin rearrangement leads to impaired activation of T cells.<sup>49,50</sup> DOCK2-deficient cells showed defects in chemokine-induced lymphocyte migration, an impaired RAC1 activation, and defects in actin polymerization.<sup>2</sup> The finding of somatic revertant in P1 and P6 CD8<sup>+</sup> T cells and P6 NK cells is intriguing and suggests a strong selective pressure for the expansion of the revertant cells. Somatic revertant mosaicism has been reported in other PID including WAS<sup>37-39</sup> and can be because of true back mutations leading to restoration of wild-type sequences or to second site mutations resulting in compensatory changes. In WAS, somatic mosaicism has been reported in up to 11% of affected patients, especially in older patients, and is generally restricted to the T-cell subset.<sup>37,51</sup> Memory T-cell and TSCM subsets constitute the majority of the T-cell pool in P1. TSCMs are a subpopulation with a high differentiation potential and self-renewal abilities and can rapidly generate antigen-experienced T-cell subsets with effector functions after stimulation.<sup>22</sup> The presence of ARPC1B<sup>+</sup> cells predominantly among EM, TEMRA, and TSCM subsets suggests that part of the selective pressure may have occurred upon antigen stimulation or as a result of homeostatic proliferation in the setting of T-cell lymphopenia. It is unclear whether ARPC1B deficiency may impact TCR diversity by impacting thymic maturation. Somech et al<sup>17</sup> described a reduction of the TCR repertoire only in 1 patient, as a secondary consequence of altered selection during T-cell development, differential survival in the periphery, and/or altered immune responses caused by loss of ARPC1B function. Our patients showed a polyclonal repertoire, with some restriction of the TCR diversity and clonotypic expansion at immune phenotype and at NGS for TRB. Few ARPC1B<sup>+</sup> clones survive in the periphery, sustaining the hypothesis that somatic reversion might have occurred in a lymphoid T-cell progenitor prior to TCR rearrangement or could be because of in vivo selection of ARPC1B<sup>+</sup> clones after infectious events. Differently from RAG1/2 deficiency, where a poor TRB CDR3 diversity and an higher germline index are indicative of defective CDR3 junctional diversity,<sup>40</sup> this was reduced in our patient, as indicative of higher junctional diversity level and most likely normal thymic maturation. The absence of detectable ARPC1B<sup>+</sup> naïve T cells may suggest that the revertant T-cell progenitor was exhausted in vivo whereas memory T cells persisted long-term. Finally, transduction of patients' T cells with a lentiviral vector encoding ARPC1B restored protein expression and normal proliferation, further corroborating the pathogenetic role of ARPC1B in these patients. These results open the way for gene therapy strategies for the treatment of this novel PID as in the treatment of other PID.<sup>21,52,53</sup>

In conclusion, our data expand the spectrum of clinical manifestation in ARPC1B deficiency and show that defects in ARPC1B are associated with altered cytoskeletal dynamics and functions in T cells.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Samantha Scaramuzza, Stefania Crippa, and Alessandra Mortellaro for fruitful scientific discussion; Lucia Sergi Sergi

for help in vector production; Fanny Fouyssac (Nancy Hospital) for P6 referral; Christine Bole for genomic platform at Institute Imagine; and Maria Paola Rancoita from CUSSB (University Vita Salute, Milan) for statistical support.

The study was supported by grants from the Italian Ministero della Salute (Programma di rete, NET-2011-02350069), the European Commission (ERARE-3-JTC 2015 EUROCID), and Fondazione Telethon (TIGET Core grant C6). Part of this work was carried out in ALEMBIC, an advanced microscopy laboratory established by the San Raffaele Scientific Institute and the Vita-Salute San Raffaele University. This study was also partially funded by the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health; and by the Colombian Administrative Department of Science, Technology and Innovation Colciencias (111574455633, contract 774-2016).

## Authorship

Contribution: I.B. designed and supervised the research, performed experiments, developed gene panel for targeted sequencing, interpreted results, and wrote the manuscript; M.Z. performed bioinformatics analysis and molecular and functional experiments; M.P.C., F.B., S.V., M.G., G.R., R.C., P.P., J.L.F., T.I., A.I., A.B., J.A.A.-A., J.B., N.M., D.M., B.N., and R.S. provided clinical samples and patients' clinical data; D.M. and M.B.-N. performed bioinformatic and genetic analysis for P6; Y.N.L. performed NGS for TRB, TRG, and IGH analysis; M.B.-N. performed high-throughput sequencing analysis; L. Pfajfer, C. Scielzo, L. Pavesi, and L.D. helped in cytoskeletal function assays and confocal microscopy; L.S. and A.V. performed platelet assays and analysis; S.G., C. Sartirana, F.D., S.S., P.C., A.L., J.R., A.A.A., J.A.A.-A., J.L.F., and L.B.-R. contributed to patient molecular and functional analyses and flow cytometry; B.M. performed HLA typing; J.-L.C., B.B., C.O.-Q., M.M.V., A.A.A., J.K., J.B., and K.D. performed genetic analysis; M.D. performed protein modelling; J.-L.C., L.D., and J.B. critically revised the manuscript; L.D.N., C. Scielzo, and M.G. participated in the study design, data interpretation, and manuscript revision; and A.A. designed and supervised the research, interpreted the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interest.

ORCID profiles: I.B., 0000-0002-0338-2230; M.D., 0000-0002-0787-1883; A.A.A., 0000-0002-9478-8403; K.D., 0000-0002-3432-3137; J.L.F., 0000-0001-5664-6415; A.A., 0000-0002-5398-1717.

Correspondence: Alessandro Aiuti, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina, 60, 20123 Milano, Italy; e-mail: aiuti.alessandro@hsr.it.

## Footnotes

Submitted 19 July 2018; accepted 17 September 2018. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 25 September 2018; DOI 10.1182/blood-2018-07-863431.

\*M.G. and A.A. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

## REFERENCES

- Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(10):713-726.
- Dobbs K, Domínguez Conde C, Zhang S-Y, et al. Inherited DOCK2 deficiency in patients with early-onset invasive infections. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2409-2422.
- Haddad E, Zugaza JL, Louache F, et al. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood*. 2001;97(1):33-38.



4. Westerberg LS, Meelu P, Baptista M, et al. Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med*. 2010;207(6):1145-1152.
5. Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(9):577-590.
6. Castro-Castro A, Ojeda V, Barreira M, et al. Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation. *EMBO J*. 2011;30(19):3913-3927.
7. Shiw LR, Paris K, Akana MC, Cyster JG, Sorensen RU, Puck JM. Severe combined immunodeficiency (SCID) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) associated with a Coronin-1A mutation and a chromosome 16p11.2 deletion. *Clin Immunol*. 2009;131(1):24-30.
8. Abella JVG, Galloni C, Pernier J, et al. Isoform diversity in the Arp2/3 complex determines actin filament dynamics. *Nat Cell Biol*. 2016;18(1):76-86.
9. Dupré L, Houmadi R, Tang C, Rey-Barroso J. T lymphocyte migration: an action movie starring the actin and associated actors. *Front Immunol*. 2015;6:586.
10. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, et al. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*. 2001;294(5547):1679-1685.
11. Goumier H, Goley ED, Niederstrasser H, Trinh T, Welch MD. Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell*. 2001;8(5):1041-1052.
12. Kahr WHA, Pluthero FG, Elkadri A, et al. Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nat Commun*. 2017;8:14816.
13. Mullins RD, Pollard TD. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(2):244-249.
14. Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, Rosen MK. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(33):E472-E479.
15. Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):182-192.
16. Kuijpers TW, Tool ATJ, van der Bijl I, et al. Combined immunodeficiency with severe inflammation and allergy caused by ARPC1B deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):273-277.e.10.
17. Somech R, Lev A, Lee YN, et al. Disruption of thrombocyte and T lymphocyte development by a mutation in ARPC1B. *J Immunol*. 2017;199(12):4036-4045.
18. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, et al. The 2015 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2015;35(8):727-738.
19. Itan Y, Casanova J-L. Novel primary immunodeficiency candidate genes predicted by the human gene connectome. *Front Immunol*. 2015;6:142.
20. Chiriaco M, Brigida I, Ariganello P, et al. The case of an APDS patient: defects in maturation and function and decreased in vitro antimycobacterial activity in the myeloid compartment. *Clin Immunol*. 2017;178:20-28.
21. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341(6148):1233-1235.
22. Biasco L, Scala S, Basso Ricci L, et al. In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(273):273ra13.
23. Scielzo C, Bertilaccio MTS, Simonetti G, et al. H51 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood*. 2010;116(18):3537-3546.
24. Meys I, Bosch B, Bolze A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):957-969.
25. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2018;38(1):129-143.
26. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
27. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303.
28. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-315.
29. Itan Y, Shang L, Boisson B, et al. The mutation significance cutoff: gene-level thresholds for variant predictions. *Nat Methods*. 2016;13(2):109-110.
30. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, et al. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*. 2001;294(5547):1679-1684.
31. Brigida I, Scaramuzza S, Lazarevic D, et al. A novel genomic inversion in Wiskott-Aldrich-associated autoinflammation [published correction appears in *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(5):1721]. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):619-622.e7.
32. Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeau DD. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity*. 2007;26(2):177-190.
33. Murugesan S, Hong J, Yi J, et al. Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *J Cell Biol*. 2016;215(3):383-399.
34. Pfajfer L, Seidel MG, Houmadi R, et al. WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly. *Blood*. 2017;130(17):1949-1953.
35. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996;184(3):1101-1109.
36. Acuto O, Michel F. CD28-mediated costimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):939-951.
37. Wada T, Konno A, Schurman SH, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1389-1397.
38. Wada T, Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(6):510-514.
39. Trifari S, Scaramuzza S, Catucci M, et al. Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):439-448.e8.
40. Yu X, Almeida JR, Darko S, et al. Human syndromes of immunodeficiency and dysregulation are characterized by distinct defects in T-cell receptor repertoire development. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1109-1115.
41. Bosticardo M, Marangoni F, Aiuti A, Villa A, Grazia Roncarolo M. Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. 2009;113(25):6288-6295.
42. Semple JW, Siminovitsh KA, Mody M, et al. Flow cytometric analysis of platelets from children with the Wiskott-Aldrich syndrome reveals defects in platelet development, activation and structure. *Br J Haematol*. 1997;97(4):747-754.
43. Sereni L, Castiello MC, Marangoni F, et al. Autonomous role of Wiskott-Aldrich syndrome platelet deficiency in inducing autoimmunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. In press.
44. Frelinger AL III, Grace RF, Gerrits AJ, et al. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*. 2015;126(7):873-879.
45. Trifari S, Sitia G, Aiuti A, et al. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol*. 2006;177(10):7451-7461.
46. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(17):11351-11356.
47. Carisey AF, Mace EM, Saeed MB, Davis DM, Orange JS. Nanoscale dynamism of actin enables secretory function in cytolytic cells. *Curr Biol*. 2018;28(4):489-502.e9.
48. Castiello MC, Scaramuzza S, Pala F, et al. B-cell reconstitution after lentiviral vector-mediated gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(3):692-702.e2.

49. Antón IM, de la Fuente MA, Sims TN, et al. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity*. 2002;16(2):193-204.
50. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, et al. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med*. 2012;209(1):29-34.
51. Cotta-de-Almeida V, Dupré L, Guipouy D, Vasconcelos Z. Signal integration during T lymphocyte activation and function: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Immunol*. 2015;6:47.
52. Aiuti A, Brigida I, Ferrua F, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase deficient-SCID. *Immunol Res*. 2009;44(1-3):150-159.
53. Scaramuzza S, Biasco L, Ripamonti A, et al. Preclinical safety and efficacy of human CD34 (+) cells transduced with lentiviral vector for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Ther*. 2013;21(1):175-184.

**T cell defects in patients with *ARPC1B* germline mutations account for combined immunodeficiency.**

Immacolata Brigida<sup>1</sup>, Matteo Zoccolillo<sup>1,4</sup>, Maria Pia Cicalese<sup>1,2,3</sup>, Laurène Pfajfer<sup>5-9</sup>, Federica Barzaghi<sup>2,4</sup>, Serena Scala<sup>1</sup>, Carmen Oleaga-Quintas<sup>10,11</sup>, Jesus A. Álvarez-Álvarez<sup>12,32</sup>, Lucia Sereni<sup>1</sup>, Stefania Giannelli<sup>1</sup>, Claudia Sartirana<sup>1</sup>, Francesca Dionisio<sup>1</sup>, Luca Pavesi<sup>13</sup>, Marta Benavides-Nieto<sup>14,15</sup>, Luca Basso-Ricci<sup>1</sup>, Paola Capasso<sup>1</sup>, Benedetta Mazzi<sup>16</sup>, Jeremie Rosain<sup>10,11,28</sup>, Nufar Marcus<sup>17</sup>, Yu Nee Lee<sup>18</sup>, Raz Somech<sup>18</sup>, Massimo Degano<sup>19</sup>, Giuseppe Raiola<sup>20</sup>, Roberta Caorsi<sup>21</sup>, Paolo Picco<sup>21</sup>, Marcela Moncada Velez<sup>12</sup>, Joelle Khourieh<sup>10,11</sup>, Andrés Augusto Arias<sup>12,29</sup>, Aziz Bousfiha<sup>22</sup>, Thomas Issekutz<sup>23</sup>, Andrew Issekutz<sup>23</sup>, Bertrand Boisson<sup>10,11,24</sup>, Kerry Dobbs<sup>25</sup>, Anna Villa<sup>1,26</sup>, Angelo Lombardo<sup>1,3</sup>, Benedicte Neven<sup>14</sup>, Despina Moshous<sup>14,15</sup>, Jean-Laurent Casanova<sup>10,11,24,27</sup>, José Luis Franco<sup>12</sup>, Luigi D Notarangelo<sup>25</sup>, Cristina Scielzo<sup>13</sup>, Stefano Volpi<sup>21,30</sup>, Loïc Dupré<sup>5-9</sup>, Jacinta Bustamante<sup>10,11,24,28</sup>, Marco Gattorno<sup>21,31‡</sup>, and Alessandro Aiuti<sup>1,2,3‡§</sup>.

## Affiliations:

<sup>1</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, SR-TIGET. <sup>2</sup>Pediatric Immunohematology, San Raffaele Scientific Institute, Milan. <sup>3</sup>Vita-Salute San Raffaele University, Milan, Italy. <sup>4</sup>Department of Systems Medicine, Tor Vergata University, Rome, Italy. <sup>5</sup>INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France. <sup>6</sup>CNRS, UMR5282, Toulouse, France. <sup>7</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France. <sup>8</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria. <sup>9</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria. <sup>10</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, 75015 Paris, France, EU. <sup>11</sup>Paris Descartes University, Imagine

Institute, 75015 Paris, France, EU. <sup>12</sup>Group of Primary Immunodeficiencies, Department of Microbiology & Parasitology, School of Medicine, University of Antioquia UdeA, Medellin, Colombia. <sup>13</sup>Division of Experimental Oncology, Unit of B-cell Neoplasia, San Raffaele Scientific Institute, Milan. <sup>14</sup>Pediatric Hematology-Immunology Unit, Necker Hospital for Sick Children, AP-HP, 75015 Paris, France, EU. <sup>15</sup>Genome Dynamics in the Immune System, Université Paris Descartes – Sorbonne Paris. <sup>16</sup>Immunogenetics Laboratory, HLA & Chimerism, Dept. of Immunohematology & Blood Transfusion, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, Italy. <sup>17</sup>Kipper Institute for Allergy and Immunology, Schneider Children's Medical Center of Israel, Petach Tikva, Israel, affiliated with Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel. <sup>18</sup>Pediatric Department A and the Immunology Services, "Edmond and Lily Safra" Children's Hospital, Jeffrey Modell Foundation Center, Sheba Medical Center, Tel Hashomer affiliated with Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel. <sup>19</sup>Division of Immunology, Transplantation, and Infectious Diseases, Biocrystallography Unit. San Raffaele Scientific Institute, Milan. <sup>20</sup>U.O.C. di Pediatria, Azienda Ospedaliera "Pugliese-Ciaccio" di Catanzaro. <sup>21</sup>U.O. Clinica Pediatrica e Reumatologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy. <sup>22</sup>Clinical Immunology Unit, Department of Pediatrics, King Hassan II University, Ibn-Rochd Hospital, Casablanca, Morocco. <sup>23</sup>Department of Pediatrics & Department of Microbiology-Immunology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. <sup>24</sup>St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA. <sup>25</sup>Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, USA. <sup>26</sup>Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Milan

Unit, Milan, Italy. <sup>27</sup>Howard Hughes Medical Institute, NY, USA. <sup>28</sup>Center for the Study of Primary Immunodeficiencies, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris AP-HP, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France, EU. <sup>29</sup>School of Microbiology, University of Antioquia UdeA, Medellin, Colombia. <sup>30</sup>Università degli Studi di Genova, Genova, Italy. <sup>31</sup>UOSD Centro Malattie Autoinfiammatorie e Immunodeficienze, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy. <sup>32</sup>IPS universitaria, health services of University of Antioquia, Medellín – Colombia.

‡A. Aiuti, M. Gattorno: Equal contribution.

#### **Address corresponding author**

§Alessandro Aiuti, MD, PhD, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina, 60; 20123 Milano; Tel.: +39 02 26436564; fax: +39 02 26436545; e-mail: [aiuti.alessandro@hsr.it](mailto:aiuti.alessandro@hsr.it).

**Supplementary text and Supplementary Figures word count:** 4103

**Supplementary Figures count:** 9

**Supplementary Table count:** 4

**Supplementary Reference count:** 31

**Supplementary text****Clinical presentation of patients.**

**P1** (II.1, kindred A), a boy born from unrelated Italian parents, presented at 1 month of life with severe growth failure, eczema, recurring episodes of hemorrhagic enterocolitis with the isolation of *Salmonella typhi* in the stools in one occasion, lower limbs and abdomen leucocytoclastic vasculitis with concomitant elevation of inflammatory indexes. Blood tests showed lymphopenia, eosinophilia and thrombocytopenia (38.000-97.000/mmc) with reduced mean platelet volume (<7.7 fL) (Supplementary Tables 1-2). For suspected food allergy, several elimination diets were attempted in the first years of life, without success. Gastrointestinal biopsies did not show any major histological alteration. At 7 months, the patient underwent an staphylococcal upper right lobe pneumonia, with residual pneumatocele (Supplementary Figure 1A), which was surgically removed at 5 years. Concomitantly, episodes of symptomatic thrombocytopenia occurred, requiring hospitalization and IVIG administration. At 8 and 11 years of age two episodes of pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* occurred. Since 10 years of age, warts at the hands and the face recurred (Supplementary Figure 1B). Flow cytometry and molecular analysis excluded mutations in *WAS*, *WIP* and *FOXP3* genes. Since the age of 9 years, painful subcutaneous nodules in the upper limbs associated with arthromyalgia were reported and classified as panniculitis, requiring steroid and antibiotic therapy. Palpable purpura was resistant to azathioprine and managed with steroids. Mycophenolate Mofetil was temporarily administered, but soon stopped for the occurrence of hematochezia and vasculitis. Rapamycin was administered at 12 years resulting effective on the vasculitis, but stopped after 1 year due to an increased frequency and severity of respiratory infections and to a spread of the cutaneous warts. Failure to

thrive was approached with growth hormone replacement therapy at 10 years, but stopped after 2 years for inefficacy. Patient underwent TCR $\alpha$ - $\beta$ /CD19 depleted mobilized peripheral blood stem cell transplantation (HSCT) from haploidentical related donor (mother). Immunological parameters are shown in Supplementary Tables 1-2<sup>1-2</sup> and Supplementary Figure 2 summarize the clinical manifestations and the in depth immunological characterization of patients included in the study.

**P2** (II.1, kindred B), a boy from consanguineous Italian parents, presented since the age of 2 months with fever, polymorphic vasculitic rash (Supplementary Figure 1C) hepatosplenomegaly and hematochezia. Biochemical investigations showed cytopenia, thrombocytopenia (80.000-130.000/mm<sup>3</sup>) with reduced MPV (6.9-9 fL) (Supplementary Tables 1-2), hypertriglyceridemia and increased liver enzymes and supported the hypothesis of macrophage activation syndrome (MAS), but bone marrow aspirate resulted negative. High doses of steroids i.v. were efficacious in controlling the manifestations. For a prolonged CMV reactivation with high viremia, Ganciclovir was administered for 4 months, but at the drug withdrawal a second episode of MAS occurred, requiring to restart antiviral and steroidal treatment for the following 4 months. In the following year the patient presented failure to thrive (< the 3<sup>rd</sup> centile), persistent hepatosplenomegaly, recurrent pustular vasculitic skin lesions and recurrent infections (i.e. Pseudomonas-caused otitis). Persistent lymphopenia, requiring anti-PCP prophylaxis, with increased CD4/CD8 double negative population and  $\gamma/\delta$  T cell expansion was reported. Mutations in *RMRP*, *PSTPIP1* and *RAG* genes were excluded. Progressive lymphadenomegaly appeared at 2 years of age, with any sign of malignancy in the lymph node biopsy and bone marrow aspirate. Recombinant growth hormone (GH) was not effective in improving the growth parameters. From 3 years of age recurrent episodes of fever with inflammatory systemic status were

evident. At 4 years of age, an acute fever episode with elevation of inflammatory indexes, cervical lymphadenopathy and a painful and harsh mass at the right abdominal wall with macrophage muscular infiltrate at biopsy (Supplementary Figure 1D) was registered. Malignancies were excluded and the episode was responsive to steroids and, later, to rapamycin. For the recurrence of the severe autoinflammatory episodes, TCR $\alpha$ - $\beta$ /CD19 depleted mobilized peripheral blood stem cells transplant from haploidentical related donor (father) was performed at 5 years of age.

**P3** (II.1, kindred C) clinical history was reported in 2005<sup>3</sup> before the molecular diagnosis. The patient was born from consanguineous Canadian parents. He showed lifelong recurrent bacterial infection at cutaneous and mucosal sites. Along with dysregulation of oxidative burst response in neutrophils, a T cell lymphopenia and disappearance of naïve T lymphocytes was reported. Repeated infections, variable eosinophilia associate with seborrheic dermatitis, eczema and warts were observed. He died at 24 years of age due to pneumonia.

**P4** (II.4, kindred D) is a 3.5 years-old male born from first-degree consanguineous Colombian parents. Two brothers died for severe anemia, pneumonia and gastrointestinal bleeding, but no material for genetic analysis was available. At 23 days of age, he presented a gluteal abscess treated by antibiotics and surgery. At 4 months of age, the patient was hospitalized for a pulmonary abscess affecting left lung and requiring mechanical ventilation. A history of thrombocytopenia (91.000/mmc) with low MPV, chronic anemia, recurrent respiratory infections (pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa*, bronchiolitis), early-onset severe chronic eczema (Supplementary Figure 1E-F), hepatosplenomegaly, lymphadenopathies, and inflammatory colitis with gastrointestinal bleeding was reported. At 11 months, he underwent sepsis by *Staphylococcus pettenkoferi*. Blood analyses showed persistent



chronic anemia, with persistent gingival and occasional GI bleeding that required hospitalization. Lymphopenia with expansion of  $\gamma/\delta$  T cells was reported (Supplementary Tables 1-2). Proliferation to PHA was severely impaired requiring anti-infective prophylaxis. Flow cytometric WASP expression was normal. HCST is currently planned.

**P5** (II.1, kindred E) is a girl born from consanguineous parents from Morocco. Two siblings with recurrent respiratory infections, cold abscesses and diarrhea died in infancy, but no material was available for genetic testing. P5 presented history of cold abscess in lung and recurrent pneumonia with evidence of bronchiectasis, requiring hospitalizations, bloody diarrhea, oral thrush and eczema (Supplementary Figure 1G-J). Blood tests showed lymphopenia, anemia, hypereosinophilia (1.700 cells/mm<sup>3</sup>) and normal number of platelets (Supplementary Tables 1-2). Immunological screening for PID was performed. Proliferation to PHA was poorly impaired. Nitro Blue Tetrazolium Reduction Test was normal.

**P6** (II.1, kindred F) is an 11-year-old girl, born to Turkish non-consanguineous parents. Syndromic features, as fine and brittle hair and keratotic hair lesions, a peculiar face, big thumb and hallux, dysplastic teeth, delay of dental eruption, and early release of the upper gums were evident since birth. Microcephaly (-2SD) and psychomotor retardation (i.e. independent walking at 3 years), delay of language acquisition and learning difficulties were observed. At 15 days of life, she presented with *S. aureus* positive lung and joint abscesses, bloody diarrhea and bacterial meningitis. After the acute episode, severe eczema, persistent diarrhea with poor growth (not improving on enteral and parenteral nutrition) and oral, perianal and vulvar necrotizing ulcerations, evolving in lichenoid lesions, were reported. Skin biopsy showed HPV-positive epidermodysplasia verruciformis. Blood tests showed

thrombocytopenia (37.000 to maximum 112.000/mm<sup>3</sup>), aregenerative anemia, eosinophilia, and no lymphopenia (Supplementary Tables 1-2). Systemic inflammation was reported. GI endoscopy showed inflammatory infiltrates, total villous atrophy, and apoptosis in jejunum and colon, without any improvement on steroid and azathioprine. GH deficiency was ruled out. Recurrent infections included frequent *S.aureus* skin infections, submandibular adenitis, recurrent otorrhea, pansinusitis with osteolysis, bronchopulmonary infections and CMV pulmonary infection requiring Gancyclovir. Anti-infectious prophylaxis was started. A pneumatocele was detected at 5 years and required surgical excision at the age of 8 years (Supplementary Figure K-N). Specific antibody testing to vaccines showed no response to polio 1/2/3 and only weak response to diphtheria, tetanus, *Haemophilus influenzae* type B and *S. pneumoniae*. Subsequently, she presented recurrent cutaneous infections by *Actinomyces*, evolving in abscesses requiring drainage. Brain CT scan performed at 2.5 years showed aneurysm of left carotid sinus without calcification. A subsequent MRI one year later showed a dysplastic lesion of both internal carotid arteries, requiring artery embolization at the age of 9 years. At the age of 7 years lower extremities purpura and right knee arthritis appeared without histological signs of vasculitis. Persistent hepatosplenomegaly and intermittent cervical and mediastinal adenopathies were evident, but lymph-node biopsy only showed follicular hyperplasia. Genetic testing by karyotype, FISH 22q11 and CGH array were normal. Sequencing of coding regions for *RMRP*, *STK4*, *STAT3*, *STAT5B* and *IGFALS* were wild type. NGS of 270 genes implicated in known primary immunodeficiencies revealed two missense variants in *DOCK8*, which were predicted to be benign.

**Platelets dysfunctions in ARPC1B-deficient patients.** Intermittent thrombocytopenia was often observed in P1, P2, P4 and P6. Thin section transmission electron microscopy (TEM) on platelet sections of P1, P2 and healthy controls was performed to investigate a possible alteration of the morphology in patients' platelets (Supplementary Figure 3A). The platelet size resulted different in the two patients. Indeed the area was nearly normal for P1, as confirmed by flow cytometry analysis, but the perimeter was significantly smaller in P2 platelets (Supplementary Figure 3B and data not shown). Immunoblot analysis on total platelets lysate from P1 showed complete absence of ARPC1B while this protein was detectable in family members and healthy controls (Supplementary Figure 3C). Based on these data, we speculate that lack of the ARPC1B protein and inability to upregulate PAC1 may contribute to the increased bleeding observed in this patient. To investigate potential platelet dysfunctions in ARPC1B deficient patients, we studied the surface membrane expression of activation marker CD62P and PAC1 membrane integrin by flow cytometry after platelet activation with different stimuli (ADP, thrombin and collagen). CD62P, expressed on platelet surface after  $\alpha$ -granules release, resulted expressed at normal levels in both patients and controls (Supplementary Figure 4A-C). PAC1 recognizes an activation dependent epitope of the GPIIb-IIIa complex, a phenomenon dependent from the inside-out integrin signaling in the platelets. After ADP stimulation, a marked reduction of PAC1 expression was observed on P1's platelets, and a more modest decrease was also observed on P2's platelets (Supplementary Figure 4D,G). Thrombin and collagen stimulation were unable to upregulate PAC1 on cell surface in both patients (Supplementary Figure 4E-F and H-I).

**Altered TCR diversity in *ARPC1B* revertant patient.** It is unclear whether *ARPC1B* deficiency may impact TCR diversity by impacting thymic maturation. NGS of the immunoglobulin (IGH), and TCR-beta (TRB) and -gamma (TRG) transcripts expressed by circulating lymphocytes in P1 showed an overall reduction in repertoire diversity (Supplementary Figure 9A), with a significantly reduced Shannon's H index in the TRB and TRG repertoires (Supplementary Figure 9B-C). The germ line index (GI)<sup>4</sup> measures the level of sequences that are lacking junctional diversity. We observed a profound reduction in P1 at total- and unique- TRB sequence levels (Supplementary Figure 9D), indicative of higher junctional diversity level (nongermine sequences) and most likely normal thymic maturation. Differently from patients with mutations in *RAG1/2* genes where a poor TRB CDR3 diversity and an higher germline index are indicative of defective CDR3 junctional diversity<sup>4</sup>, we observed a reduction of germline index, indicative of higher junctional diversity level and most likely normal thymic maturation. The reduction of Shannon's H diversity index in P1 is likely due to a reduced number of T cells coming into the periphery.

#### **Supplementary methods.**

**Library design and targeted exome sequencing.** A Haloplex custom kit of 200bp (Agilent, Santa Clara, CA) was used to test 630 genes among those described for PID and candidate genes<sup>5,6</sup> in patient 1 (P1) and the family. Probe design was performed by Agilent SureDesign online tool. Indexed paired-end Illumina sequencing libraries were generated according to Haloplex manufacturer's protocol. Sequencing was performed with a MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) on Illumina MiSeq machine. For bioinformatics analysis FastQ reads were aligned to human reference genome (UCSC hg19, GRCh37) by bwa-mem<sup>7</sup>. Picard HsMetrics was applied to analyze the

target-capture sequencing experiments (<http://picard.sourceforge.net/>). Raw variants were called by Freebayes variant caller<sup>8</sup> and filtered for QUAL> 1, QUAL/AO> 10, SAF>0, SAR>0, RPR>1, RPL>1. Variants were annotated for dbSNP-146 database, ClinVar database, dbNSFP v2.9 database and SnpEff<sup>9</sup> and filtered for Common Allele Frequencies (CAF) < 5%, variant effects (missense, frame shift, splice acceptor/donor, start lost, stop lost, stop gained) and concordance between 4 prediction tools: Mutation Taster<sup>10</sup>, LRT<sup>11</sup>, PolyPhen-2<sup>12</sup> and SIFT<sup>13</sup>.

**Massively parallel sequencing.** For whole exome sequencing genomic DNA (3 µg) extracted from the peripheral blood cells of patients 2 to 6 (P2, P3, P4, P5, P6) was sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator (Covaris). An adapter-ligated library was prepared with the Paired-End Sample Prep kit V1 (Illumina). Exome capture was performed with the SureSelect Human V4+UTR kit (Agilent Technologies). Paired-end sequencing was performed on a HiSeq 2500, generating 100-base reads. *Sequence alignment, variant calling and annotation:* The sequences were aligned with the human genome reference sequence (hg19 build), using BWA aligner<sup>14</sup>. Downstream processing was carried out with the Genome analysis toolkit (GATK)<sup>15</sup>, SAMtools<sup>16</sup> and Picard Tools (<http://picard.sourceforge.net>). Substitution calls were made with a GATK UnifiedGenotyper, whereas indel calls were made with a GATK IndelGenotyperV2. All calls with a read coverage ≤2x and a Phred-scaled SNP quality of ≤20 were filtered out. All variants were annotated with the GATK Genomic Annotator.

*Revertant high-throughput sequencing:* gDNA from whole blood from P1 and P6 was amplified with primers specific for the segment around the localization of the mutation *ARPC1B* c.64+1 reported for P1 and P6 (F: 5' TACCACAGCTTCCTGGTGGGA 3', R: 5' CCCATCCCAGGAGGTGGAA 3'),

including an anchor sequence (MR1-APRCIB\_F acactcttccctacacgacgctctccgatctTACCACAGCTTCCTGGTGGGA and MR2-APRCIB\_R gtgactggagttcagacgtgtgctctccgatctCCCATCCCAGGAGGTGGAA) for subsequent NGS sequencing on the PGM (IonTorrent, Life Technologies, South San Francisco, Calif), as previously described<sup>17</sup>. PCR bands were gel purified and re-amplified with PGM sequencing primers targeting the anchor sequences (P5-MR1\_F 5' ATGATACGGCGACACCGAGATCTacactcttccctacacgacgctctcc 3' and P7-BCx-MR2\_R 5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATxxxxxxxgtgactggagttcagacgtg 3'), where xxx represents the barcode (BCx) sequence. Sequencing on the PGM was performed according to the manufacturer's recommendations. Fastq files were analyzed and revertant frequencies were quantified by measuring the number of reads containing the reported mutations (*ARPC1B* c.64+1G>C for patient 1 and c.64+1G>A for patient 6) and WT reads (+SD).

**Sequencing of *ARPC1B* mutations.** DNA (50 ng) from whole blood was amplified for *ARPC1B* genomic exon 2 region by PCR reactions (94°C for 3 minutes, followed by 35 three-step amplification cycles consisting of 30 seconds denaturation at 94°C, 30 seconds annealing at 59.2°C and 60 seconds extension at 72°C) with ex.gDNA.2F (AACTGCTGCCCTCTAAACT), ex.gDNA.2R (CTGGCCCATTCCTCCTTAA), ex.gDNA.9-10F: CGCCAGCACAGGTTGAAT, ex.gDNA.9-10R: GCAGCTAGGATGAAGGCAAC, ex.gDNA.4F: 5'GGCAGATACAGCTTCCACCTG'3, ex.gDNA.4R: 5'GTCCTGACATCCCATTTGGTG'3 primers and GoTaq Polymerase (Promega or Invitrogen). cDNA analysis on *ARPC1B* coding exon 1-4 was performed by PCR reactions (94°C for 3 minutes, followed by 40 amplification cycles - 94°C for 30

seconds, annealing at 62°C for 30 seconds, second extension at 72°C for 1 minutes) with ex.cDNA.1F (GTCGACTGCCAGAGTCC), ex.cDNA.4R (ACCCACCAGTCATTCTCCTG) primers and GoTaq Polimerase (Promega). Direct sequencing was performed on purified PCR products by QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Both strands were sequenced with the ABI 3730xl DNA Analyzer system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and analyzed on 4Peaks Electropherogram analyzer tool (Mekentosj, Amsterdam).

**Next generation sequencing of T-cell receptor b and g (TRB, TRG) repertoire and Immune repertoire analysis.** DNA from whole blood of P1 and age-matched HC (150ng per reaction) was analyzed for NGS on T cell receptor beta (TRB), gamma (TRG) and Immunoglobulin H chain (IGH) repertoire according to previously described methods<sup>18,19</sup>. For the TRB repertoire, Adaptive Immunoseq survey level of service sequencing was used (Adaptive biotechnologies, USA). For the TRG and IGH repertoires, primers for conserved regions of *V* and *J* genes were used to generate TRG and IGH libraries according to manufacturer's protocol (LymphoTrack, Invivoscribe Technologies, France and USA) and sequenced using Mi-Seq Illumina technology (Illumina Inc, USA). Briefly, raw sequences were filtered for PCR errors, a hierarchical tree map was generated from the total complementary determining region (CDR)–3 sequences to analyze relative distribution of distinct rearrangements in IGH, TRB and TRG (Macrofocus GmbH, Switzerland). The top 100 frequencies of most abundant CDR3 and the Shannon's H diversity index for entropy were analyzed for TRB, TRG and IGH.

**Modeling of ARPC1B insertion mutant.** The structure of the ARPC1B protein was taken from the crystal structure of the bovine seven-protein ARP2/3 complex (chain C from PDB, code 1K8K)<sup>20</sup>. P1 insertion mutant was modeled with I-TASSER<sup>21</sup>, after

alignment of the mutated amino acid sequence with the wild type protein with TCoffee<sup>22</sup>. The model obtained was refined by FG-MD<sup>23</sup> and visualized with PyMOL (<http://www.pymol.org>).

***In silico* analysis of the V208F mutant.** The effect of the missense p.Val208Phe substitution of P2 on the stability of ARPC1B was assessed by FoldX program<sup>24</sup>. The isolated ARPC1B structure was subjected to an energy minimization to remove any steric clashes that involved side chain atoms. Val208 residue was mutated to Phe and the associated  $\Delta\Delta G$  was computed. The procedure was repeated for 65 times to ensure that the model of the mutated protein was not caught in a local minimum. The evaluation of the energetic gain/loss due to amino acid substitution determined a  $\Delta\Delta G=10.5\pm 0.8$  kcal mol<sup>-1</sup> corresponding to a major disruption of the protein structure, because of major steric clashes with residues Ala158, Cys166 and Val217.

**Immune phenotype of ARPC1B deficient patients.** Peripheral blood lymphocytes were stained for CD45, CD19, CD3, CD56, CD4, CD8, CD45RA, CD31, CCR7 and CD27 (BD Bioscience) according to manufacturer's instructions.

**Flow cytometry for ARPC1B.** Total PBMCs (300.000 per tube) were stained for CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD56 lymphocytes surface markers (all from BD Bioscience) and intracellular staining for ARPC1B was performed after fixation and permeabilization (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences) according to described method<sup>25</sup>. Polyclonal rabbit anti human-ARPC1B antibody (Abcam, ab99314) was used at 1:50. After 30 min of incubation at room temperature cells were washed 3 times, stained with goat-anti-Rabbit Alexa 488 in permeabilization buffer and incubated for 30 min at 4°C. An additional incubation in PBS-FACS for 30 min at 4°C was done to avoid any aspecific staining. Surface staining was performed for 20 min at 4°C. The TCR V $\beta$  repertoire was analyzed by FACS accordingly to



manufacturer's instructions (IOtest Beta Mark kit; Immunotech, France). For the intracellular detection of ARPC1B with the Vbeta repertoire in the CD4 or CD8 gate, a donkey-anti-Rabbit Alexa 647 was used as secondary antibody. 30.000 events were acquired in the lymphogate using a BD FACS CantoII and analyzed with FlowJo software version 9.3.2 (TreeStar Inc, Ashland, Ore). The percentage of ARPC1B+ cells was calculated by positioning the gate on up to 90% of positivity in the healthy control.

T memory cell subsets were determined according to Biasco *et al*<sup>26</sup> in combination with the intracellular staining for ARPC1B. Cell sorting was performed on PHA T-cell blasts of P1 after 2 weeks of stimulation. Bulk population ( $6 \times 10^6$ ) was stained for intracellular ARPC1B and CD4 and CD8 surface markers. Subpopulations were sorted according to ARPC1B expression.

**Vector production.** VSV-G pseudotyped third generation bidirectional lentiviral vector encoding for ARPC1B (hPGK.ARPC1B.WPRE.minhCMV.mCherry) or mock transduction vector (hPGK.GFP.WPRE.minhCMV.mCherry) were produced by transient cotransfection of four plasmids in HEK293T cells and concentrated by ultracentrifugation as previously described<sup>27,28</sup>. Vector titers were of  $3.7 \times 10^9$  TU/ml for the first and of  $1.6 \times 10^9$  TU/ml for the second vector. Infectivity (ratio between titer and particle content) was of  $3.8 \times 10^4$  transfer units/ng of p24 and of  $1.4 \times 10^4$  transfer units/ng of p24 respectively.

**In vitro migration assays.** Total PBMCs were seeded on a transwell chamber in presence of scalar dilutions of SDF1- $\alpha$  (Peprotech) and migration capacity was assessed after 3 hours<sup>29</sup>. PHA T-cell blasts used for the detection of ARPC1B before and after migration were plated at the concentration of  $1 \times 10^6$  T cells/condition. T cell blasts were stained for ARPC1B expression before migration as a quantification of

input of ARPC1B<sup>+</sup> cells. After migration, migrated cells were harvested, counted and stained for ARPC1B and CD8 as reported. 30.000 events were acquired in the lymphogate and analyzed by FlowJo software. Absolute numbers of ARPC1B<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and ARPC1B<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> were calculated with the following formula:  $[(\%ARPC1B+CD8+ \text{ or } \%ARPC1B-CD8+/100) \times (n^{\circ} \text{ migrated CD8+ cells})]$ .

**T cell proliferation and transduction.** Total PBMCs ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with CellTrace violet dye at 5 $\mu$ M (CellTrace™, Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Stained cells were stimulated with 0.1-1 $\mu$ g/ml of plate-bound anti-CD3 (Miltenyi Biotec) and 1 $\mu$ g/ml of anti-CD28 (BD-Pharmingen) for 3 days. The percentage of proliferation was calculated within the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> gate.

PHA T-cell blasts were seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/ml and prestimulated for 18 hours with 1 $\mu$ g/ml of plate-bound anti-CD3 (Miltenyi Biotec) and 10 $\mu$ g/ml of anti-CD28 (BD-Pharmingen). Cells were transduced with a bidirectional lentiviral vector encoding for *ARPC1B* (hPGK.ARPC1B.WPRE.minhCMV.mCherry indicated as PGK.ARPC1B\_mCherry) or with mock transduction vector (hPGK.GFP.WPRE.minhCMV.mCherry indicated as PGK.GFP\_mCherry) at 50 multiplicity of infection (MOI:50) for 1-hit of transduction. Bulk cell lines were analyzed for mCherry and ARPC1B expression, FACS sorted according to mCherry, tested for proliferation after anti-CD3 stimulation and for ARPC1B expression by flow cytometry. Proliferation was evaluated by <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Biosciences) incorporation.

**Confocal microscopy.** Analysis of ARPC1B expression and localization was performed on freshly isolated PBMCs as described<sup>29</sup>. Samples were incubated on poly-L-Ornithine-coated glass-bottom dishes (1.5 H 13mm, Marienfield-Superior), fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% Triton-X100 (Sigma)

followed by staining for ARPC1B (1:50), Phalloidin Texas-Red (1:40) and DAPI (1:2000). Four fields per sample were acquired with a Leica TCS SP8 confocal microscope (x63-1.4 oil immersion objective).

**Immunological synapse assembly.** For immunological synapse formation expanded PHA T-cell lines were seeded for 10 min on slides with preformed reaction wells (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), coated with 2 $\mu$ g/ml recombinant ICAM-1/Fc chimera (R&D Systems) and 10 $\mu$ g/ml anti-CD3 Ab (OKT3, eBioscience). Where indicated, T cells were treated with a pan-formin inhibitor (SMIFH2, 50 $\mu$ M, Sigma Aldrich) and plated on the ICAM1/OKT3 coated slides. Alternatively, expanded T cells were conjugated with P815 cells coated or not with anti-CD3 at 2:1 ratio for 10 min and deposited on poly-L-lysine coated slides. Cells were stained with phalloidin-AF488 (Life Technology), ARPC1B and  $\alpha$ -tubulin mouse monoclonal Ab (Sigma, T9026) in permeabilization buffer. ARPC1B and  $\alpha$ -tubulin were revealed by AF555- and AF647-coupled secondary Ab (Life Technology). Slides were examined with a LSM 710 confocal microscope (x63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective, Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Images of randomly selected cells were acquired and analyzed by ImageJ software.

**Conjugate formation.** Expanded PHA T-cell blasts were stained with CellTrace™ Violet (ThermoFischer Scientific) for 20'. P815 cells were coated with anti-CD3 Ab (OKT3, 10 $\mu$ g/ml) for 1 hour at 37°C and stained with CellTracker™ Green CMFDA Dye (2 $\mu$ M, ThermoFischer Scientific) for 30'. T cells were conjugated with either uncoated or OKT3-coated P815 cells at a 1:1 ratio at indicated time points. Conjugates were fixed with 1% PFA for 30' at 37°C prior to analysis on MACSQuant10 or MACSQuantVyb (Miltenyi Biotec) flow cytometers. The

percentage of conjugates was analyzed by FlowJo software and defined as the proportion of CMFDA<sup>+</sup>CTV<sup>+</sup> events within the CTV<sup>+</sup> gate.

#### **Immunoblot for ARPC1B**

For qualitative analysis of ARPC1B protein, platelets lysates as well as internal positive control (Hela cell line) were obtained by lysis in a *in-house* Laemly Buffer preparation with phosphatase (PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail tables, Roche) and proteases inhibitors (Protease inhibitor cocktail tables; Roche). Lysates were separated on 12% Mini-Protean TGX Gels (BioRad) with TRIS buffer and transferred into Trans-Blot Turbo Transfer membranes (BioRad). Membranes were blocked for 4 hours with Blocking Buffer (TBS 0.05 % Tween 20 and 5% low fat milk) and incubated with polyclonal rabbit anti-human ARPC1B antibody (Abcam, ab99314, 1:500) overnight at 4°C, while the detection of the housekeeping protein (mouse anti-human tubulin, 1:3000 from Sigma) was performed after incubation for 1 hour at room temperature. After extensive washing of the membranes, these were incubated with horseradish peroxidase-linked secondary antibody (goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins/HRP, 1:3000, Dako Denmark A/S) for 1 hour at room temperature. Detection was performed using Peroxidase substrates (GE healthcare life sciences).

**Transmission electron microscopy (TEM) analysis.** PRP pellets were fixed in 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon. Sample sections were stained and examined at LEO 912AB transmission electron microscope. TEM images were analysed with ImageJ software for area and perimeter.

**Platelet functionality test.** Peripheral blood from patients and healthy donors was collected in citrated blood collection tubes (Sodium Citrate Tube, 105M/3.2% - BD Vacutainer - 1.8 ml) and Platelet Rich Plasma (PRP) was obtained after centrifugation

at 700 rpm for 10 min. PRP was measured and counted at the haemocytometer Sysmex KX-21N (Dasit). 200.000 Platelets/sample was stained for CD61 (VI-PL2, Biolegend, San Diego, CA), CD62P (Psel.KO2.3, Invitrogen, MA) and PAC1 (PAC-1, BD Pharmingen, San Diego, CA) for 10 min at room temperature in FACS buffer (Phosphate-buffer saline, PBS, 0.3% Bovin Serum albumin, BSA, 0.1%NaN<sub>3</sub>). Five microliters of stimuli (ADP and Thrombin purchased from Sigma, Collagen kindly given from M. Brunelli) were added and incubated for 15 minutes (ADP and Collagen) and 2 minutes (Thrombin). PLTs were fixed and acquired in a BD FACS CantoII and analyzed with FlowJo software 9.3.2 (TreeStar Inc, Ashland, Ore). The percentage of platelets CD62P<sup>+</sup> or PAC1<sup>+</sup> and the MFI of PAC1/CD61 were calculated according to <sup>30</sup> in order to normalize the activation markers expression for the PLT volume, assigning to the HC unstimulated sample a theoretical value of 100.

**Statistical analysis.** Data are expressed as Mean ± SE/SD. Mann-Whitney test was applied to test difference between the means of two or more independent groups. Data were analyzed with Graph-Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, la Jolla) with a *p*-value < 0.05 as significant.

**Supplementary references**

1. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The pediatric AIDS clinical trials group P1009 study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;112(5):973–980.
2. Comans-Bitter WM, De Groot R, Van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood: Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.* 1997;130(3):388–393.
3. Yan SR, Bortolussi R, Issekutz TB, Issekutz AC. Increased chemoattractant induced neutrophil oxidative burst, accelerated apoptosis, and dysregulated tyrosine phosphorylation associated with lifelong bacterial infections. *Clin. Immunol.* 2005;117(1):36–47.
4. Yu X, Almeida JR, Darko S, et al. Human syndromes of immunodeficiency and dysregulation are characterized by distinct defects in T-cell receptor repertoire development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;133(4):1109–1115.e14.
5. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018;96–128.
6. Itan Y, Casanova J-L. Novel Primary Immunodeficiency Candidate Genes Predicted by the Human Gene Connectome. *Front. Immunol.* 2015;6(April):1–8.
7. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv Prepr. arXiv.* 2013;00(00):3.
8. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv Prepr. arXiv1207.3907.* 2012;9.

9. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80–92.
10. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Bioinformatics*. 2002;4(4):e67.
11. Chun S, Fay JC. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Identif. deleterious Mutat. within three Hum. genomes*. 2009;19(9):1553–1561.
12. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet*. 2013;Chapter 7(SUPPL.76):Unit7.20.
13. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc*. 2009;4(7):1073–1081.
14. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589–595.
15. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–1303.
16. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–2079.
17. Berland A, Rosain J, Kaltenbach S, et al. PROMIDIS $\alpha$ : A T-cell receptor  $\alpha$  signature associated with immunodeficiencies caused by V(D)J recombination defects. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2018;

18. Lee YN, Frugoni F, Dobbs K, et al. Characterization of T and B cell repertoire diversity in patients with RAG deficiency. *Sci. Immunol.* 2016;1(6):1–13.
19. Brauer PM, Pessach IM, Clarke E, et al. Modeling altered T-cell development with induced pluripotent stem cells from patients with RAG1 -dependent immune deficiencies. *Blood.* 2016;128(6):783–794.
20. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, et al. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 2001;294(5547):1679–84.
21. Yang J, Yan R, Roy A, et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth.* 2015;12(1):7–8.
22. Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa J, Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 2000;302(1):205–217.
23. Zhang J, Liang Y, Zhang Y. Atomic-level protein structure refinement using fragment-guided molecular dynamics conformation sampling. *Structure.* 2011;19(12):1784–1795.
24. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, et al. The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005;1(33):W382-8.
25. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science (80- ).* 2013;341(6148):1233151.
26. Biasco L, Scala S, Basso Ricci L, et al. In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(273):273ra13-273ra13.
27. Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Vigna E, Naldini L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters.



*Nat Biotechnol.* 2005;23(1):108–16.

28. Amendola M, Passerini L, Pucci F, et al. Regulated and multiple miRNA and siRNA delivery into primary cells by a lentiviral platform. *Mol. Ther.* 2009;17(6):1039–1052.
29. Scielzo C, Bertilaccio MTS, Simonetti G, et al. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood.* 2013;116(18):3537–3546.
30. Gerrits AJ, Leven E a, Iii ALF, et al. Effects of eltrombopag on platelet count and platelet activation in Wiskott-Aldrich syndrome / X-linked thrombocytopenia. *Platelets and Thrombopoiesis.* 2015;126(11):1367–1379.
31. Somech R, Lev A, Lee YN, et al. Disruption of Thrombocyte and T Lymphocyte Development by a Mutation in *ARPC1B*. *J. Immunol.* 2017;199(12):4036–4045.

**Supplementary Figures**

**Supplementary Figure 1. Clinical symptoms observed in ARPC1B deficient patients.** A) Pneumatocele secondary to Staphylococcal pneumonia in the upper right lobe presented at the age of 10 months in P1. B) Warts on hand in P1. C) Polymorphic vasculitic rash presented by P2 at 2 months of age. D) CT scan showing large inflammatory pseudotumor at right hemi-abdomen presented by P2 at 4 years of age. E-F) Eczema in P4. G) Cold abscess in legs of P5. H) Cutaneous scarring secondary to the infections in P5. I-J) Multiple cutaneous lesions in abdomen, type of achromic papules in P5. K-N) Chest CT scan of P6 at 7 years of age showing a massive pneumatocele, presumably consequent to Staphylococcal infection(s) at the upper right lung side.

**Supplementary Figure 2. Immunological characterization of ARPC1B deficient patients.** Peripheral blood lymphocytes were stained for CD45, CD19, CD3, CD56, CD4, CD8, CD45RA, CD31, CCR7 and CD27. Percentage of each subpopulation and gate are indicated.

**Supplementary Figure 3. Transmission electron microscopy of platelets.** A) Representative electron micrographs of fixed platelets in HC, P1 and P2. B) Area and perimeter in HC (30 sections), P1 (18 sections) and P2 (43 sections). Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ . Red bar: median value. C) Immunoblot analysis of ARPC1B in PLT lysates from P1, the family, an HC and HeLa cell line with respect to the housekeeping protein Tubulin.

**Supplementary Figure 4. Platelets are defective in ARPC1B patients after stimulation.** A-C) Percentage of CD62P on platelets of HC (square), P1 (circle) and P2 (triangle) after stimulation with different concentrations of ADP, Thrombin and Collagen. D-F) Percentage of PAC1 on platelets in the two patients and the control.

G-I) Ratio of PAC1/CD61 MFI normalized to HC unstimulated sample, which has an assigned value of 100. Mean $\pm$ SEM.

**Supplementary Figure 5. Characterization of c.64+1G>C splice donor variant in cDNA from total PBMC of the revertant patient.** Electropherograms show cDNA sequencing at the mutation c.64+1G>C in P1 and his family as compared to healthy control. cDNA sequencing at the mutation c.64+1G>A in P6 was performed on B-EBV cell line.

**Supplementary Figure 6. Formin inhibition in ARPC1B-deficient T lymphocytes.**

A) Confocal images of T cells from a normal donor and patients 1, 2 and 7 treated with the formin inhibitor SMIFH2. Cells were incubated on ICAM1/anti-CD3 Ab coated slides and stained for F-actin, ARPC1B,  $\alpha$ -tubulin and DAPI. B) Quantification of the area of individual cells interacting with ICAM1/anti-CD3 Ab.

**Supplementary Figure 7. Restoration of ARPC1B expression in transduced T cell lines.** A) Representative dot plots of untransduced (UT) and transduced PHA-T cell blasts in P2 and a HC. The percentage of ARPC1B+ mCherry+ cells is indicated. MOI: multiplicity of infection. B) Percentage of ARPC1B+mCherry+ in sorted cells T cells. C) Percentage of mCherry+GFP+ in mock transduced T cells.

**Supplementary Figure 8. V $\beta$  repertoire of T cell subsets in P1.** Analysis of TCR V $\beta$  chains in CD3+ (A), CD4+ (B) and CD8+ (C) T cells of P1 (white bars) and P6 (grey bars) as compared to range of V $\beta$  expression in HC (black bars, n=84). Mean $\pm$ SD. Arrows indicate relative expansion of V $\beta$  chains.

**Supplementary Figure 9. Immune repertoire determined by NGS in P1.** A) Tree map representing the diversity and clonality of IGH, TRB and TRG in P1 and age-matched HC. Each dot represents the relative frequency of the rearrangement in the population. B) Shannon's H diversity index for the quantification of immune

repertoire diversity. C) Frequency of the Top 100 most abundant clones in B and T cell subpopulations. \*depicts control samples previously published<sup>18,31</sup>. D) Average germline (GI) index in TRB total- and unique- sequences in P1 as compared to controls and ratio between the average frequency for germline clones and the average frequency of non-germline clones.

**Supplementary Table 1. Characteristics of patients**

Patient	Nationality	Age at diagnosis	Gender	Disease Onset	Current status
P1	Italy	15y	M	1 month	Alive after HSCT
P2	Italy	5y	M	2 months	Alive after HSCT
P3*	Canada	24y (after death)	M	2 months	Died
P4	Colombia	3.5y	M	23 days	Alive
P5	Morocco	3y	F	3 years	Alive
P6	Turkey	11y	F	15 days	Alive
P7**	Israel	0.1y	M	1 month	Died after HSCT

**Supplementary Table 2. Immunological features<sup>§</sup>**

Patient	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD3- CD56+	CD4+ CD45RA+	CD4+ CD45RO+	CD8+ CD45RA+	CD8+ CD45RO+	Ig
P1	795 (N:1000- 2200)	308 (N:530- 1300)	237 (N:330- 1300)	286 (N:110- 570)	45 (N:70- 480)	99.5 (N:230- 770)	345 (N:240- 700)	235 (N:240- 710)	136 (N:60-310)	↑ IgE, IgA ↓ IgM
P2	1160 (N:1400- 3700)	446 (N:700- 2200)	304 (N:490- 1300)	1073 (N:390- 1400)	348 (N:130- 720)	215 (N:420- 1500)	174 (N:220- 660)	225 (N:260- 850)	22 (N:90-440)	↑ IgE
P3*	300 (N:1400- 3700)	200 (N:700- 2200)	100 (N:490- 1300)	800 (N:390- 1400)	NA	16 (N:420- 1500)	172 (N:220- 660)	NA	NA	↑ IgE, IgA
P4	1042 (N:1400- 3700)	470 (N:700- 2200)	380 (N:490- 1300)	1440 (N:390- 1400)	943 (N:130- 720)	38 (N:420- 1500)	889 (N:220- 660)	55 (N:260- 850)	1027 (N:90-440)	↑ IgE
P5	968 (N:1400- 3700)	760 (N:700- 2200)	220 (N:490- 1300)	2332 (N:390- 1400)	NA	20.52 (N:420- 1500)	732.6 (N:220- 660)	38.7 (N:260- 850)	132.7 (N:90-440)	↑ IgE
P6	1518 (N:1200- 1600)	667 (N:650- 1500)	690 (N:370- 1100)	667 (N:270- 860)	69 (N:100- 480)	26.7 (N:320- 1000)	489 (N:240- 700)	7 (N:240- 710)	285.6 (N:60-310)	↑ IgE, IgA ↓ IgM
P7**	2600 (N:2500- 5500)	1700 (N:1600- 4000)	500 (N:560- 1700)	3020 (N:300- 2000)	360 (N:170- 1100)	NA	NA	NA	NA	↑ IgE

NA: not available. N: normal.

\* reported in Yan *et al.*, *Clin. Immunol.* 2005;117(1):36–47.\*\* P7 included in this study is reported as P2 in Somech *et al.*, *J. Immunol.* 2017;199(12):4036-4045."§ normal values according to Shearer *et al.*, *Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 2009; Comans-Bitter *et al.*, *Journal of Pediatrics* 1997.

**Supplementary Table 3. Clinical manifestations of the disease.**

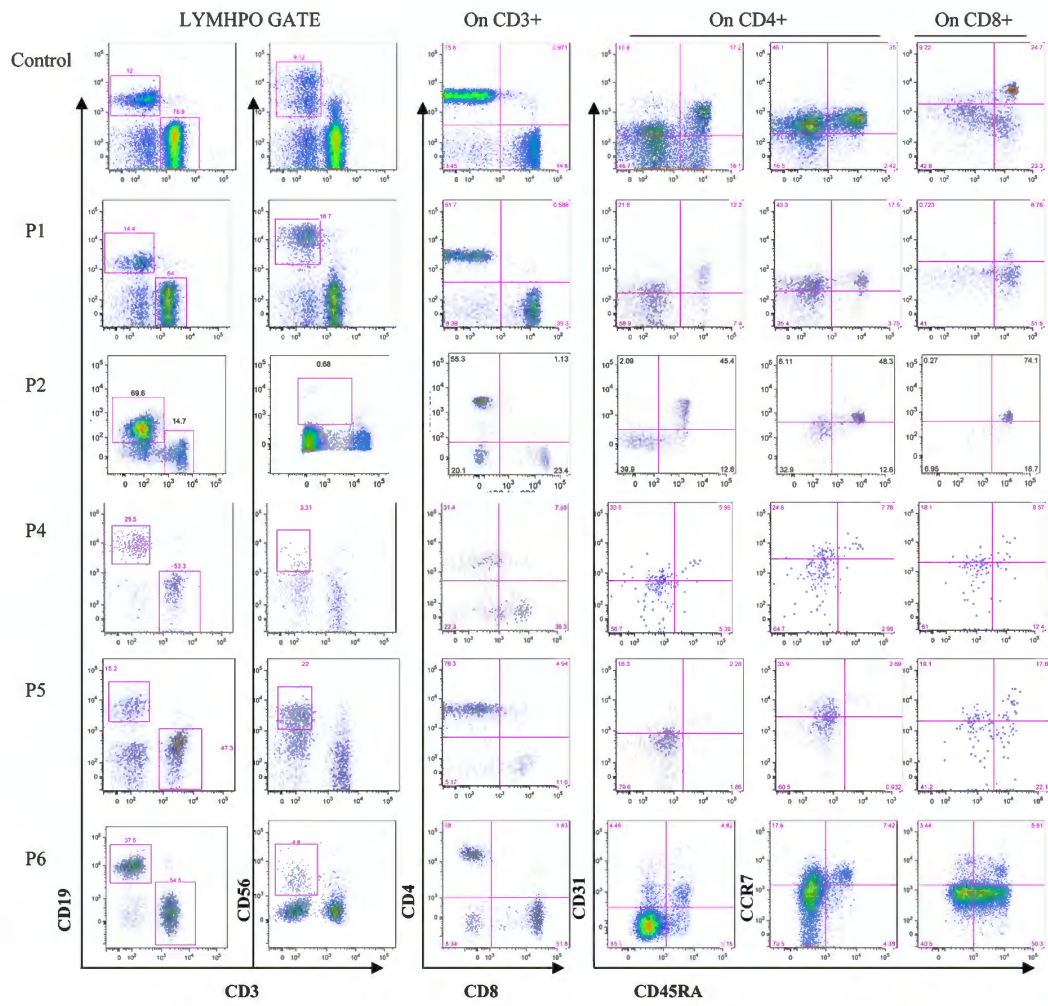
	Kuijpers et al						Kahr et al			Somech et al		
	P1	P2	P3*	P4	P5	P6	P1	P1	P2	P3	P1	P7**
Growth failure	YES	YES	YES	YES		YES	YES					
Thrombocytopenia (from neonatal age)	YES	YES		YES		YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES
Hypereosinophilia	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES
Recurrent infections (bacterial, viral)	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES			YES	YES
Allergy	YES						YES					
Eczema	YES	YES	YES	YES	YES	YES				YES	YES	YES
Leucocytoclastic vasculitis	YES	YES					YES	YES	YES			
Macrophage activating syndrome		YES										
Hepatosplenomegaly		YES	YES	YES (mild)		YES						
Hemorrhagic enteritis	YES			YES	YES	YES					COLITIS	
Lymphadenopathy		YES	YES	YES		YES						
GI bleeding				YES	YES	YES	YES					YES

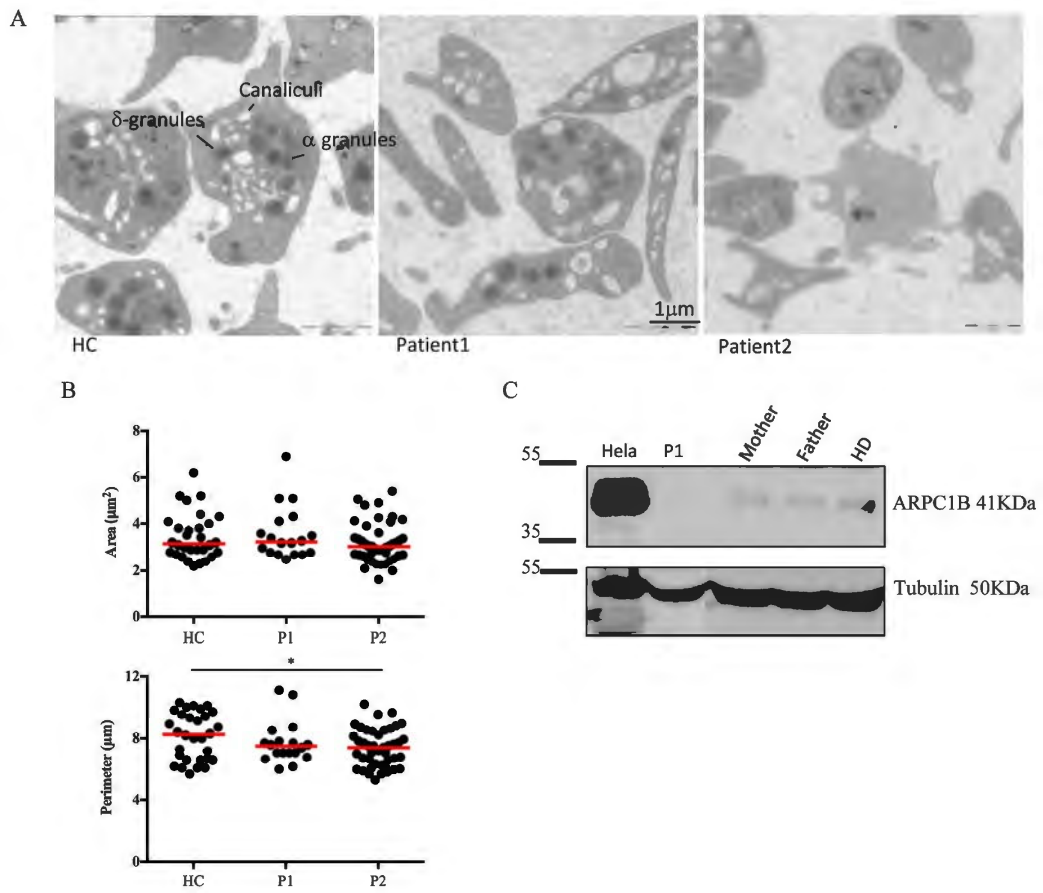
\* reported in Yan et al., Clin. Immunol. 2005;117(1):36–47.

\*\* P7 included in this study is reported as P2 in Somech et al., J. Immunol. 2017;199(12):4036-4045.



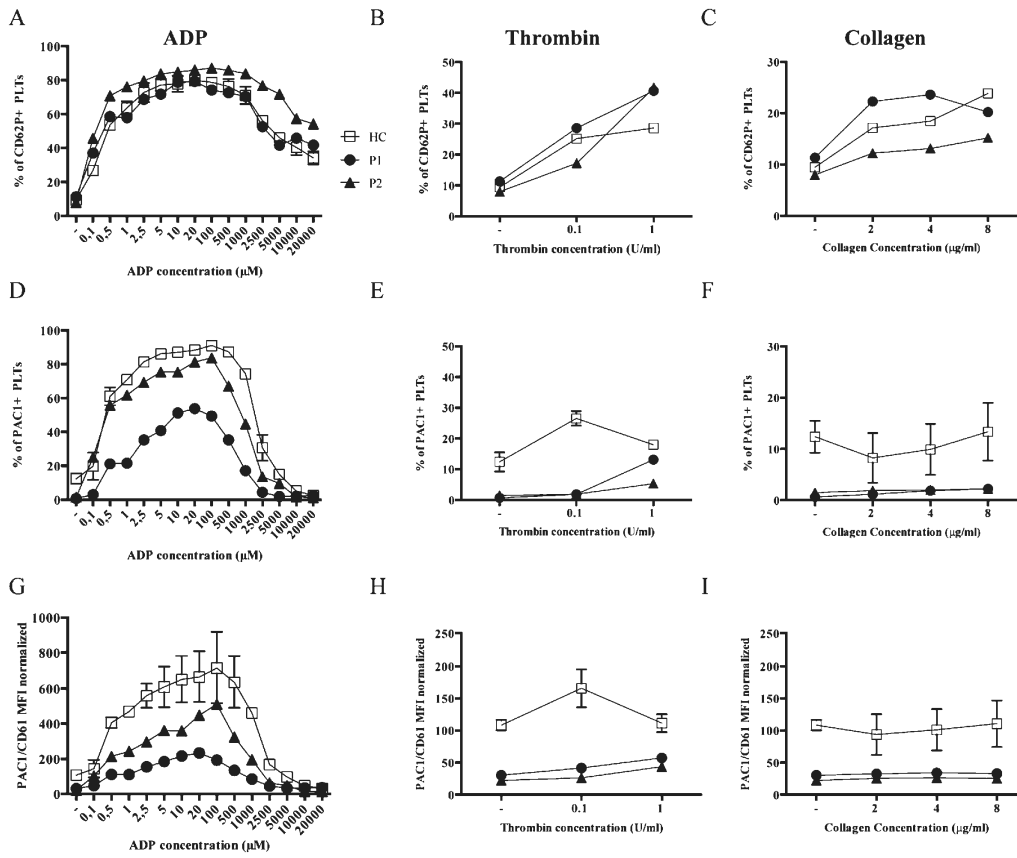


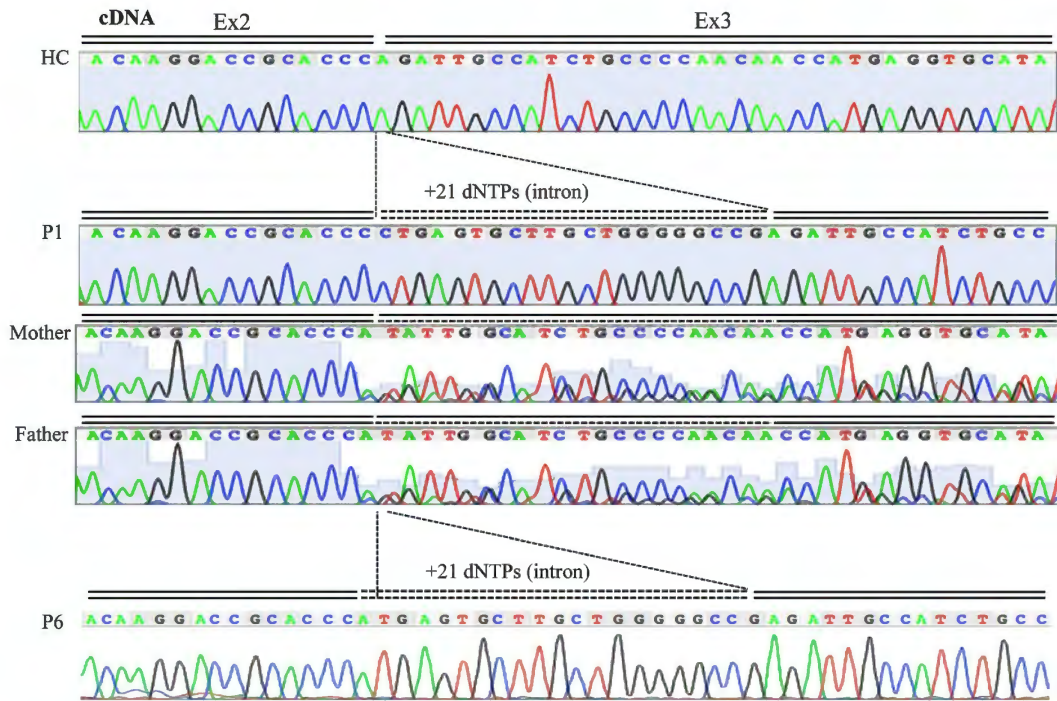


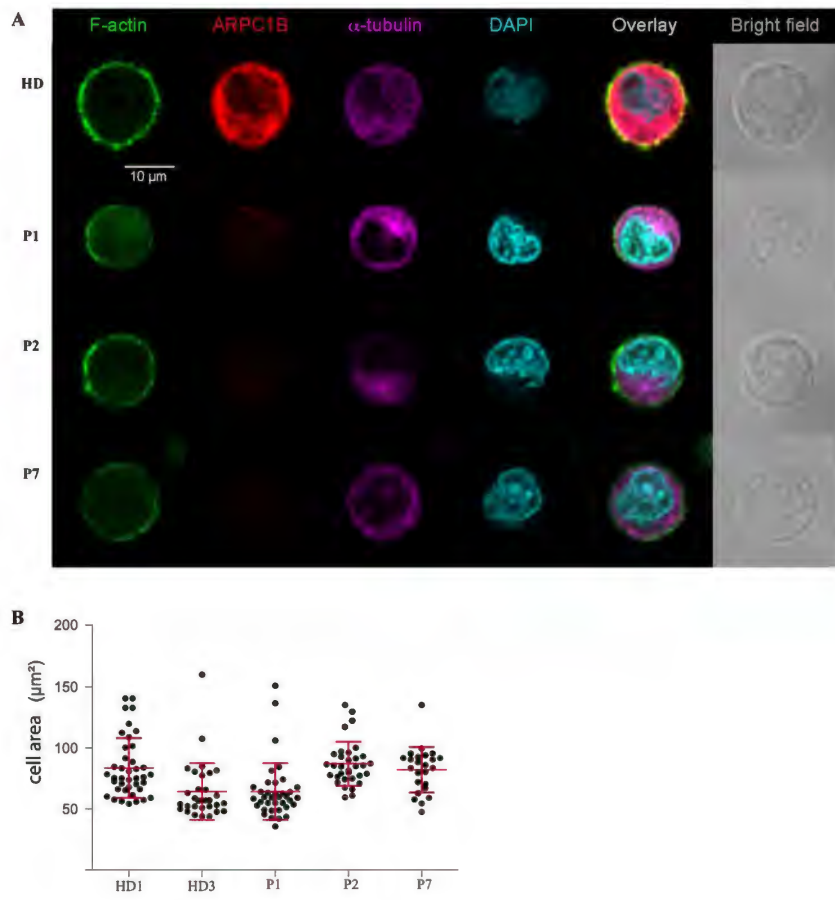


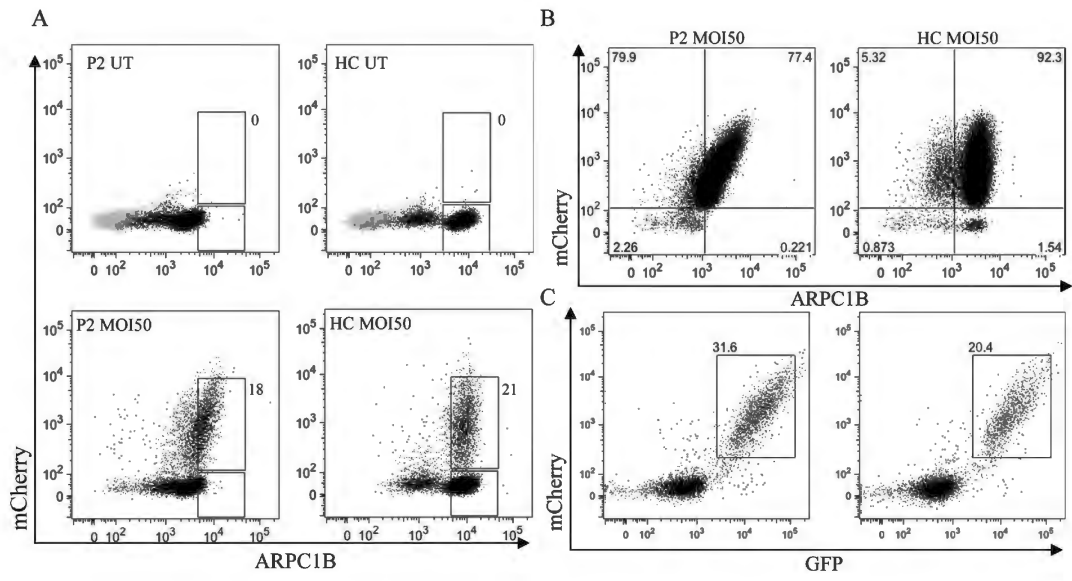
Supplementary Figure 4

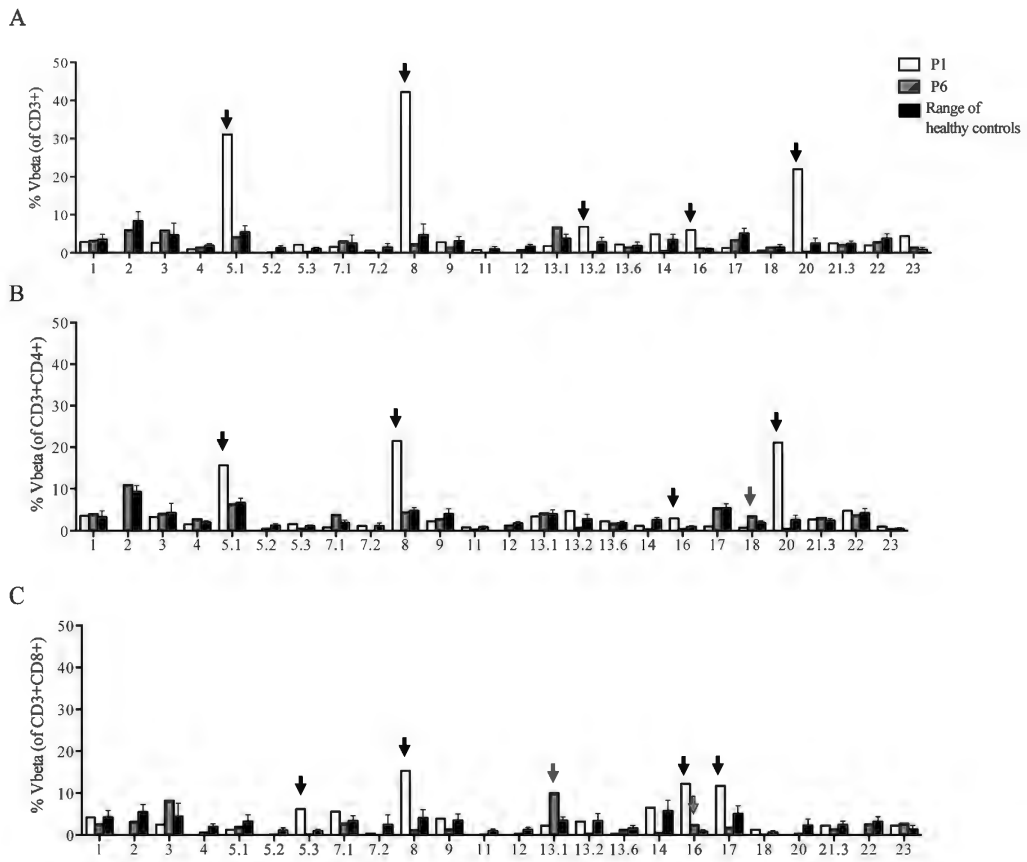
Brigida et al.

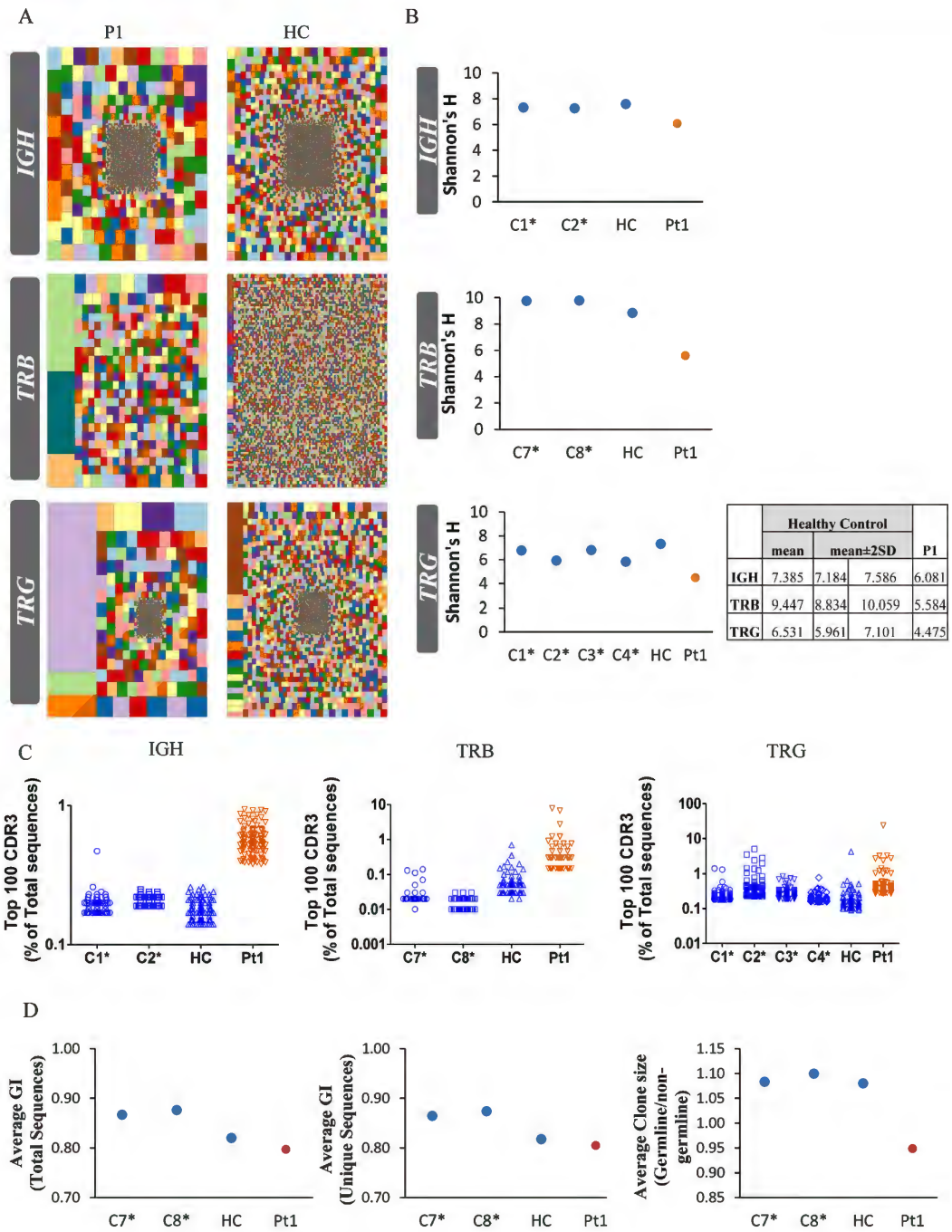














**Papier #3: « Mutations affecting the actin regulator WD repeat-containing protein 1 lead to aberrant lymphoid immunity » - 1<sup>er</sup> auteur**

Article original, publié dans « Journal of Allergy and Clinical Immunology », 2018

Résumé

La protéine WDR1 permet le recyclage des filaments d'actine à l'aide de la protéine cofiline. Des mutations dans le gène de WDR1 sont associées à une immunodéficiences ainsi qu'un syndrome auto inflammatoire notamment dus à une morphologie aberrante et des défauts fonctionnels des cellules myéloïdes. En tenant compte de l'expression ubiquitaire de la protéine WDR1, nous avons alors étudié dans quelles proportions le système immunitaire adaptatif était touché par ces mutations.

Pour élucider le rôle de WDR1 dans le développement et les fonctions des lymphocytes T et B, nous avons étudié 6 patients porteurs de mutations WDR1 bi-allélique. Grâce à la méthode de séquençage de l'exome, nous avons identifiés de nouvelles mutations faux-sens homozygotes ainsi qu'hétérozygote composé, dans 6 patients provenant de 3 groupes familiaux distincts. La déficience en WDR1 est associée avec une aberration de l'activation des lymphocytes T et un défaut de développement des lymphocytes B. Parmi les lymphocytes T, uniquement le sous-groupe des lymphocytes T « follicular helper » (T<sub>FH</sub>) est réduit chez les patients. Cependant, les lymphocytes T provenant du sang périphérique forment des structures atypiques d'actine dans le cadre de la formation de la synapse immunologique, et montrent une diminution du flux calcique induit après l'engagement du TCR. La déficience en WDR1 est associée à des défauts beaucoup plus importants dans le compartiment B des patients. Cela inclut une lymphopénie sévère, une diminution voire absence des précurseurs lymphoïdes B dans la moelle osseuse, un défaut de la recombinaison de classe des lymphocytes B mémoires, et un étalement anormalement élevé après stimulation du BCR/TLR.

En conclusion, nous avons identifié de nouveau rôle de WDR1 dans l'immunité adaptative, en surlignant le rôle central de WDR1 comme régulateur du turnover de l'actine durant la formation des synapses immunologiques des lymphocytes T et B.

### Contribution à l'article

J'ai pris part à l'élaboration du projet, son exécution expérimentale ainsi qu'au travail de réflexion et d'écriture de l'article. J'ai en outre coordonné et centralisé l'ensemble des données des différents collaborateurs cliniques et scientifiques.

Concernant le travail expérimental, J'ai pris soin de générer et de cultiver l'ensemble des modèles cellulaires (lymphocytes T primaires, lymphocytes B-EBV). Concernant les données présentées dans les figures, j'ai généré les données suivantes :

Figure 1 :

Western Blot de l'expression protéine de WDR1 (K)

Figure 2 :

Analyse des expériences de microscopie sur les neutrophiles et les monocytes (A-C, E,F)

Figure 3 :

Exécution et analyse de l'immunophénotypage du compartiment T (A,B)

Exécution et analyse de l'expérience de la synapse immunologique des lymphocytes T (C, D)

Figure 4 :

Exécution et analyse de l'immunophénotypage du compartiment B (A et B)

Figures annexes :

Exécution et analyse des expériences d'immunophénotypage, de régulation de l'expression du TCR, de migration et de cytotoxicité (respectivement E2 - B,C,E et F).

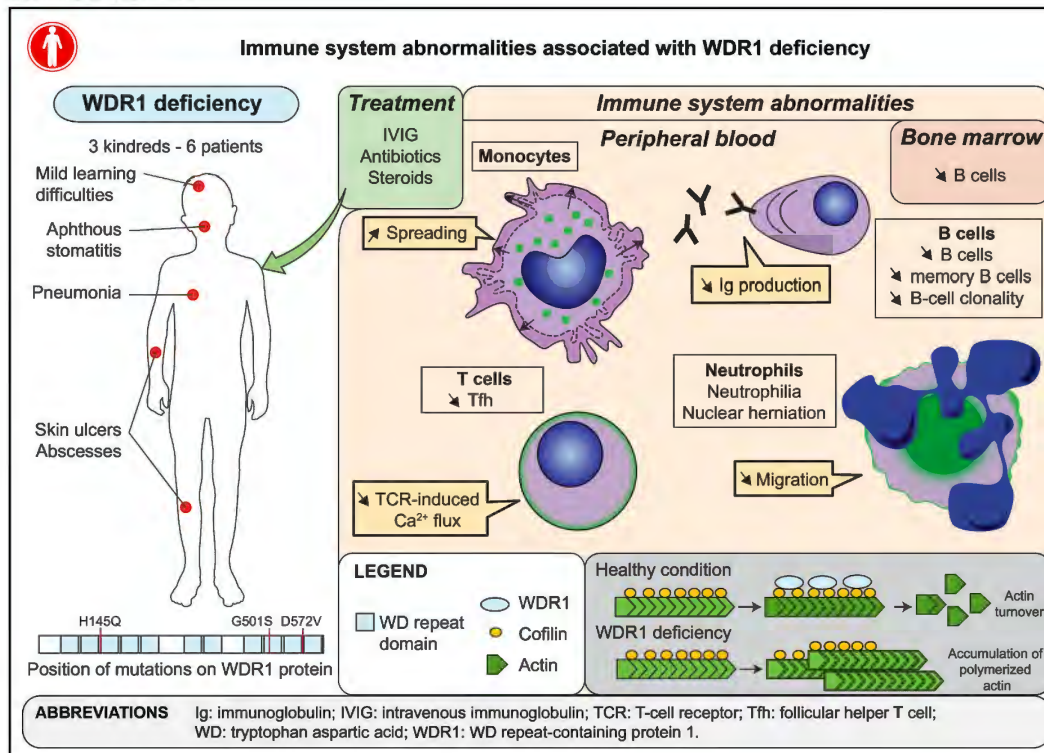
Exécution et analyse de l'immunophénotypage (E4 - A)

# Mutations affecting the actin regulator WD repeat-containing protein 1 lead to aberrant lymphoid immunity

Check for updates

Laurène Pfajfer, MSc,<sup>a,b,c,d,e,\*</sup> Nina K. Mair, BSc,<sup>a,b,\*</sup> Raúl Jiménez-Heredia, MSc,<sup>a,b</sup> Ferah Genel, MD,<sup>f</sup> Nesrin Gulez, MD,<sup>f</sup> Ömür Ardeniz, MD,<sup>g</sup> Birgit Hoeger, PhD,<sup>a,b</sup> Sevgi Köstel Bal, MD, PhD,<sup>a,b,h</sup> Christoph Madritsch, PhD,<sup>i</sup> Artem Kalinichenko, PhD,<sup>a,b</sup> Rico Chandra Ardy, MSc,<sup>a,b</sup> Bengü Gerçekler, MD,<sup>j</sup> Javier Rey-Barroso, PhD,<sup>c,d,e</sup> Hanna Ijspeert, PhD,<sup>k</sup> Stuart G. Tangye, PhD,<sup>l,m</sup> Ingrid Simonitsch-Klupp, MD,<sup>n</sup> Johannes B. Huppa, PhD,<sup>i</sup> Mirjam van der Burg, PhD,<sup>k</sup> Loïc Dupré, PhD,<sup>a,b,c,d,e,†</sup> and Kaan Boztug, MD<sup>a,b,o,p,†</sup>  
 Vienna, Austria, Toulouse, France, Izmir and Ankara, Turkey, Rotterdam, The Netherlands, and Darlinghurst, Australia

## GRAPHICAL ABSTRACT



From <sup>a</sup>the Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna; <sup>b</sup>the CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna; <sup>c</sup>INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse; <sup>d</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse; <sup>e</sup>CNRS, UMR 5282, Toulouse; <sup>f</sup>the Department of Pediatrics, Dr Behcet Uz Children's Hospital, Izmir; <sup>g</sup>EÜTF Internal Medicine, Division of Allergy and Clinical Immunology, Bornova, Izmir; <sup>h</sup>the Department of Pediatric Allergy and Immunology, Ankara University School of Medicine; <sup>i</sup>the Institute for Hygiene and Applied Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, <sup>j</sup>the Department of

Pathology, <sup>k</sup>the Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, and <sup>l</sup>the St Anna Kinderspital and Children's Cancer Research Institute, Department of Pediatrics, Medical University of Vienna; <sup>m</sup>the Division of Dermatology, EÜTF Internal Medicine, Bornova, Izmir; <sup>n</sup>the Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam; <sup>o</sup>the Immunology Division, Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst; and <sup>p</sup>St Vincent's Clinical School, University of New South Wales, Darlinghurst.

\*These authors contributed equally to this work.  
 †These authors contributed equally to this work.

1589

**Background:** The actin-interacting protein WD repeat-containing protein 1 (WDR1) promotes cofilin-dependent actin filament turnover. Biallelic *WDR1* mutations have been identified recently in an immunodeficiency/autoinflammatory syndrome with aberrant morphology and function of myeloid cells.

**Objective:** Given the pleiotropic expression of WDR1, here we investigated to what extent it might control the lymphoid arm of the immune system in human subjects.

**Methods:** Histologic and detailed immunologic analyses were performed to elucidate the role of WDR1 in the development and function of B and T lymphocytes.

**Results:** Here we identified novel homozygous and compound heterozygous *WDR1* missense mutations in 6 patients belonging to 3 kindreds who presented with respiratory tract infections, skin ulceration, and stomatitis. In addition to defective adhesion and motility of neutrophils and monocytes, WDR1 deficiency was associated with aberrant T-cell activation and B-cell development. T lymphocytes appeared to develop normally in the patients, except for the follicular helper T-cell subset. However, peripheral T cells from the patients accumulated atypical actin structures at the immunologic synapse and displayed reduced calcium flux and mildly impaired proliferation on T-cell receptor stimulation. WDR1 deficiency was associated with even more severe abnormalities of the B-cell compartment, including peripheral B-cell lymphopenia, paucity of B-cell progenitors in the bone marrow, lack of switched memory B cells, reduced clonal diversity, abnormal B-cell spreading, and increased apoptosis on B-cell receptor/Toll-like receptor stimulation.

**Conclusion:** Our study identifies a novel role for WDR1 in adaptive immunity, highlighting WDR1 as a central regulator of actin turnover during formation of the B-cell and T-cell immunologic synapses. (J Allergy Clin Immunol 2018;142:1589-604.)

**Key words:** WD repeat-containing protein 1, actin cytoskeleton, immunodeficiency, lymphocytes, immunologic synapse

Actin cytoskeletal dynamics drive a wide array of cellular processes, such as morphogenesis, polarity, and motility.<sup>1</sup> Actin regulators work in concert to tune the assembly and turnover of actin filament meshworks at different cellular locations.<sup>2</sup> Immune cell function relies on finely tuned actin cytoskeletal dynamics. Indeed, both myeloid and lymphoid cells are highly motile and need to establish dynamic cell-to-cell contacts to execute their function. The pivotal role of the actin cytoskeleton in driving immune cell function in human subjects is being revealed by the characterization of a growing number of inherited defects of the immune system (primary immunodeficiencies [PIDs]) caused by deficiency or molecular alteration of actin cytoskeleton-remodeling proteins.<sup>3</sup>

Supported by the Vienna Science and Technology Fund (WWTF-LS16-060 to K.B. and L.D. and WWTF-LS14-31 to J.B.H.), the Austrian Science Fund (I2250-B28 to K.B.), the French National Agency for Research (ANR-13-BSV1-0031 to L.D.), a ZonMW Vidi grant (no. 91712323 to M.v.d.B.), and grants from the National Health and Medical Research Council of Australia (to Ö.A. and S.G.T.).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication October 19, 2017; revised March 12, 2018; accepted for publication April 6, 2018.

Available online May 8, 2018.

Corresponding authors: Kaan Boztug, MD, Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Lazarettgasse 14 AKH BT 25.3, A-1090 Vienna, Austria. E-mail:

#### Abbreviations used

APC:	Allophycocyanin
BCR:	B-cell receptor
B-LCL:	EBV-immortalized B-lymphoblastic cell line
CADD:	Combined annotation-dependent depletion
CDR:	Complementarity-determining region
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
fMLP:	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
ICAM-1:	Intercellular adhesion molecule 1
IRM:	Interference reflection microscopy
PE:	Phycocerythrin
PID:	Primary immunodeficiency
SHM:	Somatic hypermutation
SLB:	Supported lipid bilayer
TCR:	T-cell receptor
T <sub>H</sub> :	Follicular helper T
TIRF:	Total internal reflection fluorescence
TLR:	Toll-like receptor
WAS:	Wiskott-Aldrich syndrome
WASP:	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WDR1:	WD repeat-containing protein 1

A very recently discovered actin-related PID is caused by biallelic loss-of-function mutations in the gene encoding actin-interacting protein 1 (AIP1)/WD repeat-containing protein 1 (WDR1).<sup>4,5</sup> WDR1 is part of a large family of WD (tryptophan-aspartic acid) repeat domain-containing proteins that act as molecular scaffolds through a 7-bladed beta-propeller.<sup>6</sup> WDR1 is expressed ubiquitously and promotes actin filament disassembly through cofilin.<sup>7-12</sup> More precisely, actin filament disassembly relies on sequential recruitment of coronin, cofilin, and WDR1, which act in concert to sever actin filaments.<sup>13-15</sup> WDR1 activity is enhanced further by interaction with the immunomodulatory protease caspase-11.<sup>16</sup>

In human subjects defective expression of WDR1 has been shown recently to affect in particular the innate arm of the immune system. A first study reported 4 children carrying *WDR1* biallelic mutations resulting in severe immunodeficiency associated with a prominent defect in neutrophils, which emitted nuclear herniations and were defective in migrating toward the bacterial chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP).<sup>4</sup> A second study reported 2 siblings carrying a *WDR1* biallelic mutation associated with autoinflammation, immunodeficiency, and thrombocytopenia.<sup>5</sup> Expression of misfolded WDR1 in monocyte-derived dendritic cells from those patients led to enlarged actin-rich podosomes and excessive amounts of IL-18 caused by abnormal inflammasome activation. This phenotype is in line with a previous study showing that a hypomorphic mutation

kaan.boztug@rud.lbg.ac.at. Loïc Dupré, PhD, INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan, 1, place du Dr Baylac, 31300 Toulouse, France. E-mail: loic.dupre@inserm.fr.

The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749

© 2018 Ludwig Boltzmann Society - Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases. Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.023>

of *Wdr1* in mice results in macrothrombocytopenia and autoinflammatory disease characterized by excessive neutrophil recruitment to sites of inflammation.<sup>17</sup> In these mice neutrophils show increased levels of F-actin and cofilin, resulting in mislocalization and reduced migration.<sup>17</sup> Additional studies have linked aberrant expression of *WDR1* in human subjects to gout,<sup>18</sup> pancreatitis,<sup>19</sup> and primary glioblastoma.<sup>20</sup> The extent to which naturally occurring *WDR1* mutations also affect the adaptive arm of the human immune system has not been investigated.

Here we identified the largest cohort of patients with biallelic *WDR1* mutations to date and set out to systematically dissect the consequences on different leukocyte subsets, with a particular focus on lymphocytes.

## METHODS

### Study oversight

The studies, including immunologic diagnostic procedures and genetic analyses, were performed in accordance with guidelines of good clinical practice, the current version of the Declaration of Helsinki, written informed consent from the patients or patient's legal representatives, and approval from the relevant institutional review boards.

### Whole-exome sequencing

For whole-exome sequencing, a TrueSeq Rapid Exome kit, as well as the Illumina HiSeq3000 system and cBot Cluster Generation instruments (Illumina, San Diego, Calif), were used, as previously described,<sup>21,22</sup> with minor changes. Briefly, reads were aligned to the human genome version 19 by using the Burrows-Wheeler Aligner. Variant Effect Predictor was used for annotating single nucleotide variants and insertion/deletion lists. The obtained list was then filtered, excluding variants with a minor allele frequency of greater than 0.01 in the 1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium, or dbSNP build 149 databases. After further filtering steps for nonsense, missense, and splice-site variants, an internal database was used to filter for recurrent variants. Moreover, variants are prioritized by using tools, such as SIFT, PolyPhen-2, and the combined annotation-dependent depletion (CADD) score,<sup>23</sup> that predict the deleteriousness of a present variant.

### Homozygosity mapping

Homozygous sections are mapped with H3M2 (Homozygosity Heterogeneous Hidden Markov Model) software,<sup>24</sup> allowing screening for variants segregating with patient phenotype.

### Sanger sequencing

Sanger sequencing was used to validate the *WDR1* variants c.C435G (H145Q) in exon 5 and c.A1715T (D572V) in exon 15 obtained from whole-exome sequencing in the affected family members. Variants in family 3 (D572V in exon 15 and G501S in exon 13) were obtained from direct Sanger sequencing. This was done by designing specific primers for all the variants found: for H145Q in introns 4 and 5 and exon 5/introns 5 and 6, 5'- GTTCTTGGGTCCCTTTGGAC -3' (F1) and 5'- CACTTACGCCAATTGT-GAACT -3' (R1); for D572V in introns 14 and 15 and the 3' untranslated region, 5'- CTAGTCCCTGATTCGGTCCA -3' (F2) and 5'- CAGGAGTGT CACGTGGAGAA -3' (R2); and for c.G1501A (G501S) in introns 12 and 13 and introns 13 and 14, 5'- AGGATGGGTGTGGTGTGTG -3' (F3) and 5'- ACAGATAACCTCCCACTGCC -3' (R2).

### WDR1 expression

Patient and healthy donor PBMCs were lysed in 100  $\mu$ L RIPA buffer (150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mmol/L TRIS [pH 8.0]), run on a 10% acrylamide gel at 120 V, and blotted overnight at 120 mA at 4°C on a polyvinylidene difluoride membrane.

Membranes were incubated with anti-human *WDR1* (Novus Biologicals, Littleton, Colo) polyclonal antibody at a dilution of 1:600 in Tris-buffered saline with 0.5% Tween and 5% milk overnight at 4°C and a secondary anti-rabbit antibody at room temperature for 2 hours. As a control, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (clone 86C5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex) at a dilution of 1:1000 in combination with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody diluted 1:30,000 was used. Blots were developed with ECL (GE Healthcare, Fairfield, Conn).

### Immunophenotyping

Healthy donor and patient PBMCs were obtained by using Ficoll density centrifugation and stained for 30 minutes at 4°C with the following mouse anti-human antibodies: CXCR5-allophycocyanin (APC; 51505) from R&D Systems (Minneapolis, Minn); CCR7-phycoerythrin (PE)-CF594 (150503), CD27 V450 (M-T271), CD27 Brilliant Violet (M-T271), CD38-PE-Cy7 (HIT2), CD21-PE (B-ly4), CD3-APC-H7 (SK7), CD5-Alexa Fluor 700 (UCHT), CD4-APC (RPA-T4), CD4-Brilliant Violet 605 (RPA-T4), CD45RA-Alexa Fluor 700 (HI100), CD8-V500 (RPA-T8), CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC; HIT8a), IgM-APC (G20-1273), IgD-FITC (IA6-2), and CD95-PE-Cy7 (DX2) from BD Pharmingen (San Jose, Calif); CD19-peridinin-chlorophyll-protein complex-Cy5.5 (HIB19), CD10-APC (CB-CALLA), and CD31-APC (WM59) from eBioscience (San Diego, Calif); CD14-PE-Cy7 (RMO52), CD56-PE (N901), CD4-PE (13B8.2), T-cell receptor (TCR)-V $\beta$ 11-FITC (C21), and TCR-V $\alpha$ 24-PC-7 (C15) from Beckman Coulter; and CD8-V450 (RPA-T8) from BD Horizon (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Stained cells were analyzed on a BD LSR Fortessa cytometer. Data were processed with FlowJo X software (TreeStar, Ashland, Ore) and sketched with Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, Calif).

### Confocal microscopy

On isolation from peripheral blood samples, neutrophils, monocytes, and T cells were transferred onto glass slides precoated with 2  $\mu$ g/mL fibronectin (all cells) or 10  $\mu$ g/mL anti-CD3 mAbs (T cells). Neutrophils were stimulated in parallel with 10 nmol/L fMLP, whereas monocytes were treated with 50 ng/mL LPS. After 1 hour of incubation at 37°C, cells were fixed with PFA 3% and stained with Phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40 dilution) for 1 hour in permeabilization buffer (eBioscience) at room temperature in the dark. Slides were imaged with a Zeiss LSM700 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). The acquired images were analyzed with the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md).

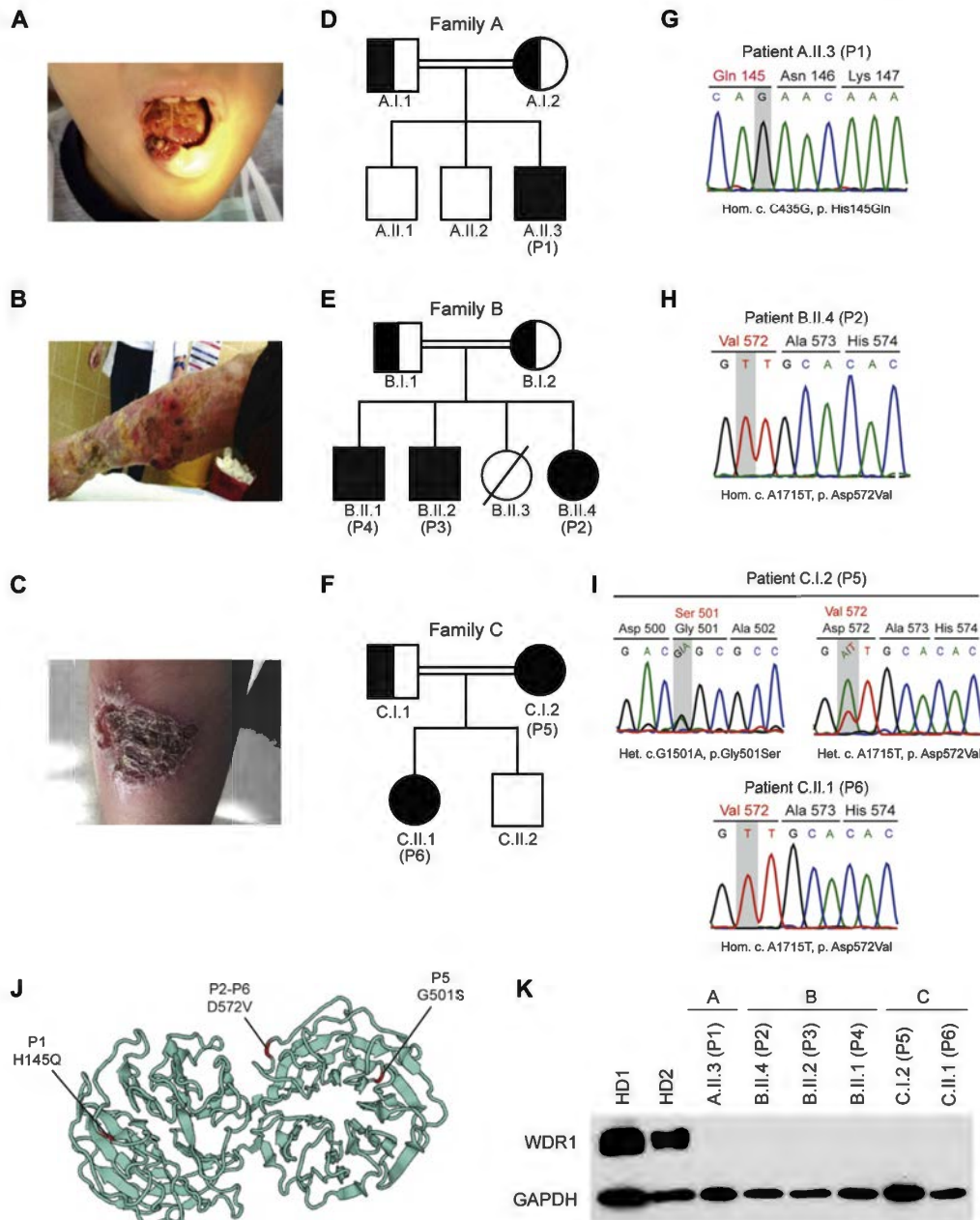
### Histologic and immunohistologic bone marrow examination

Histologic staining of paraffin-embedded tissue sections of 2 decalcified bone marrow biopsy specimens was performed, as previously described.<sup>25</sup> Immunohistologic staining was done with a panel of antibodies against CD10, CD22, CD3, and CD5 from Novocastra (Newcastle upon Tyne, United Kingdom); CD19, CD20, CD117, CD79a, paired box 5 (PAX-5), and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) from DAKO (Glostrup, Denmark); and CD71, CD34, CD61, CD14, and tryptase from Cell Marque (Rocklin, Calif) on an automated Leica BOND III immunohistological stainer (Leica, Wetzlar, Germany). Total bone marrow cellularity and representation of individual lineages were estimated by comparing the individual cellular compartments with age-matched control tissue.

### Neutrophil migration

Ninety-six-well transwell plates containing a 5- $\mu$ m pore size membrane (Corning, Corning, NY) were used to assess cell migration toward chemoattractants. Freshly isolated neutrophils ( $5 \times 10^4$  cells in 50  $\mu$ L) were loaded on the top of the transwell filter, and 150  $\mu$ L of fMLP was added at the indicated concentrations to the lower chamber. After 30 minutes





**FIG 1.** Identification of novel *WDR1* mutations in 3 kindreds. **A**, Aphthous stomatitis in patient P1. **B**, Skin infection on the calf of patient P3. **C**, Skin ulceration on the calf of patient P5. **D**, Pedigree of family A. **E**, Pedigree of family B. **F**, Pedigree of family C. **G**, Sanger validation of *WDR1* mutation in patient P1 (c.C435G, p.His145Gln). **H**, Sanger validation of *WDR1* mutation in patient P2 (c.A1715T, p.Asp572Val). **I**, Sanger validation of the compound heterozygous variants in patient P5 (c.A1715T, p.Asp572Val and c.G1501A, p.Gly501Ser) and homozygous variant in patient P6 (c.A1715T, p.Asp572Val). **J**, Three-dimensional structure of *WDR1* with localization of the identified variants. **K**, Representative Western blot analysis of *WDR1* expression in lysates from PBMCs isolated from 2 healthy donors and the 6 patients. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) is shown as the loading control. The data correspond to 1 experiment of 2 performed. *HD*, Healthy donor.

**TABLE I.** Clinical characteristics of the patients

Family	A		B		C	
	1	2	3	4	5	6
Patient	1	2	3	4	5	6
Sex	Male	Female	Male	Male	Female	Female
Ethnic origin	Turkish	Turkish	Turkish	Turkish	Syrian	Syrian
Current age (y)	11	12	21	24	26	7
Age at onset (y)	2.5	9	11	14	NA	NA
Consanguinity	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Clinical presentation						
General	Recurrent fever (4- to 6-mo intervals) No dysmorphism obvious facial Diarrhea and vomiting Weight and height: 27 kg (0 SDS, 50th-75th percentile) and 128 cm (0.2 SDS, 50th-75th percentile) at time of admission (8 y)	No recurrent fever Facial dysmorphism (frontal bossing, minimal hypertelorism, wide nasal nostrils) No gastrointestinal manifestations Weight and height: 16.7 kg (-3.9 SDS, <3rd percentile) and 112 cm (-3.6 SDS, <3rd percentile)	No recurrent fever Facial dysmorphism (frontal bossing, minimal hypertelorism, wide nasal nostrils) Diarrhea Weight and height: 43 kg [-3.8 SDS, <3rd percentile] and 162 cm (-2 SDS, <3rd percentile)	No recurrent fever Facial dysmorphism (frontal bossing, minimal hypertelorism, wide nasal nostrils) Diarrhea Weight and height: 50 kg (-2.5 SDS, <3rd percentile) and 168 cm (-1.2 SDS, 10th-25th percentile)	No recurrent fever No obvious facial dysmorphism No gastrointestinal manifestations Weight and height: 75 kg (+1.2 SDS, 90th percentile) and 160 cm (-0.5 SDS, 25th-50th percentile)	Recurrent fever (1-to 2-mo intervals) No obvious facial dysmorphism No gastrointestinal manifestations Weight and height: 20 kg (25th percentile) and 116 cm (10th-25th percentile)
Neurological	Mental impairment (WISC-R test; Verbal IQ: 72, Performance IQ: 84 Total IQ: 75)	Learning difficulty in school, no formal test performed	Learning difficulty in school, no formal test performed	Learning difficulty in school, no formal test performed	Learning difficulty in school, no formal test performed	Learning difficulty in school, no formal test performed
Infections	Pneumonia Aphthous stomatitis Oral candidiasis	Pneumonia Bronchiectasia Aphthous stomatitis Otitis Encephalitis (suspected from viral infection; responsible agent not isolated) Lymphadenopathy Abscesses Varicella infection <i>Burkholderia gladioli</i> isolated from skin abscess	Pneumonia Bronchiectasia Nodulocystic acne Skin ulcers Pyoderma gangrenosum HBV carrier <i>Staphylococcus aureus</i> infection	Bronchitis Bronchiectasia Nodulocystic acne Abscesses Skin ulcers Lymphadenopathy Pyoderma gangrenosum HBV carrier <i>Staphylococcus aureus</i> infection	Aphthous stomatitis Otitis media Sinusitis Pharyngitis Abscesses	Pneumonia Aphthous stomatitis Vesicular lesion Subcorneal pustular dermatosis
Autoinflammation and autoimmunity	Autoimmune thyroiditis Chronic thrombocytopenia Noninflammatory myopathy		Fluctuating thrombocytopenia	Splenomegaly Fluctuating thrombocytopenia		
Treatment	IVIG Fluconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis	IVIG Fluconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis Inhaler steroid and salbutamol	IVIG Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis + Colchicum-Dispert	IVIG Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis + Colchicum-Dispert	None	IVIG Fluconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis

IVIG, Intravenous immunoglobulin replacement; NA, not available/applicable; SDS, Standard deviation score; WISC-R, Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised.

TABLE II. Immunologic characterization of the patients

Family Patient	A				B			
	1		11		2		3	
Age at evaluation (y)	7	8	9	11	9	11	12	18
Hemoglobin (g/dL)	11	10.6	12.2	10.3	9.5	10.3	9	5.83
Lymphocyte count (cells/ $\mu$ L)	2,300 (1,500-7,600)	830 (1,500-7,600)	1,910 (1,500-7,600)	1,920 (1,700-5,700)	3,810 (1,500-7,600)	4,540 (1,700-5,700)	2,630 (1,700-5,700)	3,000 (1,700-5,700)
Neutrophil count (cells/ $\mu$ L)	4,600	18,020	2,200	3,810	16,160	19,370	4,580	10,900
Platelet count (cells/ $\mu$ L)	63,000 (150,000-450,000)	27,000 (150,000-450,000)	55,000 (150,000-450,000)	54,000 (150,000-450,000)	389,000 (150,000-450,000)	440,000 (150,000-450,000)	277,000 (150,000-450,000)	422,000 (150,000-450,000)
MPV (fL)	10.1	10.9	13.7	12.2	8.2	8.3	9.1	8.17
IgG (g/L)	5.72 (without substitution) (4.11-14.35)	3.71 (without substitution) (4.11-14.35)	7.06 (IVIG substitution) (6.54-15.94)	10.40 (IVIG substitution) (6.54-15.94)	13.3 (without substitution) (6.54-15.94)	8.1 (IVIG substitution) (6.54-15.94)	13.6 (IVIG substitution) (6.98-11.94)	11.2 (without substitution) (5.84-14.86)
IgA (g/L)	1.95 (0.34-2.14)	1.09 (0.34-2.14)	0.31 (0.11-2.51)	0.99 (0.11-2.51)	1.57 (0.11-2.51)	1.49 (0.11-2.51)	1.19 (0.22-2.74)	0.98 (0.91-3.93)
IgM (g/L)	0.72 (0.15-1.15)	0.29 (0.15-1.15)	0.27 (0.13-1.45)	0.53 (0.13-1.45)	0.26 (0.13-1.45)	0.34 (0.13-1.45)	0.39 (0.19-0.99)	0.37 (0.32-2.23)
Response to vaccination antigens	Anti-rubella: 52 IU/mL (positive, N: >10 IU/mL) Anti-tetanus: 5 IU/mL (positive, N: >0.1 IU/mL) Anti-diphtheria: 1.61 IU/mL (positive, N: >1 IU/mL) Anti-HBsAg: <5 mIU/mL (negative, N: >10 mIU/mL)				Anti-tetanus <0.1 IU/mL (negative, N: >0.1 IU/mL) Anti-HBsAg: 5 mIU/mL (negative, N: >10 mIU/mL)			
CD19 <sup>+</sup> B cells (cells/ $\mu$ L)	NA	100 (200-2,200)	170 (200-2,200)	190 (200-1,400)	60 (200-2,200)	164 (200-1,400)	112 (200-1,400)	5 (200-1,400)
CD3 <sup>+</sup> T cells (cells/ $\mu$ L)	NA	570 (1,000-4,900)	1,490 (1,000-4,900)	1,474 (1,100-4,100)	3,090 (1,000-4,900)	2,670 (1,100-4,100)	3,196 (1,100-4,100)	1,743 (1,100-4,100)
CD4 <sup>+</sup> T cells (cells/ $\mu$ L)	NA	340 (500-2,700)	760 (500-2,700)	705 (600-2,400)	1,780 (500-2,700)	1,596 (600-2,400)	1,838 (600-2,400)	976 (600-2,400)
CD8 <sup>+</sup> T cells (cells/ $\mu$ L)	NA	240 (300-2,100)	650 (300-2,100)	648 (400-1,500)	1,220 (300-2,100)	981 (400-1,500)	1,226 (400-1,500)	744 (400-1,500)
NK cells (cells/ $\mu$ L)	NA	120 (200-900)	220 (200-900)	223 (200-1,000)	290 (200-900)	337 (200-1,000)	595 (200-1,000)	302 (200-1,000)
Neutrophil function (BURST test)	Normal				NA			
Other	Anti-thyroglobulin and anti-TPO autoantibodies: positive Cranial MRI: normal				Parahormone and growth hormone stimulation tests: normal			

Normal ranges are shown in parentheses. Normal range for cell types in children is according to Ikinogullari et al.<sup>29</sup> normal range for cell types in adults is according to Coman-Bitter et al.<sup>30</sup> normal range for immunoglobulins in children is according to Stiehm and Fudenberg,<sup>31</sup> and normal range for immunoglobulins in adults is according to Puisant-Lubrano et al.<sup>32</sup>  
 IVIG, Intravenous immunoglobulin replacement; MPV, mean platelet volume; MRI, magnetic resonance imaging; NA, not available/applicable; NK, natural killer; TPO, thyroperoxidase.

of incubation at 37°C, transmigrating cells were collected, transferred into a U-bottom 96-well plate, and counted with a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). The proportion of migrating cells was normalized to the initial input cell number.

### Expansion of T and B cells

Patient and healthy donor T cells were expanded by using a feeder cell mixture, as previously described,<sup>26</sup> and maintained in RPMI 1640 medium containing L-glutamine (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, Calif) and 10% heat-inactivated human serum (all from Gibco). Culturing conditions were 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. EBV-immortalized B-lymphoblastic cell lines (B-LCLs) were generated by adding EBV viral supernatant onto freshly isolated PBMCs. The following day, 1  $\mu$ g/mL

cyclosporin A was added to the cells, which were cultured in RPMI 1640 medium with L-glutamine supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 10% heat-inactivated FCS (Gibco, Life Technologies).

### Morphology and apoptosis of B-LCLs

The morphology and F-actin content of B-LCLs was assessed on combined B-cell receptor (BCR)/Toll-like receptor (TLR) stimulation. Eight-well slides (ibidi, Martinsried, Germany) were coated with anti-IgA/IgG/IgM (10  $\mu$ L/mL; Abcam, Cambridge, United Kingdom) overnight at 4°C. After washing, cells were seeded in the presence of 5  $\mu$ mol/L CpG ODN 2006 (InvivoGen, San Diego, Calif) and 1  $\mu$ mol/L Sir-Actin (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France). After 3 hours, bright-field, total internal reflection fluorescence (TIRF), and interference reflection microscopy (IRM) images of live cells were acquired with a Nikon inverted spinning disk confocal



TABLE II. (Continued)

3		B			4	5		C	
20	21	21	23	23	26	5	6	7	
12	13.7	10.5	12.5	14	NA	9.6	NA	9.1	
2,480 (1,600-2,500)	2,780 (1,600-2,500)	1,170 (1,600-2,500)	1,400 (1,600-2,500)	1,180 (1,600-2,500)	1,500 (1,900-2,800)	1,360 (1,500-5,200)	NA	1,600 (1,500-7,600)	
9,310	29,700	8,000	7,600	2,110	8,770	11,670	NA	14,830	
108,000 (150,000-450,000)	125,000 (150,000-450,000)	120,000 (150,000-450,000)	105,000 (150,000-450,000)	49,000 (150,000-450,000)	174,000 (150,000-450,000)	213,000 (150,000-450,000)	NA	191,000 (150,000-450,000)	
10.2	9.79	9.6	8.32	9.03	9.2	8.8	NA	9.2	
10.3 (IVIG substitution) (5.84-14.86)	8.5 (IVIG substitution) (5.84-14.86)	6.96 (without substitution) (5.84-14.86)	10.0 (IVIG substitution) (5.84-14.86)	9.27 (IVIG substitution) (5.84-14.86)	15.3 (without substitution) (5.84-14.86)	5.45 (without substitution) (4.73-13.85)	NA	9.65 (without substitution) (4.11-14.35)	
0.97 (0.91-3.93)	0.69 (0.91-3.93)	2.18 (0.91-3.93)	2.18 (0.91-3.93)	2.01 (0.91-3.93)	2.50 (0.91-3.93)	6.25 (0.39-1.47)	NA	9.65 (0.34-2.14)	
0.33 (0.32-2.23)	0.24 (0.32-2.23)	0.23 (0.32-2.23)	0.42 (0.32-2.23)	0.36 (0.32-2.23)	2.20 (0.50-2.60)	0.53 (0.20-0.92)	NA	0.37 (0.15-1.15)	
Anti-tetanus: 0.15 IU/mL (positive, N: >0.1 IU/mL)	Anti-pneumococcus: 4 mg/L (positive, N: >1.3 mg/L)	Anti-tetanus: 0.5 IU/mL (positive, N: >0.1)			NA	Anti-tetanus: >5 IU/mL (positive, N: >0.1 IU/mL) Anti-rubella: 15 IU/mL (Positive, N: 10-15 IU/mL) Anti-HBsAg: 45 mIU/mL (positive, N: >10 mIU/mL)			
25 (130-260)	28 (130-260)	7 (130-260)	14 (130-260)	12 (130-260)	41 (170-270)	53 (300-1,200)	89 (200-2,200)	60 (200-2,200)	
1,959 (700-2,100)	2,113 (700-2,100)	506 (700-2,100)	882 (700-2,100)	732 (700-2,100)	1,351 (700-2,100)	1,168 (1,900-3,600)	1,355 (1,000-4,900)	1,194 (1,000-4,900)	
967 (300-1,400)	1,029 (300-1,400)	312 (300-1,400)	588 (300-1,400)	484 (300-1,400)	576 (300-1,400)	582 (600-2,000)	648 (500-2,700)	511 (500-2,700)	
794 (200-900)	945 (200-900)	213 (200-900)	364 (200-900)	295 (200-900)	699 (200-900)	560 (300-1,300)	633 (300-2,100)	581 (300-2,100)	
99 (90-600)	278 (90-600)	77 (90-600)	224 (90-600)	260 (90-600)	72 (90-600)	119 (200-1,200)	159 (200-900)	200 (200-900)	
Normal		Normal			NA	Normal			

microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a back-thinned charge-coupled device camera (Evolve, 512 × 512 pixels; Photometrics, Tucson, Ariz), a temperature- and CO<sub>2</sub>-controlled chamber, and an oil immersion ×100/1.49 NA objective. The morphologic parameters of the acquired cells were quantified with ImageJ software, applying masks to the bright-field images. Apoptosis of B-LCLs was measured on stimulation with 1.5 μL/mL anti-IgA/IgG/IgM and 5 μmol/L CpG ODN 2006. At the indicated time points, cells were stained on ice with Annexin V-APC (3 μL per 100 μL; BD Biosciences) and propidium iodide (1.5 μL per 100 μL; BioLegend, San Diego, Calif) in Annexin V binding buffer (eBioscience) for 5 minutes, topped up with an additional 200 μL of binding buffer, and kept on ice for acquiring by using flow cytometry. Gates were defined by means of comparison with apoptotic control samples treated at 65°C for 10 minutes.

### B-cell somatic hypermutation and class-switch recombination

PBMCs were collected for patients and healthy donors, as described above. RNA extraction was carried out according to the RNeasy Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany). Elution was done twice with 25 μL of RNase-free water. Two independent multiplex PCR reactions were performed by using VH1-6 FRI forward primers and IGHA or IGHG reverse primers, respectively. The obtained PCR fragments were cloned into pGEM-t Easy Vector (Promega, Madison, Wis), and sequencing of single clones was performed on an ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, Calif). After demultiplexing the raw data, FASTA files were uploaded into the IMGIT High-V-Quest database, and the resulting files were analyzed by using the

somatic hypermutation (SHM) and class-switch recombination pipeline in ARGALaxy. The clonality of the complementarity-determining region (CDR) 1–CDR3 region was analyzed by using Change-O. SHM analysis was done, as previously described.<sup>27</sup>

### Calcium flux experiments on supported lipid bilayers

Calcium flux was assessed in expanded T cells confronted with stimulatory glass-supported lipid bilayers (SLBs), as described previously,<sup>21</sup> with the modifications described below. Briefly, T cells ( $0.5-1 \times 10^6$ ) were loaded with 5  $\mu\text{mol/L}$  Fura-2 AM (Invitrogen) in complete RPMI 1640 medium for 30 minutes at 25°C and then washed twice with 10 mL of imaging buffer (1 $\times$  HBSS [Gibco] supplemented with 1% FCS [Sigma, St Louis, Mo], 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  and 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ). For imaging, cells were spotted onto SLBs functionalized with OKT3-derived single-chain variable fragments at indicated densities and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1; 50 ng/well or approximately 100 ng/mL). SLB protein density determination was performed, as previously described.<sup>28</sup> Image acquisition was performed with a DMI4000B microscope (Leica Microsystems) equipped with a  $\times 20$  objective (Leica  $\times 20$  PH2) and an Andor iXon Ultra-8871 EM-CCD camera (Andor Technology, Belfast, United Kingdom) controlled by Metamorph Imaging software (Molecular Devices, Eugene, Ore). Imaging of Fura-2 (excitation, 340 nm and 380 nm; emission, 510 nm) was achieved with the use of a fast external excitation filter wheel equipped with band pass filters at 340 and 380 nm (Leica Fura EX) and a filter cube consisting an emission band pass filter at 520 nm (Fura-2 Leica EM520/36, DC:409). Fura-2 images were collected at intervals of 30 seconds over approximately 10 minutes. Intracellular calcium dynamics were determined ratiometrically from Fura-2 emissions acquired through 340 and 380 nm of excitation by using the open-source Fiji software package. Ratios of Fura-2 emissions were normalized with regard to the first acquired Fura-2 emission ratio determined for nonactivated T cells, which had not yet established productive contacts with the SLB. T cells contacting SLBs featuring ICAM-1 alone were recorded for each healthy donor and patient and served as negative controls.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad software. Statistical significance was determined by performing 2-tailed nonparametric *t* tests. Resulting *P* values are indicated as follows: ns,  $P > .05$ ,  $*.01 < P < .05$ ,  $**.001 < P < .01$ , and  $***P < .001$ .

## RESULTS

### Clinical characteristics of the patients

Here we studied 6 patients from 3 consanguineous pedigrees experiencing skin ulcerations, multiple respiratory tract and other infections, intellectual impairment, and in 3 cases stomatitis inflammation (Fig 1, A–F, and Tables I and II).<sup>29–32</sup> A detailed case report is provided in a separate document (see the Methods section and Tables E1 and E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

### Identification of novel *WDR1* gene mutations in 3 families, resulting in reduced *WDR1* expression

Given the consanguineous background of the 3 families, the shared phenotypic traits within the patients, and the absence of clinical signs of immunodeficiency in the unaffected siblings and parents (with the exception of family C), we suspected a common autosomal recessive disease trait. We performed whole-exome sequencing to identify the underlying genetic disease cause. Patient P1 (family A) was found to carry a homozygous missense variant on chromosome 4, 10099458: G>C (hg19 build 137; NM\_017491.3: c.C435G, p.His145Gln) in *WDR1* (Fig 1, G).

Patient P2 (family B), as well as patients P3 and P4, were found to carry a homozygous missense variant (c.A1715T, p.Asp572Val) in *WDR1* (Fig 1, H). Patient P6 (family C) was found to carry the same mutation as identified in family B (c.A1715T, p.Asp572Val), and patient P5, the mother of P6, was found to be a heterozygous carrier of the p.Asp572Val mutation together with another heterozygous variant (c.G1501A, p.Gly501Ser; Fig 1, I). These *WDR1* gene variants have not been observed in heterozygous or homozygous form in several human genetic variation databases, including the 1000 Genomes Project and the Exome Aggregation Consortium. In addition, the heterozygous carriers did not show any symptoms. The variant found in family A (H145Q) was predicted to be benign and tolerated, with a CADD score of 13.3. The variant identified in families B and C (D572V) was predicted to be damaging and deleterious based on PolyPhen-2 and SIFT predictors for the corresponding protein function, with a CADD score of 28. The heterozygous variant identified in patient P5 (G501S) was predicted to be damaging and deleterious, with a CADD score of 26.7.

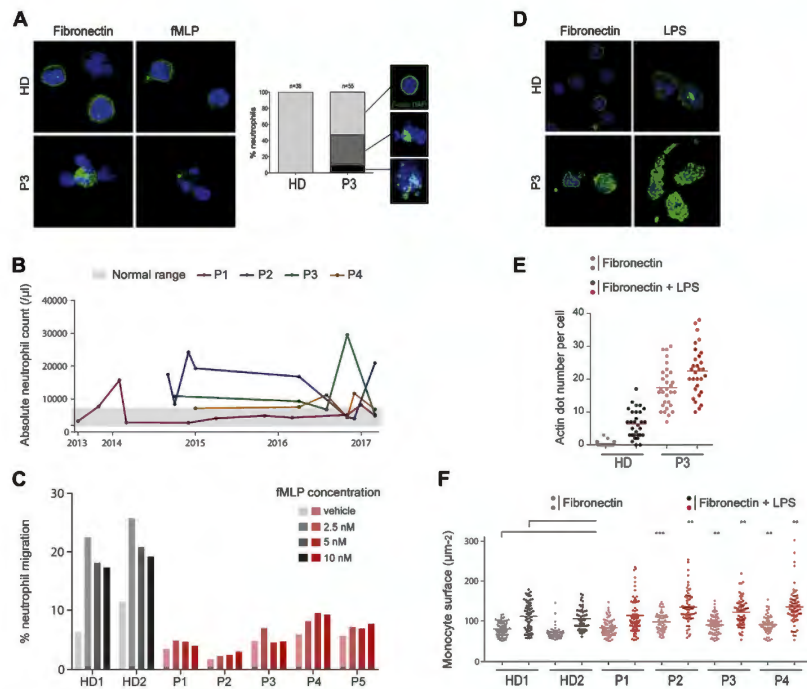
The *WDR1* gene variants found in the 3 families segregated perfectly with the disease under the assumption of autosomal recessive inheritance (see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Although variants in additional genes also segregated within the individual families (see Table E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), they were disregarded as being causative because they could not be related to the immunodeficiency status of the patients. Additionally, the striking similarities between the clinical phenotypes in the 3 families pointed to the *WDR1* variants as the common cause of the immunopathology. The 3 identified mutations are located in coils between antiparallel  $\beta$ -sheet repeats, which might affect the 3-dimensional blade structure of *WDR1* and its overall stability (Fig 1, J).

We analyzed *WDR1* expression in the patients' PBMCs by using Western blotting. The newly identified mutations were associated with near-absent levels of *WDR1* expression (Fig 1, K). However, we observed variable residual *WDR1* expression in both expanded T cells from the patients, suggesting that lymphocyte activation might stimulate or stabilize expression of the *WDR1* variants (see Fig E2, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

Together, our data demonstrate that the newly identified *WDR1* mutations lead to a marked *WDR1* expression defect in peripheral blood cells from the patients, reinforcing the link of causality between the *WDR1* mutations and the immunopathology affecting the patients.

### Neutrophil and monocyte defects associated with *WDR1* mutations

On blood smear examination, we detected abnormal hemiation of neutrophil nuclear lobes (data not shown). This characteristic observation is in line with the recent identification of *WDR1* mutations in immunodeficient patients for whom neutrophil nuclear hemiation and associated defects were identified as a hallmark of the disease.<sup>4</sup> Neutrophils were purified and stained with Phalloidin and 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride to further characterize the morphologic defects associated with mutant *WDR1*. Approximately half of the neutrophils from the patients with *WDR1* mutations had aberrant morphology (Fig 2,



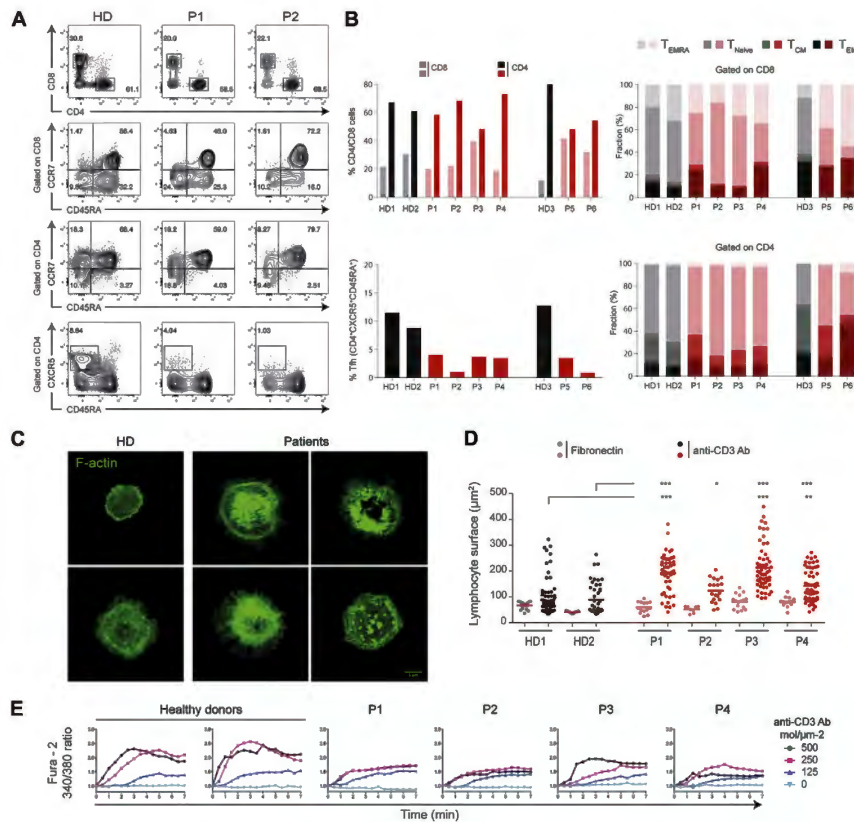
**FIG 2.** Effect of *WDR1* variants on neutrophils and monocytes. **A**, Representative picture of neutrophils from a healthy donor and patient P3 deposited on fibronectin or fibronectin plus fMLP. Morphologies of fMLP-stimulated neutrophils (36 from a healthy donor and 55 from patient 3) classified as normal (light gray), nuclear herniations (dark gray), or complex aberrations (black). **B**, Five-year longitudinal analysis of neutrophil absolute counts in patients P1 to P4. The normal range is indicated in gray. **C**, Migration of neutrophils from 2 healthy donors and patients P1 to P5 in response to indicated concentrations of fMLP. Data correspond to 1 experiment of 2 performed. **D**, Representative picture of monocytes from a healthy donor and patient P3 on spreading over fibronectin or fibronectin plus LPS. **E**, Number of actin dots quantified in 30 monocytes from a healthy donor and patient P3. Data correspond to 1 experiment of 2 performed. **F**, The surface covered by monocytes spreading over fibronectin (gray and light red dots) or fibronectin plus LPS (black and red dots) was quantified in 60 monocytes from 2 healthy donors and patients P1 to P4. Data pertaining to morphologic aberrations in neutrophils were confirmed in independent experiments performed on a second blood sampling from patients P1 to P4. HD, Healthy donor. \*\* $.001 < P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$ .

A). They displayed either nuclear herniation with 1 or more nuclear lobes protruding from the cell body or a loss of nuclear integrity, as revealed by spread 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride staining. These morphologic aberrations were associated with dissolution of cortical actin and abnormal accumulation of filamentous actin toward the cell center, as determined based on F-actin staining. Therefore our immunofluorescence data suggest that loss-of-function mutations in *WDR1* affect actin turnover, thereby leading to both a weakening of the cell cortex and accumulation of cytoplasmic actin structures. This process either pushes nuclear lobes out of the cell body or more profoundly disrupts nuclear integrity. These morphologic defects were not associated with reduced numbers of circulating neutrophils. On the contrary, patients had normal to increased neutrophil counts in peripheral blood (Fig 2, B). We further explored how such morphologic aberration might affect the capacity of neutrophils to survive and migrate.

Neutrophils from the patients with *WDR1* mutations did not consistently display accelerated loss of mitochondrial membrane potential (see Fig E3, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)) or increased apoptosis (see Fig E3, B and C). However, a transwell assay revealed impaired migration of neutrophils from the patients with *WDR1* mutations in response to fMLP (Fig 2, C). Therefore our data reinforce the notion that biallelic *WDR1* mutations in human subjects are associated with a characteristic phenomenon of neutrophil herniation, with defective migration toward fMLP.

We next investigated whether morphologic aberrations would apply to monocytes. On blood isolation and seeding over fibronectin-coated slides, monocytes from the patients with *WDR1* mutations emitted actin dots oriented toward the substrate, which were not detectable in normal monocytes (Fig 2, D). These structures are reminiscent of actin-rich podosomes, which are assembled in macrophages and monocyte-derived dendritic



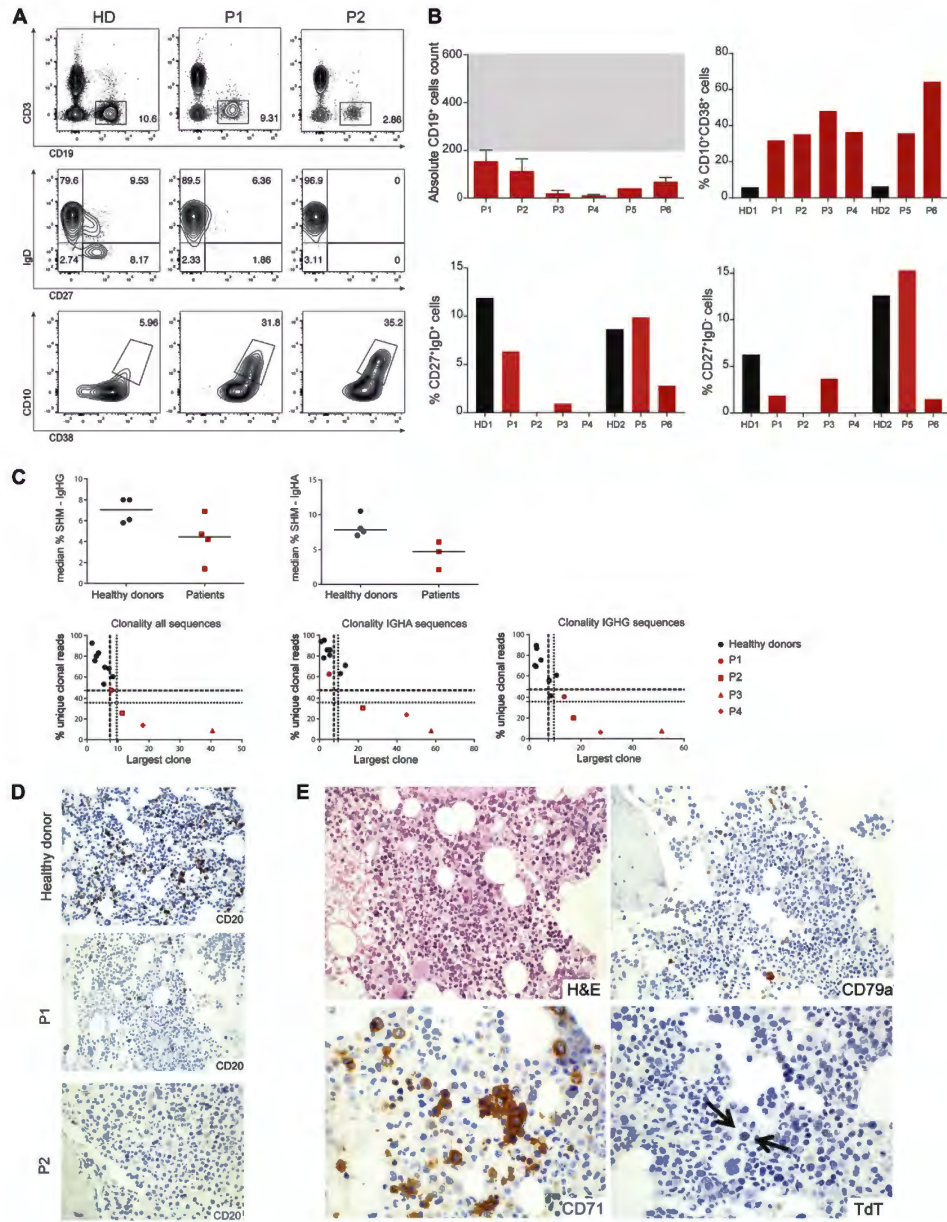


**FIG 3.** Effect of *WDR1* variants on T-cell activation and function. **A**, Representative flow cytometric analysis of T-cell subsets in PBMCs from a healthy donor and patients P1 and P2. **B**, Flow cytometry–based quantification of the indicated T-cell subsets in PBMCs from 3 healthy donors and the 6 patients. Data correspond to 1 experiment of 2 performed for patients P5 and P6 and of 1 experiment for patients P1 to P4. **C**, Representative images of F-actin staining in primary T cells from a healthy donor and patients P2 (upper panels) and P3 (lower panels) spreading over coated anti-CD3 antibody. Comparable morphologic aberrations were observed in an experiment performed on a second blood sampling from patients P1 to P4. **D**, T-cell surface on spreading over fibronectin (gray and light red dots) or anti-CD3 antibody (black and red dots) in 2 healthy donors and patients P1 to P4. Ten to 60 T cells were analyzed per condition. Data correspond to 1 experiment of 2 performed. **E**, Calcium influx in expanded T cells from 2 healthy donors and patients P1 to P4 stimulated over a lipid bilayer presenting ICAM-1 and anti-CD3 antibodies. Data correspond to 1 experiment of 2 performed. HD, Healthy donor. \*.01 <  $P$  < .05, \*\*.001 <  $P$  < .01, and \*\*\* $P$  < .001.

cells.<sup>33</sup> Similar structures were observed in normal monocytes on LPS stimulation. Evidently, patients' monocytes emitted a significantly higher number of actin dots when compared with control monocytes on LPS stimulation (Fig 2, E). These observations are in agreement with previous findings of increased podosome assembly in dendritic cells from patients with *WDR1* mutations.<sup>5</sup> In parallel, we measured an increased ability of patients' monocytes to spread over fibronectin spontaneously or on LPS stimulation (Fig 2, F). In conclusion, monocytes isolated from the blood of patients with *WDR1* mutations displayed increased basal and LPS-driven spreading associated with podosome-like F-actin structures.

### TCR activation in *WDR1*-mutated T lymphocytes

In view of the pleiotropic expression of *WDR1*, we reasoned that *WDR1* mutations might also affect functional integrity of lymphoid cells. We first investigated the T-cell compartment of patients through phenotypic characterization of peripheral blood T-cell subsets. Although normal proportions of T cells belonging to the CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, naive, central memory, effector memory, and stem memory subsets were detected, follicular helper T (T<sub>fh</sub>) cells were present in a reduced proportion in all 6 patients (Fig 3, A and B, and see Fig E2, B). We then investigated actin cytoskeletal organization in T cells from patients P1 to P4 on interaction with anti-CD3 antibody–coated slides. Somewhat



**FIG 4.** Effect of *WDR1* variants on the B-cell compartment. **A**, Representative flow cytometric analysis of B-cell subsets in PBMCs from a representative healthy donor and patients P1 and P2. **B**, Absolute numbers of peripheral B cells (*upper left panel*, mean  $\pm$  SD of 3 values, normal range in gray) and proportion of CD19<sup>+</sup> B-cell subsets from 2 healthy donors and the 6 patients: transitional B cells (CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, *upper right panel*), IgM/D memory B cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, *lower left panel*), and IgG memory B cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, *lower right panel*). Data correspond to 1 experiment of 2 performed for patients P5 and P6 and of 1 experiment for patients P1 to P4. **C**, Analysis of B-cell clonal diversity in PBMCs from 8 healthy donors and patients P1 to P4. Clonal diversity is represented as plots depicting the relative size of the largest clone and the proportion of unique clonal reads for all sequences, IgA sequences, and IgG sequences (*upper plots*). SHM events in B cells from healthy donors and patients P1 to P4 (*lower plots*). **D**, Immunohistology of bone marrow from an age-matched healthy donor and patients P1 and P2. **E**, Immunohistologic staining for hematoxylin and eosin (*H&E*), CD71, CD79a, or terminal deoxynucleotidyl transferase (*TdT*) in bone marrow from patient P1. *HD*, Healthy donor.



reminiscent of what we observed in the monocytes, the tested T cells from patients displayed aberrant actin meshwork organization and increased spreading (Fig 3, C and D). The abnormal actin structures identified in *WDR1*-mutant lymphocytes included actin arcs, actin spikes, and filopodia, which were described to be dependent on formin activity.<sup>34</sup> This suggests that the defect in actin turnover associated with *WDR1* deficiency results in increased assembly of structures that might depend on formin rather than Arp2/3 activity.

We then tested which aspects of TCR-mediated activation might be controlled by *WDR1*. T cells derived from all tested patients (P1-P4) displayed a diminished calcium response, which was reduced in amplitude at intermediate and high densities of stimulatory anti-CD3 antibodies (Fig 3, E). This indicates a role for *WDR1* in tuning TCR-proximal signaling. Differently, the later event of TCR internalization was not affected in *WDR1* mutant T cells from patients P1 to P4 (see Fig E2, C). A recent study reported a defect in anti-CD3 antibody-evoked T-cell proliferation in a patient carrying a *WDR1* mutation.<sup>5</sup> Our analysis of T-cell proliferation from peripheral blood collected at different time points showed inconsistent anti-CD3 antibody-evoked proliferation rates, varying from reduced to normal values (see Fig E2, D). In addition, the *WDR1* mutations affected neither the ability of T cells expanded from the blood of patients P1 to P4 to migrate in response to CXCL12 (see Fig E2, E) nor the capacity of purified CD8<sup>+</sup> T cells to kill target cells (see Fig E2, F). Together, our data suggest that *WDR1* deficiency only mildly affects the development and TCR activation of T lymphocytes.

#### Abnormal B-cell development in patients with *WDR1* mutations

Although *WDR1* mutations had only a limited effect on production of mature T cells in the periphery, we observed a marked phenotype in the B-cell compartment. Indeed, low B-cell counts were detected in the peripheral blood in all patients reported here (Fig 4, A and B, and see Fig E4, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Residual peripheral B cells were abnormally skewed toward the transitional B-cell stage in all 6 patients. Except for patient 5, the proportions of IgM nonswitched (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) and IgG class-switched memory (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) cells among the B-cell subset were significantly reduced. This phenotype points toward a defect in B-cell development. Indeed, there was a large accumulation of peripheral blood B cells with a CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> phenotype, which is consistent with them being transitional B cells (ie, recent bone marrow emigrants; Fig 4, A and B, and see Fig E4, A).

The paucity of memory B cells might reflect a defect during the steps of class-switch recombination or SHM.

To explore this possibility, we sequenced the CDR1-CDR3 region and analyzed the clonality of the *IGHA* or *IGHG* regions. The BCR repertoire of the 4 tested patients with *WDR1* mutations was of a restricted size, with P3 and P4 harboring an extremely clonal repertoire (Fig 4, C). These 2 patients are the oldest (21 and 24 years compared with 11 and 12 years for P1 and P2), which might indicate that the size of the BCR repertoire diminished with age. We further detected decreased SHM in B cells from the patients with *WDR1* mutations (Fig 4, C). The mechanisms underlying this observation could include CD4<sup>+</sup> T-cell lymphopenia, especially Tfh cells, impaired T-cell

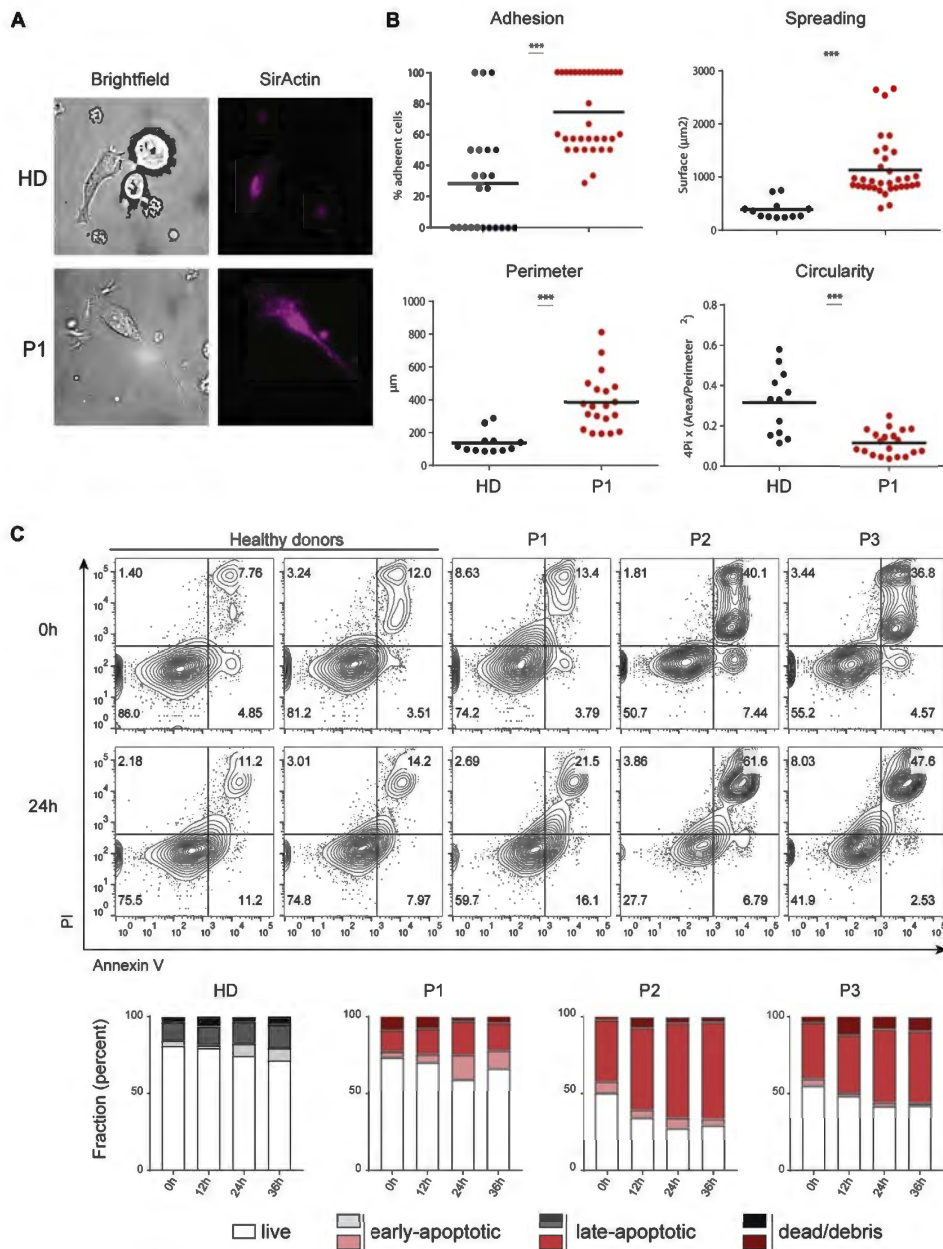
proliferation, or an intrinsic B-cell defect. However, SHM targeting (AID and Pol η motifs) and repair (transition/transversion mutation at the AT or GC locations) were normal (see Fig E4, B). This suggests no defect in the error-prone repair of mismatch repair or base excision repair that is used during SHM. The median CDR3 length was higher, but this is probably not caused by an increase in JH6 (the longest JH gene) or an increase in the number of N-nucleotides, but the number of deletions is lower in the patients (see Fig E4, C). The median CDR3 length in the switched memory B cells is higher in patients compared with control subjects, suggesting that selection for B cells with shorter CDR3 length might be impaired. The abnormal peripheral B-cell compartment might originate from an early bone marrow defect. Bone marrow biopsy specimens were available from patients P1 and P2, which allowed us to perform histologic analysis. In both patients the marrow was normocellular, with a usual topographic arrangement of slightly disrupted erythropoietic (Fig 4, D and E, and see Fig E5, A and B, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)) and myeloid precursor cells. Megakaryocytes were regularly distributed and inconspicuous. Only a few lymphocytes were discerned morphologically.

Immunohistologically, most lymphocytes were CD3<sup>+</sup> T cells with only singular CD20<sup>+</sup>/CD79a<sup>+</sup>/PAX-5<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup> B cells intermingled. However, the few B cells were mostly mature, given the fact that they were terminal deoxynucleotidyl transferase and CD10 negative. Compared with the frequency of normal B cells in age-matched control bone marrow biopsy specimens, the very low frequency of CD20<sup>+</sup> cells points to a severe reduction of bone marrow B-cell precursors.

We then reasoned that the paucity of B-cell precursors in the bone marrow and the reduced ability of the B cells that reach the periphery to differentiate and generate a diversified BCR repertoire could result either from intrinsic BCR signaling defects, motility defects affecting tissue localization and homing, or reduced survival. To test these possibilities, we used B-LCLs generated from the few B cells collected from the peripheral blood of the patients. After stimulation with anti-IgA/IgG/IgM and CpG, B cells from patients with *WDR1* mutations displayed increased adhesion, as determined based on the proportion of cells spreading (Fig 5, A). Strikingly, the morphology of the patients' B cells spreading over anti-IgA/IgG/IgM and CpG was characterized by an increased emission of multiple thin protrusions. In agreement with the role of *WDR1* in actin turnover, examination of the actin cytoskeleton by using TIRF microscopy of cells prestained with SiR-actin revealed an increased density of polymerized actin at the ventral plane of the cells. Accordingly, the cells carrying *WDR1* mutations displayed a very tight adhesion to the substratum, as observed by using IRM. This propensity of the *WDR1*-mutated B cells to spread resulted in a much wider surface and perimeter than control cells and a reduced circularity (Fig 5, B).

We then assessed the ability of the B-LCLs from patients with *WDR1* mutations to migrate directionally. When exposed to a CCL19 gradient, the *WDR1*-mutated B cells migrated normally along the gradient, as assessed by using the forward migration index (see Fig E6 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). This suggests that the *WDR1*-related defect of B cells is restricted to the BCR.

We next investigated whether these B cells might be abnormally prone to apoptosis on BCR/TLR stimulation. B-LCLs from patients P2 and P3 displayed spontaneous



apoptosis, as highlighted by the high proportion of late apoptotic cells (propidium iodide–positive Annexin V<sup>+</sup>) before stimulation (Fig 5, C). The proportion of late apoptotic cells further increased on BCR/TLR stimulation. Although B cells from patient P1 appeared less affected, we noted an increased rate of both early and late apoptotic cells after 24 hours of stimulation.

Collectively, these data highlight the key role of WDR1 in the development and activation of B cells. They further indicate that WDR1 is required for BCR-mediated activation and survival.

## DISCUSSION

Here we identified 6 patients from 3 consanguineous families carrying novel *WDR1* biallelic missense mutations leading to defective expression of WDR1 in immune cells. In addition to recently described alteration of myeloid cell morphology and function in the context of WDR1 deficiency,<sup>43</sup> our study unravels a previously unappreciated role of WDR1 in lymphocyte activation and development.

The discovery of a number of PIDs caused by deficiency or molecular alteration of actin cytoskeletal remodeling proteins has allowed us to gain insight into the key role of actin cytoskeletal dynamics in supporting immune cell function.<sup>3</sup> In this context the characterization of patients carrying *WDR1* mutations provides a unique insight into a yet poorly studied facet of actin cytoskeletal dynamics in control of leukocyte development, activation, and function.

A hallmark of *WDR1*-mutated leukocytes appears to be the assembly of aberrant actin structures. This applied to T- and B-cell immunologic synapses, as well as to neutrophils and monocytes. Of interest, these structures were specific to each cell subset and were interfering with distinct cellular processes. WDR1-mutated lymphocytes displayed defective activation or survival on antigen receptor triggering, which appeared to be related to abnormal actin turnover at the synapse. Monocytes displayed aberrant spreading in relationship with the assembly of numerous podosome-like structures. Neutrophils appeared to be affected predominantly in their migratory capacity as a probable consequence of the loss of their morphologic integrity. These observations point to a rather selective role of WDR1 in sustaining specific actin-related processes in distinct leukocytes.

The most severe cellular defect identified in our cohort of patients with *WDR1* mutations was a profound B-cell lymphopenia mirrored by low B-cell precursor counts in the bone marrow. In apparent contrast, the few B cells detected in bone marrow were mature B cells, whereas the peripheral B-cell compartment was skewed toward an immature transitional B-cell stage. This might result from a premature release of immature B cells from the bone marrow, as shown in patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), another disorder of the actin cytoskeleton.<sup>35</sup> Therefore, for the first time, our study identifies WDR1 as a key actin regulator required for B-cell differentiation. Applying TIRF and IRM microscopy to patient-derived B cell lines, we further observed aberrant activation on BCR/TLR stimulation, leading to multiple actin-rich filopodia associated with elongated B-cell synapse morphology. This is in line with previous studies showing that BCR stimulation depends on actin depolymerization<sup>36</sup> and that cofilin-evoked actin severing is key to BCR-induced synapse formation.<sup>37</sup> The prominent effect of WDR1 deficiency on development of the B-cell compartment might be explained by a role in tonic BCR signaling, a process that depends on actin dynamics and is crucial

for the survival of developing B cells.<sup>38</sup> Indeed, we identified an increased apoptosis rate in B-LCLs derived from patients with *WDR1* mutations on BCR stimulation. We suspect that the B-lymphocyte defects associated with WDR1 deficiency might underlie some of the clinical manifestations, in particular the recurrent infections.

The consequences of the identified *WDR1* mutations on generation of the T-cell compartment appeared less prominent than on generation of the B-cell compartment. Thus, with the exception of Tfh cells, normal proportions of the main T-cell subsets were present in the peripheral blood of the patients from our cohort. The selective reduction in numbers of Tfh cells is likely a consequence of the B-cell deficiency because Tfh cells require B cells for their differentiation and survival.<sup>39</sup> On stimulation with immobilized anti-CD3 antibodies, mature T cells from the patients displayed increased spreading and aberrant actin-rich structures that most probably result from a defect in actin turnover. Such a defect might affect predominantly Arp2/3-driven actin branching and lamellipodia assembly by limiting the availability of actin monomers and capped actin oligomers. In contrast, formin-driven actin filament elongation might be affected to a lesser extent, and its activity would become dominant over that of Arp2/3.

In agreement with this hypothesis, we observed aberrant assembly of long actin filaments, either organized radially and pointing outward or organized as arcs forming a circular belt around the synapse. In agreement with those observations, activation of patients' T cells over a membrane bilayer presenting recombinant ICAM-1 and anti-CD3 antibodies resulted in reduced calcium influx. However, WDR1 deficiency was not consistently associated with reduced anti-CD3–evoked T-cell proliferation, pointing to a rather mild role in TCR-driven activation compared with other PID-associated actin regulators, such as Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) or dedicator of cytokinesis 8.<sup>40,41</sup> Coronin 1A–mediated actin depolymerization has been shown to facilitate lytic granule delivery in natural killer cells.<sup>42</sup> In our study, however, the identified *WDR1* mutations did not appear to cause a defect in T cell–mediated cytotoxicity in expanded peripheral blood T cells. These observations call for a further exploration of the molecular mechanisms controlling actin depolymerization in the context of the cytotoxic activity of natural killer and CD8<sup>+</sup> T cells.

Our report expands the phenotypic spectrum of WDR1 deficiency, which comprises marked defects of both innate and adaptive immunity, resulting in severe autoinflammation, predisposition to autoimmunity, and compromised B-cell function. Different from WASP deficiency,<sup>43</sup> the prototypical actin-related PID, thrombocytopenia was inconsistent and platelet volume was normal in patients with *WDR1* mutations. Eczema, a typical manifestation of WAS, was also absent in these patients. However, the recurrent skin infections were reminiscent of those observed in patients with WAS. The characteristic auto-inflammatory manifestations of the patients with *WDR1* mutations are distinct from those of patients with WAS, whereas the autoimmune clinical presentation overlaps between the 2 disease entities. Although this has not been reported yet, it appears likely that WDR1 deficiency is also associated with a greater risk of malignancy, given dysregulated actin polymerization reminiscent of the relatively high risk of myelodysplasia/acute myeloid leukemia in X-linked neutropenia caused by gain-of-function mutations in patients with WAS,<sup>44</sup> and



the impaired immune surveillance for viral and other triggers in general.<sup>45</sup> On that basis, at least for the more severely affected patients, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation might be a feasible and rational approach.

Another clinical feature consistently observed in the patients with *WDR1* mutations was mild-to-moderate intellectual disability. Gene variant analysis did not reveal any additional variant that would be shared by the patients presenting with intellectual disability and that might be related to such a clinical presentation. Chronic inflammation or repeated hospitalization periods might have contributed to intellectual disability. Given the pleiotropic expression of *WDR1*, its deficiency in the central nervous system might also result in neuronal defects. The potential role of *WDR1* in neuronal tissues will deserve further investigation in the future.

We thank Marion Gröger and Sabine Rauscher from the imaging core facility of the Medical University of Vienna. We also thank Sophie Allart, Danièle Daviaud, and Astrid Canivet from the CPTP microscopy platform of Toulouse. We are grateful to Delphine Guipouy from CPTP, Toulouse, France, and Cecilia Domínguez Conde from LBI-RUD, Vienna, Austria, for technical advice and discussion.

#### Key messages

- Deficiency of the actin regulator *WDR1* in human subjects is associated with a paucity of B-cell progenitors in the bone marrow and lack of switched memory B cells in the periphery.
- *WDR1* missense mutations lead to aberrant assembly of both T- and B-cell immunologic synapses.

#### REFERENCES

1. Blanchoin L, Boujemaâ-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* 2014;94:235-63.
2. Pollard TD. Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8.
3. Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunol Rev* 2013;256:282-99.
4. Kuhns DB, Fink DL, Choi U, Sweeney C, Lau K, Priel DL, et al. Cytoskeletal abnormalities and neutrophil dysfunction in *WDR1* deficiency. *Blood* 2016;128:2135-43.
5. Standing AS, Malinova D, Hong Y, Record J, Moulding D, Blundell MP, et al. Autoinflammatory periodic fever, immunodeficiency, and thrombocytopenia (PFIT) caused by mutation in actin-regulatory gene *WDR1*. *J Exp Med* 2017;214:59-71.
6. Voegtli WC, Madrona AY, Wilson DK. The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates Cofilin-mediated actin depolymerization. *J Biol Chem* 2003;278:34373-9.
7. Iida K, Yahara I. Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 1999;4:21-32.
8. Okada K, Obinata T, Abe H. XAIP1: a Xenopus homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J Cell Sci* 1999;112:1553-65.
9. Rodal AA, Tetreault JW, Lappalainen P, Drubin DG, Amberg DC. Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J Cell Biol* 1999;145:1251-64.
10. Okada K, Blanchoin L, Abe H, Chen H, Pollard TD, Bamberg JR. Xenopus actin-interacting protein 1 (XAIP1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J Biol Chem* 2002;277:43011-6.
11. Okada K, Ravi H, Smith EM, Goode BL. Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell* 2006;17:2855-68.
12. Ono S. Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* 2003;42:13363-70.
13. Jansen S, Collins A, Chin SM, Ydenberg CA, Gelles J, Goode BL. Single-molecule imaging of a three-component ordered actin disassembly mechanism. *Nat Commun* 2015;6:7202.
14. Kueh HY, Charras GT, Mitchison TJ, Briehner WM. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol* 2008;182:341-53.
15. Briehner WM, Kueh HY, Ballif BA, Mitchison TJ. Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of *Listeria* actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. *J Cell Biol* 2006;175:315-24.
16. Li J, Briehner WM, Scimone ML, Kang SJ, Zhu H, Yin H, et al. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat Cell Biol* 2007;9:276-86.
17. Kile BT, Panopoulos AD, Storzaker RA, Hacking DF, Tahatmouni LH, Willson TA, et al. Mutations in the cofilin partner Aip1/Wdr1 cause autoinflammatory disease and macrothrombocytopenia. *Blood* 2007;110:2371-80.
18. Liu LJ, Zhang XY, He N, Liu K, Shi XG, Feng T, et al. Genetic variation in *WDR1* is associated with gout risk and gout-related metabolic indices in the Han Chinese population. *Genet Mol Res* 2016;15.
19. Qi D, Wu B, Tong D, Pan Y, Chen W. Identification of key transcription factors in caerulein-induced pancreatitis through expression profiling data. *Mol Med Rep* 2015;12:2570-6.
20. Xu H, Chen Y, Tan C, Xu T, Yan Y, Qin R, et al. High expression of *WDR1* in primary glioblastoma is associated with poor prognosis. *Am J Transl Res* 2016;8:1253-64.
21. Salzer E, Cagdas D, Hons M, Mace EM, Garncarz W, Petronczki OY, et al. RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. *Nat Immunol* 2016;17:1352-60.
22. Ozen A, Comrie WA, Ardy RC, Dominguez Conde C, Dalgic B, Beser OF, et al. CD55 deficiency, early-onset protein-losing enteropathy, and thrombosis. *N Engl J Med* 2017;377:52-61.
23. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;46:310-5.
24. Magi A, Tattini L, Palombo F, Benelli M, Gialluisi A, Giusti B, et al. H3M2: detection of runs of homozygosity from whole-exome sequencing data. *Bioinformatics* 2014;30:2852-9.
25. Schiefer AI, Kornauth C, Simonitsch-Klupp I, Skrabs C, Masel EK, Streubel B, et al. Impact of single or combined genomic alterations of TP53, MYC, and BCL2 on survival of patients with diffuse large B-cell lymphomas: a retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e2388.
26. Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* 2002;17:157-66.
27. de Jong BG, Ujspeert H, Marques L, van der Burg M, van Dongen JJ, Loos BG, et al. Human IgG2- and IgG4-expressing memory B cells display enhanced molecular and phenotypic signs of maturity and accumulate with age. *Immunol Cell Biol* 2017;95:744-52.
28. Axmann M, Schutz GJ, Huppa JB. Single molecule fluorescence microscopy on planar supported bilayers. *J Vis Exp* 2015;(105):e53158.
29. Ikinciogullari A, Kendirli T, Dogu F, Egin Y, Reisli I, Cin S, et al. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr* 2004;46:125-30.
30. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997;130:388-93.
31. Stiehm ER, Fudenberg HH. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics* 1966;37:715-27.
32. Puissant-Lubrano B, Peres M, Apoll PA, Congy-Jolivet N, Roubinet F, Blancher A. Immunoglobulin IgA, IgD, IgG, IgM and IgG subclass reference values in adults. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:e359-61.
33. Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* 2003;13:376-85.
34. Murugesan S, Hong J, Yi J, Li D, Beach JR, Shao L, et al. Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *J Cell Biol* 2016;215:383-99.
35. Castiello MC, Bosticardo M, Pala F, Catucci M, Chamberlain N, van Zelm MC, et al. Wiskott-Aldrich Syndrome protein deficiency perturbs the homeostasis of B-cell compartment in humans. *J Autoimmun* 2014;50:42-50.
36. Hao S, August A. Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Mol Biol Cell* 2005;16:2275-84.
37. Freeman SA, Lei V, Dang-Lawson M, Mizuno K, Roskelley CD, Gold MR. Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *J Immunol* 2011;187:5887-900.

38. Mattila PK, Batista FD, Treanor B. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: an emerging concept in tuning receptor signaling. *J Cell Biol* 2016;212:267-80.
39. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, et al. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:993-1006.e1.
40. Molina JJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* 1993;151:4383-90.
41. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, et al. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1289-302.e4.
42. Mace EM, Orange JS. Lytic immune synapse function requires filamentous actin deconstruction by coronin 1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:6708-13.
43. Candotti F. Clinical manifestations and pathophysiological mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Clin Immunol* 2018;38:13-27.
44. Vandenberghe P, Beel K. Severe congenital neutropenia, a genetically heterogeneous disease group with an increased risk of AML/MDS. *Pediatr Rep* 2011;3(suppl 2):e9.
45. Hauck F, Voss R, Urban C, Seidel MG. Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:59-68.e4.

## METHODS

### Case reports

Patient P1 (8 years old, male sex) born to consanguineous parents was admitted to the hospital with fever, diarrhea, aphthous stomatitis, and pneumonia at 8 years of age. Past medical history revealed that he had recurrent fever with vomiting, diarrhea, aphthous stomatitis, and hypokalemia occurring every 4 to 6 months, and although anti-thrombocyte antibodies were not studied, he was given a diagnosis of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura at 2.5 years of age. On physical examination, mild intellectual disability and muscle weakness with positive Gowers sign were noted. Laboratory investigations showed chronic thrombocytopenia and an acute decrease in lymphocyte counts with increased neutrophil counts and acute-phase reactants during febrile episodes, which were triggered by infections every 4 to 6 months. *Candida albicans* was isolated from his aphthous lesions. Low IgG levels with B-cell lymphopenia were observed (Table II). Anti-rubella, anti-tetanus, and anti-diphtheria antibodies were positive, and results for anti-HB antibodies were negative. Anti-thyroglobulin and anti-TPO autoantibody results were also positive. At age 8 years, the Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised test performed for evaluation of mental development and revealed a verbal IQ score of 72, a performance IQ score of 84, and a total IQ score of 75. Cranial magnetic resonance imaging results were normal, and results of muscle biopsy was consistent with noninflammatory myopathy. During follow-up, he responded well to fluconazole and trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis with intravenous immunoglobulin replacement. The patient is currently stable and is being evaluated for bone marrow transplantation.

Patient P2 (12 years old, female sex) was admitted to the hospital with fever, growth retardation, and finger abscess at age 8 years. Past medical history was significant for recurrent pneumonia, bronchiectasis, aphthous stomatitis, and viral encephalitis. Having consanguineous parents, her family history revealed that she had 2 brothers with the same symptoms (Fig 1, E). She exhibited dysmorphic facial features, including frontal bossing, hypertelorism, and wide nostrils. Severe growth retardation was noted on physical examination, but growth hormone levels were normal. Leukocytosis and anemia were detected by using a complete blood count. Immunophenotyping revealed B-cell lymphopenia. The immunoglobulin levels were within age references (Table II). Prophylactic antibiotics and intravenous immunoglobulin replacement were initiated because she had severe recurrent infections at age 9 years. During follow-up, she had multiple episodes of hospitalizations and hepatosplenomegaly and lymphadenopathies with increased acute-phase reactant levels (see Table E2). A corresponding biopsy revealed reactive lymphoproliferation. Currently, she receives intravenous immunoglobulin and prophylactic antibiotics with apparently milder symptoms with growing age.

Patients P3 (21 years old, male sex) and P4 (24 years old, male sex) are brothers of P2. P3 was evaluated at age 18 years at the dermatology unit because of disseminated ulcerated lesions in the lower extremities that appeared 7 years previously after an episode of trauma. He had facial cystic acne, a short stature, and difficulty in communication. Skin biopsy was compatible with pyoderma, but results of pustule cultures were negative. Laboratory assessment showed low IgM levels, B-cell lymphopenia, persistent leukocytosis with neutrophilia, high C-reactive protein and serum amyloid A levels (see Table E2), and fluctuating thrombocytopenia (Table II). Thorax computed tomography revealed bronchiectasis (data not shown). After starting regular intravenous immunoglobulin and Colchicum-Dispert, skin lesions improved, as did facial acne. P4 was admitted to the dermatology department at age 22 years with disseminated ulcerating purple-colored lesions causing pruritus developing on the tibial area 7 years before after trauma. Multiple cystic acne was also present on the face. Biopsy from the lesions revealed *Pyoderma gangrenosum*, and cultures were negative for bacteria and fungi. Bronchiectasis was detected on thorax computed tomography. He had the same laboratory abnormalities as his younger brother, lymphopenia, and persistent leukocytosis with polymorphonuclear leukocyte increase. Fluctuating thrombocytopenia with large platelet volume was recorded. Immunologic assessment revealed low B-cell numbers. Low IgM and IgG<sub>2</sub> levels were detected (Table II). He had persistent C-reactive

protein and serum amyloid A increases (see Table E2). Multiple antibiotic courses and dressings with intravenous immunoglobulin were administered. After beginning regular intravenous immunoglobulin (500 mg/kg) and Colchicum-Dispert, lesions were alleviated.

Patient P6 (7 years old, female sex) was born to consanguineous parents. She presented with recurrent febrile episodes every 1 to 2 months after a respiratory tract infection, together with generalized vesiculopustular lesions. Dermatologic evaluation and subsequent biopsy revealed subcorneal pustular dermatosis. She also had recurrent aphthous stomatitis and pneumonia, during which levels of acute-phase reactants remained high. Immunologic evaluation was significant for high IgA levels and low B-cell counts. She had generalized necrotic dermal lesions during the disease course. We lately discovered that her mother (patient P5 [26 years old, female sex]) had similar symptoms as her daughter. She experienced recurrent aphthous stomatitis, skin abscesses, and pneumonia.

### Neutrophil mitochondrial membrane potential

Neutrophils were isolated from peripheral blood and cultured at low density in complete RPMI medium. As a measure of mitochondrial fitness, dissipation of its membrane potential was monitored by loss of JC-1 mitochondrial aggregates (red channel; excitation/emission, 535/590 nm) and a shift toward its monomeric cytosolic form (green channel; excitation/emission, 485/530 nm). Neutrophils were loaded with JC-1 dye (3.5  $\mu\text{mol/L}$ ; Life Technologies) at 37°C for 15 minutes, washed with PBS, and analyzed by using flow cytometry at the indicated time points. Gates were applied on intact and single cells based on forward- and side-scatter features.

### Neutrophil apoptosis

Apoptosis was measured in neutrophils on spontaneous progression of cell death. At the indicated time points, cells were stained on ice with Annexin V-APC (3  $\mu\text{L}$  per 100  $\mu\text{L}$ ; BD Biosciences) and propidium iodide (1.5  $\mu\text{L}$  per 100  $\mu\text{L}$ ; BioLegend) in Annexin V binding buffer (eBioscience) for 5 minutes, topped up with an additional 200  $\mu\text{L}$  of binding buffer, and kept on ice for acquiring by means of flow cytometry. Gates were defined by comparing with apoptotic control samples treated at 65°C for 10 minutes.

### WDR1 expression in expanded T cells

Expanded T cells from patients and healthy donors were lysed in 100  $\mu\text{L}$  of RIPA buffer. WDR1 expression was analyzed as described in the main Methods section.

### TCR downregulation

P815 cells were coated with OKT3 at the indicated concentrations. CD8<sup>+</sup> T cells were purified with immunomagnetic beads and incubated with P815 cells at a 1:2 ratio for 4 hours. Cells were then stained with APC-H7-conjugated anti-CD3 and FITC-conjugated anti-TCR antibodies (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C. Expression of TCR at the CD8<sup>+</sup> T-cell surface was analyzed by using a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software.

### T-cell proliferation

PBMCs were labeled with eFluor 450 violet proliferation dye (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. T-cell proliferation was assessed after 72 hours of stimulation with either soluble anti-CD3 antibody (1  $\mu\text{g/mL}$ , clone OKT3; eBioscience) plus anti-CD28 antibody (1  $\mu\text{g/mL}$ , clone CD28.2; eBioscience) or anti-CD3/CD28 antibody-coated Dynabeads (Sigma-Aldrich). Dilution of the proliferation dye was recorded on a BD Fortessa cytometer and analyzed with FlowJo X software.

### T-cell migration

Ninety-six-well transwell plates (5- $\mu\text{m}$  pore size; Corning) were used to assess T-cell migration in response to CXCL12. Expanded T cells were harvested and resuspended in serum-free RPMI 0.5% BSA medium at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL. Fifty microliters of cell suspension was loaded on the top of the transwell filter, whereas 150  $\mu\text{L}$  of CXCL12 (PeproTech, Rocky

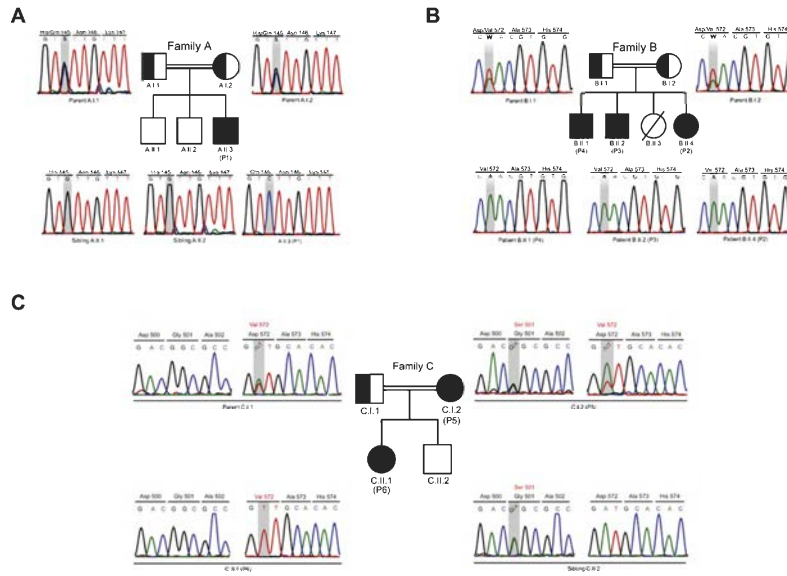
Hills, NJ) solution was added to the lower chamber at the indicated concentrations. After 4 hours of incubation at 37°C, transmigrating cells were collected and analyzed as described in the main Methods section.

#### **T cell-mediated cytotoxicity**

Green fluorescent protein-expressing P815 target cells pretreated with aphidicolin (Sigma-Aldrich) to prevent proliferation were coated with OKT3 at the indicated concentrations to assess CD8<sup>+</sup> T-cell cytotoxic function. CD8<sup>+</sup> T cells purified with immunomagnetic beads (MagneSort Human CD8<sup>+</sup> T-cell Enrichment Kit) were added to the green fluorescent protein-P815 target cells at a ratio of 1:1 for 4 or 24 hours, as indicated. After incubation, 150  $\mu$ L of the respective cell suspensions was transferred to a 96-well plate, and 50  $\mu$ L of a 10% 7-aminoactinomycin D solution (BD PharMingen) was added to each well. Analysis of residual target cell numbers was performed by using a Fortessa flow cytometer equipped with an automated plate reader device (BD Biosciences).

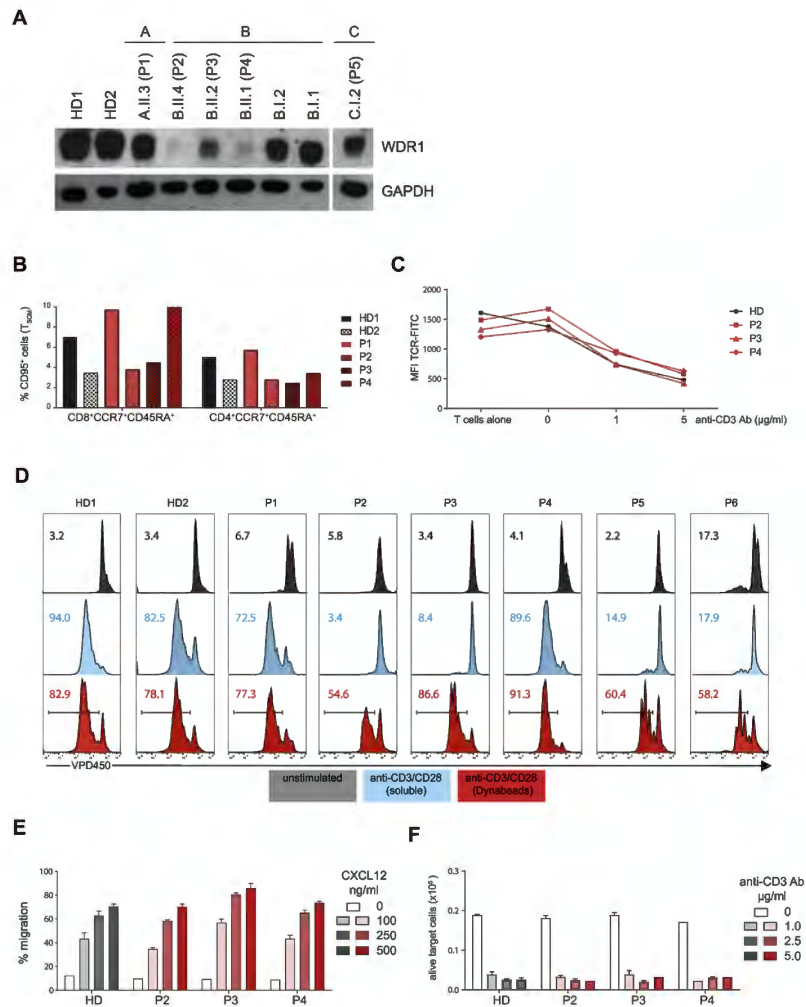
#### **Chemotaxis of B-LCLs**

Cells ( $10^5$  B-LCLs in 6  $\mu$ L of culture medium) were loaded into the central transversal channel of Ibitreat 3D Chemotaxis  $\mu$ -slides (ibidi), coated with 5  $\mu$ g/mL fibronectin, and incubated at 37°C for 30 minutes to allow cell attachment. A CCL19 gradient (0–200 ng/ml) was created, according to the manufacturer's instructions. Additional slides were prepared in parallel with a 10% dextran-FITC solution to verify gradient linearity and stability. Analysis of fluorescence intensity profiles showed that linear gradients were established within 3 hours and were stable over 24 hours. Slides were positioned in an Apotome microscope (Zeiss) equipped with a  $\times 5/0.15$  NA objective and with controlled temperature and CO<sub>2</sub> conditions. Recording of cell migration was initiated 5 hours after seeding and lasted for 14 hours at a rate of 1 image every minute. Obtained images were treated and binarized by using Image J software, and migration tracks were obtained by using the TrackMate plugin of the FIJI software. Only tracks lasting more than 20 minutes were considered. Chemotaxis plots and Forward Migration Index (FMI-Y) were obtained with the Chemotaxis and Migration tool from ibidi.

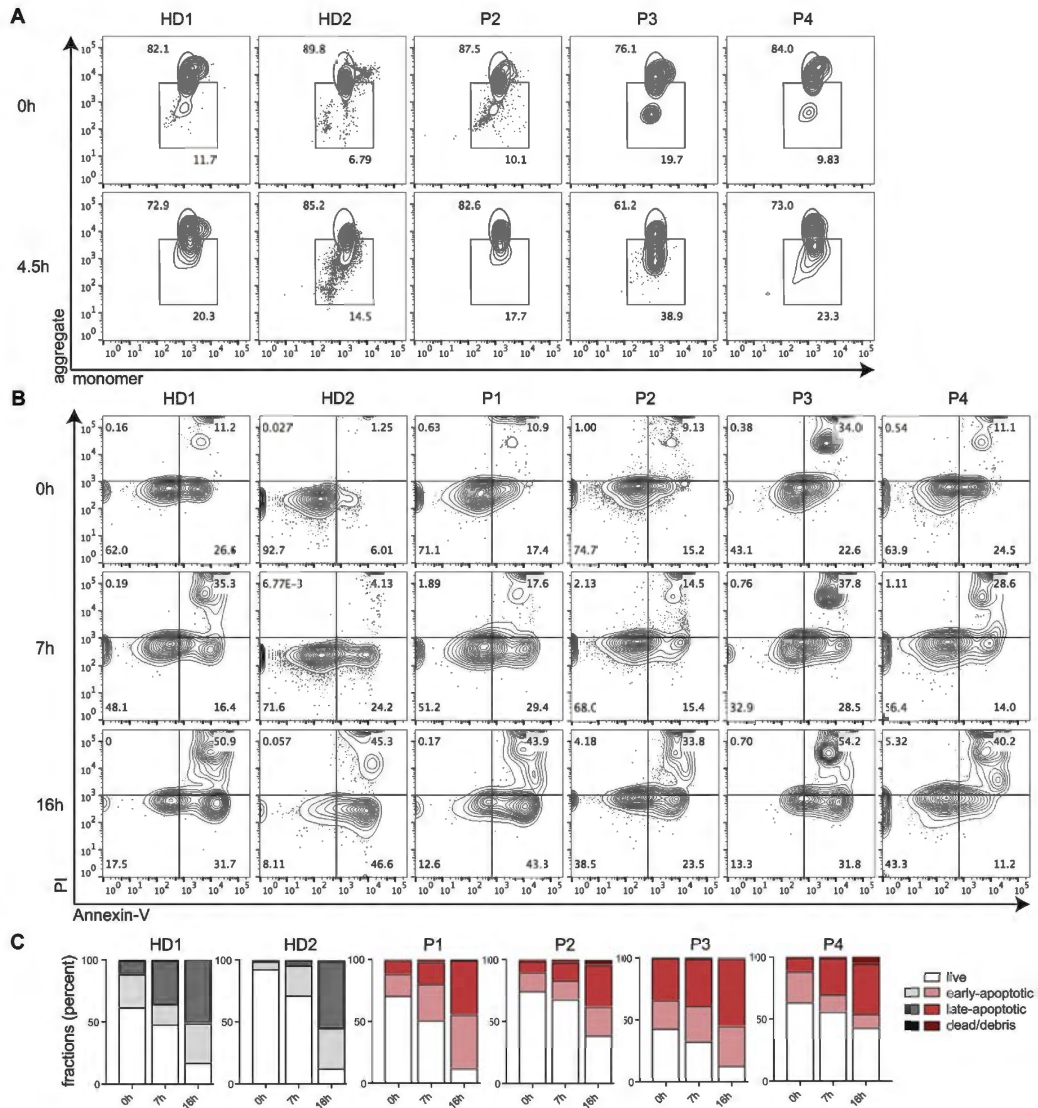


**FIG E1.** Segregation of *WDR1* variants in core pedigrees. **A**, Pedigree of family A and Sanger sequencing of *WDR1* at position 145-147. DNA sequences correspond to the antisense strand. **B**, Pedigree of family B and Sanger sequencing of *WDR1* at position 572-574. DNA sequences correspond to the antisense strand. **C**, Pedigree of family C and Sanger sequencing of *WDR1* at positions 500-502 and 572-574. DNA sequences correspond to the sense strand.

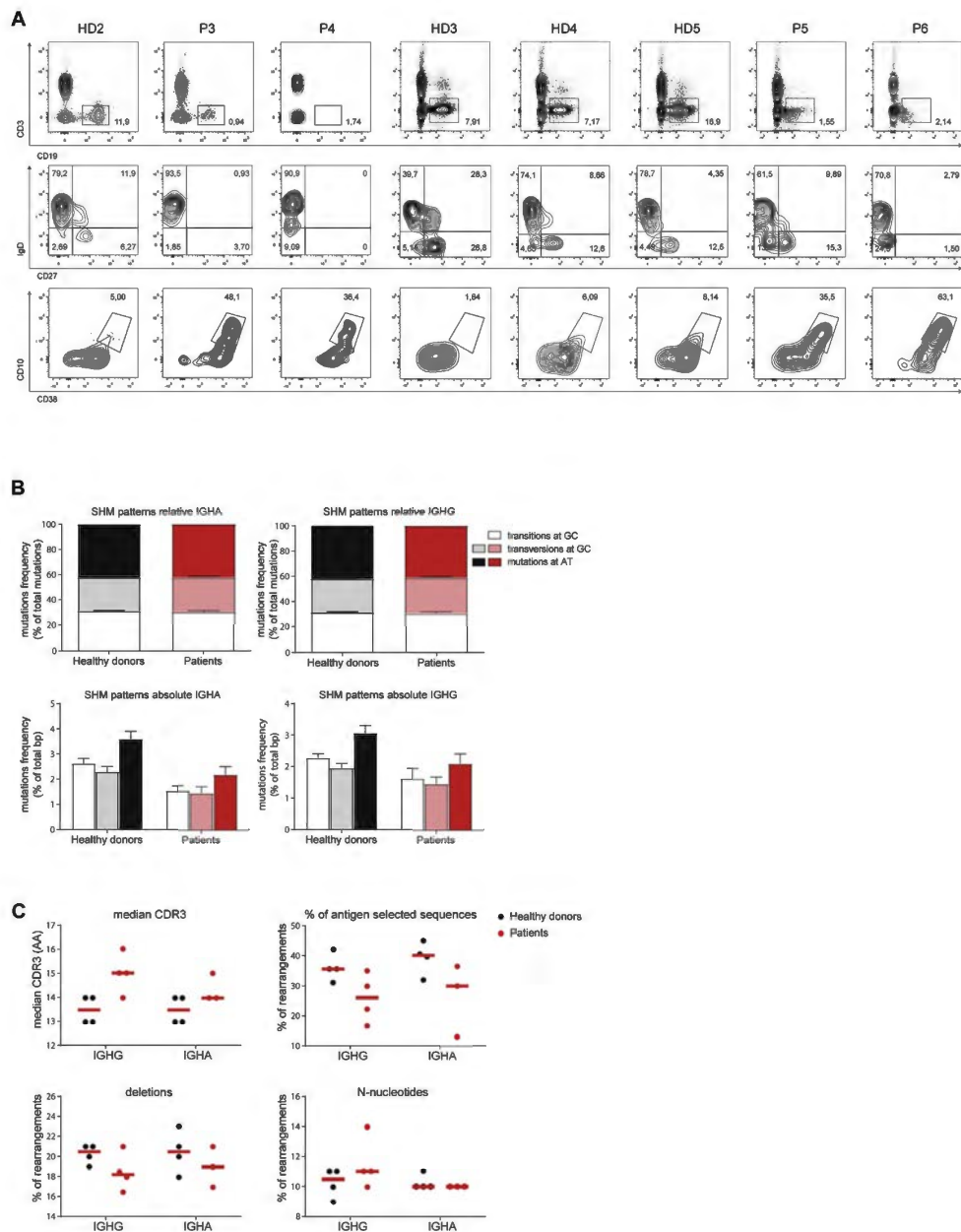




**FIG E2.** T-cell parameters in patients carrying *WDR1* variants. **A**, Representative Western blot analysis of *WDR1* expression in lysates from expanded T cells derived from 2 healthy donors, patients P1 to P5, and parents of patients P2 to P4. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) is shown as a loading control. **B**, Flow cytometry-based quantification of the proportion of the stem memory T-cell subset in PBMCs from healthy donors and patients. **C**, TCR downregulation assessed by using flow cytometry after stimulation with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody for 1 hour. **D**, Analysis of T-cell proliferation after 72 hours of stimulation of PBMCs with soluble anti-CD3/CD28 antibody or bead-coated anti-CD3/CD28 antibody. **E**, Proportion of expanded T cells that migrated in 4 hours across a transwell membrane in response to the indicated concentrations of CXCL12. **F**, Residual number of PB15 target cells after 24 hours of incubation with purified CD8<sup>+</sup> T cells from a healthy donor and patients P1 to P4 at a 1:1 ratio. PB15 cells had been coated previously with the indicated concentrations of anti-CD3 antibody to stimulate CD8<sup>+</sup> T-cell lytic activity. *HD*, Healthy donor.

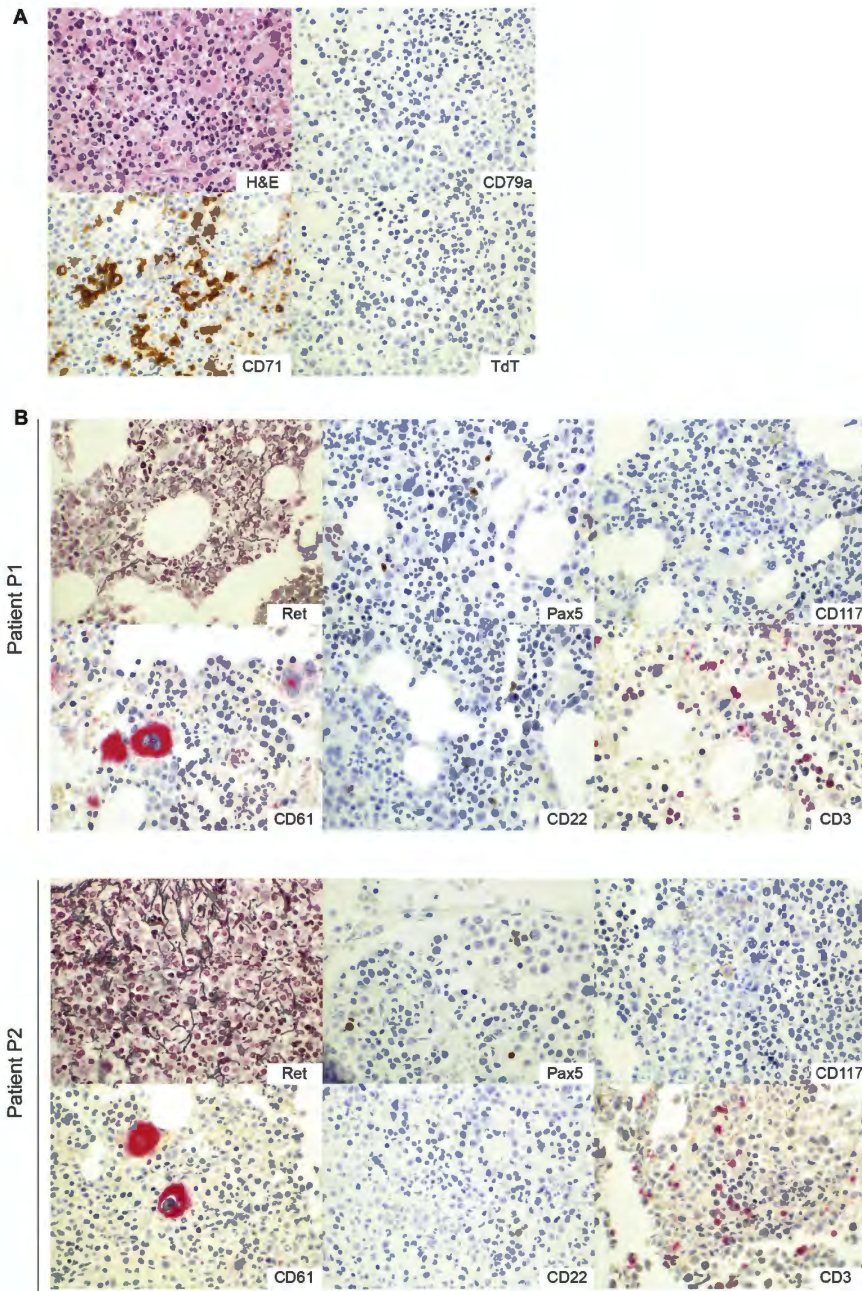


**FIG E3.** Mitochondrial membrane potential and apoptosis in neutrophils from patients carrying *WDR1* variants. **A**, Mitochondrial membrane potential monitored by using flow cytometric staining of JC-1 in neutrophils from 2 healthy donors and patients P2 to P4 on isolation and after 4.5 hours in complete RPMI medium. **B**, Apoptosis in neutrophils from 2 healthy donors and patients P1 to P4, as determined by staining for Annexin V and propidium iodide, after 0, 7, or 16 hours of incubation in complete medium. **C**, Quantification of apoptosis determined by staining for Annexin V and propidium iodide. *HD*, Healthy donor.

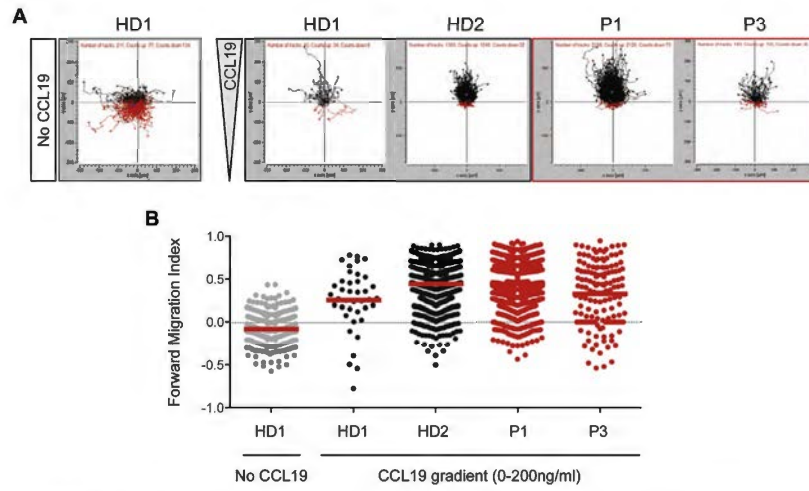


**FIG E4.** SHM patterns in B cells from patients carrying *WDR1* variants. **A**, Representative flow cytometric dot plots of the analysis of B-cell subsets in PBMCs from 4 healthy donors and patients P3 to P6. Data stem from 2 distinct experiments (experiment 1: HD2, P3, and P4; experiment 2: HD3 to HD5 and P5 to P6). **B**, Relative frequencies of transitions and transversions at GC and mutations at AT are shown as mean values for 4 healthy donors and patients P1 to P4. **C**, CDR3 length and proportions of antigen-selected sequences, deletions, and N-nucleotide rearrangements are shown for 4 healthy donors and patients P1 to P4.





**FIG E5.** Bone marrow histology. **A,** Immunohistochemistry staining for hematoxylin and eosin (*H&E*), CD71, CD79a, or terminal deoxynucleotidyl transferase (*TdT*) in the bone marrow from patient P2. **B,** Immunohistochemistry staining for reticulin (*Ret*), Pax5, CD117, CD61, CD22, and CD3 in bone marrow from patients P1 and P2.



**FIG E6.** Migration toward CCL19 in B-LCLs from patients carrying *WDR1* variants. **A**, Tracks of B-LCLs from 2 healthy donors and patients P1 and P3 exposed to a gradient of CCL19. **B**, Directional migration of individual cells assessed as the forward migration index along the axis coincident with orientation of the CCL19 gradient.

**TABLE E1.** Hematologic values pertaining to anemia

Family Patient	A		B						C			
	1		2		3		4		5		6	
Date	8/2014	3/2017	9/2014	8/2016	8/2014	3/2017	8/2014	3/2017	2/2016	12/2017	1/2016	12/2016
Hemoglobin (g/dL)	8.7	11.5	8.0	7.9	5.83	13.7	9.61	13.8	9.6	11.8	9.6	9.7
MCV (fL)	71.6	78.5	49	47.9	50.9	78.3	65.6	84.2	71.1	72.5	66	66.2
RDW (%)	13.8	15	24.6	23.1	20	13.9	18.5	13	16	15.5	19.9	18.9
Reticulocyte (%)	0.8	0.95	2.4	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.8	2
Direct coombs	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	Negative	NA	NA	NA	NA	Negative	Negative
Ferritin (ng/mL)	NA	37.5	11.8	13.1	6.23	66.11	22	83	NA	NA	28.9	NA
Total iron (μg/dL)	16	51	6	8	12	47	13	24	NA	NA	12	NA
Total iron-binding capacity (μg/mL)	169	398	264	303	395	380	273	304	NA	NA	295	NA
Transferrin saturation (%)	NA	NA	2	2	3	12.3	4.7	7.8	NA	NA	4	NA

NA, Not available/applicable; RDW, red cell distribution width.

**TABLE E2.** Febrile episodes and concomitant biological parameters in patients 1, 2, and 6

Family	A		B		C	
	1	1/2017	2	2	6	6
Patient	1		2		6	
Date	2/2014	1/2017	9/2014	12/2016	1/2016	12/2016
Body temperature during representative febrile episodes (°C)	38.5	38.8	38.0	39.0	38.5	38.2
Leukocyte count (cells/ $\mu$ L)	20,330 (4,500-10,500)	18,460 (4,500-10,500)	15,410 (4,500-10,500)	13,910 (4,500-10,500)	13,910 (4,500-10,500)	24,820 (4,500-10,500)
Lymphocyte count (cells/ $\mu$ L)	830 (1,500-7,000)	1,250 (1,500-7,000)	4,230 (1,500-7,000)	1,360 (1,500-7,000)	1,360 (1,500-7,000)	1,420 (1,500-7,000)
Neutrophil count (cells/ $\mu$ L)	18,020 (1,500-8,000)	15,810 (1,500-8,000)	9,860 (1,500-8,000)	11,670 (1,500-8,000)	11,670 (1,500-8,000)	22,470 (1,500-8,000)
Hemoglobin (g/dL)	9.7 (11-16)	13 (11-16)	8.6 (11-16)	7.6 (11-16)	9.6 (11-16)	11.3 (11-16)
Thrombocyte count (cells/ $\mu$ L)	27,000 (15,000-400,000)	47,000 (15,000-400,000)	284,000 (15,000-400,000)	406,000 (15,000-400,000)	213,000 (15,000-400,000)	117,000 (15,000-400,000)
Ferritin (ng/mL)	236 (7-140)	347 (7-140)	11.8 (7-140)	20.1 (7-140)	28.9 (7-140)	NA
Fibrinogen (mg/dL)	575 (200-400)	NA	NA	405 (200-400)	281 (200-400)	NA
SA-A (mg/L)	140 (0-6)	>216 (0-6)	NA	190 (0-6)	12.8 (0-6)	190 (0-6)
CRP (mg/dL)	12 (<0.5)	5.5 (<0.5)	8.23 (<0.5)	14.9 (<0.5)	10.24 (<0.5)	14.09 (<0.5)
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	55	100	39	28	67	91
Specific clinical features accompanying febrile episodes	Aphthous stomatitis, diarrhea	Aphthous stomatitis, diarrhea, vomiting	Pneumonia, otitis media, common skin abscess	Pneumonia, otitis media, typhilitis, aphthous stomatitis	Bullous skin lesions, pneumonia	Bullous skin lesions, aphthous stomatitis, pneumonia

Values in parentheses indicate normal ranges. Patients 3, 4, and 5 did not present with febrile episodes during the current clinic follow-up. Data pertaining to the occurrence of previous episodes are not available. CRP, C-reactive protein; NA, not available/applicable; SA-A, serum amyloid A.

**TABLE E3.** Homozygous genetic variants segregating within families 1 and 2 together with *WDR1* mutations

Gene	Chromosome	Genomic position	SNP ID	R	A	AA	CADD	Biological function/phenotypic effect	Variant in previous reports
<b>Family A</b>									
<i>WDR1</i>	4	10099458		G	C	H145Q	13.3	—	—
<i>WFS1</i>	4	6302816	rs35031397	C	G	L432V	23.7	Wolfram syndrome-1 is a rare and severe autosomal recessive neurodegenerative disease characterized by diabetes mellitus, optic atrophy, diabetes insipidus, and deafness (DIDMOAD). Additional clinical features can include renal abnormalities, ataxia, dementia or mental retardation, and diverse psychiatric illnesses.	Variant found in heterozygosity in patients with diabetes and deafness ( <i>WFS1</i> mutations in Spanish patients with diabetes mellitus and deafness)*
<i>MTMR1</i>	X	149895690	rs376319087	A	G	K119R	22.1	<i>MTMR1</i> might play a role in muscle formation and might represent another target for abnormal mRNA splicing in myotonic dystrophy.	—
<i>CLDN25</i>	11	113650613		G	T	Q32H	10.15	This gene encodes a member of the claudin family. Claudins are integral membrane proteins and components of tight junction strands. Tight junction strands serve as a physical barrier to prevent solutes and water from passing freely through the paracellular space between epithelial or endothelial cell sheets and also play critical roles in maintaining cell polarity and signal transductions.	—
<i>BLID</i>	11	121986544		T	C	I29M	0.008	<i>BLID</i> functions as a proapoptotic molecule through the caspase-dependent mitochondrial pathway of cell death.	—
<i>OTOP1</i>	4	4199758	rs145349079	T	C	Y268C	23.8	This gene encodes a transmembrane protein that belongs to the otopetrin domain protein family and is required for formation of otoconia and otoliths, calcium carbonate biominerals within the inner ear of mammals that are required for detection of linear acceleration and gravity.	—
<i>CPSF1</i>	8	145624679		G	C	T460S	8.967	Cleavage and polyadenylation specificity factor ( <i>CPSF</i> ) is a multisubunit complex that plays a central role in 3-prime processing of pre-mRNAs.	—
<b>Family B</b>									
<i>WDR1</i>	4	10077108		T	A	D572V	28	—	—
<i>TM4SF19</i>	3	196054442	rs188688105	G	A	T7M	2.304	The protein encoded by this gene is a member of the 4-transmembrane L6 superfamily. Members of this family function in various cellular processes, including cell proliferation, motility, and adhesion through their interactions with integrins. In human brain tissue this gene is expressed at high levels in the parietal lobe, occipital lobe, hippocampus, pons, white matter, corpus callosum, and cerebellum.	—

A, Alternative base; AA, amino acid substitution; R, reference base; SNP ID, reference single nucleotide polymorphism number.

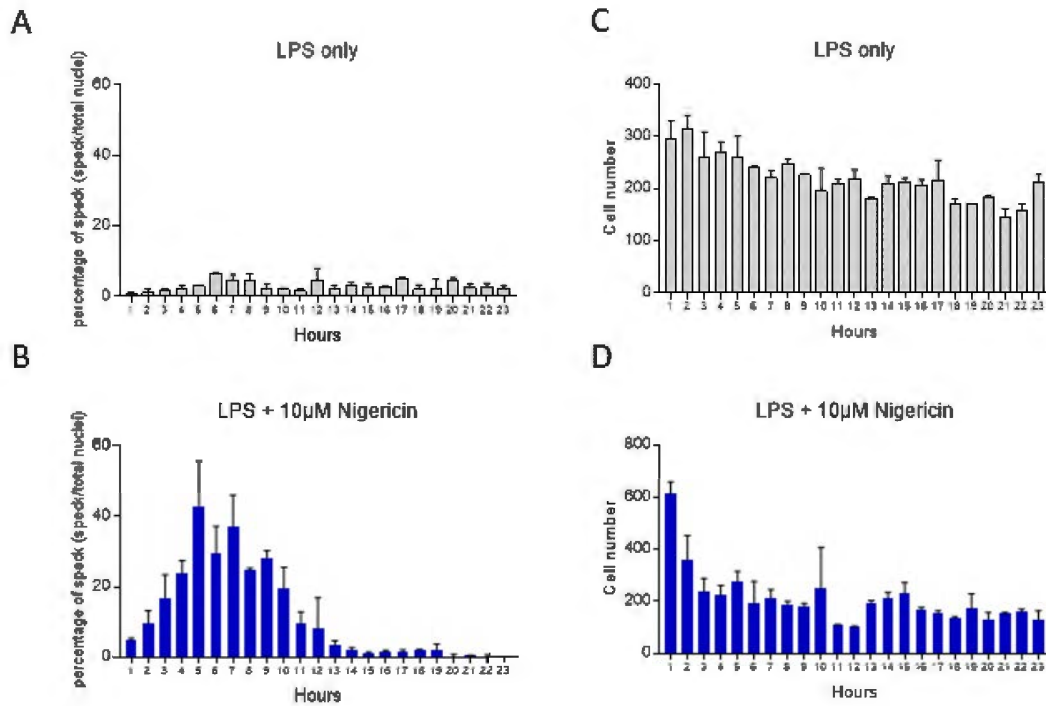
\*Domenech et al, Eur J Hum Genet 2002;10:421-6.

## **Projet #4 - InflamAct : Étude de la relation moléculaire entre le cytosquelette d'actine et l'activation des inflammasomes**

Données préliminaires

Nous avons pu voir par l'étude de la déficience en WDR1, mais également avec les déficiences en WASP, PSTPIP1 et ARPC1B, que l'absence ou la non-fonctionnalité des régulateurs du cytosquelette d'actine peuvent induire des désordres inflammatoires<sup>333,334,439,450,508,509</sup>. Outre les études démontrant que l'actine séquestre la caspase 1 par interaction avec d'autres protéines<sup>338</sup>, certains régulateurs comme PSTPIP1 ou WDR1 peuvent également interagir avec des composants des inflammasomes<sup>450,510</sup>. L'existence de telles interactions entre régulateurs d'actine et composants des inflammasomes ouvre de nouvelles possibilités d'étude pour comprendre le lien moléculaire entre les régulateurs d'actine et la formation et l'activation des inflammasomes.

Comment les cellules telles les monocytes/macrophages coordonnent remodelage du cytosquelette et mise en place de la réponse inflammatoire n'a pas encore été étudié. Afin de tester cette hypothèse, nous étudions l'impact des régulateurs d'actine sur l'activation des inflammasomes NLRP3 et pyrine, qui sont à ce jour les deux inflammasomes impactés chez les patients PID. Pour évaluer l'activation des inflammasomes, nous avons mesuré la proportion de cellules ayant formé ce que l'on nomme un « speck ASC ». En effet, la détection de la protéine ASC nous permet d'étudier les différents inflammasomes facilement, puisque cette protéine est partagée dans les différents inflammasomes. Par ailleurs, un seul speck ASC peut être formé par cellule. Pour cela nous utilisons des cellules THP1, modèle cellulaire des monocytes, modifiées génétiquement pour exprimer la protéine ASC avec un tag GFP. En effet, cela nous permet de nous libérer de l'utilisation d'un anticorps pouvant induire une variabilité de marquage entre les échantillons. C'est pour cela que nous avons utilisé une expertise expérimentale passant par l'utilisation de l'operetta, microscope à haut débit, permettant un screening de différentes drogues et cellules modifiées génétiquement. Par ailleurs, en parallèle de la formation des speck ASC, nous avons effectué un marquage de l'actine filamentaire grâce à la phalloïdine. Ainsi, nous pourrions visualiser l'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules ayant formé l'inflammasome.



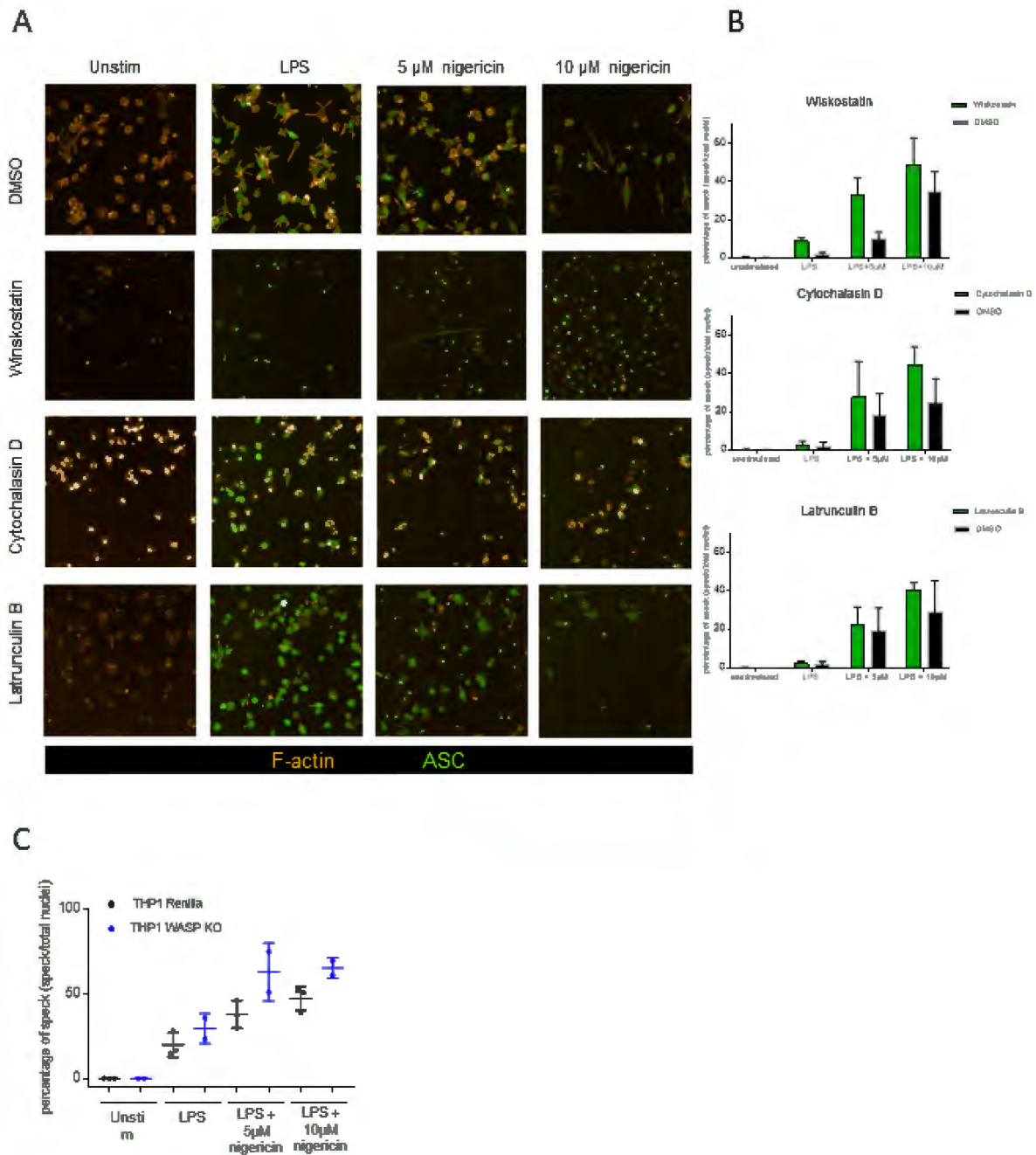
**Figure 1. Validation de la méthode d'observation des speck ASC par microscopie à haut débit. (A, B)** Analyse cinétique de la formation des speck ASC. Les cellules THP1 ont été pré-traitées pendant 4h avec 0,5µg/mL LPS. Elles ont ensuite été stimulé ou non pendant différents temps d'incubation avec une concentration de 10µM de nigéricine. Les cellules ont ensuite été fixé, marqué avec la phalloïdine puis analyse par microscopie OPERETTA. **(C,D)** Quantification du nombre de cellules analysées

Les données présentées ci-contre ont été effectuées dans le but d'étudier l'inflammasome NLRP3. Pour ce fait, la stimulation des cellules nécessite deux signaux : un premier signal d'activation TLR4 (LPS) et un second signal provenant de PAMPs, DAMPs ou cristaux (dans notre cas, nous avons utilisé la nigéricine). Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique d'activation de l'inflammasome NLRP3 au cours de 24h (figure 1), après activation de cellules THP1-ASC-GFP avec différentes concentrations de nigéricine (activateur des flux potassique). Comme nous pouvons le voir, la stimulation avec le LPS uniquement n'induit que peu d'activation de l'inflammasome NLRP3 au cours du temps (fig. 1A). D'un autre côté, l'ajout de la nigéricine après 4h de pré-traitement avec le LPS, induit la formation de speck d'ASC au cours du temps (fig. 1B). L'observation de cette analyse cinétique nous indique un pic de pourcentage d'ASC speck après 5h de stimulation (jusqu'à 40% de cellules ayant formé l'inflammasome NLRP3. Nous avons pu observer une diminution de la quantité de speck ASC après 7h de stimulation avec la nigéricine, jusqu'à atteindre un pourcentage de cellules positive similaire au traitement LPS seul. Nous avons pensé que cela pourrait être dû à une diminution de la quantité de

cellule au cours du temps, due à la mort cellulaire. Nous avons donc quantifié le nombre de cellule analysée pour chaque condition (fig. 1C, D). Bien que le nombre de cellule après 1h de stimulation diffère entre les deux conditions, nous n'observons qu'une légère diminution du nombre de cellules analysées au cours du temps, ce qui n'expliquerait pas l'absence de détection de speck ASC après 13h de stimulation.

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'impact du cytosquelette d'actine sur la formation des specks ASC. La stimulation au LPS (inducteur du premier signal activateur de l'inflammasome NLRP3) induit une augmentation de l'étalement cellulaire sur la fibronectine ainsi que l'expression de la protéine ASC (figure 2A ligne 1). L'induction du deuxième signal induit une rétractation des protrusions cellulaires ainsi que la formation de speck ASC. Lorsque les cellules sont traitées avec la wiskostatine (inhibiteur spécifique de WASP), une diminution de l'intensité d'actine est observée, ainsi qu'une absence d'étalement cellulaire (figure 2A ligne 2). Le même phénomène est observable sur les cellules traitées avec la latrunculine B (figure 2A ligne 4), bien que la diminution de l'intensité d'actine semble moins forte. Le traitement à la cytochalasine D perturbe le réseau d'actine et augmente la quantité de filament d'actine (figure 2A ligne 3), comme il l'a précédemment été montré<sup>511</sup>. Quant à l'effet des drogues sur le pourcentage de cellules ayant formé un speck ASC, nous pouvons observer une augmentation de ce pourcentage en présence des différentes drogues (figure 2B). Cela est en accord avec les précédentes études ayant démontré que le traitement avec la latrunculine B induisait une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ <sup>331</sup>, quant à la cytochalasine D, celle-ci induit une augmentation du pourcentage de speck ASC<sup>512</sup>. Outre l'importance de la dynamique du cytosquelette d'actine dans la régulation négative de la formation des specks ASC, le traitement à la wiskostatine révèle l'importance de la protéine WASP dans la régulation négative de l'activation de NLRP3.

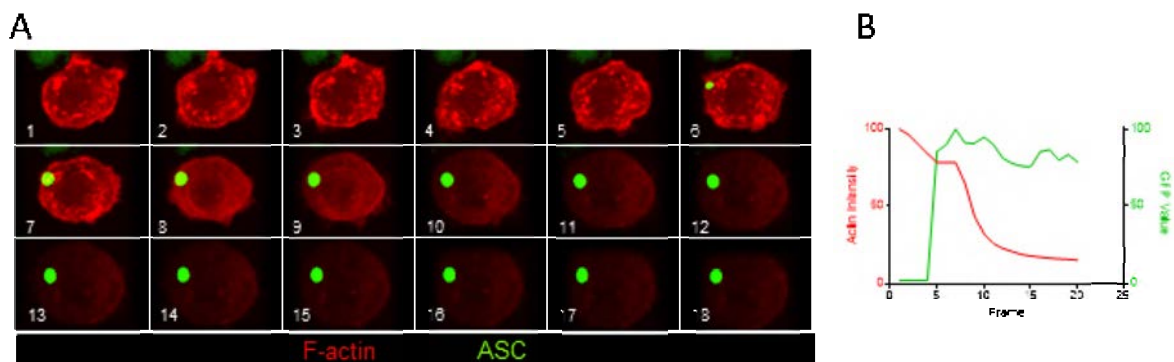




**Figure 2. Observation du lien entre cytosquelette d'actine et la formation de l'inflammasome NLRP3.** **A)** Images de l'OPERETTA de cellules THP1 traitées avec des inhibiteurs du cytosquelette d'actine (latrunculine B, cytochalasine) ou l'inhibiteur de WASP (wiskostatine). Les cellules THP1 ont été traitées pendant 4h avec 0,5 $\mu$ g/mL de LPS, puis stimulées pendant 4h avec 10 $\mu$ M/mL de nigericine en présence ou non des drogues à différentes concentrations (low, medium et high). **B)** Quantification du pourcentage de cellule ayant formé un speck ASC en présence des drogues ciblant le cytosquelette d'actine. **C)** Quantification du pourcentage de cellule ayant formé des speck ASC dans les cellules THP1 CRISPR Renilla ou WASP.



Pour confirmer l'effet de la wiskostatine sur l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous avons effectué un knock-out de la protéine WASP dans la lignée THP1-ASC-GFP, puis stimulé les cellules 4h avec du LPS puis 4h avec différentes concentrations de nigéricine (figure 2C). Nous pouvons observer une augmentation du pourcentage de cellules ayant formé un speck ASC par rapport au contrôle renilla, ce qui est en accord avec notre précédent résultat avec la wiskostatine. Par ailleurs, ce résultat est en accord avec l'observation faite dans les monocytes de patients WAS (e.g. augmentation de l'activation de NLRP3 dans les monocytes WAS déficients)<sup>333</sup>.



**Figure 3. Organisation du cytosquelette d'actine lors de la formation de l'inflammasome NLRP3. (A, B) Cinétique et analyse de l'intensité de l'actine et de la formation du speck ASC par vidéo microscopie des cellules THP1-ASC-GFP LifeAct-RFP. Chaque image est séparée de 3 secondes**

La dynamique de l'activation de l'inflammasome et son lien avec la dynamique des microfilaments est un sujet qui n'a pas encore été exploré. C'est pour cela que nous avons voulu effectuer une observation par vidéo microscopie de la cinétique d'activation de l'inflammasome NLRP3 avec la structure du réseau d'actine en parallèle (figure 3A, B). De manière intéressante, l'observation par microscopie a démontré une diminution drastique de la quantité de F-actine peu de temps après la formation du speck ASC. Par ailleurs, la formation du speck ASC est un évènement rapide (~5 sec). De plus, nous avons pu observer avant la formation du speck ASC des structures d'actine très spécifique, semblables à des points focaux d'adhésions. De manière générale, le réseau d'actine se désassemble directement après la formation du speck ASC dans les cellules stimulées.

#### Perspectives du projet InflamAct

L'ensemble de ces résultats préliminaires montre que le cytosquelette d'actine, notamment via la protéine WASP, est fortement remodelé en amont et en aval de la formation de l'inflammasome. Dans notre étude, nous n'avons étudié que l'inflammasome NLRP3, activé par le LPS et la nigéricine. L'inflammasome NLRP3 possède de multiples voies d'activation et est régulé par différentes protéines mais également des modifications post-traductionnelles<sup>513,514</sup>. La toxine nigéricine induit une déplétion du potassium cytosolique, nécessaire à l'activation de NLRP3, puisque qu'une forte concentration de potassium dans le cytoplasme bloque son activation<sup>515,516</sup>. De manière générale, la concentration de plusieurs ions est vital à l'activation de NLRP3, que ce soient les ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  ou encore  $Na^+$  et les flux ioniques sont interconnectés : ainsi s'il y a une augmentation de la concentration en sodium (par l'utilisation de cristaux d'acide urique), cela va induire une diminution de la quantité cytosolique de potassium et ainsi activer l'inflammasome NLRP3<sup>517</sup>. Une autre possibilité d'activation de NLRP3 est via des particules (cristaux d'acide urique, de la silice, de l'alun, amyloïde  $\beta$ , ou encore des cristaux calciques)<sup>517</sup>. Ces particules vont endommager les lysosomes après avoir été phagocytés, induisant un relargage du contenu lysosomal dans le cytoplasme. Cependant, le mécanisme d'activation via la dégradation des lysosomes reste encore méconnu.

Compte tenu des différentes voies d'activation de NLRP3 et des différents activateurs extracellulaires, il sera intéressant d'effectuer une analyse du rôle de WASP lorsque l'inflammasome NLRP3 est activé par d'autre ligands. Certains régulateurs du cytosquelette d'actine pourraient alors être impliqués dans certaines voies de signalisation d'activation. Pour cela, nous pourrions effectuer les mêmes expériences que celles précédemment citées en modifiant le ligand activateur du second signal (cristaux, alun, ATP). De même, la validation de l'implication des régulateurs d'actine par d'autre expérience (tel que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ou IL-18) viendrait nous conforter dans l'idée que WASP, et sûrement d'autre régulateurs d'actine, régulent les inflammasomes négativement.

Dans la même direction, puisque notre modèle cellulaire nous le permet, nous pouvons étudier l'impact du cytosquelette au cours de l'activation d'autre inflammasomes (inflammasome pyrine ou NLRP1). Ainsi par l'utilisation des activateurs spécifiques de ces inflammasomes, nous pourrions évaluer si certains régulateurs ne modulent que certains inflammasomes, ou s'ils sont impliqués dans un mécanisme commun.

D'un point de vue cellulaire, nous allons également pousser l'étude de la cinétique d'activation par vidéo microscopie de NLRP3 en présence des inhibiteurs du cytosquelette d'actine et de la wiskostatine. Par ailleurs, il a été observé au cours de ces expériences que certaines cellules ayant formé l'inflammasome contactaient d'autres cellules encore inactivées via l'émission de protrusions cellulaires fines (données non montrées). Les cellules inactivées formaient alors un speck ASC peu de temps après le contact cellulaire. Compte tenu de la capacité des macrophages à pouvoir échanger des informations via la formation de pores cellulaires<sup>518-520</sup>, il est très probable qu'un macrophage puisse passer l'information d'activation de l'inflammasome par ces mêmes pores.

Nous n'avons étudié ici que la protéine WASP dans le cadre de l'activation de l'inflammasome NLRP3. D'autres gènes sont en cours d'étude pour permettre de comprendre comment et pourquoi certains régulateurs peuvent réguler les inflammasomes. Pour cela, des protéines régulant le cytosquelette d'actine ont été sélectionnées pour que leur expression protéique soit inhibée dans la lignée THP1-ASC-GFP. Dans le cas où nous identifierons un nœud moléculaire regroupant des régulateurs d'actine proches ou impliqués dans les mêmes processus moléculaires, nous pourrions effectuer une analyse de l'interactome de ces régulateurs. Ces interactomes pourraient servir à connaître par quelle voie de signalisation les régulateurs d'actine pourraient être connectés avec les différents composants protéiques des inflammasomes. Outre les interactomes, dans le cadre du projet InflamAct, les voies de signalisation n'ont pas été étudiées jusqu'à présent. Dans le cas de l'inflammasome NLRP3, le premier signal correspond à l'activation du TLR4 par le LPS, activant ainsi la voie NF- $\kappa$ B.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## I) Vers une meilleure compréhension des rôles spécifiques et multiples des régulateurs du cytosquelette d'actine au sein des cellules immunitaires

Comme nous avons pu le voir au fur et à mesure de cette thèse, le cytosquelette est une structure cellulaire primordiale. De manière générale, l'observation du cytosquelette d'actine par microscopie me semble nécessaire pour détecter les subtilités morphologiques induites par des défauts dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Au fil des décennies, et de l'avancée technologique (voir figure 13), nous avons été capable d'observer de manière fine le réseau d'actine dans différents types cellulaires. Dans les trois études de cette thèse, l'observation par microscopie du réseau d'actine a permis d'observer les structures fines et le rôle des protéines WIP, ARPC1B et WDR1 dans l'assemblage de ce réseau complexe, et quelles structures étaient plus impactés par les mutations génétiques.

Cependant il semble nécessaire d'aller plus loin dans l'observation systématique des défauts morphologiques. En effet, la plupart des études, y compris celles présentées dans cette thèse, évaluent les structures d'actines dans des conditions spécifiques. Il est rare de retrouver une consistance expérimentale entre les publications scientifiques, dans le domaine de l'étude du cytosquelette d'actine de patient PID (variabilité dans les conditions d'évaluation de la migration, activité cytotoxique, type cellulaire étudié, etc.). Or conduire une étude systématique de l'analyse des cellules de patients par microscopie quantitative serait une source d'information importante autant d'un point de vue fondamental que d'un point de vue clinique. Il est évidemment que les modèles cellules et murins sont une source capitale et importante pour la compréhension des rôles cellulaires des régulateurs du cytosquelette d'actine. Cependant, ces modèles possèdent leur limite en ce qui concerne les conséquences *in vivo* de ces mutations. En effet, le cas de WDR1 est un parfait exemple de dissonance phénotypique entre la souris et l'homme. Les modèles murins existants n'ont pas révélé de déficience dans le compartiment lymphoïde B, présente chez les patients déficients en WDR1. C'est pour cela que l'utilisation de cellules de patients de manière optimale semble importante pour collecter des informations permettant une meilleure compréhension du rôle des régulateurs d'actine chez l'humain. Pour cela, nous pourrions nous aider de la microscopie à haut débit, déjà utilisée pour effectuer des *screening* de drogues pour étudier de nouvelles pistes thérapeutiques pour la lutte contre le cancer, ou encore l'étude de la résistance bactérienne<sup>521</sup>. L'utilisation de cette technique de microscopie, qui ne

nécessite pas beaucoup de matériel cellulaire, nous permettrait alors d'étudier les différents types cellulaires de patient, dans des conditions que l'on pourrait systématiser.

Cette systématisation de l'étude des cellules de patients nous permettrait alors d'étudier les régulateurs du cytosquelette d'actine dans les mêmes conditions, et de pouvoir comparer les différents défauts morphologiques entre les différentes PIDs, ce qui est à ce jour impossible à faire, du fait de la diversité expérimentale. Les informations que l'on pourrait recueillir permettraient alors d'identifier des gènes, ou des groupes de gènes impliqués dans le même processus morphologique (e.g. formation des filopodes, de la synapse immunologique, etc.). Par la suite, ces informations pourraient servir de références pour l'étude de nouvelles pathologies.

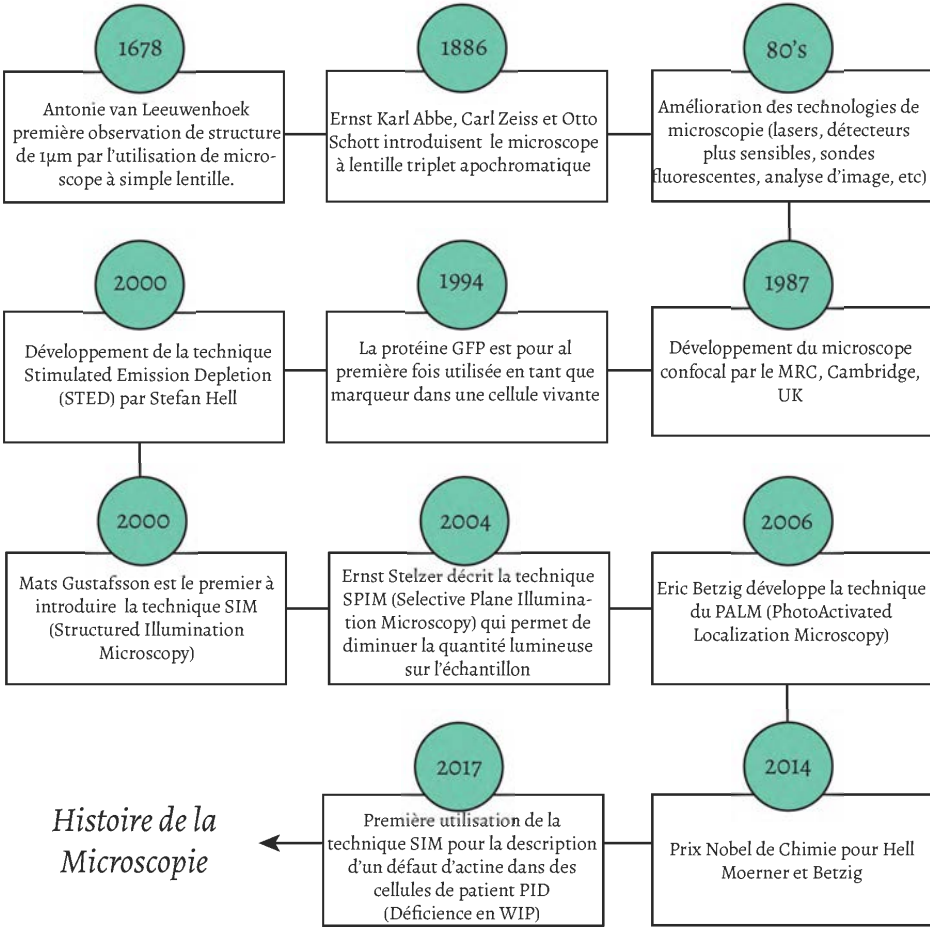


Figure 13. Évolution des techniques de microscopie

En effet, la microscopie à haut débit comme l'OPERA ou l'OPERETTA est une technique permettant d'étudier en parallèle plusieurs sous-types cellulaires dans des conditions similaires, ou au contraire étudier en parallèle différentes conditions de stimulation. De plus, l'utilisation de logiciels d'apprentissage permet une analyse automatisée des échantillons de patients. Cela pourrait permettre

la création d'une banque de données importante pour la clinique et la communauté scientifique. L'étude menée par German et collaborateur a d'ailleurs permis grâce à cette technique pour caractériser les propriétés morphologiques de la synapse immunologique dans les lymphocytes T primaires humains<sup>522</sup>.

Nous avons pu apprécier par l'étude des différentes PID que des carences en protéines contrôlant un même processus de remodelage de l'actine (polymérisation des microfilaments) induisaient des phénotypes cliniques et cellulaires distincts. Les études des déficiences en WIP, WASP et ARPC1B ont montré que les degrés de sévérité sont variables selon les fonctions cellulaires étudiées. Cela nous permet de supposer que, outre leur rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine, ces régulateurs agissent sur d'autres voies cellulaires. Les protéines WIP et WASP sont d'ailleurs de très bons exemples en matière de protéines ayant des actions sur le cytosquelette d'actine mais également sur d'autres actions cellulaires et nucléaires.

En effet, il a déjà été fait mention dans cette thèse du rôle de WASP dans le noyau des lymphocytes T et dans son implication vers la polarisation des LT ( $T_{H0}$  vers  $T_{H1}$ )<sup>355</sup>. WIP possède également d'autres fonctions que de celles de stabiliser la protéine WASP dans le milieu intracellulaire<sup>523</sup>. D'une part, WIP possède plusieurs rôles en association avec la protéine (N-)WASP, comme l'induction de filopodes, induction de la nucléation de l'actine, ou encore la sécrétion de l'IL2 dans les LTs. D'autre part WIP possède des fonctions cellulaires indépendantes de WASP, comme son interaction avec la cortactine, la profiline ou encore Nck, ou sa capacité à lier elle-même l'actine globulaire et filamentaire permettant la stabilisation du cytosquelette d'actine dans la cellule. Tout comme WASP, WIP possède une activité transcriptionnelle, plus spécifiquement sur la voie NF-AT/AP1, en association avec Vav<sup>524,525</sup>. Bien que la liaison de WIP avec WASP soit nécessaire, celle-ci n'est pas suffisante pour permettre à WIP de réguler l'activité de NF-AT/AP1. Cette régulation de l'activation de la voie NF-AT/AP1 implique une région protéique de WIP, située entre les acides aminés 121 et 237. La perte de WIP dans les LTs de patients pourrait logiquement perturber la voie NF-AT/AP1, importante pour différentes fonctions effectrices des LTs. En effet, NF-AT/AP1, en coopération avec d'autres facteurs de transcription, vont réguler l'activation de gènes clefs des LTs comme l'IL-2, NFAT2 ou encore CD25<sup>526</sup>. Bien que ces voies de régulation n'aient pas été explorées chez les patients, il semble tout légitime d'émettre l'hypothèse

que les défauts d'activation des LTs déficient en WIP peuvent également provenir de l'incapacité des protéines NF-AT et AP1 à exercer leurs fonctions.

## II) Adaptation du remodelage du cytosquelette d'actine aux fonctions particulières des différentes cellulaires immunitaires

Nous avons pu voir que dans le contexte de la déficience en WDR1, différents sous-types cellulaires étaient affectés de manière différentielle par les mutations génétiques. En effet les fonctions des neutrophiles et des lymphocytes B étaient beaucoup plus impactées par les mutations que les lymphocytes T, dont les fonctions cellulaires ne semblaient que légèrement affectées.

Si nous reprenons les connaissances que nous avons collecté concernant le partenaire protéique de WDR1, la cofiline, nous pouvons émettre des hypothèses concernant cet impact différentiel entre les cellules immunitaires. En effet, il a été démontré que la cofiline est une protéine essentielle pour la dépolymérisation des microfilaments induits par l'activation du BCR<sup>369</sup>. Or lorsque la cofiline n'est pas active dans ces cellules, les LBs présentent un défaut d'activation et d'étalement cellulaire. Puisque la protéine WDR1 agit en collaboration avec la cofiline, nous pouvons supposer que l'absence, ou l'inactivation de WDR1, pourrait induire le même type de défaut chez les patients. Cependant, contrairement aux LBs où la phosphorylation de la cofiline est inhibée et induit une diminution de la capacité d'étalement cellulaire, les LB WDR1 déficients présentent une augmentation de la capacité d'étalement.

Concernant les neutrophiles, la déphosphorylation de la cofiline est également nécessaire pour leur capacité migratoire en réponse à l'IL-8<sup>527</sup>. On pourrait alors supposer que WDR1 serait également nécessaire au même titre que la cofiline, pour permettre la migration effective des neutrophiles. Bien que l'on pourrait penser que la déphosphorylation de la cofiline soit suffisante pour permettre la migration des neutrophiles, la première étude ayant décrit la déficience en WDR1 montre que les neutrophiles de patients ont une diminution de la phosphorylation de la cofiline, indiquant son activation<sup>426</sup>. Cependant, les neutrophiles présentent toujours un défaut de migration. En regroupant les différentes études, nous pourrions supposer que la déphosphorylation de la cofiline est un évènement important à l'activité migratoire des neutrophiles, mais que WDR1 est une protéine capitale à la capacité migratoire des neutrophiles.



L'absence de défaut important dans les LTs de patients déficients en WDR1 laisse supposer qu'un mécanisme compensatoire est présent. Il est également possible que l'expression de WDR1 soit régulée différemment entre les sous types cellulaires. Ainsi, alors que WDR1 pourrait être fortement exprimé dans les LB et neutrophiles, cette protéine pourrait être exprimé de façon plus ponctuelle ou même à un niveau moindre, qui pourrait expliquer les fonctions cellulaires quasi intactes des LTs. On ne peut cependant pas exclure le rôle de WDR1 dans les LTs puisque nous avons observés un délai du flux calcique en réponse à la stimulation TCR dans les LTs de patients déficients en WDR1. Cette latence peut suggérer que les lymphocytes T des patients peuvent en effet exercer leurs fonctions effectrices, mais dans un temps plus grand que pour des cellules normales. La capacité cytotoxique des LTs CD8<sup>+</sup> n'est pas impactée par les mutations dans le gène WDR1, cependant nous ne pouvons pas exclure le rôle de la protéine dans la notion du signal d'arrêt de migration. En effet, la latence du flux calcique pourrait être le reflet d'un défaut de réception du signal stop. Le signal stop permet aux cellules d'arrêter leur migration pour interagir avec une CPA et recevoir les signaux d'activation<sup>398,528</sup>. Puisque l'étude de LTs déficient en WDR1 a démontré que la formation de la synapse immunologique était retardée (données non montrés), il est fortement probable que WDR1 soit impliqué dans la notion du signal stop, compte tenu de l'importance du remodelage d'actine pour la stabilité de la synapse. Il est également probable que WDR1 soit impliqué dans le détachement cellulaire après activation des LTs par les CPA. C'est pour cela que nous émettons l'hypothèse que WDR1 et LFA-1 pourraient être deux protéines liées moléculairement. En effet, LFA-1 est une protéine nécessaire pour la migration mais également de signal stop. Si LFA-1 doit être active lors de la migration pour interagir avec ICAM-1, c'est une intégrine qui est bloquée en conformation active ouverte lors de l'interaction LT-CPA, permettant la stabilisation de la synapse immunologique<sup>529,530</sup>. Une trop forte activation de LFA-1 induit un défaut dans le détachement cellulaire des LT après leur interaction avec une CPA. Par ailleurs, l'équipe de Buschow a analysé l'interactome de LFA-1 et a découvert de nombreuses protéines régulatrices du cytosquelette d'actine, comme WDR1<sup>531</sup>. Puisque la dynamique du cytosquelette d'actine est importante pour la migration cellulaire et l'activation de l'intégrine LFA-1, la présence de protéine de désassemblage des microfilaments comme WDR1 dans l'interactome d'LFA-1 ne semble pas inapproprié. Les auteurs ont d'ailleurs identifié d'autre protéines telle que la cofiline, qui comme nous le savons désormais, est l'interacteur de WDR1.

Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions mettre les LTs en conditions de migration en réponse à une chimiokine, et mettre en compétition cette migration avec des CPA chargées en antigène, ou anticorps anti-CD3<sup>532</sup>. Nous pourrions également évaluer par vidéo microscopie le temps nécessaire pour former la synapse immunologique<sup>400</sup>.

Il est très probable que WDR1 possède des fonctions alternatives à l'activité de *severing*. En effet, certaines protéines régulatrices du cytosquelette d'actine ont des effets dans le noyau, et induisent des modifications transcriptionnelles. Nous pouvons très bien émettre l'hypothèse, que puisque la cofiline est présente dans le noyau, alors WDR1 pourrait également être présente et tout comme WASP, exercer des activités nucléaires autre que son activité de régulation des microfilaments. En effet, une étude chez l'amibe a démontré que WDR1 était nécessaire pour la formation de *rods* d'actine, structure d'actine retrouvé dans le noyau et associé à différentes maladies telles que les maladies neurodégénératives, la maladie de Huntington ou encore la myopathie nemaline<sup>533</sup>. Ces informations nous permettent de discuter le potentiel rôle de WDR1 dans le noyau. En effet, WDR1 et la cofiline agissent conjointement pour réguler le *pool* d'actine dans le cytoplasme et permettre la dépolymérisation des filaments d'actine. On pourrait alors supposer que ce même couple protéique agit de la même manière dans le noyau.

Dans un autre registre, tout comme WASP qui est essentiel au développement des TH1, WDR1 pourrait également avoir une spécificité de lignage, et pourrait par exemple être impliqué dans des activités transcriptionnelles dans les LBs. Une de nos observations a été que selon les patients, la protéine WDR1 était tout de même induite (voir données supplémentaires). Nous pouvons alors supposer que dans le lignage T, WDR1 peut toujours être induite et exercer ses fonctions au sein des LTs.

De manière plus générale nous pouvons nous demander pourquoi, alors que les cellules immunitaires possèdent le même set de régulateurs d'actines, il existe autant de disparité morphologique. Par exemple, les cellules dendritiques vont être capable d'émettre des protrusions qui leur sont spécifiques (dendrites) qui vont nécessiter des acteurs protéiques partagées entre les cellules du système immunitaire. Il est évident que bien que les acteurs soient partagés, les cascades de signalisation, leur combinaison, leur dosage fin, leur localisation spatiale et l'activation de protéines

lignage spécifique peuvent être la clef de ces morphologies typiques. L'activation séquentielle de cascades de signalisation, ou des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine, ajoutent d'autant plus à la complexité à la compréhension des mécanismes moléculaires soutenant la formation de structures d'actine et de morphologies cellulaires variées.

### III) Mieux comprendre le rôle des régulateurs d'actine dans la mise en place de la réponse inflammatoire

Mieux connaître les modèles de régulations des inflammasomes via le cytosquelette d'actine pourrait être bénéfique pour d'autre pathologie. En effet, les immunodéficiences primaires sont parfois accompagnées d'autre déficits, comme le syndrome HLH<sup>534,535</sup>. Ce syndrome se caractérise par une activation incontrôlée du système immunitaire, plus particulièrement des lymphocytes et des macrophages, conduisant à un état sévère d'hyper inflammation chez les patients.

Le développement de maladies inflammatoires chez les patients PID est sous-jacent aux défauts immunitaires. Par ailleurs, il semble y avoir un lien entre dérégulation du cytosquelette d'actine et activation des inflammasomes. Les résultats préliminaires semblent en effet aller dans ce sens. La continuité de cette étude est nécessaire à la compréhension aussi bien fondamentale que clinique de ce lien moléculaire entre régulateurs du cytosquelette d'actine et inflammasomes. J'ai souligné précédemment les rôles décrits et potentiels de protéine telle que WIP WASP ou WDR1 dans des fonctions autres que celle de la régulation de la dynamique des microfilaments. Une hypothèse serait que les régulateurs pourraient également jouer le rôle de capteur dans les cellules capables de former un inflammasome, et pourrait induire une signalisation spécifique permettant l'activation de ces plateformes inflammatoires. Si nous supposons que les régulateurs du cytosquelette d'actine peuvent influencer sur la formation/activation des inflammasomes, l'inverse est tout aussi probable. L'étude menée par Caution *et al* a d'ailleurs démontré que les caspases 11 et 1 influent sur la phosphorylation de la cofiline, de manière distincte<sup>536</sup>. Si la caspase 11 est nécessaire à la phosphorylation de la cofiline via l'activation de la GTPase RhoA, la caspase 1 va induire sa déphosphorylation par recrutement des phosphatase SSH. L'influence des caspases sur d'autre régulateurs du cytosquelette d'actine n'a pas encore été étudié. De plus, il serait intéressant de savoir si la caspase 4 (homologue humain de la caspase 11) induit la même régulation sur la cofiline.

Une autre piste qui semble extrêmement intéressante à étudier est la cinétique d'activation des inflammasomes et la coordination entre formation de l'inflammasome et modulation de la capacité migratoire des cellules immunitaires. En effet, l'étude conduite par Li *et al* a montré que l'activation de NLRP3 dans des macrophages induisait une augmentation de la capacité migratoire de ces derniers<sup>537</sup>. L'activation de la caspase-1 est également un facteur clé à la migration de ces macrophages puisque son inhibition induit un défaut de la capacité migratoire des macrophages. Dans des modèles tumoraux, l'activation de l'inflammasome NLRP3 augmente la migration et la capacité invasive de cellules tumorales<sup>538</sup>. De manière générale, les macrophages sont des cellules capables de migrer dans les tissus. Cette migration est permise notamment par l'expression intermédiaire d'intégrine  $\beta_2$  ( $\alpha_M\beta_2$  et  $\alpha_D\beta_2$ )<sup>539</sup>. En effet, une trop grande expression d'intégrine inhibe la capacité migratoire, logiquement due à une forte capacité d'adhésion aux ligands des intégrines. Nous avons pu voir dans le chapitre 2 que les intégrines étaient reliées au cytosquelette d'actine, qui permet leur activation, mais est également impacté par la signalisation induite par les intégrines elles-mêmes une fois activées (signalisation inside-out et outside-in)<sup>540-542</sup>. Wang et collaborateur ont notamment pu démontrer que les intégrine  $\beta_2$  étaient nécessaire à l'activation de la voie non-canonique de NLRP3, qui induit l'activation de l'inflammasome par la caspase 11 chez la souris<sup>543</sup> (la voie non-canonique étant activée par la caspase 4 chez l'humain<sup>544</sup>). Les auteurs ont démontré que cette activation de NLRP3 via les intégrines  $\beta_2$  s'effectue notamment par l'activation de la voie Rac, activation la production de ROS, activateur de NLRP3.

Pour répondre à ces hypothèses supposant un lien entre la capacité migratoire et l'activation des inflammasomes, nous avons plusieurs possibilités. Il serait tout à fait possible de mettre des monocytes ou macrophages humaines dans des conditions migratoires dans des micro-canaux, et de les mettre en contact au cours de leur migration avec un activateur de l'inflammasome. Nous pourrions également pré-activer les cellules avec un activateur d'inflammasome et les mettre en conditions de migration. Quant au rôle des intégrines  $\beta_2$ , il serait intéressant d'utiliser des cellules porteuses de mutation dans le gène ITGB2, dont les mutations induisent chez l'homme un déficit d'adhérence des leucocytes (LAD en anglais)<sup>545-547</sup>.

Lorsque les cellules immunitaires activent et forment l'inflammasome, elles vont alors produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. En parallèle va s'activer la gasdermine D, qui va alors induire différentes cascades de signalisation conduisant à une mort cellulaire spéciale que l'on nomme la pyroptose.

Nous avons observé que le traitement à la wiskostatine (tout comme la délétion de WASP dans les cellules THP1) induisait une augmentation du pourcentage de cellules ayant formé un speck ASC. Par ailleurs, au cours du temps, nous avons pu remarquer qu'après la pyroptose, les specks ASC restaient dans la lumière extracellulaire. Cette « sécrétion » des specks ASC est un événement qui a déjà été décrit<sup>330,548</sup> auparavant. En effet, l'équipe d'Eicke Latz a démontré que lorsque les inflammasomes NLRP3, NLRP1 ou AIM2 étaient activés, des specks ASC étaient retrouvés dans le milieu extracellulaire après la mort des cellules<sup>330</sup>. Par la suite, ils ont pu démontrer que cette formation de speck ASC extracellulaire était dépendante de l'activité de la caspase 1 : ainsi les protéines ASC existent sous forme de monomère, dimère, trimère ou oligomère dans le milieu extracellulaire. Par la suite, les auteurs ont pu montrer que les speck ASC extracellulaire agissaient comme des DAMPs sur des cellules non activées, notamment en induisant une dégradation des lysosomes.

Chez les patients PID souffrant de désordres inflammatoires, il n'est pas exclu que le syndrome inflammatoire observé peut être dû à une combinaison de plusieurs facteurs. Comme nous l'avons vu, la perte de WASP ou le blocage de son activité induit une augmentation du pourcentage cellulaire formant un speck ASC. Outre le rôle de WASP dans la régulation même de l'activation de l'inflammasome, il est également possible que puisque plus de cellules sont activées, plus vont mourir par pyroptose induisant une augmentation de speck ASC dans le milieu extracellulaire, augmentant par la même occasion la probabilité d'activer d'autres cellules encore inactives par le mécanisme de phagocytose.

Puisque le mécanisme de phagocytose est dépendant du cytosquelette d'actine, nous pourrions étudier si cette augmentation de ce pourcentage de cellules formant un speck ASC est due uniquement à une augmentation propre du nombre de cellule activée, ou si les speck ASC extracellulaire pourraient également jouer un rôle. Puisque les speck ASC peuvent être assemblés en tube à essai, nous pourrions évaluer la capacité des cellules THP1 WASP-KO ou traités à la wiskostatine à répondre à différentes concentrations d'ASC extracellulaire. De manière plus générale, il serait intéressant de savoir si les

speck ASC provenant de l'activation de l'inflammasome NLRP3, NLRP1 et AIM2 sont identiques dans leur structure, et s'ils activent les même inflammasomes dans les cellules réceptacles.

# ANNEXES

Les pages suivantes regroupent en annexe les papiers auxquels j'ai collaboré pendant ma thèse.

Annexe 1: RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics

Annexe 2: Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis

Annexe 3: Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type 1 regulatory T cells

## RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics

Elisabeth Salzer<sup>1,2</sup>, Deniz Cagdas<sup>3,14</sup>, Miroslav Hons<sup>4,14</sup>, Emily M Mace<sup>5,14</sup>, Wojciech Garncarz<sup>1,2</sup>, Özlem Yüce Petronczki<sup>1,2</sup>, René Platzer<sup>6</sup>, Laurène Pfajfer<sup>1,2</sup>, Ivan Bilic<sup>1</sup>, Sol A Ban<sup>1</sup>, Katharina L Willmann<sup>1</sup>, Malini Mukherjee<sup>5</sup>, Verena Supper<sup>6</sup>, Hsiang Ting Hsu<sup>5</sup>, Pinaki P Banerjee<sup>5</sup>, Papiya Sinha<sup>5</sup>, Fabienne McClanahan<sup>7</sup>, Gerhard J Zlabinger<sup>8</sup>, Winfried F Pickl<sup>9</sup>, John G Gribben<sup>7</sup>, Hannes Stockinger<sup>6</sup>, Keiryn L Bennett<sup>1</sup>, Johannes B Huppa<sup>6</sup>, Loïc Dupré<sup>1,2,10</sup>, Özden Sanal<sup>3</sup>, Ulrich Jäger<sup>11</sup>, Michael Sixt<sup>4,14</sup>, İlhan Tezcan<sup>3,14</sup>, Jordan S Orange<sup>5,14</sup> & Kaan Boztug<sup>1,2,12,13</sup>

RASGRP1 is an important guanine nucleotide exchange factor and activator of the RAS-MAPK pathway following T cell antigen receptor (TCR) signaling. The consequences of *RASGRP1* mutations in humans are unknown. In a patient with recurrent bacterial and viral infections, born to healthy consanguineous parents, we used homozygosity mapping and exome sequencing to identify a biallelic stop-gain variant in *RASGRP1*. This variant segregated perfectly with the disease and has not been reported in genetic databases. RASGRP1 deficiency was associated in T cells and B cells with decreased phosphorylation of the extracellular-signal-regulated serine kinase ERK, which was restored following expression of wild-type RASGRP1. RASGRP1 deficiency also resulted in defective proliferation, activation and motility of T cells and B cells. RASGRP1-deficient natural killer (NK) cells exhibited impaired cytotoxicity with defective granule convergence and actin accumulation. Interaction proteomics identified the dynein light chain DYNLL1 as interacting with RASGRP1, which links RASGRP1 to cytoskeletal dynamics. RASGRP1-deficient cells showed decreased activation of the GTPase RhoA. Treatment with lenalidomide increased RhoA activity and reversed the migration and activation defects of RASGRP1-deficient lymphocytes.

RASGRP1 is a guanine-nucleotide-exchange factor that is involved in lymphocyte development and function<sup>1</sup>. The catalytic region of RASGRP1 consists of a RAS exchange motif and a CDC25 domain. RASGRP1 contains two atypical calcium-binding EF hands, a C1 diacylglycerol (DAG)-binding domain and a protein kinase C phosphorylation site that is necessary for activation of the protein<sup>2</sup>. Although the protein has high expression in lymphoid cells, its role is best studied in T cells following activation of the TCR<sup>2</sup>. Following increased DAG expression and/or phosphorylation by protein kinase C, RASGRP1 translocates to the membrane and converts the small GTPase RAS from an inactive GDP-bound to an active GTP-bound state. This process mediates activation of the MAP-kinase (RAS-RAF-MEK-ERK) cascade<sup>3</sup>.

Although RAS signaling is well known for its association with malignant transformation, RAS GTPases control a variety of cellular processes under physiological conditions, including cell growth,

differentiation, apoptosis, neuronal activity and cell migration. There are three main RAS isoforms (K, H and N) that all share a conserved core GTPase domain but have distinct biological functions. Depending on the upstream stimulus, RASGRP1 can activate all three Ras isoforms<sup>4</sup>. Studies of *Rasgrp1*<sup>-/-</sup> mice have revealed substantial defects in thymocyte development and function as a result of defective TCR-mediated ERK phosphorylation. Accordingly, *Rasgrp1*<sup>-/-</sup> mice have considerably fewer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells compared with wild-type mice<sup>5</sup>.

Studies of patients with inborn errors of their immune system (primary immunodeficiency disorders) have considerably shaped the molecular understanding of key nodes of human immunity, sometimes revealing surprising differences between patients and mouse models with deficiency in corresponding gene products<sup>6-8</sup>. In humans, the subgroup of quantitative or qualitative defects of T lymphocytes that result in combined immunodeficiencies

<sup>1</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria. <sup>2</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria. <sup>3</sup>Section of Pediatric Immunology, Hacettepe University, İhsan Doğramacı Children's Hospital, Ankara, Turkey. <sup>4</sup>Institute of Science and Technology Austria, Klosterneuburg, Austria. <sup>5</sup>Center for Human Immunobiology, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston, Texas, USA. <sup>6</sup>Institute for Hygiene and Applied Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>7</sup>Centre for Haemato-Oncology, Barts Cancer Institute - a CR-UK Centre of Excellence, Queen Mary University of London, London, UK. <sup>8</sup>Institute of Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>9</sup>Christian Doppler Laboratory for Immunomodulation and Institute of Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>10</sup>Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), INSERM, UMR1043, Toulouse Purpan University Hospital, Toulouse, France. <sup>11</sup>Department of Medicine I, Division of Hematology and Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>12</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>13</sup>St. Anna Kinderspital and Children's Cancer Research Institute, Department of Pediatrics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>14</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to K.E. (kaan.boztug@rud.tbg.ac.at).

Received 15 July; accepted 1 September; published online 24 October 2016; doi:10.1038/ni.3575





comprise a heterogeneous subgroup of primary immunodeficiencies<sup>9,10</sup>. Often, these defects are associated with primary or secondary B cell defects<sup>11,12</sup>. Despite some heterogeneity, impairment of adaptive immunity in these diseases increases susceptibility to recurrent, early-onset and severe infections with a variety of pathogens, including viruses, bacteria, fungi and parasites<sup>9</sup>.

We found that deficiency in human RASGRP1, a major regulator of RAS signaling in T lymphocytes, resulted in a previously unknown primary immunodeficiency disease. Our findings indicate a major role for RASGRP1 in immune cell signaling and function in T cells, B cells and NK cells. We also decipher a previously unknown role for RASGRP1 in the dynamic regulation of the cytoskeleton and identify lenalidomide as a potential treatment option for this immunodeficiency.

## RESULTS

### Identification of human RASGRP1 deficiency

We studied a 12-year-old index patient of healthy consanguineous parents (Fig. 1a). Three older siblings of the patient (II/1, II/3 and II/4; Fig. 1a) died in the first 2 years of life, possibly as a result of immunodeficiency-related complications. However, no material from these siblings was available for further genetic testing. The index patient presented with recurrent infections, including multiple episodes of pneumonia that resulted in bronchiectasis and collapse of the right upper pulmonary lobe (Fig. 1b). Over time, severe failure to thrive, with height and weight below the third percentile, as well as finger clubbing became evident (data not shown). At the age of 12 years, after another episode of pneumonia, monthly intravenous immunoglobulin therapy was started. Prophylactic antibiotic therapy was recommended, which the patient did not use regularly. Further episodes of pneumonia and herpetic lesions necessitated hospitalization. Serial immunological analyses revealed normal numbers of total lymphocytes, but a progressive decrease in the number of CD4<sup>+</sup> T cells, an inverted ratio of CD4<sup>+</sup> T cells to CD8<sup>+</sup> T cells, an increased relative proportion of TCR $\gamma\delta$  cells, and progressively decreasing B cell counts compared with healthy individuals (Fig. 1c and Supplementary Table 1). Routine adenotomy was performed on this patient at the age of 15 and, unexpectedly, histology revealed a low-grade Epstein-Barr virus (EBV)-associated B cell lymphoma (Supplementary Fig. 1a). Given the immunodeficiency-related complications and the development of lymphoma, chemotherapy was performed, followed by myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Given the known consanguinity in the family and the absence of clinical signs of immunodeficiency in either parent, paralleled by unremarkable leukocyte immunophenotyping (Supplementary Tables 2 and 3), we suspected an autosomal-recessive disease trait. We performed homozygosity mapping and exome sequencing to identify the underlying genetic disease etiology. Although we detected no variants in genes previously associated with primary immunodeficiencies, we found a homozygous nonsense variant on Chr15: 38805097: G>A (hg19 build 137) (c. C726T, p. Arg246\*) in RASGRP1 (Fig. 1d,e). This variant has not been observed in heterozygous or homozygous form in several human genetic variation databases including the 1000 Genomes Project and the Exome Aggregation Consortium (ExAC) (Supplementary Tables 4 and 5a). It was predicted to be highly damaging for the corresponding protein function, with a combined annotation-dependent depletion (CADD) score of 35 (Supplementary Table 5b). The RASGRP1 gene has a negative residual variation intolerance score and is among the 11.77% most intolerant genes, indicative of the evolutionary conservation of RASGRP1. Accordingly, the number of 'observed' nonsense variants was significantly lower than

the number of 'expected' nonsense variants (Supplementary Table 5b). Of note, no other homozygous variants in RASGRP1 leading to premature stop codons or frameshift mutations have been observed with higher population frequencies (Supplementary Table 5a). The variant showed perfect co-segregation with the disease under the assumption of autosomal-recessive inheritance, with both parents and all three available healthy siblings being heterozygous for the detected variant (Supplementary Fig. 1). In addition to the identified stop codon variant in RASGRP1, a variant in UROCI (p.G313R), which encodes urocanase enzyme, segregated with the disease in the core family (data not shown). Biallelic loss-of-function mutations in this gene have been shown to cause urocanic aciduria, mental retardation and ataxia<sup>13</sup>. As we could not reconcile this variant with the immunodeficiency in our patient, we disregarded this gene as being causative of the immunological phenotype in the index patient.

To assess the effect of the variant in RASGRP1, we expressed wild-type or mutant streptavidin-hemagglutinin (Strep-HA)-tagged RASGRP1 in doxycycline-inducible HEK293T human embryonic kidney cells and observed markedly reduced expression of the truncated protein product (Fig. 1f). Consistent with these observations, immunoblot analysis with an antibody to RASGRP1 (anti-RASGRP1) did not detect endogenous full-length RASGRP1 protein in cells from the patient (Fig. 1g).

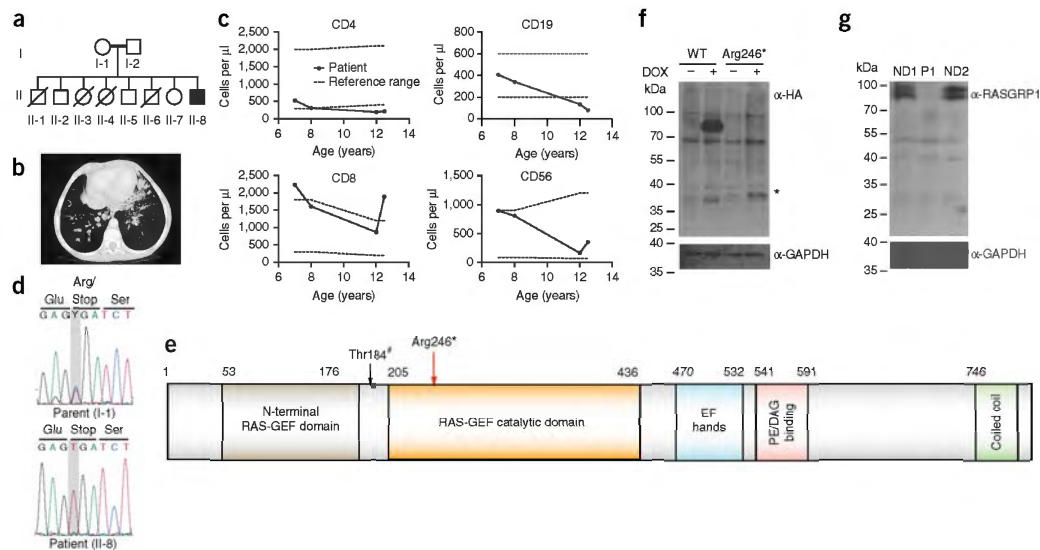
### Profound multifaceted peripheral blood T cell defects

Mouse studies have identified RASGRP1 as a guanine-nucleotide-exchange factor that acts as an essential activator of the RAS-RAF-MEK-ERK signaling in T cells; it thus serves as a major regulator of T cell development<sup>14</sup>, survival and proliferation<sup>15</sup>. Activation of RASGRP1 is dependent on DAG and occurs following activation of the signaling protein PLC $\gamma$ 1 in T cells<sup>16</sup>. RASGRP1 has high expression in all lymphoid cells and in a variety of other cell types<sup>17</sup>. However, so far the function of mouse RASGRP1 beyond its function in T cells has remained largely elusive (comparison, Supplementary Table 6). We performed detailed T cell immunophenotyping to characterize deficiency in human RASGRP1 and observed persistent CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia together with an increase in the number of CD8<sup>+</sup> T cells compared with healthy controls (Fig. 2a). Evaluation of the distribution of TCR $\alpha\beta$  T cells versus that of TCR $\gamma\delta$  T cells revealed increased numbers of TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells compared to reference values (Supplementary Table 1). We further investigated the compartment of non-conventional T cells and observed reduced numbers of mucosal-associated invariant T cells (Supplementary Table 3). Furthermore, the number of invariant NKT cells was very low, bordering on absent (Supplementary Tables 3 and 6, and Supplementary Fig. 2), reminiscent of studies of mice<sup>18</sup>. Although a prominent population expressing the TCR  $\alpha$ -chain variable region 24 (V $\alpha$ 24) was detectable<sup>19</sup>, these cells expressed the surface markers CD8 and CD45RA (Supplementary Fig. 2a), which suggested that they might belong to oligoclonally expanded and exhausted memory CD8<sup>+</sup> T cells.

Both CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells from the patient exhibited an exhausted phenotype, as indicated by expansion of CCR7-CD45RA<sup>+</sup> effector memory T cell populations, which represented up to 80% of CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 2b,c, Supplementary Table 3 and Supplementary Fig. 3). In the CD4<sup>+</sup> T cell subset, the majority of cells were CD45RA-CXCR5<sup>+</sup> (Fig. 2d), suggestive of an increased frequency in peripheral blood follicular helper T cells compared with healthy controls<sup>5,20,21</sup>. In the CD4<sup>+</sup> compartment of the patient, normal proportions of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and recent thymic emigrants were present (Supplementary Table 3).

Functionally, both RASGRP1-deficient CD4<sup>+</sup> T cells and RASGRP1-deficient CD8<sup>+</sup> T cells showed defective proliferation after stimulation with antibody to the TCR invariant chain CD3 (anti-CD3) and antibody





**Figure 1** Identification of human RASGRP1 deficiency. (a) Pedigree of the index family; double lines indicate consanguinity; filled black indicates the index patient; diagonal lines indicate deceased siblings. (b) Computed tomography scan of the index patient showing bronchiectatic segments, centrilobular nodular opacities, and paratracheal, subcarinal and bilateral hilar lymphadenopathy. (c) Longitudinal peripheral blood lymphocyte counts (exact measurements, **Supplementary Table 1**); gray dotted lines represent reference values. (d) Capillary sequencing confirmation of the stop-gain mutation in *RASGRP1* (c. C726T, p. Arg246\*). (e) RASGRP1 protein domains: red arrow indicates position of the stop-gain mutation; black arrow indicates the Thr184 PKC-phosphorylation site (Thr184<sup>#</sup>). (f) Cropped immunoblot analysis of wild-type (WT) and mutant (Arg246\*) RASGRP1 tagged at the amino terminus with Strep-HA in doxycycline-inducible HEK293T cells. \*, expected size of the truncated protein. (g) Cropped immunoblot analysis of full-length RASGRP1 in EBV-immortalized B cells from the patient (P1) and two normal donors (ND). Data are representative of four (f) or two (g) independent experiments.

to the costimulatory molecule CD28 (anti-CD28) (**Fig. 2e** and **Supplementary Fig. 3**), accompanied by impaired expression of the activation markers CD25 and CD69 (**Fig. 2f**). Defective T cell proliferation was recapitulated in Jurkat human T cells with doxycycline-inducible short hairpin RNA-based knockdown of *RASGRP1* (sh*RASGRP1*) (**Supplementary Fig. 2b**). In addition, proliferation assays using thymidine incorporation also showed defective cellular proliferation after nonspecific stimulation with various mitogens (**Supplementary Fig. 2c**). Consistent with the above-mentioned proliferation defects, TCR V $\beta$  spectratyping of patient peripheral blood T cells revealed a restricted TCR repertoire (**Fig. 2g** and **Supplementary Fig. 2d**). CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell populations obtained from the patient and expanded *ex vivo* showed increased expression of perforin and granzyme B compared to healthy donors (**Fig. 2h**), as well as defective killing of target cells following activation with the monoclonal antibody against CD3 (OKT-3) (**Fig. 2i**).

Published studies have shown that RASGRP1 is critical for TCR-induced signal transduction in mouse T cells<sup>5,16</sup>. Here we sought to investigate the functional consequences of RASGRP1 deficiency on the activation of human T cells. In both inducible sh*RASGRP1*-Jurkat cells and in a patient T cell line, immortalized using human telomerase reverse transcriptase (hTERT) we did not observe defects in initial TCR signaling events upstream of RASGRP1, including intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) ring formation, exclusion from the central supramolecular activation complex (cSMAC), or calcium flux (**Fig. 2j** and **Supplementary Fig. 2e–g**). Thus, we focused on potential signaling defects downstream of RASGRP1 in populations of primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from patient and expanded *ex vivo* using anti-CD3 and anti-CD28. Cells were serum- and antibody-

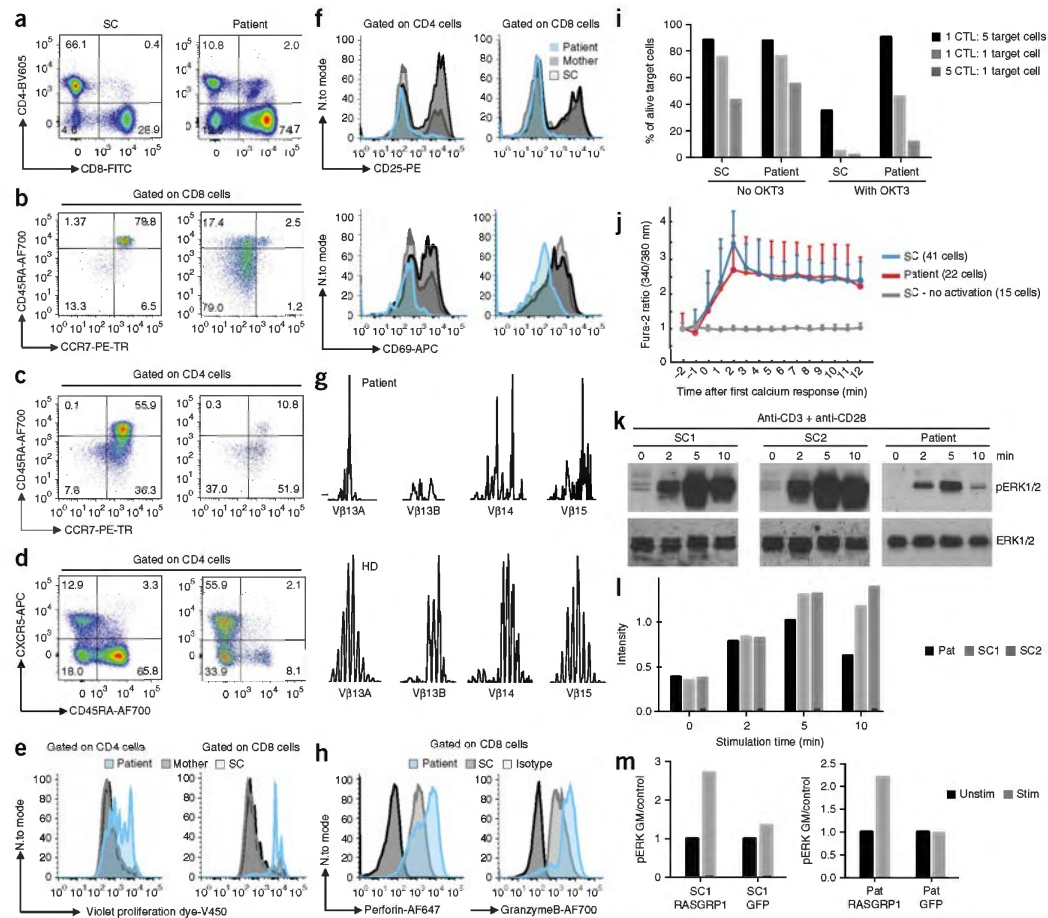
starved and re-stimulated with anti-CD3 and anti-CD28. We observed reduced, but not absent, phosphorylation of ERK1/2 (at Thr202 and Tyr204) in RASGRP1-deficient cells compared to healthy donor expanded T cells (**Fig. 2k,l** and **Supplementary Fig. 2h**). Transient transfection of the cells with vector encoding wild-type RASGRP1 normalized impaired activation of ERK in the patient's CD8<sup>+</sup> T cells (**Fig. 2m**).

#### Deficient B cell activation and proliferation

Studies of the role of RASGRP1 in mouse B cells have remained contradictory<sup>22,23</sup>. We performed detailed immunophenotypic analysis of the patient's B cell subsets and observed decreased proportions of memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) and increased proportions of both transitional B cells and CD21<sup>lo</sup> B cells, the latter of which constituted up to 20% of all CD19<sup>+</sup> B cells, compared to healthy donor B cell subsets (**Fig. 3a,b** and **Supplementary Fig. 3**). The concentrations of total immunoglobulin G (IgG) and IgM were normal in the patient, but IgA concentrations were elevated (**Supplementary Table 1**). Although findings from mouse studies have suggested a role for RASGRP1 in the development of autoimmunity<sup>22</sup> and genome-wide association studies have identified an association of single-nucleotide variants in the gene encoding RASGRP1 with systemic lupus erythematoses<sup>24</sup>, no clinical signs of autoimmunity were apparent, consistent with the absence of detectable autoantibodies (**Supplementary Table 7**). However, we observed insufficient vaccination responses, including absent antibodies to hepatitis B surface antigen and decreased pneumococcus-specific antibodies following vaccination (data not shown).

To assess B cell function, we stimulated the patient's PBMCs with antibody to the costimulatory receptor CD40 and interleukin 4 (IL-4)<sup>25</sup>.



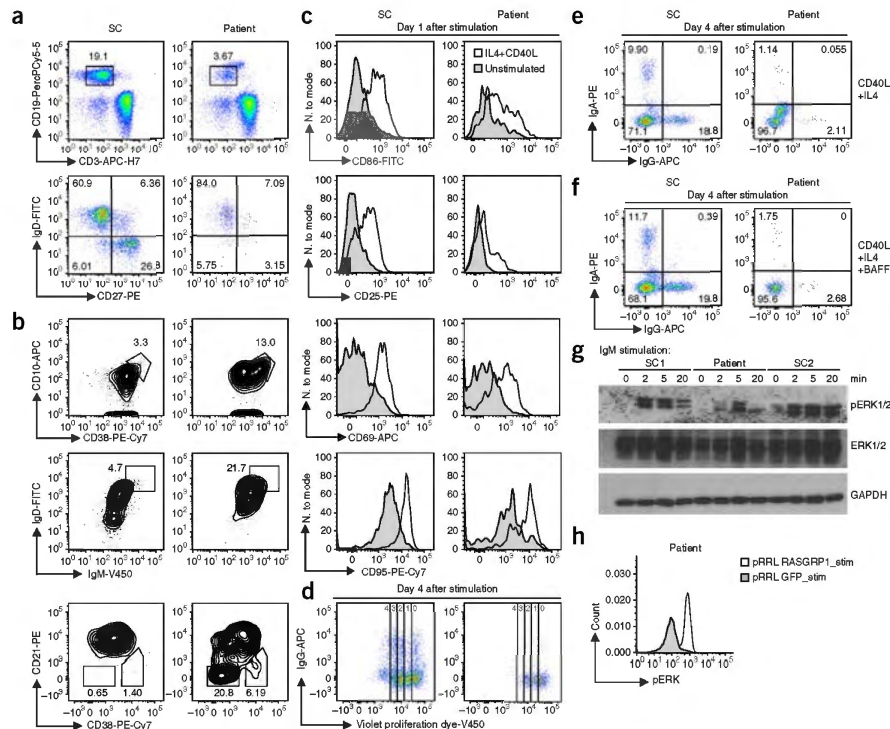


**Figure 2** RASGRP1 deficiency causes defective TCR signaling and an aberrant immunophenotype. (**a–d**) T cell immunophenotyping displaying relative proportions of CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells amongst CD3<sup>+</sup> cells in lymphocyte gate (**a**), proportions of naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) T cells and exhausted effector memory (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) T cells among CD8<sup>+</sup> T cells (**b**) and CD4<sup>+</sup> T cells (**c**), and the relative abundance of CXCR5<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> cells and naive (CXCR5<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) cells among CD4<sup>+</sup> cells (**d**). Full gating strategy, **Supplementary Figure 3**. (**e**) Proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells at day 4 after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. (**f**) Expression of CD25 and CD69 24 h after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. (**g**) TCR V $\beta$  spectra-typing of the patient's peripheral blood T cells. (**h**) Expression of perforin and granzyme B on the patient's CD8<sup>+</sup> T cells. (**i**) Killing of target cells by CD8<sup>+</sup> T cells with (right) or without (left) OKT3. CTL, cytotoxic T lymphocytes. (**j**) Microscopy of intracellular Ca<sup>2+</sup> flux in immortalized T cell lines following stimulation with anti-CD3, assessed by detection of the Fura-2 excitation ratio. (**k**) Cropped immunoblot analysis of total and phosphorylated (p-) ERK in primary T cells after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. (**l**) Quantification of the results in **k**. (**m**) Geometric mean (GM) of phosphorylated ERK in the patient's CD8<sup>+</sup> T cells and shipment control CD8<sup>+</sup> T cells transfected to express a vector encoding wild-type RASGRP1 or a vector encoding green fluorescent protein (GFP) as control. Data are representative of eight (**a**), four (**b,c**), three (**e,f,h,i,m**) or two (**d,g,j,k**) independent experiments.

The patient's B cells, compared to healthy donor B cells, showed reduced upregulation of expression of the activation markers CD86, CD25, CD95 and CD69 (**Fig. 3c**) that resulted in decreased B cell proliferation (**Fig. 3d**) and reduced class-switch recombination following stimulation (**Fig. 3e**). The observed defects could not be reversed by the addition of the mature B cell survival factor BAFF (**Fig. 3f**), which suggested that self-reactive transitional B cells were absent from the PBMC compartment<sup>26</sup>.

Both quantitative defects and qualitative defects in B cells in patients with inherited deficiencies of T cells result from either an intrinsic B cell defect (primary defect) or deficient co-stimulation<sup>11,12</sup>. To assess our hypothesis of a B cell–intrinsic phenotype, we evaluated B cell antigen receptor (BCR) signaling in EBV-transformed B cell lines from the patient. The EBV-immortalized B cells showed reduced activation of the MAPK pathway following IgM stimulation, similar to the T cell defects that we observed (**Fig. 3g**). Defective ERK





**Figure 3** RASGRP1 deficiency results in a B cell proliferation and activation defect. **(a)** Showing relative proportion of naive (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) B cells, memory non-switched (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) B cells and memory-switched (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) B cells. Full gating strategy, **Supplementary Figure 3**. **(b)** Flow cytometry of gated CD19<sup>+</sup> B cells showing transitional T1 (CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) B cells, transitional (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) B cells and activated (CD21<sup>-</sup>CD38<sup>lo</sup>) B cells. **(c)** Flow cytometric expression of CD86, CD95, CD25 and CD69 of CD19<sup>+</sup> cells 1 d after stimulation with anti-CD40L and IL-4. **(d)** Proliferating B cells at day 4 after stimulation as in c. **(e)** IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> switched B cells at day 4 stimulation. **(f)** IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> switched B cells at day 4 stimulation as in c with (bottom) or without (top) the addition of BAFF. **(g)** Cropped immunoblot analysis of total and phosphorylated ERK in EBV-transformed B cells from the patient, assessed after stimulation with IgM. **(h)** Phosphorylated ERK after gene transfer using a lentiviral backbone (pRR) with sequence encoding wild-type RASGRP1 or GFP in EBV-transformed B cells from the patient, after stimulation with IgM. Data are representative of four **(a,b)**, two **(c,d,g,h)** or one **(e,f)** independent experiment(s).

phosphorylation in patient B cells was reversed after lentiviral transduction of wild-type *RASGRP1* (**Fig. 3h**). Collectively, the patient's B cells showed defective MAPK activation, with defective BCR signaling resulting in reduced proliferation and class switching.

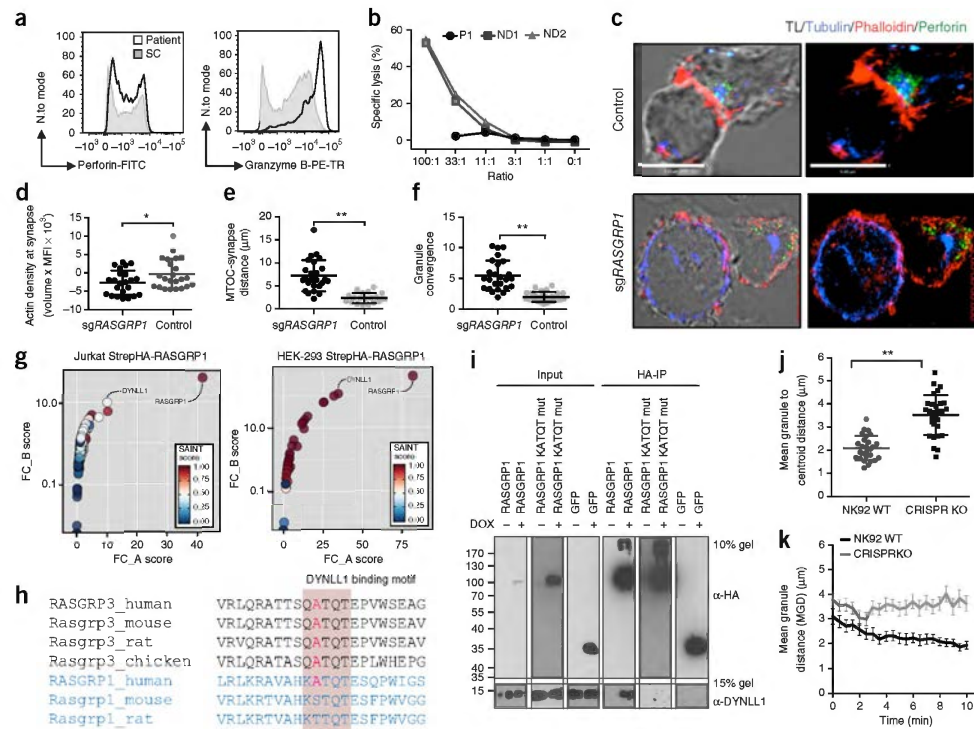
#### RASGRP1 deficiency causes impaired NK-cell cytotoxicity

Mouse studies have not yet addressed the role of RASGRP1 in NK cells, to the best of our knowledge. We observed unaltered numbers of the patient's NK cells with normal CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> subset distributions (**Supplementary Table 1**). However, the CD56<sup>bright</sup> NK cells had high expression of intracellular IL-5 (**Supplementary Fig. 4a**). These data might suggest that there is a developmental bias toward the production of T helper type 2 cytokines at an intermediate differentiation state, as production of these cytokines is lost following terminal differentiation<sup>27</sup>. Despite having high protein expression levels of intracellular granzyme B and perforin (**Fig. 4a**), the patient's NK cells exhibited severely impaired cytolytic function (**Fig. 4b**). This impairment was associated with defective formation of a mature NK cell immunological synapse in CRISPR/Cas9-edited NK-92 cell lines deficient in RASGRP1

(*sgRASGRP1*) (**Fig. 4c**) with decreased F-actin accumulation, increased distance from the microtubule-organizing center (MTOC) to the synapse and impaired granule convergence (**Fig. 4d–f**), consistent with impaired formation of the NK cell immunological synapse in primary cells from the patient (**Supplementary Fig. 4b**).

#### Proteomics links RASGRP1 to cytoplasmic dynein

The patient's CD8<sup>+</sup> T cells displayed normal expression of ICAM1 and did not show any defects in ICAM1 ring formation or exclusion from the central supramolecular activation complex following TCR stimulation (**Supplementary Fig. 2f**), which suggested that the cells retained the required elements for formation of the immunological synapse. In addition, the patient's NK cells showed normal expression of NK cell-activating receptors, as well as similar levels of granzyme B and perforin protein expression compared to healthy donor NK cells (**Fig. 4a**). However, we observed an unusual combination of defective granule convergence together with defects in the accumulation of F-actin in both the patient's NK cells and *sgRASGRP1* NK-92 cells. Assuming a similar role for MAPK activation in actin



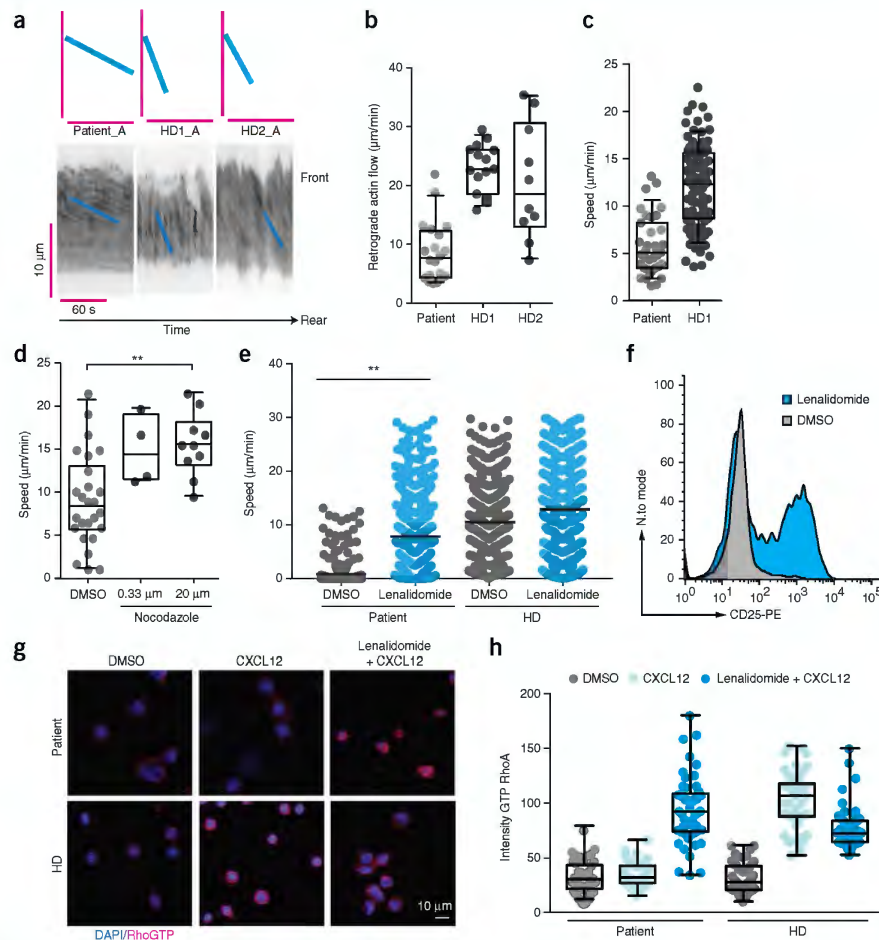
**Figure 4** Aberrant cytoskeletal dynamics in NK cells. (a) Flow cytometry analyzing the intracellular accumulation of perforin and granzyme B in NK cells from the patient and control donors. Full gating strategy, **Supplementary Figure 4**. (b) Chromium ( $^{51}\text{Cr}$ )-release assay of NK cell cytotoxicity, E/T, effector cell/target cell. (c) Confocal microscopy of a fixed RASGRP1 wild-type NK-92 control cell (top) and an NK-92 cell with CRISPR-mediated editing of *RASGRP1* (*sgRASGRP1*) (bottom) conjugated to K562 cells, detected with anti- $\alpha$ -tubulin (blue), anti-perforin (green) and phalloidin-stained F-actin (red). TL, transmitted light. (d–f) Actin density at the synapse (d), distance from lytic granule to MTOC (e), and granule convergence to MTOC (f) of RASGRP1 wild-type NK-92 control cells and *sgRASGRP1* NK-92 cells. (g) Tandem affinity purification of RASGRP1 in Jurkat cells (left) and HEK cells (right), presented as FC-A scores versus FC-B scores. (h) Conservation of the KATQT motif in RASGRP1 and RASGRP3 across various vertebrate species. (i) HA-based co-immunoprecipitation of Strep-HA-tagged wild-type (WT) RASGRP1, KATQT-mutant (mut) RASGRP1 or Strep-HA-tagged-GFP with endogenous DYNLL1. (j, k) Video microscopy of granule convergence in *sgRASGRP1* and control NK cells. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.0001$  (unpaired Student's *t* test). Data are representative of four (c), three (a, c–f, i), two (g, j, k) or one (b) independent experiment(s) (mean and s.d. in d–f, j, k).

polymerization in both T cells and NK cells<sup>28</sup>, we hypothesized that the defect in granule convergence might be linked to an as-yet-unknown interaction partner. Thus, we performed tandem affinity purification of RASGRP1 tagged at the amino terminus with Strep-HA plus subsequent mass-spectrometry analysis of bound interactors in HEK293T cells and Jurkat T cells (**Fig. 4g**). In both HEK293T cells and Jurkat T cells which were engineered for doxycycline-inducible RASGRP1 expression, the dynein light chain DYNLL1 was one of the top-ranking interacting proteins according to both SAINT and FC-scoring (**Fig. 4g**). Notably, published studies of mice and rats have reported binding of RASGRP3, but not of RASGRP1, to DYNLL1 (ref. 29). Such cross-species differences might be explained by the fact only human RASGRP1 contains a binding motif similar to that of mouse RASGRP3 (ref. 30) (**Fig. 4h**). Co-immunoprecipitation of RASGRP1 tagged at the amino terminus with Strep-HA confirmed the interaction of RASGRP1 with endogenous DYNLL1 in both Jurkat T cells and HEK293T cells (**Fig. 4i**, **Supplementary Table 8a, b** and **Supplementary Fig. 4d**). Substitution of the assumed DYNLL1-binding

motif with alanine residues resulted in abrogation of the binding of DYNLL1 (**Fig. 4i**), which confirming the critical role of this motif in the RASGRP1-DYNLL1 interaction.

Cytoplasmic dynein can mediate retrograde transport over the microtubule cytoskeleton toward the MTOC in T cells, which results in centrosome polarization following TCR activation<sup>31</sup>. In NK cells, dynein-driven transport of lytic granules along microtubules is required for convergence to the MTOC preceding formation of the immunological synapse<sup>32</sup>. Visualization of *sgRASGRP1* NK cells by video microscopy revealed markedly defective granule motility (**Fig. 4j, k**). Consistent with a putative role for RASGRP1 in regulating the microtubule cytoskeleton, accumulation of dynein before centrosome polarization has been shown to depend on the RASGRP1 activator DAG<sup>33</sup>. Moreover, lytic granule convergence occurs rapidly after target-cell engagement and is independent of actin dynamics<sup>32</sup>. Thus, RASGRP1 deficiency markedly affects NK cell cytotoxicity by impairing both actin polymerization and the convergence of lytic granules to the MTOC, which is possibly explained by an abrogated interaction with DYNLL1.





**Figure 5** RASGRP1 deficiency leads to cell-migration defects that are reversed following treatment with lenalidomide. **(a)** Kymographs of retrograde actin flow in CD8<sup>+</sup> T cells from the patient and healthy donors after transfection with Lifeact. Each kymograph represents one cell. **(b)** Quantification of retrograde actin flow in CD8<sup>+</sup> T cells from the patient and two healthy donors. Each symbol represents one cell. **(c)** Migration speed of CD8<sup>+</sup> T cells from the patient and healthy donors. **(d)** Migration speed of CD8<sup>+</sup> T cells from the patient and healthy donors following the addition of nocodazole. **(e)** Migration speed of PBMCs from the patient and healthy donors after the addition of lenalidomide. **(f)** Flow cytometry analyzing the expression of CD25 on proliferating T cells obtained from the patient and incubated with lenalidomide (blue) or DMSO (gray). **(g)** Immunofluorescence microscopy of CD8<sup>+</sup> T cells from the patient and a healthy control that underwent population expansion and were pre-treated for 16 h with either lenalidomide or DMSO and were activated for 5 min with CXCL12, then were stained for active RhoA-GTP (red) and counterstained with the DNA-binding dye DAPI (blue). **(h)** Quantification of immunofluorescence images as in **g** (50 cells per condition) by measurement of the mean intensity of total RhoA and RhoA-GTP. ( $P > 0.05$ ),  $*P \leq 0.05$  (**e**),  $**P < 0.01$  (**e**) and  $***P \leq 0.0001$  (ANOVA (**e,d**)). Data are representative of four (**c**), or two (**a,b,e,f,g**) independent experiments.

#### Reversal of cellular defects by lenalidomide

Apart from NK-cell cytotoxicity, microtubules and actin also depend on precisely coordinated interactions to establish cell polarity<sup>34</sup> and the coordinated cell migration that is essential for lymphocyte function<sup>34</sup>. To visualize cytoskeletal dynamics and cell migration in primary cells from the patient, we transiently transfected CD8<sup>+</sup> T cells with the actin marker Lifeact<sup>TM</sup>. We observed significantly slower actin turnover in RASGRP1-deficient CD8<sup>+</sup> T cells than in CD8<sup>+</sup> T cells from healthy

donors (**Fig. 5a,b**). To assess whether slow actin turnover would also 'translate' into a low cell-migration speed, we performed cell-migration assays with CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with the chemokine CXCL12 on ICAM-1-coated plates. Indeed, RASGRP1-deficient cells migrated at lower speeds than did CD8<sup>+</sup> T cells from healthy donors (**Fig. 5c**).

RASGRP1-deficient mouse mast cells display decreased RhoA activity<sup>35</sup>. We found that levels of active RhoA were markedly lower in the patient's T cells following CXCL12 stimulation compared with



healthy donor T cells, whereas total RhoA levels differed only mildly (Supplementary Fig. 5). Thus, we hypothesized that activation of RhoA signaling might reverse the migration defect of RASGRP1-deficient CD8<sup>+</sup> T cells. Indeed, the known RhoA activator nocodazole normalized the observed migration defect (Fig. 5d). However, as nocodazole is not amenable for clinical use, we sought to identify an alternative compound that could induce similar functional effects. In patients with chronic lymphocytic leukemia, T cells exhibit an exhausted (immunodeficient) phenotype that is similar to that of the RASGRP1-deficient patient<sup>36,37</sup>. The thalidomide-derived drug lenalidomide can modulate the activity of key transcription factors that are important for restoring T cell function, which results in increased RhoA activity<sup>38</sup>. Indeed, treatment with lenalidomide significantly increased cell velocity and thus normalized the overt migration defect observed in RASGRP1-deficient PBMCs (Fig. 5e); thus, this might represent a potential treatment option for RASGRP1-deficient patients. Consistent with the published positive effect of lenalidomide on IL-2 secretion<sup>39</sup>, we observed increased CD25 expression in T cells following lenalidomide treatment (Fig. 5f). Given that lenalidomide modifies multiple targets of the Cullin–E3 ligase complex by binding to its intracellular target cereblon, we aimed to investigate whether the effect of lenalidomide on the cellular phenotype could be linked to normalization of RhoA signaling. In CD8<sup>+</sup> T cells from healthy control donors, stimulation with CXCL12 activated RhoA, as detected with an antibody specific for the GTP-bound state of RhoA (Fig. 5g,h). In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells from the RASGRP1-deficient patient failed to activate RhoA following stimulation with CXCL12 (Fig. 5g,h). Notably, treatment of the patient's CD8<sup>+</sup> T cells with additional lenalidomide restored active RhoA to amounts comparable to those measured in the control CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 5g,h).

## DISCUSSION

We identified human RASGRP1 deficiency as a previously unknown primary immunodeficiency with notable defects in the lymphoid compartment that were amenable to partial reversal with lenalidomide. Although our study was performed on a pedigree with a single affected patient, our results demonstrated that the loss of RASGRP1 caused the phenotype, consistent with outlined criteria as published<sup>40</sup>: the patient's candidate genotype was monogenic and did not occur in subjects without the clinical phenotype; we found that the detected mutation caused the absence of full-length RASGRP1 protein and reduced ERK phosphorylation; we observed restoration of the defective phosphorylation of ERK following expression of wild-type RASGRP1 in the patient's cells; and shRNA and CRISPR-based studies of Jurkat cells and NK-92 cell lines reproduced the phenotype observed in primary cells from the patient. The phenotype of human RASGRP1 deficiency differs substantially from previously described mouse models<sup>5,22</sup> and suggests a previously unknown role for RASGRP1 in cellular responses beyond TCR signaling. Although RASGRP1-deficient mice exhibit decreased numbers of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> single-positive thymocytes<sup>5</sup>, the patient's immunological phenotype showed an inverted ratio of CD4<sup>+</sup> T cells to CD8<sup>+</sup> T cells with population expansion of exhausted effector memory cells, consistent with a partial T cell defect<sup>9</sup>. Partial T cell defects are often associated with autoimmunity<sup>9</sup>. The role of RASGRP1 in autoimmunity has remained controversial. Both RASGRP1-deficient mice<sup>22</sup> with an autoreactive BCR and *Rasgri*<sup>-/-</sup> mice overexpressing a truncated form of RASGRP1 that lacks the carboxy-terminal tail domain<sup>41</sup> develop a lymphoproliferative disorder with features reminiscent of human systemic lupus erythematosus. We did not observe overt autoimmunity in human RASGRP1 deficiency. Future studies,

including more RASGRP1-deficient subjects, will enable delineation of the full phenotypic spectrum of human RASGRP1 deficiency.

The role of RASGRP1 in NK cells has not been addressed in detail in mouse models. NK cells are innate immune cells best known for their ability to mediate cytotoxicity after the ligation of germline-encoded activation receptors<sup>42</sup>. A variety of human primary immunodeficiencies are associated with defective accumulation of actin at the immunological synapse, particularly actin-polymerization deficiencies such as Wiskott–Aldrich syndrome<sup>43</sup> or deficiency in the actin regulators WIP<sup>44</sup> or DOCK8 (ref. 45). However, the combination of defective polymerization of actin, together with the considerable granule-convergence defect seen in cells from the RASGRP-deficient patient has not been seen in human immunodeficiencies before, to our knowledge.

Accumulation of dynein before centrosome polarization in lymphocytes depends on the known RASGRP1 activator DAG<sup>46</sup>. Evidence has revealed a RAS-binding domain in the dynein intermediate chain that probably mediates activation of the complex<sup>47</sup>. Our discovery of an interaction between human RASGRP1 and cytosolic DYNLL1 provides evidence that RASGRP1 mediates granule convergence following activation, a dynein-dependent process<sup>32</sup>. To our knowledge, RASGRP1 deficiency represents the first association of impaired dynein function with a human primary immunodeficiency. Of note, several viral proteins, including the HIV-1 integrase, interact with DYNLL1, and their interaction has been shown to be involved in efficient reverse transcription of HIV-1 (ref. 48).

Our study has also identified a targeted treatment strategy with lenalidomide, providing proof-of-concept for such approaches in primary (and potentially secondary) immunodeficiencies with aberrant cytoskeletal dynamics. Thus far, the thalidomide derivative lenalidomide has been approved for various lymphoid malignancies, such as multiple myeloma<sup>37</sup> and chronic lymphocytic leukemia<sup>36</sup>. In these diseases, T cells are in a state of pseudo-exhaustion and show defects in activation, proliferation and cytotoxicity<sup>49</sup>, similar to those observed in RASGRP1 deficiency. The action of lenalidomide has been linked to cereblon which, together with the scaffolding protein CUL4 and the catalytic subunit ROC1, forms the E3 ubiquitin ligase cereblon–CRL4 complex that mediates degradation of the transcription factors Ikaros and Aiolos and may alter other targets of the E3 ubiquitin ligase<sup>38</sup>. These processes result in, among other effects, the upregulation of RhoA activity, which might be the factor responsible for the rescue of RASGRP1-deficient lymphocytes<sup>36</sup>; we found that treatment with lenalidomide significantly increased RhoA activity in patient CD8<sup>+</sup> T cells. In sum, we have identified RASGRP1 deficiency as a previously unknown type of partial T cell defect, which revealed a previously unknown link between RAS signaling and cytosolic dynein dynamics and which was amenable to improvement following RhoA activation and lenalidomide treatment.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient and his family for participating in this study; B. Fleckenstein and M. Schmidt for generating and providing patient-derived T cell lines; and G. Superti-Furga, J. Bigenzahn for providing the inducible protein expression system used for Jurkat T cells and together with N. Serwas, C.D. Conde, A. Kalnichenko, K. Ackerman and R. Martins for critically reviewing the manuscript and providing comments. The research leading to



these results was funded by the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) / ERC grant agreement 310857 (K.B.), the Vienna Science and Technology Fund (WWTF) through project LS14-031 (J.B.H. and K.B.), an unrestricted research grant from Celgene Austria (U.), the National Institutes of Health (R01AI067946 to J.S.O.), Boehringer Ingelheim Fonds (R.P.), the Austrian Science Fund (FWF): Project M1809-B19 (K.L.W.), and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV1-0031 to L.D.).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.S. performed most of the experiments, analyzed data, interpreted results, and, together with K.B., wrote the initial draft and revised version of the manuscript. D.C., I.T. and Ö.S. cared for the patient, and provided and interpreted clinical and immunological data. M.H. and E.S. performed migration and Lifect experiments. M.S. provided critical input to the content of the manuscript. E.M.M., P.S., M.M., P.P.B., H.T.H. and J.S.O. performed and interpreted NK-cell immunological synapse experiments and detailed flow-cytometry-based NK-cell immunophenotyping. S.A.B. and E.S. identified the RASGRP1 mutation and performed initial experiments. R.P. and J.B.H. performed lipid bilayer calcium-flux experiments, and analyzed and interpreted data. L.P. generated an untransformed CD8<sup>+</sup> T cell line from the patient and performed the CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxic assays. H.S. and V.S. performed proliferation analyses together with E.S. and provided critical input. Ö.Y.P. and L.D. performed the immunofluorescence experiments to quantify RhoA activation. K.L.W., W.G. and I.B. performed experiments and provided critical input. E.M., J.G.G. and U.J. helped with migration analyses. K.L.B. performed mass spectrometry analyses. W.F.P. and G.J.Z. performed thymidine incorporation assays, chromium release assays and analyses of autoantibody titers. K.B. conceived of and coordinated the study, provided laboratory resources, interpreted data, supervised E.S., W.G., Ö.Y.P., I.B., S.B. and K.W., wrote the manuscript together with E.S. and took overall responsibility for the study. All of the authors provided critical input and agreed to this publication.

#### COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Roose, J. & Weiss, A. T cells: getting a GRP on Ras. *Nat. Immunol.* **1**, 275–276 (2000).
- Stone, J.C. Regulation and function of the RasGRP family of Ras activators in blood cells. *Genes Cancer* **2**, 320–334 (2011).
- Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S. & Cantrell, D.A. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* **346**, 719–723 (1990).
- Kremer, K.N., Kumar, A. & Hedin, K.E. G alpha 12 and ZAP-70 mediate RasGRP1 membrane localization and activation of SDF-1-induced T cell functions. *J. Immunol.* **187**, 3177–3185 (2011).
- Dower, N.A. *et al.* RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat. Immunol.* **1**, 317–321 (2000).
- Khanna, R. & Burrows, S.R. Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 330–331 (2011).
- Mestas, J. & Hughes, C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
- Waterston, R.H. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).
- Notarangelo, L.D. Functional T cell immunodeficiencies (with T cells present). *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 195–225 (2013).
- Notarangelo, L.D. Partial defects of T-cell development associated with poor T-cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1297–1305 (2013).
- Picard, C. *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
- Boustifha, A. *et al.* The 2015 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* **35**, 727–738 (2015).
- Espinós, C. *et al.* Mutations in the urocanase gene URO1 are associated with urocanic aciduria. *J. Med. Genet.* **46**, 407–411 (2009).
- Chen, Y. *et al.* Differential requirement of RasGRP1 for  $\gamma\delta$  T cell development and activation. *J. Immunol.* **189**, 61–71 (2012).
- Warnecke, N. *et al.* TCR-mediated Erk activation does not depend on Sos and Grb2 in peripheral human T cells. *EMBO Rep.* **13**, 386–391 (2012).
- Jun, J.E., Rubio, I. & Roose, J.P. Regulation of ras exchange factors and cellular localization of ras activation by lipid messengers in T cells. *Front. Immunol.* **4**, 239 (2013).
- Depaillé, P. *et al.* RasGRP1 opposes proliferative EGFR-SOS1-Ras signals and restricts intestinal epithelial cell growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 804–815 (2015).
- Shen, S. *et al.* Critical roles of RasGRP1 for invariant NKT cell development. *J. Immunol.* **187**, 4467–4473 (2011).
- Montoya, C.J. *et al.* Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody. *6B11*. *Immunology* **122**, 1–14 (2007).
- Priatel, J.J. *et al.* Chronic immunodeficiency in mice lacking RasGRP1 results in CD4 T cell immune activation and exhaustion. *J. Immunol.* **179**, 2143–2152 (2007).
- Ma, C.S. & Deenick, E.K. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 64–71 (2014).
- Bartlett, A., Buhlmann, J.E., Stone, J., Lim, B. & Barrington, R.A. Multiple checkpoint breach of B cell tolerance in Rasgrp1-deficient mice. *J. Immunol.* **191**, 3605–3613 (2013).
- Coughlin, J.J., Stang, S.L., Dower, N.A. & Stone, J.C. RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J. Immunol.* **175**, 7179–7184 (2005).
- Sun, C. *et al.* High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat. Genet.* **48**, 323–330 (2016).
- Tangye, S.G., Ferguson, A., Avery, D.T., Ma, C.S. & Hodgkin, P.D. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J. Immunol.* **169**, 4298–4306 (2002).
- Thien, M. *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* **20**, 785–798 (2004).
- Perussia, B., Chen, Y. & Loza, M.J. Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol. Immunol.* **42**, 385–395 (2005).
- Navarro, M.N. & Cantrell, D.A. Serine-threonine kinases in TCR signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 808–814 (2014).
- Okamura, S.M., Oki-Idouchi, C.E. & Lorenzo, P.S. The exchange factor and diacylglycerol receptor RasGRP3 interacts with dynein light chain 1 through its C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 36132–36139 (2006).
- Rodríguez-Crespo, I. *et al.* Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett.* **503**, 135–141 (2001).
- Huse, M. Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Front. Immunol.* **3**, 235 (2012).
- Mentlik, A.N., Sanborn, K.B., Holzbaur, E.L. & Orange, J.S. Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytotolytic commitment. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2241–2256 (2010).
- Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J. & Weiss, A. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol. Cell Biol.* **25**, 4426–4441 (2005).
- Li, R. & Gundersen, G.G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 860–873 (2008).
- Liu, Y., Zhu, M., Nishida, K., Hirano, T. & Zhang, W. An essential role for RasGRP1 in mast cell function and IgE-mediated allergic response. *J. Exp. Med.* **204**, 93–103 (2007).
- Ramsay, A.G. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* **121**, 2704–2714 (2013).
- Richardson, P.G. *et al.* Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* **116**, 679–686 (2010).
- Krönke, J. *et al.* Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301–305 (2014).
- Gandhi, A.K. *et al.* Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN). *Br. J. Haematol.* **164**, 811–821 (2014).
- Casanova, J.L., Conley, M.E., Seligman, S.J., Abel, L. & Notarangelo, L.D. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* **211**, 2137–2149 (2014).
- Fuller, D.M. *et al.* Regulation of RasGRP1 function in T cell development and activation by its unique tail domain. *PLoS One* **7**, e38796 (2012).
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
- Thrasher, A.J. & Burns, S.O. WASP: a key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–192 (2010).
- Lanzi, G. *et al.* A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J. Exp. Med.* **209**, 29–34 (2012).
- McGhee, S.A. & Chatila, T.A. DOK8 immune deficiency as a model for primary cytoskeletal dysfunction. *Dis. Markers* **29**, 151–156 (2010).
- Liu, X., Kapoor, T.M., Chen, J.K. & Huse, M. Diacylglycerol promotes centrosome polarization in T cells via reciprocal localization of dynein and myosin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 11976–11981 (2013).
- Schroeder, C.M., Ostrem, J.M., Hertz, N.T. & Vale, R.D. A Ras-like domain in the light intermediate chain bridges the dynein motor to a cargo-binding region. *eLife* **3**, e03351 (2014).
- Jayappa, K.D. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 employs the cellular dynein light chain 1 protein for reverse transcription through interaction with its integrase protein. *J. Virol.* **89**, 3497–3511 (2015).
- Zenz, T. Exhausting T cells in CLL. *Blood* **121**, 1485–1486 (2013).







## ONLINE METHODS

**Patient and ethics.** The patient was included with informed written consent by the parents and approval from the Institutional Review Boards of the Medical University of Vienna and Ankara Hacettepe University Medical School.

**Homozygosity mapping.** Affymetrix 6.0 single nucleotide polymorphism (SNP)-based homozygosity mapping was performed as previously described<sup>50</sup>.

**Exome sequencing.** DNA extraction, exome sequencing and data analysis were performed as described previously<sup>51</sup>.

**Sanger sequencing.** Primers for the variants detected with exome sequencing were designed using Primer3. PCR amplification and capillary sequencing was performed as previously described<sup>51</sup>.

**Statistics.** Statistical tests used in this study include Student's *t* test, with or without Welch's correction, as appropriate and detailed in the respective methods sections.

**Mutational profile and population genetics.** The Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score was determined using CADD version v1.3 (ref. 52). The mutational and population genetics profile of RASGRP1 CCDS (ENSG00000172575) was obtained from ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000172575>, accessed 29th April, 2016). The Residual Variation Intolerance Score was obtained from Genic Intolerance (<http://genic-intolerance.org>, accessed April 29, 2016). A binomial test was used to assess statistical significance of the deviation of the theoretically expected distribution of nonsense variants (expected) from the observed nonsense variants (observed) based on the ExAC database. Loss-of-function carrier frequency (*q*) was calculated as:  $q = (\text{SUM of putative loss-of-function population alleles}) / (\text{Total population alleles})$ . Expected rate of nullizygous (1 in *X* non-consanguineous conceptions) variants was calculated as:  $X = 1/q^2$ . If the Sum of putative loss of function alleles was 0,  $q^*$  was calculated as:  $q^* = 1/(X \text{ Total population alleles})$ , and expected rate of nullizygous variants:  $X = 1/(q^*)^2$ .

**Flow cytometry.** All flow cytometric analyses were recorded on a BD LSR Fortessa except NK-cell immunophenotyping (recorded on both BD LSR Fortessa and FACS Canto) and cell proliferation assays upon shRNA-mediated knockdown (recorded on BD FACS Calibur). All data were analyzed using FlowJo X (TreeStar) and data was graphed with Prism 6.0 (GraphPad Software).

**Immunophenotyping.** PBMCs immunophenotyping was performed on an LSR-Fortessa (BD Biosciences). Antibodies were used as described previously<sup>51</sup> apart from: GranzymeB-AF700, TCR $\alpha$  $\beta$ -FITC, TCR $\alpha$  $\beta$ -PE, TCR $\gamma$  $\delta$ -APC, TCR $\gamma$  $\delta$ -PE, TCR-PE, all from BD Biosciences; TCR V $\alpha$ 7.2-APC, Ig-PE both from Miltenyi Biotec; Perforin-AF647 from BioLegend; CXCR5-APC from Biomedica.

**Cell lines. Feeder cell-mediated T-cell expansion.** Feeder T-cell generation was done as described<sup>53,54</sup>. Obtained expanded T cells were evaluated by flow cytometry for expression of CD4, CD8, perforin and granzyme B and purified as necessary using a MagniSort CD8 cell separation kit (eBioscience).

**Generation of EBV-immortalized B-cell lines.** Patient and healthy donor PBMCs were isolated using Ficoll density centrifugation. 10<sup>6</sup> freshly isolated PBMCs were incubated with EBV virus supernatant and on the following day 1  $\mu$ g/ml cyclosporin A was added to the cells. Cells were maintained in complete RPMI medium (Gibco) with 10% FCS, 1% L-glutamine and 1% PenStrep (all from Invitrogen).

**HEK293T cells.** Human RASGRP1 cDNA and the mutant version thereof were cloned into pTO-SII-HA-GW vectors using gateway recombination to generate N-terminal Streptavidin-Hemagglutinin-tagged fusion protein and transfected into HEK293 Flp-In-TREx cells (Thermo Fisher Scientific) as described<sup>55,56</sup>.

**Jurkat cells with inducible overexpression of RASGRP1.** Jurkat E6.1 cells (ATCC) were retrovirally infected with a retroviral vector (MSCV-rtTA3-IRES-EcoR-PGK-Puro) as described previously<sup>57,58</sup>. A codon-optimized

version of RASGRP1 cDNA (IDT systems) was cloned into pSIN-TREtight-SH-gw-N-IRES-mCherry-PGK-BlastR as described<sup>57</sup>.

**Inducible shRNA mediated knock down of RASGRP1 in Jurkat cells.** Short hairpin RNAs were designed according to published recommendations<sup>57</sup>. Jurkat T-cell line expressing an rTA3 element with an ecotropic receptor as well as PlatE cells for virus production were kindly provided by Johannes Zuber (IMP). Cell lines were tested for protein expression 24h after induction with 1  $\mu$ g/ml doxycycline using flow cytometric analyses. GFP marks successful transfection whereas dsRed expression indicates protein expression after doxycycline addition. The following short hairpin RNAs were used: sh\_RGRP1:UGAAACACUAAUCUACAAGCUA; sh\_RGRP2:UUAACUUGUUAUACUUAUACCUC. Each shRNA has 2 off-targets sites that correspond to known RASGRP1 isoforms and no XhoI/EcoRI restriction sites.

**CRISPR-mediated gene deletion in NK-92 cell lines.** CRISPRs targeting RASGRP1 were designed as described<sup>59</sup> and cloned into a lentiCRISPRv2 vector<sup>60</sup>. NK-92 cells (ATCC) were cultivated according to the supplier's instructions. Lentiviral virus production and cell infection were performed according to standard procedures. Limited dilution was performed and single cell clones were selected. Editing at genomic position was confirmed using capillary sequencing and subsequent upload into tide (<http://tide.nki.nl>, accessed November, 2014)<sup>61</sup>. Only clones with frameshift mutations in both alleles of more than 90% were used for further experiments. Following CRISPR targeting sequences were used for cloning: C\_RASGRP1\_E2\_p1\_A\_t:CACCgAGACACCATCATTTCGGAAGT; C\_RASGRP1\_E2\_p1\_A\_b:AAACAGTTCGGAATGATGGTGTCTC; C\_RASGRP1\_E2\_p2\_A\_t:CACCgGAGACACCA TCATTTCGGAAC; C\_RASGRP1\_E2\_p2\_A\_b:AAACGTTCCGAATGATGGTGTCTC.

**Immunoblot experiments. RASGRP1 immunoblot experiments.** 4  $\times$  10<sup>6</sup> Patient and healthy donor EBV-immortalized B cells were lysed in 50  $\mu$ l Laemmli Buffer, ran on a 10% acrylamide gel at 110 V and blotted overnight at 120 mA at 4  $^{\circ}$ C on a PVDF membrane. Membranes were incubated with anti-human RASGRP1 (Merck Millipore, Clone 10.1) in Tris-buffered saline with 0.5% Tween and 5% milk overnight at 4  $^{\circ}$ C and a secondary anti-mouse antibody at -21  $^{\circ}$ C for 2 h. Blots were developed using ECL (Thermo Scientific) and films (GE healthcare).

**TCR and BCR signaling analysis.** Patient or healthy donor derived T cell lines were starved for up to 4 h in RPMI medium (Invitrogen) containing 1% FCS (Sigma-Aldrich), 0.2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) and 20 mM HEPES (Gibco). Cells were put on ice for at least 20 min and ice-cold stimulation mix containing mAb to CD3 (clone OKT-3, purified, 2  $\mu$ g/ml) and mAb against CD28 (clone Leu28, purified, 1  $\mu$ g/ml, BD Bioscience). Cells were stimulated for indicated time points, washed in ice-cold PBS and lysed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (all from Roth) and complete protease inhibitor tablets (Roche), 1  $\mu$ M orthovanadate, 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (1% Triton X-100 (Thermo Scientific)). Upon addition of Laemmli buffer samples were boiled for 5 min and loaded on 8 or 10% acrylamide gels. Gels were run at constant voltage and blotted over night with constant 120 mA at 4  $^{\circ}$ C using a mini-protein wet blotting system (BioRad). Immunoblotting was performed according to standard conditions with Tween-buffered saline and 5% bovine serum albumin (Roth) according to the manufacturer's instructions. Antibodies are summarized below.

Prior to stimulation, B cells were serum starved for 3–4 h and stimulated with anti-IgM 500 ng/ml (Southern Biologicals) for the indicated time points. Subsequent handling was performed as described for TCR signaling analyses: p44/42 MAPK (ERK1/2) (clone 137F5), Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) MAPK (ERK1/2), (clone D13.14.4E; all from Cell Signaling), GAPDH (clone 86C5, Santa Cruz Biotechnology).

**Tandem affinity purification and mass spectrometry analyses.** Tandem affinity purification and mass spectrometry analyses were performed as described<sup>62</sup>. Data were uploaded to CRAPome database for FCA, FCB and Saint score calculations<sup>63</sup>.

**Co-immunoprecipitation of RASGRP1 and DYNLL1 in HEK293 cells and Jurkat T cells.** Immunoprecipitation was performed by lysing induced cells in IP buffer (50 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40,



50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitors from Sigma-Aldrich). Lysates were precleared with Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) and tagged RASGRP1 protein purified using anti-HA agarose beads (Sigma-Aldrich). Immunoprecipitates were washed with wash buffer (50 mM HEPES pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitors from Sigma-Aldrich), and analyzed by SDS-PAGE separation, blotting and immunostaining using antibodies against DYNLL1, GAPDH (both Santa Cruz Biotechnology) and HA tag (Sigma-Aldrich; 1:1,000 dilution for DYNLL1 antibody and 1:2,000 dilution for others). 1/40 of the lysate used for immunoprecipitation was used as input control.

**T-cell proliferation.** Thymidine incorporation assays were performed as described<sup>51</sup>. Flow cytometry-based proliferation assays were performed using Violet proliferation dye 450 (BD Biosciences). In brief, cells were labeled with proliferation dye according to manufacturer's instructions and incubated with stimulating antibodies 1 µg/ml anti-CD3 (clone OKT3/Leu-4, T3, eBiosciences) and 0.5 µg/ml anti-CD28 (clone T44, CD28.2, eBiosciences) for up to 4 d. Proliferation of shRNA-transfected Jurkat T-cell lines was performed by labeling cells with V450 proliferation dye and subsequent knockdown induction with 1 µg/ml doxycycline. For proliferation studies samples were taken on consecutive days and analyzed by flow cytometry after staining with additional markers (see Immunophenotyping section).

**Flow-cytometry-based T-cell cytotoxicity.** Assays to quantify the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells were done as previously described with minor modifications<sup>64</sup>. In brief, GFP-expressing P815 target cells were treated with aphidicolin to inhibit proliferation and pre-incubated either with or without OKT-3 (1 µg/ml). Different ratios of target cells and CD8<sup>+</sup> T cells were distributed in 96-well U-bottom low-cell-binding plates (Nunc). Following 6 or 24 h of incubation, cells were stained with 7-AAD and residual alive target cells were evaluated.

**T-cell and B-cell reconstitution experiments.** *T cells.* Patient and healthy donor PBMCs were thawed and transfected with a GFP control or wild-type N-terminally GFP-tagged RASGRP1 using the Amara human T-cell nucleofector kit (Lonza) and program V024 (unstimulated T cells). Cells were rested for 1 d in complete IMDM, starved for 4 h in serum-free medium and stimulated for 30–40 min with stimulating antibodies 1 µg/ml anti-CD3 (clone OKT3/Leu-4, eBiosciences) and 0.5 µg/ml anti-CD28 (Clone T44, CD28.2, eBiosciences). Cells were fixed in 100 µl IC-Fixation solution (eBioscience) for 20–60 min, washed 2x in Fixation/Permeabilization buffer (eBioscience) and stained with antibodies against pERK, CD4, CD8 and CD3 (see Flow Cytometry section) for 1 h ~21 °C. Samples were washed in 1x in Fixation/Permeabilization buffer and 1x in PBS and analyzed by flow cytometry gating on GFP positive cells.

*B cells.* Patient and healthy donor B-cell lines were transfected using a lentiviral vector (pRR1\_EF1a\_StrepHA\_TRES\_GFP), with second generation packaging plasmids (PAX2 and MD2G) kindly provided by the Giulio Superti-Furga laboratory (CeMM). For phospho-ERK analyses, transduced B-EBVs were serum-starved for 2–3 h and stimulated using IgM antibody (Southern biologicals) for 30–40 min. Staining was performed as described for T cells with pERK and CD19.

**B-cell class switch recombination.** B-cell class switch recombination (CSR) experiments were performed on freshly isolated PBMCs. Cells were labeled with Violet proliferation dye 450 (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions and seeded into a 96-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/well in IMDM medium supplemented with 10% FCS, 5% L-Glutamine, penicillin/streptomycin, 1% HEPES and beta-mercaptoethanol. B-cell proliferation and CSR were induced using CD40L (1/800 dilution of the titrated supernatant and IL-4 (30 ng/ml) or CD40L/IL-4/BAFF (1/1,000 dilution of the titrated supernatant; both kindly provided by H. Eibel, Center for Chronic Immunodeficiency) for 4 d. The activation status of the cultured B cells was measured 1 d upon induction by flow cytometry using CD19, CD86, CD25, CD69 and CD95 antibodies. Cell proliferation was measured by monitoring the dilution of the proliferation dye, and CSR by monitoring IgG expression on the surface on CD19<sup>+</sup> B cells using flow cytometry after 4 d in culture.

**Cell migration assays following lenalidomide treatment.** *Agarose based assays.* Human CD8<sup>+</sup> T cells were purified using MagniSort Human CD8<sup>+</sup> T-cell Enrichment Kit (eBioscience) and labeled with 5 µM CMTMR (Invitrogen) 1 d before imaging and incubated with 1 µM lenalidomide or DMSO for 24 h, and recorded migrating confined under agarose block. Briefly, home-made glass bottom dishes were coated with 2 µg/ml human ICAM-1 Fc (R&D) at 4 °C overnight and afterwards rinsed with PBS to remove residual, unbound protein. 500 µl of 0.5% agarose (Biozym Gold Agarose) solution containing 100 ng/ml human CXCL12 (R&D), 50 µM ascorbic acid and fully supplemented R10 medium (RPMI 1640, 10% FCS, glutamine, non-essential amino-acids, β-mercaptoethanol) were poured onto the coated dishes to form approximately 3-mm thick layer and allowed to solidify for 1 h at 4 °C. Finally, dishes were equilibrated for 30 min in a humidified incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and cells were injected between the glass and the agarose layer. Cells were recorded at 37 °C on Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with Hamamatsu EMCCD C9100-02 camera and tracked using Volocity software (PerkinElmer).

*Video microscopy without agarose.* The experiment was carried out as described<sup>36</sup>. Stimulation of PBMCs with 1 µM lenalidomide or DMSO was performed for 20 h before microscopy.

**Actin retrograde flow assay.** Isolated human CD8<sup>+</sup> T cells were nucleofected with plasmid expressing Lifeact-GFP using Nucleofector II and Mouse T-cell Nucleofector Kit (Lonza) 1 d before imaging. Glass bottom dishes (MatTek) were coated with 0.2 mg/ml PLL-PEG at 4 °C overnight and afterwards rinsed with PBS to remove residual PLL-PEG. 500 µl of 0.5% agarose (Biozym Gold Agarose) solution containing 100 ng/ml human CXCL12 (R&D) were poured onto the coated dishes. Cells were injected between the glass and the solidified agarose layer as described above.

Total internal reflection (TIRF) microscopy was performed at 37 °C with an inverted Axiovert 200 (Zeiss) microscope, a TIRF 488/561-nm laser system (Visitron systems) and an Evolve™ EMCCD camera (Photometrics) triggered by VisiView software (Visitron). FIJI image processing package was used for image and kymograph analysis.

**Protein expression and lipid bilayers.** DNA constructs for production of monovalent streptavidin (MonoSAv) were a gift from A. Ting (Massachusetts Institute of Technology). A 3C protease-recognition sequence was inserted between the alive streptavidin subunit and the six-glutamate tag. The gene encoding the dead streptavidin subunit was prolonged with a six-histidine tagged tail mediating binding to supported lipid bilayers containing 18:1 DGS-NTA(Ni) (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] (nickel salt)<sup>65</sup>. MonoSAv was produced by an *in vitro* refolding protocol as described<sup>66,67</sup> and subsequently purified by MonoQ (MonoQ 5/50, GE Healthcare) and size-exclusion chromatography (Superdex 200, GE Healthcare). The six-glutamate tagged tail was cleaved with the 3C protease (GE Healthcare).

**Calcium flux experiments.** T cells ( $0.5-1 \times 10^6$ ) were loaded with 5 µM Fura-2 (Invitrogen) in complete RPMI-1640 medium for 30 min at 25 °C and then washed twice with 10 ml imaging buffer (1x HBSS, Gibco, supplemented with 2% FCS, Sigma, 10 mM HEPES pH 7.4, Gibco, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM CaCl<sub>2</sub>). For imaging, cells were spotted on a supported lipid bilayer functionalized with MonoSAv (50 ng/well) linked to CD3-biotin antibodies (OKT-3, eBioscience) at 25 °C. Image acquisition was performed with a DMI4000B microscope (Leica Microsystems) equipped with a 40x immersion objective (Leica HCX PL Apo 40x, NA 1.25) and an Andor iXon Ultra-8871 EM-CCD camera (Andor Technologies) controlled by the Leica Application Suite Advanced Fluorescence software (version AF6000LX). Imaging of Fura-2 (excitation, 340 nm and 380 nm; emission, 510 nm) was achieved through a fast external filter wheel equipped with excitation filters at 340 nm and 380 nm (Leica Fura EX) and a filter cube consisting of a dichroic beamsplitter and an emission band pass filter at 520 nm (Fura-2 Leica EM520/36, DC409). DIC and Fura-2 images were collected at intervals of 1 min over 15 min. Intracellular calcium dynamics were determined from the Fura-2 excitation ratio (excitation at 340 nm/excitation at 380 nm) with the open source image analysis software package Fiji and Matlab.



Calcium flux measurement in shRNA cell lines was performed using Indo-1 Calcium Indicator (Life Technologies). 24 h after doxycycline induction cells were labeled with Indo-1 Calcium Indicator stimulated with OKT3 (eBiosciences) and analyzed on a BD LSR-Fortessa. Data were analyzed using FlowJo Software.

**NK-cell experiments on patient cells and CRISPR edited NK-92 cell lines.** Conjugates of NK-92 CRISPR edited cells and K562 cells were formed for 60 min at 37 °C on silane coated slides (Electron Microscopy Services) and then permeabilized, fixed and stained for F-actin with phalloidin Alexa-Fluor568, anti-perforin Alexa-Fluor488 (clone G9, BioLegend) and anti- $\alpha$ -tubulin biotin (Life Technologies) followed by streptavidin Alexa-Fluor647 (Life Technologies). Conjugates were imaged as z stacks of 0.2- $\mu$ m thickness to cover the entire volume of the immunological synapse, determined individually for each conjugate, on a Zeiss Axio-Observer Z1 equipped with a Yokogawa CSU10 spinning disc, Zeiss 63 $\times$  1.43 NA objective, and Hamamatsu Orca-AG camera. Images were acquired and analyzed with Volocity software (PerkinElmer) as described<sup>68</sup>.

For measurement of F-actin mesh in patient cells, PBMC were activated for 25 min on #1.5 coverslips coated with 5  $\mu$ g/ml anti-CD18 (clone IB4) and anti-NKp30 (BioLegend) then fixed, permeabilized and stained with phalloidin Alexa-Fluor532 (Life Technologies) and anti-perforin Alexa-Fluor488 (clone  $\delta$ G9, BioLegend). Slides were mounted with ProLong Gold (Life Technologies). Stimulation emission depletion (STED) images were acquired on a Leica SP8 confocal microscope with excitation by white light laser, STED depletion at 660 nm with time-gating, and emission detected by HyD (GaAs) detectors. Data was exported to Volocity software (PerkinElmer) for analysis following deconvolution with Huygens software (Scientific Volume Imaging). All data was graphed using Prism 6.0 (GraphPad). Statistical analysis was performed using the Student's two-tailed unpaired *t* test. *P* < 0.05 was considered significant.

**Analysis of RhoA activation by immunofluorescence.** Untransformed CD8<sup>+</sup> T cells were expanded with a feeder mixture and a supplement of IL-2 and IL-15, as described above. Cells ( $2 \times 10^5$ ) were treated with lenalidomide (1  $\mu$ M) or DMSO (1:1,000) in complete medium for 16 h. Half of the cells were subsequently stimulated with CXCL12 (100 ng/ml) for 5 min. Cells ( $10^5$  per condition) were then deposited onto poly-L-lysine-coated coverslips. Following a sedimentation of 5 min at 37 °C, cells were spun down for 2 min at 350 rpm. Cells were fixed with ice-cold 10% TCA/30 mM glycine onto coverslips as described<sup>69</sup>. Following incubation on ice for 15 min, coverslips were washed three times with PBS/glycine. Cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS/glycine, washed and blocked for 30 min with 3% BSA, 0.01% Triton X-100 in PBS/glycine. Cells were stained with a rabbit mAb recognizing total RhoA (catalog number: 67B9, Cell Signaling) or active RhoA-GTP (catalog number: 26904, NewEast Biosciences) in a 1:50 dilution in 0.01% Triton X-100 in PBS/glycine and incubated overnight at 4 °C. Cells were incubated with anti-rabbit Alexa-Fluor555 or anti-mouse Alexa-Fluor488 secondary Abs at 1/400 dilution. Following nuclear staining with DAPI, slides were mounted with Prolong Gold antifade mounting medium (Life Technologies). Randomly selected fields were examined with a Leica DMI 6000B fluorescence microscope equipped with a 40 $\times$  objective. The mean intensity of total RhoA and RhoA-GTP was calculated from 8-bit images in 50 cells per condition using cell masks created with ImageJ software.

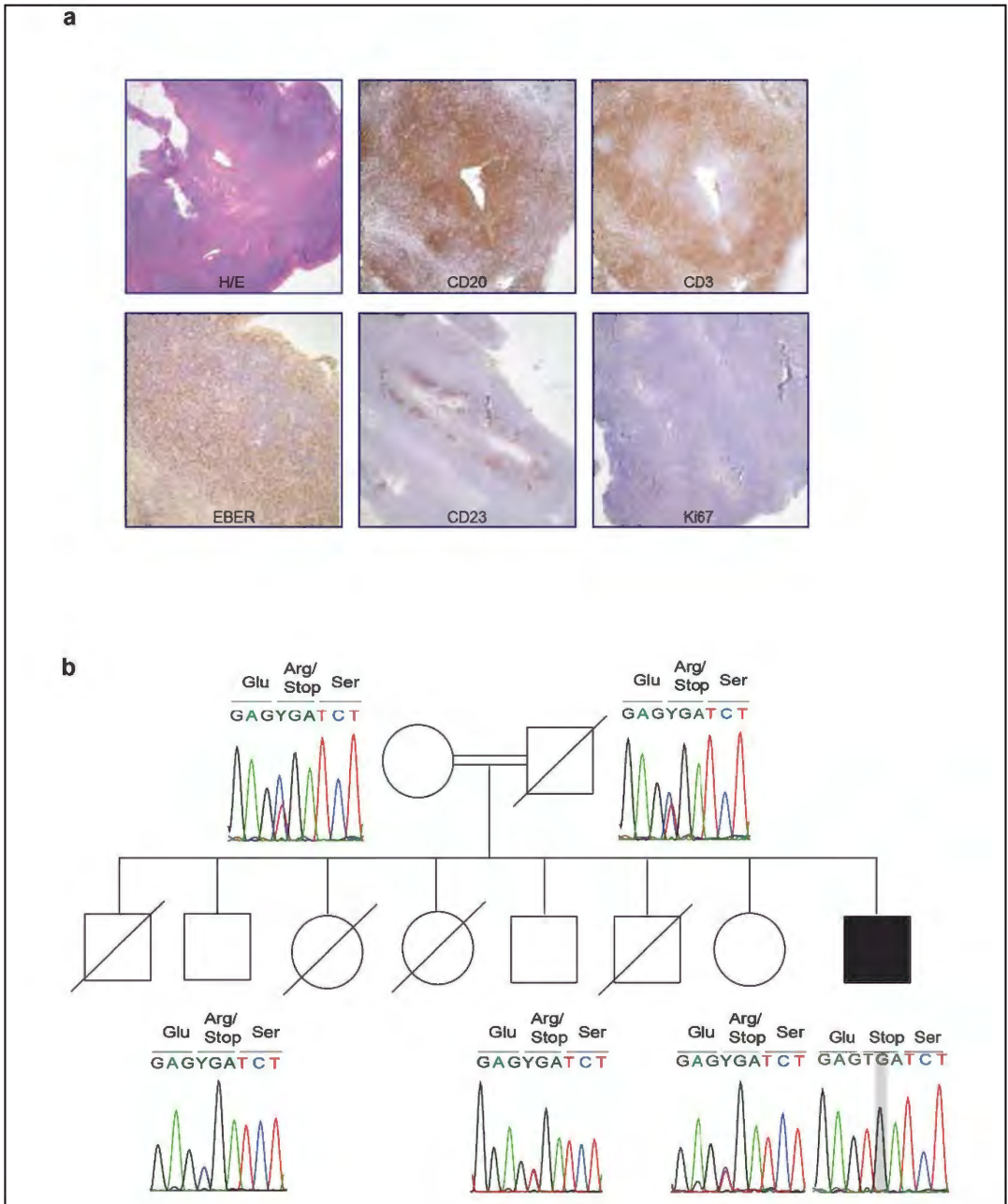
**SiR-tubulin staining and live convergence imaging.** For imaging NK cells on activated glass surface,  $3 \times 10^5$  NK cells were incubated with 500 nm of the live cell fluorogenic microtubule labeling probe SiR-tubulin (Spirochrome) and 5  $\mu$ M Verapamil for 2 h at 37 °C. For imaging lytic granules, cells were incubated with 1  $\mu$ M LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37 °C, washed once, and resuspended in dye-free R10 (RPMI 1640 (Gibco), 10% FBS (Atlanta Biologicals), 2 mM L-glutamine (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (CellGro), 10 mM HEPES (Gibco), 100  $\mu$ M MEM nonessential amino

acids (Gibco), and 100 U/ml penicillin and streptomycin), supplemented with 5  $\mu$ M Verapamil.  $\Delta$ T dishes (Bioptechs) were coated with 5  $\mu$ g/ml anti-NKp30 (BioLegend) and 5  $\mu$ g/ml anti-CD18 (Clone IB4) for 1 h at 37 °C, washed with PBS, and pre-warmed before imaging with 300  $\mu$ l dye-free R10.

For imaging of NK cells with K562 target cells,  $10^5$  Lyso Tracker Red-loaded NK cells (effectors) were stained with 500 nm SiR-tubulin and 5  $\mu$ M Verapamil for 2 h at 37 °C, washed once, resuspended in dye-free R10, and then mixed at a 1:2 ratio with target cells that had been pre-incubated for 5 min with 2.5  $\mu$ M CellTrace CFSE (Thermo Fisher Scientific). Conjugates were incubated in 1 ml microcentrifuge tubes in the presence of 5  $\mu$ M Verapamil for 30 min at 37 °C and plated in Lab-Tek #1.0 Borosilicate chamber slides (Nunc) pre-coated with 5  $\mu$ g/ml anti-CD58 (BD Pharmingen) for 30 min at 37 °C and washed with PBS. Target cells were allowed to adhere to glass for 15 min and conjugates were imaged at 30s per frame for 30–45 min on a Leica SP8 laser scanning confocal microscope with 100 $\times$  objective. Excitation was provided by a tunable white light laser at 488, 561 and 647 nm.

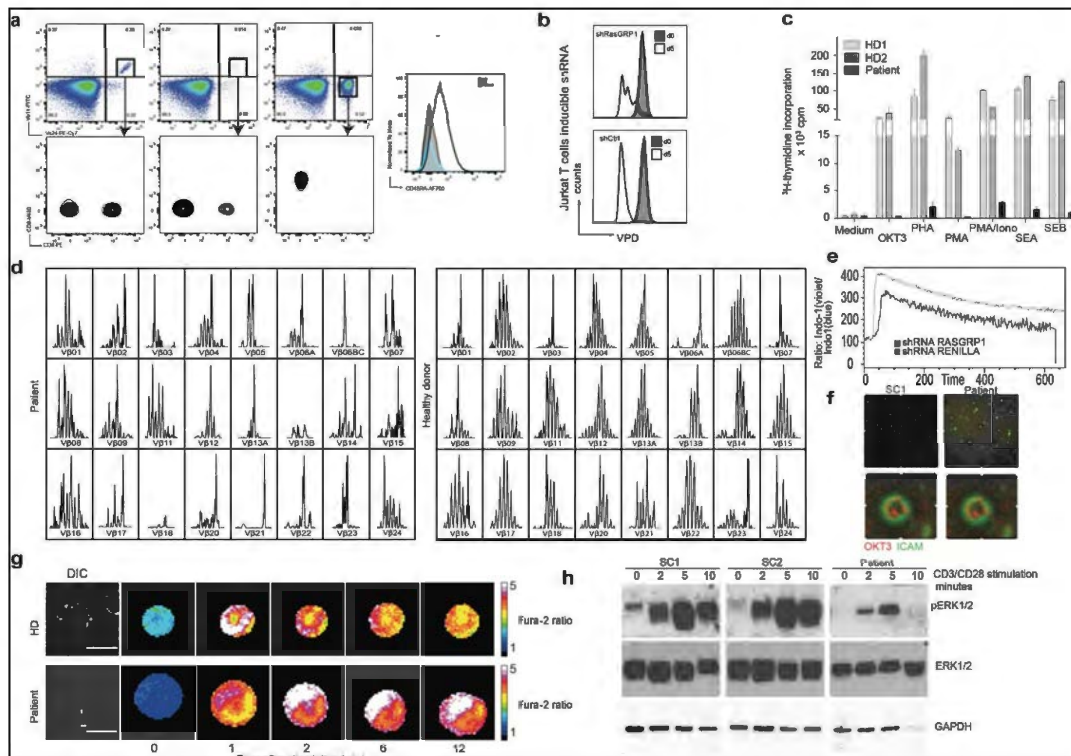
For evaluation of lytic granule convergence, raw images were analyzed in Volocity (PerkinElmer) and mean granule distance (MGD) to the MTOC was calculated as described previously<sup>32</sup>. Number of replicates performed = 3 for both types of experiments. Graphs were plotted in Prism (GraphPad) showing mean values with s.e.m. Statistical test used is unpaired *t* test with Welch's correction.

50. Salzer, E. *et al.* Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica* **98**, 473–478 (2013).
51. Willmann, K.L. *et al.* Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat. Commun.* **5**, 5360 (2014).
52. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **45**, 310–315 (2014).
53. Dupré, L. *et al.* Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum. Gene Ther.* **17**, 303–313 (2006).
54. Dupré, L. *et al.* Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol. Ther.* **10**, 903–915 (2004).
55. Pichlmair, A. *et al.* Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature* **487**, 486–490 (2012).
56. Glatter, T., Wept, A., Aebersold, R. & Gstalger, M. An integrated workflow for charting the human interaction proteome: insights into the PP2A system. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 237 (2009).
57. Dow, L.E. *et al.* A pipeline for the generation of shRNA transgenic mice. *Nat. Protoc.* **7**, 374–393 (2012).
58. Zuber, J. *et al.* An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes Dev.* **25**, 1628–1640 (2011).
59. Ran, F.A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
60. Sanjana, N.E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**, 783–784 (2014).
61. Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M. & van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* **42**, e168 (2014).
62. Boztug, K. *et al.* JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia. *Nat. Genet.* **46**, 1021–1027 (2014).
63. Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods* **10**, 730–736 (2013).
64. Vasconcelos, Z. *et al.* Individual human cytotoxic T lymphocytes exhibit intracellular heterogeneity during sustained killing. *Cell Rep.* **11**, 1474–1485 (2015).
65. Huppa, J.B. *et al.* TCR-peptide-MHC interactions *in situ* show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* **463**, 963–967 (2010).
66. Fairhead, M., Krndjija, D., Lowe, E.D. & Howarth, M. Plug-and-play pairing via defined divalent streptavidins. *J. Mol. Biol.* **426**, 199–214 (2014).
67. Howarth, M. *et al.* A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat. Methods* **3**, 267–273 (2006).
68. Banerjee, P.P. & Orange, J.S. Quantitative measurement of F-actin accumulation at the NK cell immunological synapse. *J. Immunol. Methods* **355**, 1–13 (2010).
69. Trifari, S. *et al.* Defective T<sub>H</sub>1 cytokine gene transcription in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J. Immunol.* **177**, 7451–7461 (2006).





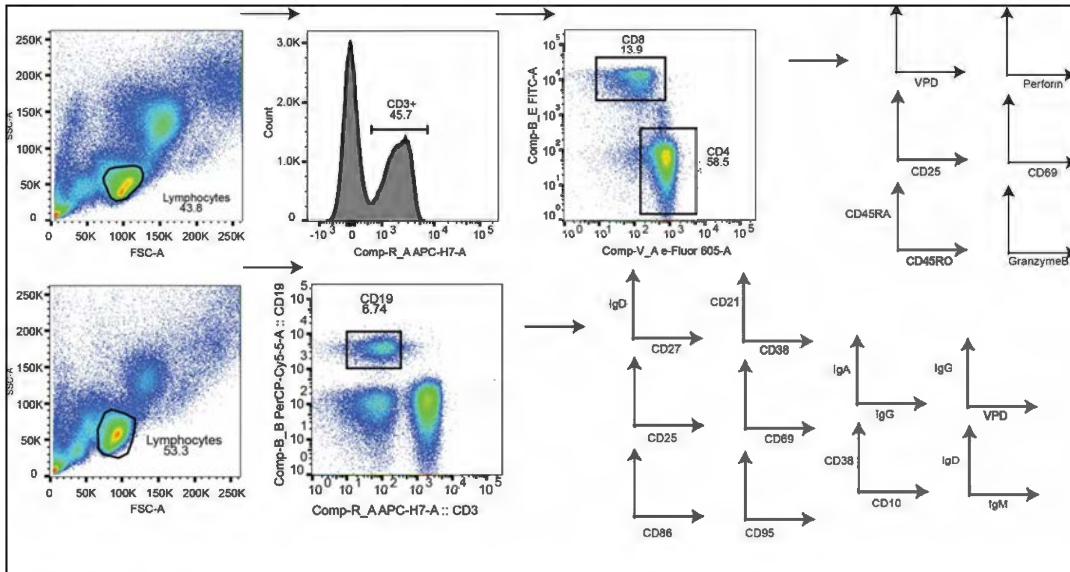
<b>Supplementary Figure 1</b>
Histology of lymphoma and segregation of the mutation with the disease phenotype.
(a) Histology of adenoid biopsy showing low grade B-cell lymphoma compatible with marginal zone lymphoma. Top left to right: Hematoxylin/Eosin staining, CD20 staining, CD3 staining. Bottom left to right: EBER, CD23, Ki67. The described findings suggest a low grade EBV-related B-cell lymphoma developed likely associated with the underlying immunodeficiency. (b) Segregation of the detected mutation among the core family (circle - female; square - male; line - dead; black filling - affected index patient).



**Supplementary Figure 2**

**Functional characterization of T cells.**

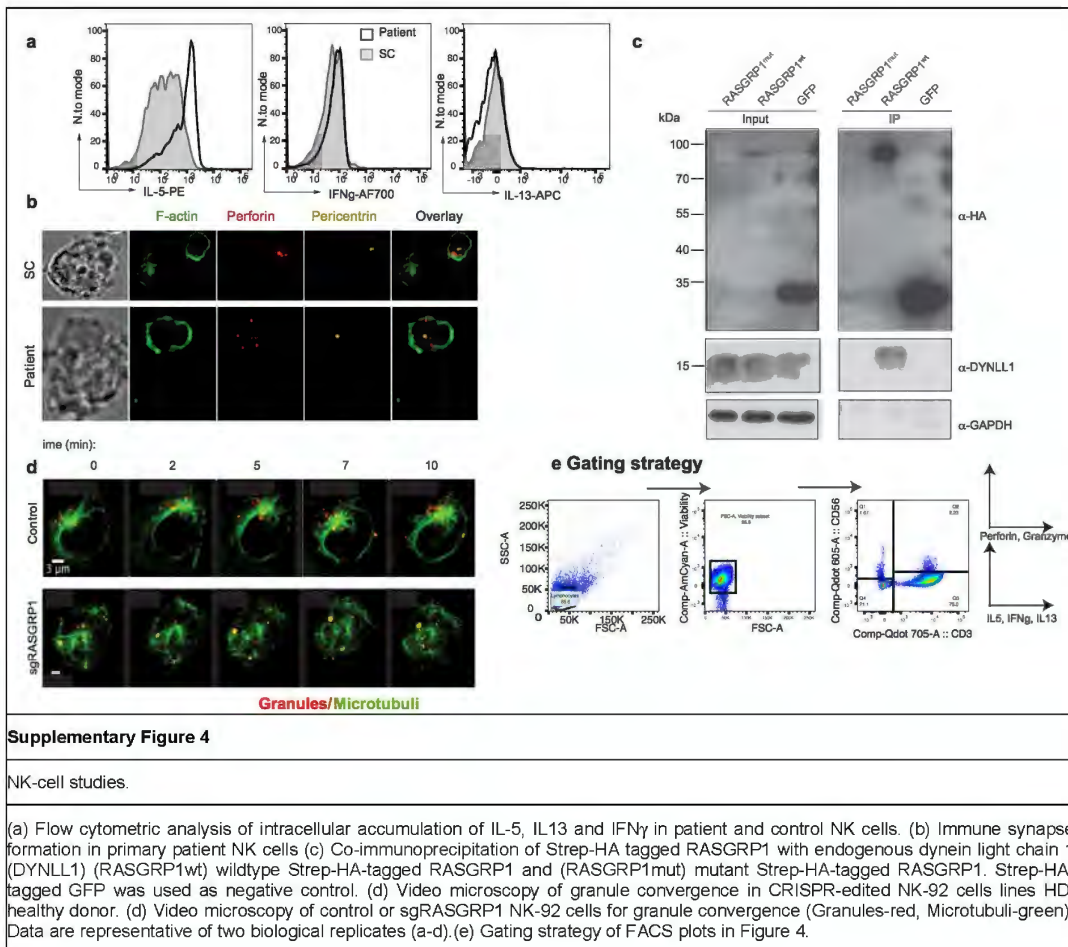
(a) Invariant natural killer T (iNKT) cells. A prominent TCRv024-expressing cell population was detectable in patient peripheral blood, however these cells expressed CD8 and CD45RA surface markers, suggesting that they belong to oligoclonally expanded exhausted memory CD8 T cells. HD – healthy donor; SC – Shipment control. (b) Proliferative response of T cells determined by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation assay after stimulation with various stimuli after 3 days (OKT3, anti-CD3 antibody (clone OKT3)); PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SEA: Staphylococcal enterotoxin A; SEB: Staphylococcal enterotoxin B; PHA: phytohemagglutinin). (c) Proliferation of Jurkat T cells upon shRNA-mediated knockdown of *RASGRP1*. shRNA against Renilla luciferase was used as negative control. Cells were labeled with violet proliferation dye and analyzed by flow cytometry over the period of 5 days. (d) TCRVβ spectratyping of patient and control T cells indicating oligoclonality of the TCR repertoire of the patient. (e) Calcium flux of Jurkat T cells upon inducible shRNA-mediated knockdown of *RASGRP-1*. shRNA against Renilla luciferase was used as negative control. (f) Fluorescence microscopy of Ca<sup>2+</sup>-flux of one representative cell is displayed below the graph. Scale bar represents 10 μm. HD – healthy donor; DIC – differential interference contrast. (g) ICAM Ring formation and cSMAC exclusion of hTERT immortalized patient and control T cell lines on a lipid bilayer following OKT3 stimulation. (h) Cropped immunoblot showing downstream TCR signaling in expanded patient and shipment T cells upon CD3/CD28 stimulation. Cells were starved and restimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies and subsequently analyzed for ERK1/2 phosphorylation. Data is representative of three (h), two (a,c,d,g) or one (b,f,e) independent experiment.



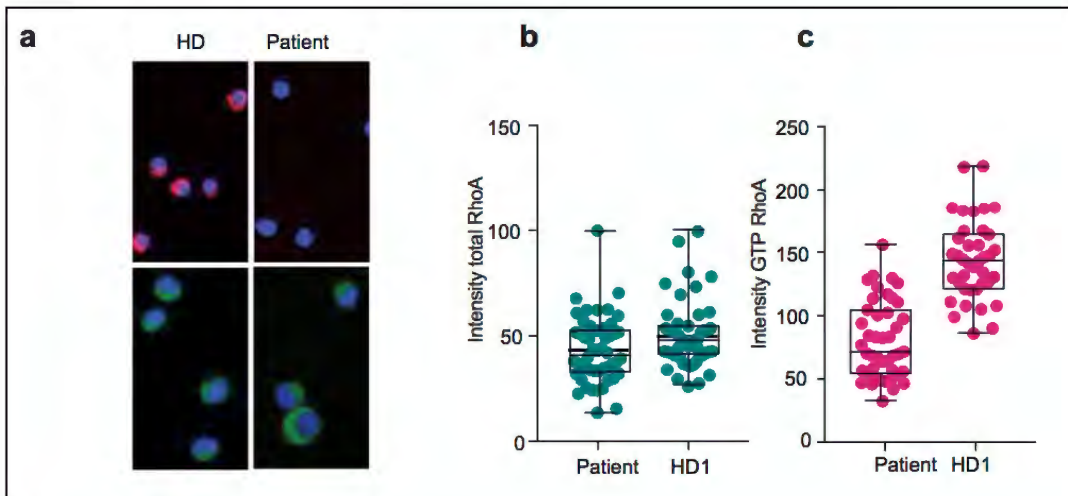
**Supplementary Figure 3**

**Gating Strategy**

Gating strategy for Figures 2 and 3 are presented in this figure.a







**Supplementary Figure 5**

T-cell activation using CXCL12.

(a-c) Immunofluorescence (a) and quantification (b,c) of patient and healthy donor expanded CD8 T cells following CXCL12 stimulation either stained for total RhoA (green) or active RhoA (pink) and DAPI (blue). Data is representative of two (a-c) independent experiments.

1

## Annexe 2: Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10812-x>

OPEN

Corrected: Publisher correction

# Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis

Nina K. Serwas, Birgit Hoeger  et al. <sup>#</sup>

Immune responses need to be controlled tightly to prevent autoimmune diseases, yet underlying molecular mechanisms remain partially understood. Here, we identify biallelic mutations in three patients from two unrelated families in *differentially expressed in FDCP6 homolog* (*DEF6*) as the molecular cause of an inborn error of immunity with systemic autoimmunity. Patient T cells exhibit impaired regulation of CTLA-4 surface trafficking associated with reduced functional CTLA-4 availability, which is replicated in *DEF6*-knockout Jurkat cells. Mechanistically, we identify the small GTPase RAB11 as an interactor of the guanine nucleotide exchange factor DEF6, and find disrupted binding of mutant DEF6 to RAB11 as well as reduced RAB11<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> vesicles in *DEF6*-mutated cells. One of the patients has been treated with CTLA-4-Ig and achieved sustained remission. Collectively, we uncover DEF6 as player in immune homeostasis ensuring availability of the checkpoint protein CTLA-4 at T-cell surface, identifying a potential target for autoimmune and/or cancer therapy.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.B. (email: [kaan.boztug@ccri.at](mailto:kaan.boztug@ccri.at)).

<sup>#</sup>A full list of authors and their affiliations appears at the end of the paper.

NATURE COMMUNICATIONS | (2019)10:3106 | <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10812-x> | [www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications)

1

Although immune dysregulation and autoimmunity are hallmarks of multiple human diseases, their underlying molecular pathological mechanisms remain poorly understood<sup>1</sup>. Studying monogenic disorders with predominant autoimmunity offers an attractive strategy to identify core regulators of immune homeostasis<sup>2</sup>. Key regulatory components which help tune immune responses include regulatory T cells ( $T_{reg}$ )<sup>3</sup> and the checkpoint protein CTLA-4<sup>4</sup>. CTLA-4 is constitutively expressed on  $T_{reg}$ s and upon activation on activated conventional helper-T cells ( $T_{conv}$ ). CTLA-4 ligand engagement results in rapid internalization from cell surfaces by clathrin-mediated endocytosis, and shuttling to either lysosomes or RAB11<sup>+</sup> recycling endosomes<sup>5–8</sup>. Functionally, CTLA-4 competes with the activating co-receptor CD28 for interaction with their shared ligands CD80/CD86 expressed on antigen-presenting cells (APCs)<sup>9</sup>, thereby inhibiting T-cell costimulation. Binding of CTLA-4 to CD80/CD86 results in ligand transendocytosis into T cells, sequestering the costimulatory ligands from APCs. Inside the T cell, CD80/86 are guided to lysosomal degradation<sup>10</sup>. Interaction of CTLA-4 with lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (LRBA) is essential for prevention of its own degradation<sup>11</sup>. The importance of CTLA-4 in regulating human immune tolerance is underlined by several SNPs conferring increased risk of autoimmunity<sup>12</sup> and further solidified with the recent identification of patients with monoallelic mutations in *CTLA4* or biallelic mutations in *LRBA* suffering from severe autoimmunity<sup>13–18</sup>. Additional cellular regulators of CTLA-4 and their relevance to human disease remain to be investigated.

DEF6, also known as IRF4 binding protein (IBP)<sup>19</sup> or SWAP-70-like adaptor of T cells (SLAT)<sup>20</sup> is a unique guanine nucleotide

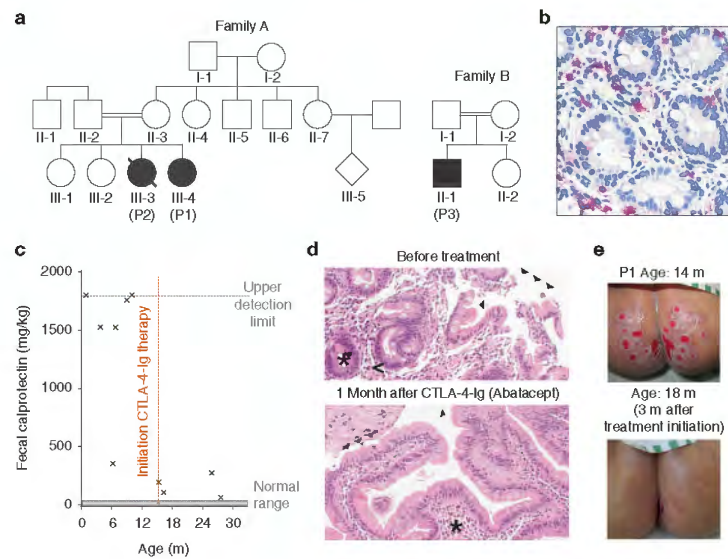
exchange factor (GEF) which has an inverse conformation of the PH-DH domain compared to conventional GEFs<sup>21</sup>. DEF6 acts downstream of the T-cell receptor (TCR) and can be phosphorylated by the tyrosine-protein kinases LCK<sup>21</sup> and ITK<sup>22</sup>. It can activate small GTPases of the RHOA<sup>21</sup> and Ras family<sup>23</sup>, promoting  $Ca^{2+}$  signaling, NFAT1 activation<sup>24</sup>, and T-cell adhesion<sup>23</sup>. Additionally, DEF6 binds and negatively regulates the transcription factor IRF4<sup>25,26</sup>. Murine knockout studies have illustrated a role of Def6 in immunological synapse formation<sup>27</sup>, Th1/Th2 lineage differentiation<sup>24</sup>, IL17 and IL21 production<sup>26</sup>, bacterial phagocytosis<sup>28</sup>, T-cell proliferation<sup>29</sup>, as well as a possible role in early-onset large vessel vasculitis<sup>26</sup> and autoimmunity<sup>27</sup>. Interestingly, other studies of *Def6*-knockout mice contrarily revealed resistance to uveitis and experimental autoimmune encephalitis<sup>30,31</sup>, and to date it remains unclear whether susceptibility to autoimmunity is dependent on the genetic background of the mice or other factors. Thus, the role of DEF6 in autoimmunity has remained controversial and partially enigmatic.

Here, we uncover an inborn error of immunity caused by biallelic mutations in *DEF6* and characterized by early-onset systemic autoimmunity. We find impaired CTLA-4 availability and trafficking, due to decreased interaction of mutated DEF6 with the small GTPase RAB11, as the mechanistic basis for the autoimmune manifestations.

## Results

### Systemic autoimmunity in three patients from two families.

We studied three patients with severe autoimmune manifestations. Patient 1 is female (P1, Family A) born to consanguineous Pakistani parents (Fig. 1a) who presented with severe watery



**Fig. 1** Systemic autoimmunity in three patients from two families. **a** Pedigree of families A and B. Filled symbols – affected patients (P). **b** Colon biopsy of P1 reveals T-cell infiltration (red: anti-CD3). **c** Fecal calprotectin values reveal therapy-dependent reduction of bowel inflammation in P1. **d** Duodenal biopsies at the age of 5 months (top) showed incomplete villous atrophy with villi focally reduced and plump (closed arrows). The inflammatory infiltrate contains clusters of eosinophilic granulocytes (lined arrows) and only few crypts with isolated apoptotic figures (asterisk). At the age of 16 months (bottom, 1 month of therapy with Abatacept, see Fig. S1e) duodenal biopsies showed presence of villi (closed arrows) and no signs of acute inflammation in the lamina propria (asterisk) of P1. **e** Perianal fissures of P1 before (top) and after (bottom) therapy initiation present a marked improvement of patient quality of life (m – months)

diarrhea in the first month of life. Endoscopy revealed atrophy of gastric mucosa and villous atrophy with pronounced T- and eosinophilic cell infiltration in the colon and duodenum (Fig. 1b and Fig. S1a). Further disease features included hepatosplenomegaly, dilated cardiomyopathy, and increased susceptibility to viral and bacterial infections suggesting a primary immune defect (Tables 1 and 2). Immune phenotyping revealed reduced CD8<sup>+</sup> T-cell numbers (Table 1) and slightly reduced percentages of CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> (Fig. S1b) in the circulation. Immunoglobulin levels were not consistently altered (Table 1), only few CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> class-switched B cells were detected (Fig. S1c), and specific antibody responses were impaired (Table 2). Clinical signs of autoimmunity were paralleled by detectable anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and autoantibodies against cardiolipin, smooth muscle protein, and β<sub>2</sub>-glycoprotein (Table 2). NK cells were in the normal range, and neutrophil function including oxidative burst as well as phagocytosis of opsonized bacteria was not impaired (Table 2). A serum cytokine/chemokine blot did not reveal elevation of pro-inflammatory cytokines but rather reduced levels of serum IL-12 and IL-6 compared to a healthy control (Fig. S1d). Upon clinical deterioration of symptoms, we initiated CTLA-4-Ig (Abatacept) treatment at 4-weekly intervals starting at 15 months of age (Fig. S1e). Consequently, bowel inflammation decreased markedly as reflected by fecal calprotectin values (Fig. 1c). Lymphocytic infiltration and complete villous atrophy of the duodenum improved within one month of treatment (Fig. 1d). In addition, persisting perianal lesions reversed and did not recur (Fig. 1e). P1 was consequently discharged and treated as an outpatient (Fig. S1e). To date, ~4 years after treatment

initiation, no overt signs of autoimmunity have reoccurred, and cardiorespiratory fitness has been stable without arrhythmias or other overt pathology. Regular immunoglobulin treatment is given. Recurrent infections requiring antibiotic treatment have persisted (Fig. S1e). The female sibling of P1 (patient 2 or P2) had been diagnosed earlier with a systemic autoimmune/autoinflammatory disease that included bowel inflammation, hepatomegaly, cholestasis, and cardiac ventricular septal defect. P2 also presented with recurrent infections and exhibited reduced numbers of lymphoid cells (Table 1, Table 2), however immunological investigations could not be performed in-depth since P2 died at 10.5 months of age due to cardiomyopathy-associated cardiac and multi-organ failure.

A third patient (P3, family B), born to consanguineous Iraqi parents (Fig. 1a), presented at 7 months of age with hemolytic anemia in the context of a CMV infection which was successfully treated with corticosteroids/azathioprin and ganciclovir/valganciclovir as indicated by decreased CMV DNA levels. Direct Coombs test was positive and hemolytic anemia relapsed at the age of 27 months (Table 2) without detectable CMV DNA, prompting initiation of immunosuppressive treatment. Despite treatment, P3 developed transient thrombocytopenia (minimum  $32 \times 10^9/L$ ) which resolved spontaneously at the age of 3.5 years. Blood counts revealed reduced lymphocyte numbers ( $0.9\text{--}2.5 \times 10^9/L$ , Table 1) with low absolute numbers of T, B and NK cells, yet largely normal relative percentages of lymphocytes (Table 1). More in-depth immunophenotyping revealed slightly increased proportions of CD38<sup>high</sup>IgM<sup>high</sup> transitional B cells (18.7%, reference 3.1–12.3% (ref. 32)) and CD38<sup>high</sup>IgM<sup>-</sup> plasmablasts (7.7%, reference 0.4–4.0% (ref. 32)) but normal frequencies of

**Table 1 Immunological data on patients with *DEF6* mutations**

Patient (age)	P1 (1–4 m)	P1 (5–8 m)	P1 (9–10 m)	P2 (4 m)	P2 (5–6 m)	P2 (7 m)	P3 (7–13 m)	P3 (5 y 3 m)	P3 (5 y 7 m)
ALC (cells/mm <sup>3</sup> ) (normal range)	6040 (4054–7048)		6250 (3320–7006)	<b>2230</b> (3320–7006)	<b>1450</b> (3320–7006)	<b>1930</b> (3320–7006)	<b>1904</b> (3873–6141)	<b>1779</b> (2340–5028)	<b>1753</b> (2340–5020)
Lymphocyte subsets									
CD3 <sup>+</sup> (%)	77 (62.7–81.6)		68 (51.8–74.2)	62 (51.8–74.2)	<b>78</b> (51.8–74.2)	67 (51.8–74.2)	<b>60</b> (60.7–75.8)	70 (59.7–77.6)	72 (59.7–77.6)
(cells/mm <sup>3</sup> )	4650 (3180–5401)		4250 (2284–4776)	<b>1380</b> (2284–4776)	<b>1130</b> (2284–4776)	<b>1290</b> (2284–4776)	<b>1137</b> (2542–4933)	<b>1265</b> (1578–3707)	<b>1263</b> (1578–3707)
CD4 <sup>+</sup> (%)	65 (42.8–65.7)		53 (34.9–53.1)	<b>56</b> (34.9–53.1)	<b>67</b> (34.9–53.1)	<b>61</b> (34.9–53.1)	34 (35.0–51.9)	35 (31.1–47.4)	34 (31.1–47.4)
(cells/mm <sup>3</sup> )	<b>3930</b> (2330–3617)		3310 (2284–4776)	<b>1250</b> (2284–4776)	<b>970</b> (2284–4776)	<b>1170</b> (2284–4776)	<b>653</b> (1573–2949)	<b>635</b> (870–2144)	<b>594</b> (870–2144)
CD8 <sup>+</sup> (%)	<b>11</b> (15–23)		<b>11</b> (12.8–27.1)	<b>7</b> (12.8–27.1)	<b>8</b> (12.8–27.1)	<b>8</b> (12.8–27.1)	18 (16.1–29.4)	18 (16.0–26.9)	14 (16.0–26.9)
(cells/mm <sup>3</sup> )	<b>660</b> (712–1361)		690 (524–1583)	<b>160</b> (524–1583)	<b>120</b> (524–1583)	<b>150</b> (524–1583)	<b>351</b> (656–1432)	513 (472–1107)	592 (472–1107)
CD19 <sup>+</sup> (%)	8 (7.4–21.3)		19 (17–37.2)	18 (17–37.2)	<b>12</b> (17–37.2)	18 (17–37.2)	21 (14.3–28.2)	16 (12.9–29.2)	14 (12.9–29.2)
(cells/mm <sup>3</sup> )	480 (315–1383)		1190 (776–2238)	<b>400</b> (776–2238)	<b>170</b> (776–2238)	<b>350</b> (776–2238)	<b>415</b> (733–1388)	<b>281</b> (434–1274)	<b>238</b> (434–1274)
CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> (%)	12 (4.2–14.8)		12 (4–15.1)	15 (4–15.1)	11 (4–15.1)	18 (4–15.1)	9 (4.0–13.8)	7 (4.7–16.2)	8 (4.7–16.2)
(cells/mm <sup>3</sup> )	730 (201–870)		750 (230–801)	330 (230–801)	<b>160</b> (230–801)	350 (230–801)	<b>183</b> (186–724)	<b>129</b> (155–565)	<b>143</b> (155–565)
CD3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	78		82		63		54	43	39
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	3630		3490		810		580	553	496
CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	6		9		14		36	57	60
CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	280		380		180		409	721	767
CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	75		62		62		99	96	88
CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	4530		3880		1190		1115	1214	1118
CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup> (cells/mm <sup>3</sup> )	2		<b>2</b> (2.8–5.8)		<b>2</b> (2.8–5.8)		1	4	11
(cells/mm <sup>3</sup> )	(0.7–4.1) 120		130		40		17	68	145
Immunoglobulins									
IgG (g/L)	<b>1.60</b> (1) (4–9.8)	4.32	9.59	5.60	5.51		6.9		
IgA (g/L)	<b>0.009</b> (1) (0.17–0.94)	0.69	<b>2.34</b> (†)	0.42	<b>1.09</b> (†)		0.25		
IgM (g/L)	<b>0.17</b> (1) (0.34–2.1)	0.91	<b>4.74</b> (†)	0.67	<b>2.92</b> (†)		0.45		

Lymphocyte reference values (in brackets) were taken from ref. 68. Values outside reference range are marked in bold. Immunoglobulin (Ig) concentration was tested at least 4 weeks after the last intravenous Ig treatment. P1 was vaccinated three times with Prevenar 13<sup>®</sup> (Pfizer: pneumococcal polysaccharide conjugated vaccine) and INFANRIX hexa<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline: *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* type 18, hepatitis B virus, poliovirus) at the age of 3, 4, and 10 months. The higher values might be caused by the presence of maternal antibodies

m months, y years, ALC absolute lymphocyte count, TCR T-cell receptor, Ig immunoglobulin



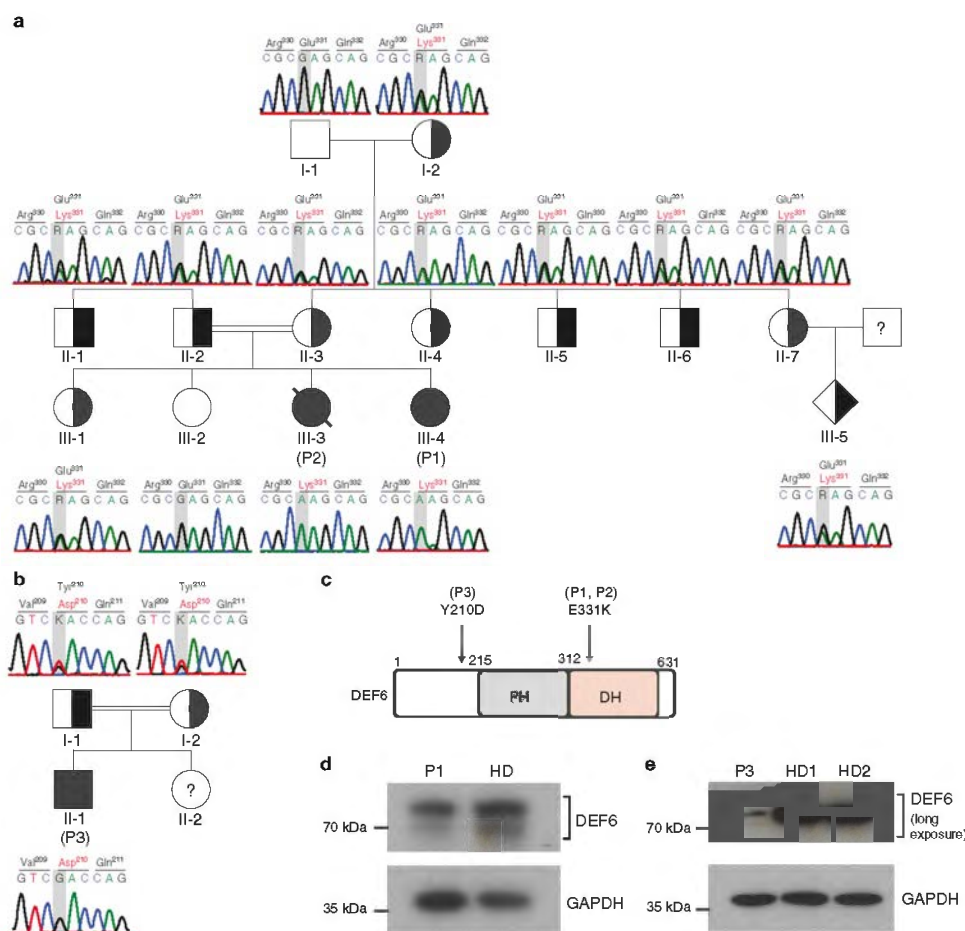
Table 2 Clinical characteristics of patients with <i>DEF6</i> mutations							
Patient (age)	P1	P1 (1-4 m)	P1 (5-8 m)	P1 (9-10 m)	P1 (11-12 m)	P2	P3
Neutrophil function							
Phagocytosis	normal ( <i>E. coli</i> opson, <i>S. pneumoniae</i> opson.)						
Oxidative burst	normal						
Hemoglobin							54 g/L (1) (2 y 3 m)
Vaccination response							
<i>C. tetani</i>		0.73 IU/ml (>=0.4 IU/ml)	<b>0.06</b> IU/ml (>=0.4 IU/ml)	<b>0.05</b> IU/ml (>=0.4 IU/ml)			
<i>C. diphtheriae</i>		<b>0.05</b> IU/ml (>=0.4 IU/ml)	<b>0.02</b> IU/ml (>=0.4 IU/ml)	<b>0.02</b> IU/ml (>=0.4 IU/ml)			
<i>S. pneumoniae</i>		<b>1:76</b> (>=1:200)	<b>1:20</b> (>=1:200)	<b>1:20</b> (>=1:200)			
<i>H. influenzae</i>		<b>0.76</b> µg/ml (>=1 µg/ml)	<b>0.06</b> µg/ml (>=1 µg/ml)	<b>0.07</b> µg/ml (>=1 µg/ml)			
<i>B. pertussis</i>			<b>0.6</b> VE (>=11 VE)				
Autoantibodies							
ANCA				Positive (1:160)	Positive (1:40)		
Cardiolipin (IgG)				n.d.	Positive (12.1 U/ml)		
Beta2-glycoprotein (IgG)				Elevated (10.5 U/ml)	Positive (28.8 U/ml)		
(IgM)				Normal (4.9 U/ml)	Positive (8 U/ml)		
Direct Coombs test							Positive
Recurrent infections							
Bacteria	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. faecalis</i>					<i>E. aerogenes</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. faecalis</i>	
Virus	Rhinovirus, influenza B, respiratory syncytial virus, rotavirus					Not specified	
Fungi	Not specified					<i>Malassezia furfur</i>	

Reference values in brackets. Values outside reference range are marked in bold. Bacterial species are indicated in italic font  
m months, y years, n.d. not determined, opson. opsonized

CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> class-switched B cells (13.1%, reference 4.7–21.2% (ref. <sup>32</sup>)), slightly reduced percentages of CD25<sup>high</sup> PD-1<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells (Fig. S1f), and decreased mature CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NK cell population (Fig. S1g). Distribution of T-helper cell subsets in PBMCs, after accounting for age-related high numbers of naive T cells, did not reveal abnormal skewing (Fig. S1h and i). Immunoglobulin levels were in the normal range (Table 1).

**Germline mutations in *DEF6* segregate in both families.** Exome sequencing was performed for P1 and P3 to identify the underlying molecular disease etiologies, and confirmed by Sanger sequencing in respective family members. Among the segregating variants, *DEF6* was the single common gene affected in both pedigrees that segregated with the disease. Enlarged pedigrees were sequenced to confirm segregation of variants with disease (Fig. 2a, b). In family A, we identified a homozygous missense variant in *DEF6* (c.G991A, p.E331K) affecting the highly conserved PH-DH domain in both affected siblings P1 and P2 (Fig. 2a, c), while exome sequencing in family B identified a second, more N-terminal homozygous missense variant in *DEF6* (c.T628G, p.Y210D) in P3 (Fig. 2b, c). Genetic investigation was

not performed for the newborn sister. Mutation Y210D affects a residue phosphorylated by ITK and necessary for interactions with the kinase<sup>22</sup>. This residue was previously shown to be phosphorylated by LCK as well and critical for induction of *DEF6* activity<sup>25</sup>, however, these findings have not been corroborated by further studies. Both variants were predicted damaging by Polyphen-2, SIFT and CADD (Table S1). The identified *DEF6* mutations have not been reported in homozygous state in ExAC, gnomAD<sup>33</sup> or TOPMed databases which are based on different population cohorts (Table S1), and heterozygotes were reported with minor allele frequencies below standard thresholds for rare diseases<sup>34</sup> (Table S1). Probability of loss-of-function intolerance for *DEF6* (pLI) was calculated as likely<sup>33</sup> (Table S1). The mutated amino acids E331 and Y210 are conserved among vertebrates (Fig. S1j). Given the overlapping phenotypes, the identification of high-impact genetic variants in *DEF6* as the only gene found mutated in both pedigrees and segregating with the disease, and the assumed role of *DEF6* in human immunity, we hypothesized that the *DEF6* variants were causative for the common disease phenotype. While amino acid exchange *DEF6*<sup>E331K</sup> led to slight reduction in protein expression in P1-derived expanded T cells (Fig. 2d), *DEF6*<sup>Y210D</sup> was barely detectable in feeder-expanded



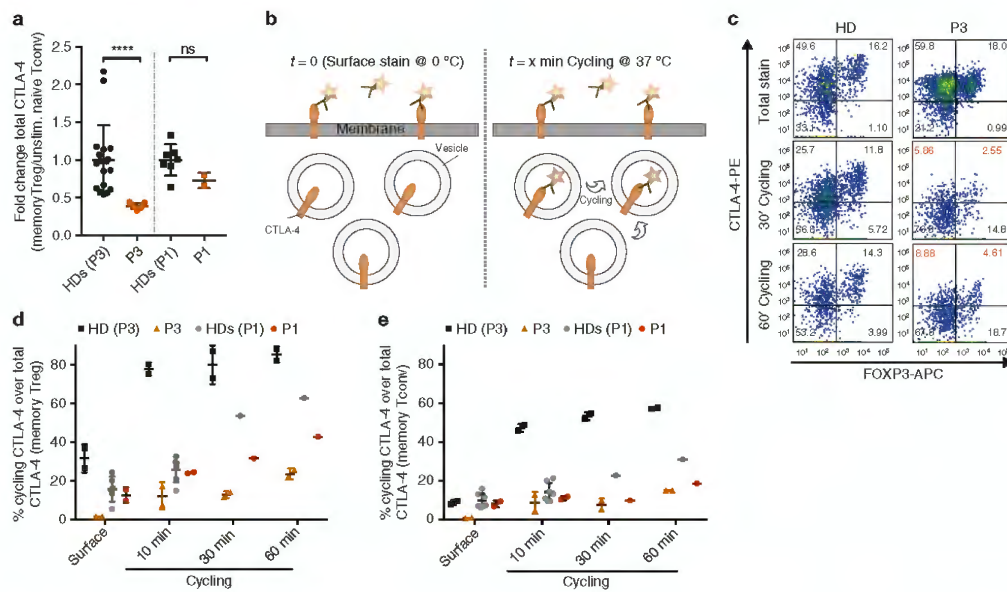
**Fig. 2** Distinct biallelic *DEF6* mutations segregate with disease. **a**, **b** Segregation pedigrees and chromatograms of the identified *DEF6* mutations in family A (a, variant c.G991A) and family B (b, variant c.T628G). All depicted individuals were validated by capillary sequencing. Unfilled – wild type; filled – homozygous mutation; half filled – heterozygous state; ? – unknown genetic state (not sequenced). For information on the variants, see Supplementary Table S1. **c** Schematic of *DEF6* protein domains indicating the identified mutations. PH – Pleckstrin homology domain; DH – Dbl homology domain. **d** *DEF6*<sup>E331K</sup> mutant protein expression is partially reduced in feeder-expanded T cells of P1. **e** *DEF6*<sup>Y210D</sup> mutant protein is barely detectable in T cells of P3 (long exposure is shown). Shorter-exposed immunoblots for **(e)** are shown in Supplementary Figure S2a. Immunoblots for **(d)** and **(e)** were cropped for visualization and are representative of two independent experiments. Source data of Fig. 2 including uncropped immunoblots are provided as a Supplementary Source Data file

T cells of P3 (Fig. 2e and Fig. S2a). In summary, we identified three patients from two unrelated families presenting with features of systemic autoimmunity, bearing two distinct biallelic missense variants within the *DEF6* gene.

***DEF6* mutations affect CTLA-4 cycling dynamics.** As *DEF6* is predominantly expressed in T cells (Fig. S2b), we focused on investigating T-cell phenotypes. While calcium flux was found unaltered in feeder-expanded patient cells upon TCR stimulation (Fig. S2c and d), ERK phosphorylation and AKT phosphorylation were partially reduced but not abolished compared to healthy

donor (Fig. S2e). Intriguingly, proliferation of PBMCs or feeder-expanded T cells was not compromised (Fig. S2f and g). *DEF6* is also expressed, to a lesser extent, in NK cells (Fig. S2b). No defect in NK-cell immunological synapse formation could be detected (Fig. S2h).

CTLA-4, similar to *DEF6*, is predominantly expressed in T cells. Given the marked response of P1 to Abatacept (CTLA-4-Ig) treatment enabling clinical disease remission (Fig. 1c–e), we hypothesized that autoimmunity in *DEF6* deficiency may be linked to aberrant CTLA-4 regulation. Expression of CTLA-4 is predominantly regulated by FOXP3 (ref. 35) and calcium-dependent NFAT activation<sup>36</sup>. We first analyzed CTLA-4



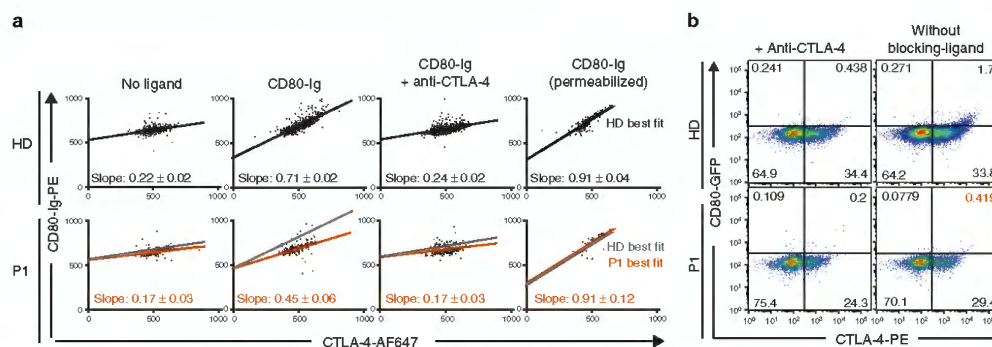
**Fig. 3** *DEF6* mutations affect CTLA-4 cycling. **a** Flow cytometric analysis of CTLA-4 expression in stimulated memory  $T_{reg}$  ( $CD4^+CD45RA^-FOXP3^+CD25^+$ ), compared to unstimulated naive  $T_{conv}$  as described in<sup>37</sup>. CTLA-4 expression in patients P1 and P3 was compared and normalized to respective healthy donor controls. Cells were stimulated for 16 h with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads. CTLA-4 expression after stimulation was reduced (P3) or unaltered (P1,  $n > 3$ ). Data are overlaid with mean  $\pm$  SD. Statistics: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns:  $p = 0.067$  (Welch's  $t$  test). **b** Schematic representation of CTLA-4 cycling assay performed on purified CD4 T cells. **c–e** CD4 T cells of P1 and P3 show reduced CTLA-4 cycling, compared to HD. Representative FACS traces of memory T cells of P3 (**c**) and time-course quantifications of cycling traces of memory  $T_{reg}$  (**d**,  $CD4^+CD45RA^-FOXP3^+$ ) and memory  $T_{conv}$  cells (**e**,  $CD4^+CD45RA^-FOXP3^-$ ), normalized to respective total CTLA-4 expression of P1, P3 or HDs. Purified CD4 T cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads for 16 h. Total stain was performed with standard intracellular staining. Cycling staining was performed by adding the labeled antibody before the cell harvest and incubation at 37 °C for the indicated times. Gating as in Fig. S3d. Representative of two independent blood shipments. Data are overlaid with mean  $\pm$  SD. Source data of Fig. 3 are provided as a Supplementary Source Data file

upregulation in stimulated memory- $T_{reg}$  cells that most robustly express CTLA-4, and normalized the expression to unstimulated, naive conventional T cells as previously described<sup>37</sup>. CD3/CD28 stimulation indeed showed significantly lower CTLA-4 expression in  $T_{reg}$  cells of P3, while CTLA-4 levels in P1 were non-significantly decreased (Fig. 3a and Fig. S3a). P1 and P3 both showed slightly reduced FOXP3 levels in  $T_{reg}$ s (Fig. S1b and f). The checkpoint receptor CTLA-4 modulates T-cell responses through binding to and transendocytosis of the costimulatory molecules CD80/CD86 from APCs. While CD80/CD86 are degraded within T-cell lysosomes, CTLA-4 itself is recycled to the plasma membrane through the vesicular transport systems<sup>8,10,11</sup>. Defective CTLA-4 lysosomal sorting has been described previously to underlie autoimmunity in LRBA deficiency<sup>11</sup>. As *DEF6* is a GEF for small GTPases, a protein class crucial for vesicular transports<sup>38</sup>, we focused on studying CTLA-4 trafficking processes in *DEF6*-mutated cells. To evaluate dynamic processes of CTLA-4 vesicular trafficking, we performed membrane cycling assays on primary T cells by comparing surface and cycled CTLA-4 normalized to total expressed CTLA-4, as outlined in schematic Fig. 3b. We observed reduced percentages of both surface and cycling CTLA-4 in all T-cell compartments of P3, including memory ( $CD45RA^-$ ) and naive ( $CD45RA^+$ ), regulatory ( $FOXP3^+$ ) as well as conventional ( $FOXP3^-$ ) T cells, respectively (Fig. 3c–e and Fig. S3b–c, gating as in Fig. S3d). Analysis of P1 and corresponding healthy donors

revealed reduced CTLA-4 cycling in the memory compartments (Fig. 3d, e). Defects in CTLA-4 cycling were observed despite normal activation as evidenced by CD25 upregulation (Fig. S3e). Comparing mean fluorescence intensities of cycled versus total CTLA-4 confirmed a relative reduction of cycling CTLA-4 in patient CD4 cells (Fig. S3f). We furthermore tested CTLA-4 recycling by only labeling for CTLA-4 that re-appeared on the cell surfaces after at least one cycle of antibody-tracked internalization, as outlined in schematic Fig. S3g. In line with our results, memory  $T_{reg}$ s of P1 also showed a reduced appearance of recycled CTLA-4 at membrane surfaces, compared to healthy control (Fig. S3h and i). Altogether, CTLA-4 cycling processes were impaired in *DEF6*-mutated patient T cells.

***DEF6* mutations affect CD80 ligand uptake by CTLA-4.** We next investigated patient T cells for their ability to capture and trans-endocytose CTLA-4-ligands. We here investigated memory  $T_{reg}$ s, as previous work has shown that this cell population most robustly reveals defects in CTLA-4 ligand binding<sup>37</sup>. In accordance with our hypothesis that defective CTLA-4 cycling results in reduced surface availability of CTLA-4 and as a secondary consequence also in reduced relative ligand capture on the T-cell surface, we observed reduced uptake of CD80-Ig in P1 memory  $T_{reg}$ s (Fig. 4a, gating as in Fig. S3k), as indicated by the reduced slope of the best fit line when compared to healthy controls





**Fig. 4** *DEF6* mutations affect CD80 ligand uptake by CTLA-4. **a** Ligand uptake assay of memory  $T_{reg}$ s reveals reduced uptake of CD80-Ig in P1 cells (bottom, orange lines) compared to HD control (top and bottom, black/gray lines), as depicted by the reduced slope of the best-fit lines. Purified CD4 T cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated beads (16 h). CD80-Ig and anti-CTLA-4 (where applicable) antibodies were present during stimulation. Anti-CTLA-4 blocked ligand uptake in both samples. For permeabilization control, CD80-Ig was added after fixation/permeabilization, for binding all available CTLA-4. Data from flow cytometry were extracted, visualized and analyzed with Prism. Slopes were calculated with linear regression. Gating as in Fig. S3k. Representative of two independent experiments. **b** Transendocytosis assay of CD4 T cells shows reduced CD80-GFP capture by P1 cells from CHO cells, indicated by reduced CTLA-4<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> double-positive populations (orange numerical insert). Presence of anti-CTLA-4 blocked transendocytosis. Cells were stimulated for 16 h with anti-CD3 antibody. Co-stimulatory signal was provided by CD80-GFP expressing cells. Quantification as in Fig. S3j, gating as in Fig. S3l. Representative of two independent experiments. Source data of Fig. 4 are provided as a Supplementary Source Data file

(Fig. 4a, “CD80-Ig”). The observed differences are in line with previous reports on cells from patients with heterozygous *CTLA4* mutations showing dysfunctional ligand capture<sup>37</sup>. Presence of CTLA-4-blocking antibody abolished ligand uptake (Fig. 4a, “CD80-Ig + anti-CTLA-4”). Finally, the addition of ligand after cell permeabilization resulted in comparable slopes reflecting similar overall binding capabilities of the total expressed CTLA-4 (Fig. 4a, “CD80-Ig (permeabilized)”). Thus, our data demonstrate that CTLA-4 does not effectively reach surfaces in *DEF6*-mutated T cells, and as a result the surface-dependent function of CTLA-4 is disturbed. We also analyzed CTLA-4-dependent ligand transendocytosis from CD80-GFP expressing donor cells. In line with a reduced CTLA-4 surface abundance we found less CD80-GFP transendocytosed into CD4 T cells of P1 compared to healthy control (Fig. 4b and quantified for CD4 T cells in Fig. S3j, gating as in Fig. S3l). Presence of CTLA-4-directed antibody blocked transendocytosis (Fig. 4b and Fig. S3j). Altogether, due to impaired availability of the checkpoint protein CTLA-4 on T cell surfaces, the capturing and transendocytosis of ligands is consequently impaired.

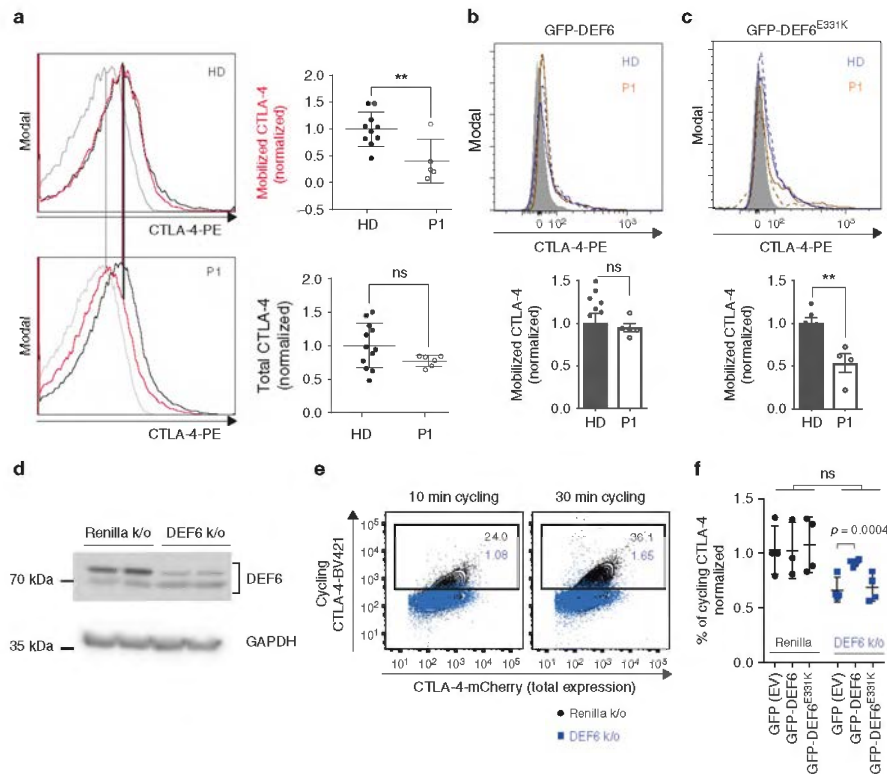
**DEF6 knockout phenocopies CTLA-4 cycling defects.** To evaluate the causality of mutated *DEF6* for aberrant regulation of CTLA-4 trafficking, we utilized several models. We performed CTLA-4 mobilization assays on CD4 T cells of P1 and a healthy donor to monitor CTLA-4 on cell surfaces after short stimulation, which effectively mobilizes CTLA-4 from internal stores. While total CTLA-4 expression was unaffected, mobilized CTLA-4 was reduced in patient T cells compared to HD (Fig. 5a, gating as in Fig. S4a). In a similar setup, we electroporated healthy control or *DEF6*<sup>E331K</sup>-mutated PBMCs with wild type *DEF6*-GFP (Fig. 5b) or mutated *DEF6*<sup>E331K</sup>-GFP (Fig. 5c). The observed mobilization defect of CTLA-4 in *DEF6*<sup>E331K</sup>-mutated CD4 T cells was reversed by wild-type *DEF6* but not by *DEF6*<sup>E331K</sup> (Fig. 5b, c, gating as in Fig. S4a). To further prove causality, we generated CRISPR-mediated knockout clones of *DEF6* and Renilla control in CTLA-4-mCherry transduced Jurkat cells (Fig. 5d).

Pronounced reduction of *DEF6* expression resulted in defective CTLA-4 cycling, confirming the role of *DEF6* in regulating CTLA-4 trafficking (Fig. 5e, gating as in Fig. S4b). These defects could be partly reconstituted by electroporating wildtype but not mutant *DEF6* (Fig. 5f, gating as in Fig. S4c), though slightly more mutant protein was expressed (Fig. S4d). *DEF6* knockout cells furthermore showed reduced suppression tendency against CD4 target cells in presence of unlabeled PBMCs as APC source (Fig. S4e, gating as in Fig. S4f).

Our collective data on primary T cells reconstituted with wildtype *DEF6* and on Jurkat knockout cells demonstrate that the decreased CTLA-4 availability in *DEF6*-mutated patient cells is caused by defective intracellular trafficking processes.

**DEF6 mutations affect RAB11 interactions.** Given our finding that the guanine nucleotide exchange factor *DEF6* regulates CTLA-4 cycling processes, we hypothesized that *DEF6* might regulate the small GTPase RAB11, a central protein for recycling endosomes that has been shown to co-localize to CTLA-4<sup>+</sup> vesicles<sup>8,11</sup>. We first assessed the localization of endogenous *DEF6*, RAB11 and CTLA-4 in activated patient-derived and control PBMCs. In line with previous studies<sup>8</sup>, we observed prominent co-localization of CTLA-4 with RAB11 in the healthy control cells (Fig. 6a, b). In sharp contrast, RAB11/CTLA-4 co-localization was largely reduced in TCR/CD28-stimulated *DEF6*<sup>E331K</sup>-mutated cells of P1 (Fig. 6c). Line scans through CTLA-4<sup>+</sup> vesicles confirmed the lack of co-localization with RAB11 in *DEF6*<sup>E331K</sup>-mutated cells (Fig. 6d). To quantify RAB11 and CTLA-4 co-localization, defined regions of interest with high CTLA-4 expression and RAB11-positive vesicles were selected and analyzed for overlap coefficients. Quantitative analyses revealed a significant reduction of co-localization for P1 and P3 compared to respective healthy control cells (Fig. S5a-c), suggesting a negative impact of mutated/reduced *DEF6* on CTLA-4<sup>+</sup>RAB11<sup>+</sup> recycling vesicles. Of note, RAB11 was expressed at similar levels in P1 and P3 as in healthy controls (Fig. S5d). To validate changes in interaction of wildtype or mutated *DEF6* with

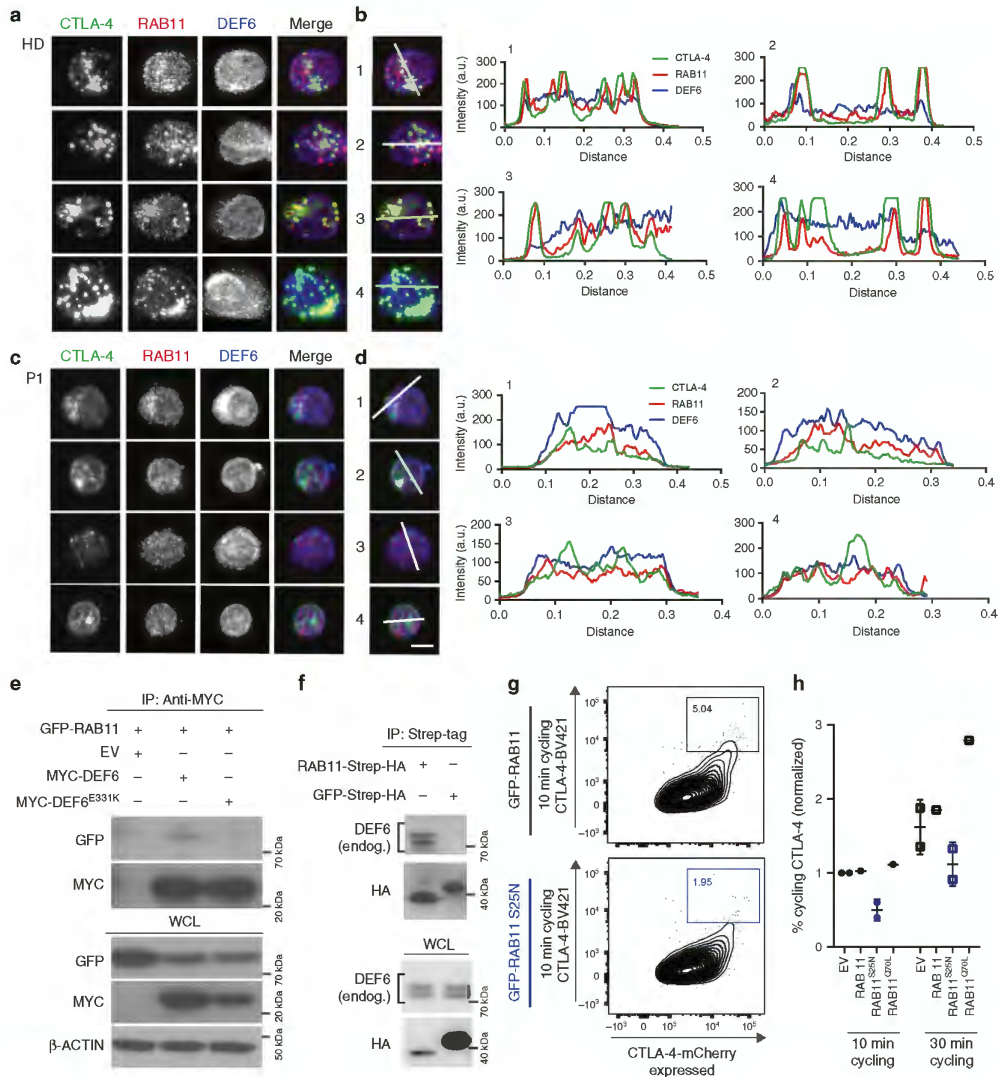




**Fig. 5** Defective CTLA-4 trafficking is rescuable and recapitulated by Jurkat *DEF6* knockouts. **a** Short-term mobilization of CTLA-4 is reduced in P1 T cells (bottom), compared to healthy control (HD, top). Cells were stimulated for 1 h with PMA/ionomycin. CTLA-4 antibody was present during stimulation to capture surface CTLA-4. Black – total CTLA-4, red – mobilized CTLA-4, gray – background surface stain. Statistics:  $**p = 0.0079$ ,  $n.s. = 0.1261$  (Unpaired *t* test). Data are overlaid with mean  $\pm$  SD. Two biological replicates. **b, c** Wild type but not mutant *DEF6* rescues CTLA-4 mobilization defects in P1 cells. PBMCs were electroporated with either GFP-*DEF6* (**b**) or with GFP-*DEF6*<sup>E331K</sup> (**c**) and stimulated as in (**a**) (top: representative plots, blue: healthy control; orange: patient; dashed line: mobilized CTLA-4; straight line: total CTLA-4; bottom: quantification; Statistics:  $p = 0.7807$  and  $p = 0.0043$ , unpaired *t* test). Data are overlaid with mean  $\pm$  SD. Representative of two independent experiments. Gating as in Fig. S4a. **d** Immunoblot of CRISPR-mediated *DEF6* knockout and Renilla control, in Jurkat cells transduced with mCherry-CTLA-4. Images were cropped for visualization, an additional GAPDH blot is shown in the Source Data file. **e** Impaired CTLA-4 cycling in *DEF6* knockout cells. Clones expressing mCherry-CTLA-4 were stimulated overnight with anti-CD3, and incubated with anti-CTLA-4 for 10 or 30 min, respectively. *DEF6* knockout impairs CTLA-4 cycling (blue), compared to Renilla (black). Numerical inserts represent percentages of cycled CTLA-4. Gating as in Fig. S4b. Representative of three independent experiments. **f** Overexpression of wildtype but not mutant *DEF6* partly rescues defective CTLA-4 cycling in Jurkat *DEF6* knockout cells. Cells were electroporated with constructs before stimulation and cycling analysis as in (**e**). Data were normalized to CTLA-4 cycling of GFP (EV) transfected Renilla k/o cells. Representative of two independent experiments. Data are overlaid with mean  $\pm$  SD. Statistics: Multiple *t* test, FDR 1%. Gating as in Fig. S4c, only transfected (GFP positive) cells were used for cycling analysis, expression levels of GFP are shown in Fig. S4d. Source data of Fig. 5 including uncropped immunoblots are provided as a Supplementary Source Data file

RAB11, we performed co-immunoprecipitation analyses in co-transfected HEK293T cells. While wildtype *DEF6* co-immunoprecipitated with RAB11 (Fig. 6e), this interaction was reduced in the *DEF6*<sup>E331K</sup>-expressing cells (Fig. 6e). These results suggest a possible GEF activity of wildtype *DEF6* for the small GTPase RAB11, and could hence play a causative role in reduced recycling of CTLA-4 in patient cells. Consistent with the fact that GEF proteins for small GTPases interact preferentially with the dominant negative, GDP-bound form of their target proteins<sup>39</sup>, we found that *DEF6* interacted strongly with dominant-negative (GDP-locked) RAB11<sup>S25N</sup>, but weakly with constitutively-active

(GTP-bound) RAB11<sup>Q70L</sup> in HEK293T cells (Fig. S5e). In contrast, *DEF6*<sup>E331K</sup> did not show relevant co-immunoprecipitation with wild-type, GDP- or GTP-locked RAB11 (Fig. S5f, long exposure shown). In Jurkat cells, endogenous *DEF6* co-immunoprecipitated with Strep-HA-tagged RAB11 but not with the Strep-HA-GFP-expressing control (Fig. 6f), confirming a physical interaction in a T-cell model. The second identified mutation *DEF6*<sup>Y210D</sup> was barely expressed in primary T cells of P3 (Fig. 2e), probably due to rapid degradation. We over-expressed GFP-tagged wildtype or Y210D-mutated *DEF6* in Jurkat cells in presence or absence of proteasomal inhibitor



**Fig. 6** DEF6 mutations affect RAB11 interactions. **a** Representative images of endogenous CTLA-4, and RAB11 and DEF6 in TCR-stimulated healthy control (HD) PBMCs showing RAB11-CTLA-4 co-localization. **b** Line scans of images in **(a)** reveal high overlap of RAB11 and CTLA-4 signal in activated HD-PBMCs. Scale bar – 5 μm. **c** Representative images of endogenous CTLA-4, RAB11 and DEF6 in activated PBMCs of P1 reveal loss of RAB11-CTLA-4 co-localization in P1. **d** Line scans show reduced overlap of RAB11 and CTLA-4 signal in P1. Scale bar – 5 μm. (for **a-d**, representative images of 30–40 analyzed cells; cells were considered T cells through expression of CTLA-4 after TCR cross-linking). Quantification as in Fig. S5a. **e** MYC-tagged wildtype DEF6 co-immunoprecipitates with GFP-RAB11 from transfected HEK293T cells, revealing a hitherto unrecognized interaction of the GEF protein DEF6 with the small GTPase RAB11. Presence of mutation E331K abrogated this interaction. Samples were balanced on immunoprecipitated GFP-RAB11 fractions and blotted for interacting DEF6. Representative of three independent experiments. **f** Endogenous DEF6 co-immunoprecipitates from Jurkat lysates with overexpressed RAB11-Strep-HA, compared to GFP-Strep-HA control. Samples were balanced on immunoprecipitated HA-tag fractions. Western blots (**e**, **f**) were cropped for visualization. **g**, **h** Overexpressing inactive RAB11<sup>S25N</sup> in Jurkat-mCherry-CTLA-4 cells mimics DEF6-deficient defects in CTLA-4 cycling. Cells were electroporated with inactive RAB11<sup>S25N</sup>, constitutively active RAB11<sup>Q70L</sup>, wildtype RAB11 or empty vector (EV), stimulated with OKT3 and analyzed for cycling CTLA-4 after 10 min and 30 min, respectively. Cycling was reduced in RAB11<sup>S25N</sup> expressing cells (blue, blue numerical insert, **g**), while RAB11<sup>Q70L</sup> enhanced cycling at 30 min (**h**). Data are overlaid with mean ± SD. Representative of two individual experiments. Source data of Fig. 6 including uncropped immunoblots are provided as a Supplementary Source Data file

MG132 and tracked GFP signals over time. Our data confirm loss of DEF6<sup>Y210D</sup> two days after transfection which could be fully reverted by adding MG132 (Fig. S5g). Lastly, kinetic studies on purified proteins suggest that the PH-DH domain of DEF6 has GEF activity toward the small GTPase RAB11, while mutated PH-DH<sup>E331K</sup> is inactive (Fig. S5h).

To confirm the link between RAB11 and CTLA-4 trafficking, we overexpressed inactive RAB11<sup>S25N</sup> and constitutively active RAB11<sup>Q70L</sup> in Jurkat-mCherry-CTLA-4 cells, and analyzed CTLA-4 cycling by counterstaining the cycling protein with BV421-coupled antibody. As shown in Fig. 6g, h (gating as in Fig. S5i), when compared to overexpressing wildtype RAB11 or empty vector, inactive RAB11<sup>S25N</sup> indeed blocked CTLA-4 cycling while presence of active RAB11<sup>Q70L</sup> contrarily enhanced this process at longer time points.

In sum, our data reveal a previously unknown physical interaction and GEF activity of DEF6 toward the small GTPase RAB11, a recognized component of CTLA-4<sup>+</sup> recycling endosomes<sup>8</sup>. Consistently, DEF6-mutated cells lacked this interaction and showed reduced RAB11<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> double-positive vesicles, suggesting a direct link to the observed defect in CTLA-4 trafficking dynamics through RAB11 as demonstrated by inactive RAB11<sup>S25N</sup> compromising CTLA-4 cycling.

## Discussion

The role of DEF6 in murine autoimmunity models has been controversial as the development of autoimmunity appears to depend on their genetic background<sup>26,27,30,31</sup>. In humans, the intronic DEF6 SNP rs10807150 which alters gene expression, is associated with the onset of systemic lupus erythematosus<sup>40</sup>. Here, we describe two unrelated families with three patients harboring two distinct biallelic missense mutations in DEF6. The patients present with immunodeficiency and systemic autoimmunity, thus indicating a critical role for DEF6 in preventing autoimmunity in humans. We uncover a role for DEF6 in regulating abundance and recycling of the T-cell checkpoint protein CTLA-4, as the functional cause of the observed autoimmune manifestations in DEF6-mutated patients. We base our conclusions on the following observations and in line with previously outlined criteria:<sup>41</sup> (i) we identified different biallelic mutations in DEF6 as the single common gene affected and segregating perfectly with the disease in two unrelated families; (ii) DEF6 has been previously shown to have a role in the immune system although its precise role in human immunity had not been determined; (iii) we identified a CTLA-4 trafficking defect amenable to rescue upon reconstitution of patient T cells with wildtype DEF6, explaining the predominant clinical presentation of autoimmunity; (iv) CRISPR-based DEF6 knockout in Jurkat cells recapitulates defective CTLA-4 cycling and could be reverted by reconstitution with the wildtype protein; (v) we provide a functional explanation involving compromised RAB11-DEF6 interaction affecting RAB11-dependent CTLA-4 shuttling; (vi) lastly, the successfully commenced CTLA-4-Ig therapy in P1 led to remission of symptoms.

CTLA-4 is a critical molecule in human immune homeostasis. A reduction of CTLA-4 levels by 50% as observed in CTLA-4 haploinsufficiency results in severe autoimmunity<sup>13,14</sup>, while notably patients with biallelic loss-of-function germline mutations in CTLA4 have not been described and are potentially lethal. *Ctla4*<sup>-/-</sup> mice are viable, although they develop fatal autoimmunity early in life whereas their *Ctla4*<sup>+/-</sup> littermates are healthy<sup>42,43</sup>. These studies suggest that humans appear to have a narrower window of tolerance regarding CTLA-4 critical abundance for the onset of disease. This assumption is further supported by genome-wide association studies which have identified

SNPs affecting the relative cell surface expression of CTLA-4 associated with human autoimmune disease<sup>44</sup>. Reduction of available CTLA-4 by enhanced lysosomal degradation is also the cause for severe autoimmunity in LRBA deficiency<sup>11</sup>. Again, in contrast to the human phenotype, *Lrba*<sup>-/-</sup> mice do not develop overt autoimmunity<sup>45-47</sup>, have a normal lifespan and also intriguingly exhibit an increased acceptance of allogeneic bone marrow grafts<sup>45</sup>. Thus, *Def6*<sup>-/-</sup>, *Ctla4*<sup>+/-</sup>, and *Lrba*<sup>-/-</sup> mice display inconsistent autoimmune manifestations or lack such. Our discovery of a mechanistic link between DEF6 mutations and CTLA-4 functional integrity offers insights to autoimmunity in humans. Clinical and immunological phenotypes in DEF6-mutated patients include T-cell lymphopenia, low class-switched B cells, hepatosplenomegaly, autoimmune hemolytic anemia and bowel inflammation, all of which are reminiscent of CTLA-4 haploinsufficiency and LRBA deficiency<sup>13-18,48-50</sup>. In accordance with previous reports on genetically determined autoimmune diseases through compromised CTLA-4, clinical manifestations vary between patients due to the lowered thresholds of inhibitory T cell function, rather than through specific triggers<sup>51</sup>. Still, they do represent the same disease. As for other newly described disease entities, larger patient cohorts in future studies will help to unravel the full phenotypic spectrum of disease due to functional DEF6 deficiency. It is impossible to dissect whether the strong immunosuppressive treatment in P1 may have contributed to the more pronounced B-cell deficiency including borderline-low frequencies of class-switched memory B cells and impaired vaccination titer generation, and also the persistent susceptibility to infections which has been described previously in individuals treated with abatacept<sup>52</sup>. To date, P3 has exhibited less pronounced autoimmune manifestations. This could be due to a distinct mutation with distinct cellular effect, or possibly a different genetic or epigenetic background. Given the reduced CTLA-4 expression in P3 (Fig. 3a), it is possible that other autoimmune manifestations may present with time. Interestingly, in contrast to CTLA-4 and LRBA-mutated patients, DEF6-mutated patients do not show an obvious activation/exhaustion phenotype in peripheral blood T cells. This might be due to the fact that DEF6 is also involved in T-cell signaling. *Def6*<sup>-/-</sup> mice, for example, exhibit a reduced clonal expansion of CD8<sup>+</sup> T cells<sup>29</sup>. The interplay of DEF6 in T-cell signaling and regulation of CTLA-4 might result in a normal status of T cells derived from the blood, but increased activation in situ, where antigen is presented in higher concentrations as suggested by the massive T-cell infiltration in peripheral tissues (Fig. 1b). The homozygous frameshift mutation in *SKIV2L* that was additionally identified in P1 and the deceased sister P2 in family A (Table S1), could represent a disease-modifying factor potentially affecting cardiac function and/or bowel inflammation<sup>53</sup>, but does not explain the autoimmune presentation observed in DEF6-mutated individuals from both families and our identified link to aberrant CTLA-4 shuttling. We proved causality by reconstitution of the CTLA-4 cycling defect in patient-derived cells through ectopic expression of wildtype DEF6, and a similar reconstitution of DEF6-knockout Jurkat models could revert the observed CTLA-4 cycling defect. Finally, the response of P1 to CTLA-4 replacement therapy suggests a T cell-mediated disease.

The co-localization, co-immunoprecipitation and over-expression data confirm that DEF6 regulates CTLA-4 vesicular trafficking via the small GTPase RAB11. RAB11 has previously been located at recycling vesicles containing CTLA-4<sup>8</sup>. We identify a cellular regulation pathway of CTLA-4, which may involve direct activation of RAB11 by DEF6, a GEF protein that functions downstream of TCR engagement. RAB11 is a broadly expressed small GTPase and its deletion in a murine knockout model was found embryonically lethal<sup>54</sup>. It is also considered a



crucial component of the so-called exocyst, which regulates late-endosomal trafficking<sup>55</sup>. However, it is largely unknown which GEF proteins activate RAB11 to promote its multiple actions, and future studies are required to address this question. Our data reveal that RAB11 interacts with DEF6, and that DEF6 acts as GEF protein for RAB11 as suggested by a preferential interaction of DEF6 with the GDP-locked small GTPase, and further evidenced by kinetic GEF activity studies on purified protein domains. The phenocopy of defective CTLA-4 cycling by over-expressing inactive RAB11<sup>S25N</sup> in Jurkat cells further supports this theory. In patient-derived DEF6-mutant T cells, RAB11+ recycling endosomes do not co-localize with CTLA-4+ vesicles, suggesting that DEF6 promotes RAB11-mediated recycling of CTLA-4.

In conclusion, our work identifies a role for DEF6 in regulating CTLA-4 availability and trafficking to prevent autoimmunity, in line with CTLA-4 functioning both as immune rheostat and defining thresholds of immune activation for anti-cancer immunity<sup>11,13,14,56</sup>. The work presented herein underlines the power of identifying genetic causes for immune diseases as a way to uncover immune regulatory pathways<sup>2</sup>. Given the identified role of DEF6 in tuning the immune checkpoint protein CTLA-4, future studies should address whether DEF6 and related proteins are amenable to manipulation for targeted therapeutic intervention in immune-mediated disorders or potentially also anti-cancer immunotherapeutic approaches.

## Methods

**Patients and ethics.** Patient studies have been approved by the ethics committee at the Medical University of Vienna (MedUni Vienna), Austria (study number EK499/2011), and the Regional Ethical Review Board in Stockholm (study number 2013/1723–31/4). Patients P1 and P2 were evaluated, followed up and treated at the Children's hospital of the MedUni Vienna. P3 was evaluated, followed up and treated at Astrid Lindgren's Children's Hospital in Stockholm. Biological material of patients and healthy donors (HD) was obtained on informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Blood drawings were taken by venipuncture. Healthy-donor shipping controls which underwent the same handling and storage conditions were included in all experiments where blood was not directly assessed.

**Further clinical information on the patients.** Patient 1 (P1, index patient of family A) presented oligohydramnion in prenatal ultrasounds and intrauterine growth retardation. A Caesarean section was performed at 38 weeks of gestation due to rupture of the membrane and pathological dopplersonographic measurements. Weight and length at birth were below third percentile (1435 g; 39 cm; head circumference 25.5 cm). No abnormalities were observed during the perinatal period, apart from mild respiratory distress syndrome. P1 presented hypertelorism, inward mamillae, growth retardation (below third percentile) and abnormal fatty tissue distribution. At 23 days of life severe watery diarrhea was observed, associated with vomiting and electrolyte imbalances (hypernatremia and hyperchloremic acidosis; Na: 159 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7.1; base excess: -18) and massive increase of inflammation markers (C reactive protein concentration: >20 mg dl<sup>-1</sup>). Total parenteral nutrition was initiated with no obvious improvements of diarrhea. Hydrolyzed formula also did not improve P1's health status. Viral, bacterial, parasitic or allergic causes of the diarrhea were excluded upon repeated testing. Massive bowel inflammation was suggested by increased stool calprotectin (Fig. 1c). Endoscopy revealed atrophy of gastric mucosa with numerous apoptotic cells. Complete villous atrophy was also observed in the small intestine. Microvillus inclusion disease and an underlying metabolic disease were excluded. The duodenum showed massive infiltration of eosinophils and T cells (Fig. S1a). Plasma and goblet cell numbers were reduced. Colonic mucosa showed normal appearance. Subsequently, P1 developed perianal dermatitis (Fig. 1e). Topical treatment had no effect on the dermatitis and deep, indurated, painful ulcers evolved. Enteral feeding was offered, but led to massive vomiting. Thus, therapy with corticosteroids (prednisone 1 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) was initiated which showed slight improvement of disease status. Intravenous cyclosporine was added to the therapy. Enteral feeding was gradually increased through a jejunostomy. Vomiting ceased and stool consistency improved substantially. Parenteral nutrition could be withdrawn. With subsequent reduction of cyclosporine, watery diarrhea recurred leading to a loss of about 1.5 kg within two weeks. At the age of 2 months P1 presented hepatomegaly and laboratory liver abnormalities (elevated  $\gamma$ -glutamyl transferase (450 U l<sup>-1</sup>) and liver enzymes (AST/ALT: 100 U l<sup>-1</sup>)), which were treatable with ursodeoxycholic acid. Echocardiography imaging of P1 revealed a dilated cardiomyopathy with an atrial septal defect (ASD). Treatment with phosphodiesterase inhibitor and

acetylsalicylic acid was initiated. Due to suspected vasculitis the patient further received intravenous immunoglobulins. P1 developed a biventricular hypertrophy, with an ASD. Treatment with enalapril, atenolol, spironolactone, and furosemide resulted in improved ventricular function, however, biventricular hypertrophy persisted and arterial hypertension developed. Due to reduced immunoglobulin levels after birth (Table 1), the patient was supplemented with intravenous immunoglobulins (IVIg) for two months in which IgG/IgM/IgA levels were closely monitored. IVIg administration was paused until the age of 10 months when IVIg supplementation was reinitiated due to reduced specific immunoglobulin titers after vaccination with various agents (polio, diphtheria, tetanus) (Table 2).

Patient 2 (P2, deceased sister, family A) was born at 35 weeks of gestation due to premature rupture of the membrane. She showed intrauterine growth retardation (weight at birth: 1260 g; length at birth: 38 cm (both: below third percentile for age); and head circumference at birth: 29.5 cm (at third percentile)) without catch-up postnatally (weight at 2 months of age: 1696 g; length at 2 months of age: 40 cm (both: below third percentile for age)). She presented with a cleft palate. Enteral feeding was difficult due to clinical signs that were interpreted as necrotizing enterocolitis. Neither diet with extensively hydrolyzed formula nor with elemental formula improved her clinical condition, necessitating parenteral nutrition. Colonoscopy at the age of 138 days revealed rectal ulcers and remarkably few plasma cells and increased numbers of apoptotic cells in the descending and transverse colon. Rectal fissures and ulcers were detected. Mucosal membrane showed normal conditions. Besides the gastrointestinal symptoms, the patient was found to have an atrioventricular septum defect (AVSD) which was treated with pulmonary artery banding and VSD patch closure. She developed increasing heart insufficiency, pulmonary hypertension and a third-grade atrioventricular (AV) block requiring pacemaker treatment. Her liver presented severe hepatomegaly and signs of progressing cholestasis, siderosis, steatosis and hypertriglyceridemia (430 mg dl<sup>-1</sup>). Furthermore, she developed a metabolic acidosis and hypokalemia. Screening for an underlying metabolic disorder was negative. Liver failure was reported as P2 presented massive jaundice, anasarca and ascites. Histology of the liver revealed autolysis. Clinical signs and symptoms suggestive of an undefined immunodeficiency appeared as P2 presented with recurrent infections and sepsis (Table 2). Autopsy after death revealed pulmonary artery and biventricular dilation as well as right ventricular hypertrophy. She showed pleural effusion and congestion.

Patient 3 (family B) was born uneventfully and healthy except for a verrucous nevus. His presentation with CMV initiated the treatment with corticosteroids as well as ganciclovir/valganciclovir. EBV and HIV serology were negative. As CMV DNA levels decreased, valganciclovir treatment was stopped after 1 month of therapy. Azathioprine treatment started after six weeks, during tapering of steroids. The steroids were stopped after 4 months of treatment, with azathioprine continued for an additional 3 months. During the relapse of hemolytic anemia P3 was put on immunosuppressive treatment again with corticosteroids and azathioprine until the age of 3.5 years. During treatment he developed transient thrombocytopenia (minimum  $32 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>) at the age of 2 years and 4 months. Thereafter, he has remained with a growth curve without remarks (5.5 years currently). Blood values have normalized except for lymphocyte numbers being repeatedly low ( $0.9\text{--}2.5 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>, Table 1). The patient has not displayed any gastrointestinal symptoms but was prescribed oral antibiotics since, and no cardiac anomalies were detected.

**Genetic analysis.** DNA of P1 and P3 was extracted from whole blood with Genomic DNA Purification kits (Promega). DNA of P2 was extracted after death from stored histology slides. DNA of relatives was extracted either as described for P1 or from saliva samples with the QIAamp® DNA mini kit. For P1 (family A), homozygous intervals were determined applying Affymetrix® SNP-based homozygosity mapping and used as a filter for detected variants. Whole exome sequencing was performed on genomic DNA of P1 and analyzed for novel nonsense, missense and frameshift variants, as follows: After library prep with the Illumina True Seq and Exon Enrichment kit, the sample was multiplexed and loaded onto two lanes of one flow cell. DNA was sequenced on an Illumina HiSeq2000 Sequencer by paired-end sequencing. After variant calling, demultiplexing and alignment of the 227,048,916 reads, 97.8% of reads could be uniquely mapped. Average target coverage was 140x. VCF.Filter software<sup>57</sup> was used for filtering for missense, nonsense, splice-site and frameshift variants in the whole exome sequencing data. The obtained list was filtered to exclude variants with a minor allele frequency (MAF) > 0.01 in 1000 Genomes, dbSNP and gnomAD, and an internal cohort database was used to further exclude recurrent variants. Filtered candidate variants were analyzed and investigated in the ExAC and gnomAD browsers for loss-of-function intolerance and predicted-to-observed mutation rates<sup>58</sup>. For segregation analysis of candidate variants, DNA of family members (14 individuals, Fig. 2a) was investigated by Sanger sequencing, leaving three candidate genes with variants in family A (Supplementary Table S1). For family B, whole-exome enrichment and sequencing of P3 and the healthy mother were performed applying a Agilent SureSelect v5 51 Mb kit and Illumina HiSeq2000 sequencer. Reads were aligned to human genome GRCh37 with BWA/0.7.4 (ref. 58). Variant calling and annotation were performed with haplotyper caller from the Genome Analysis Toolkit (GATK) (v.3)<sup>59</sup> and variant effect predictor (VEP) (version 75)<sup>60</sup>, respectively. Variant filtering was performed using GEMINI

(v0.11.0a)<sup>61</sup>. Validation of variants was done by standard capillary sequencing, family members (parents) were similarly sequenced for presence of identified variants (Fig. 2b). *DEF6* remained as the single gene affected and segregating in both pedigrees (Supplementary Table S1). All next generation sequencing data are deposited at the EGA database with restricted access (see the *Data Availability* section). Analyses of conservation and mutational impact were done with the prediction tools PolyPhen-2<sup>62</sup> and SIFT<sup>63</sup>, and CADD scores<sup>64</sup> were calculated for segregating genes.

**Flow cytometry.** For family A, immunophenotyping was performed on a BD LSRFortessa™ or BD FACSCanto™II. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from patients or HD blood with a Ficoll gradient and were either used fresh or cryo-preserved in liquid nitrogen. Staining of surface antigens was performed after blocking in FBS-containing medium for 30 min at 4 °C, intracellular antigens were stained applying the fixation/permeabilization kit for intracellular antigens or transcription factors (Affymetrix, eBioscience). All analyses were performed using FlowJo X (TreeStar Inc.) and Prism 7.0 (GraphPad Software). Magnetic microbeads-based sorting of total CD4 T cells was done by negative depletion applying the EasySep human CD4<sup>+</sup> T cell enrichment kit, stem cell technologies™. The following antibodies were used for flow cytometry: From Beckman Coulter: CD16-FITC (clone 3G8), CD19-PECy7 (J3-119), CD3-FITC (UCHT1), CD3-PC5.5 (UCHT1), CD4-PE (13B8.2), CD4-PECy7 (SFC112T4D11), CD45RA (ALB11), CD45RO (UCHL1), CD56-PE (N901), CD56-PECy5 (N901), CD8-PECy7 (SFC121), TCR $\alpha$ 24-PC-7 (C15), TCR $\nu$ B11-FITC (C21); from eBioscience, Affymetrix: CD152-PE (14D3), CD19-PerCPy5.5 (H1B19), CD3-APC (SK7), CD3-APC (UCHT1), CD4-eFluor450 (RPA-T4), CD4-PerCPy5.5 (RPA-T4), CD45RA-PerCP-Cy5.5 (H1100), CD69-APC (PN50), FOXP3-FITC (PCHI101), FOXP3-eFluor450 (236A/E7), FOXP3-APC (236A/E7) from BD Biosciences: CD152-PE (BN13), CD16-PECy7 (3G8), CD19-PECy7 (S125C1), CD25-PE (M-A251), CD25-BV605 (2A3), CD27-PE (M-T271), CD27-PECy7 (M-T271), CD27-V450 (M-T271), CD3-APC-H7 (SK7), CD4-APC (RPA-T4), CD4-AF700 (RPA-T4), CD4-BV421 (RPA-T4), CD4-BV605 (RPA-T4), CD45RA-AF700 (H1100), CD45RO-FITC (UCHL1), CD56-AF700 (B159), CD56-V450 (B159), CD69-APC (L78), CD69-PECy7 (L78), CD69-PECy7 (PN50), CD8-V450 (RPA-T8), CD8-V500 (RPA-T8), CD8-FITC (HIT8a), I $\alpha$ -PE (G20-193), I $\alpha$ -APC-H7 (IA6-2), I $\alpha$ -FITC (IA6-2), TCR $\alpha$ -FITC (WT31), TCR $\alpha$ -PE (T10B9.1A-31), TCR $\gamma$ -APC (B1), TCR $\gamma$ -PE (H1F2).

For immunophenotyping of P3, PBMCs from P3 and healthy controls were obtained by Ficoll gradient isolation. Extracellular antigens were stained at room temperature for 20 min in FACS Buffer (PBS + 2% FCS + 4 mM EDTA) supplemented with directly conjugated antibodies, fixed with 1.6% formaldehyde, permeabilized and stained intracellularly for 20 min at room temperature in BD Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) supplemented with directly conjugated antibodies. Alternatively, fixation and intracellular staining was performed with the FoxP3/Transcription Factor staining buffer set (eBiosciences) according to protocol. Cells were analyzed on a BD LSRFortessa and all analysis was performed using FlowJo software (TreeStar). To assess absolute numbers of immune cell subsets, Truocount assays were performed (BD Biosciences). The following antibodies were used for P3: From Beckman-Coulter: TCR $\alpha$ -FITC (clone IMMUS10) CD27-PECy5.5 (1A4CD27) CD27-ECD (1A4CD27), TCR $\nu$ 24-FITC (C15), TCR $\nu$ B11-APC (C21), CD56-PECy5.5 (N901), NKG2A-PECy7 (Z199), CD27-PECy5.5 (1A4CD27); from BD Biosciences: CD45-V500 (H130), I $\alpha$ -BV711 (IA6-2), CD38 (MHN4-2), CD16-PECy5.5 (3G8), CD56-PECy7 (NCAM16.2), CXCR5-AP488 (RF8B2), CD8-APCCy7 (SK1), FOXP3-V450 (259D/C7), CCR4-PE (1G1), CD69-BUV395 (PN50), CCR6-BUV737 (11A9), CD16-APCCy7 (3G8), CD16-V500 (3G8), CD19-V500 (H1B19 BD), I $\alpha$ -APC (G20-127), CD16-AF700 (3G8), CD38-BV785 (HIT2), CXCR4-PE (12G5), CD25-PECy7 (M-A251), streptavidin-FITC (554060), CD19-APCCy7 (S125-C1), CD57-BV605 (NK-1); from Biologend: CD45RA-A700 (H1100), CD8-BV570 (RPA-T8), CD3-BV605 (OKT3), PD-1-APC (EH12.2.H7), TCR $\gamma$ -BV510 (B1), CD3-BV711 (OKT3), CD45RA-BV785 (H1100), CXCR3-PE-Dazzle (G025H7), CD57-Pacific Blue (HCD57), CD19-FITC (H1B18), I $\alpha$ -APCCy7 (IA6-2), CD25-APC (BC96), CD45RO-A700 (UCHL1), CCR7-BV421 (G043H7), CD8-BV711 (RPA-T8); from Invitrogen: CD4-Qdot605 (S3.5); from Exbio Antibodies: CD21-Pacific Blue (LT21); from Miltenyi Biotec: NKG2C-biotin (REA205).

**Cell culture and stimulation conditions.** PBMCs and -derived cells as well as Jurkat E6.1 cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% of heat-inactivated FCS (Life Technologies, Gibco), 50 U ml<sup>-1</sup> penicillin, 50 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin and HEPES (all from Gibco) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For CD4 T-cell isolation, Affymetrix eBioscience MagniSort negative selection was used. T cells were either stimulated with CD3/CD28 antibody-bearing dynabeads (Gibco) at a 1:1 or 1:2 bead to cell ratio, or with anti-CD3 (OKT3) and anti-CD28 (CD28.2) soluble antibodies (both from eBioscience). T cells were expanded by co-culturing with gamma-irradiated feeder cells<sup>65</sup> with PMA/ionomycin stimulation. CHO cells were cultured in DMEM medium (Gibco), supplemented as above.

**Immunoblots.** Cells were lysed in IP buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF, 100 mM),

complete protease inhibitor cocktail (PIC) or RIPA buffer supplemented with PMSF and PIC, and analyzed by Western blot with primary antibodies against: DEP6 (H00050619-B01; Abnova), GAPDH (sc-365062; Santa Cruz Biotechnology), RAB11 (700184, Invitrogen), HSP90 (P-8, Santa Cruz). Uncropped scans and (where applicable) additional exposures of all immunoblots are shown in a separate *Source Data* file, with molecular weight markers indicated.

**Phosphoblotting.** Feeder-expanded T cells were starved for 4 h in PBS/0.5% human serum. Samples were placed on ice and PHA stimulation mix was added still on ice. Samples were placed on a 37 °C thermoshaker and at the indicated time points, ice-cold PBS was added and respective samples were placed on ice immediately. Cells were then lysed in RIPA buffer as above, and resolved by SDS-PAGE Western blot. The following primary antibodies were used: HSP90 (P-8, Santa Cruz), AKT (40D4, Cell Signaling), phospho-AKT (Ser473, D94, Cell Signaling), ERK1/2 (137F5, Cell Signaling), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling).

**mRNA expression.** Extraction of RNA was performed using RNeasy kit (Qiagen), first-strand complementary DNA synthesis was done using Expand Reverse Transcriptase (Roche) using both oligo-dT and random hexamer primers. Intron-spanning primers were used for gene expression analysis: *DEF6*-forward: 5'-CATCTCGGAAGTGTCTCC-3', *DEF6*-reverse: 5'-CAAGTCCATCTGG-TACGCCT-3', *ACTB*-forward: 5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3', *ACTB*-reverse: 5'-GCACAGAGCCTCCGCTT-3'.

**Calcium flux.** To assess calcium influx in P1, feeder-expanded T cells were harvested, washed with PBS and loaded with Calcium Sensor Dye eFluorTM 514 (eBioscience) for 30 min at 37 °C. After loading, cells were washed and resuspended in RPMI 10% FCS medium at 1 × 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>. Anti-CD3 (OKT3, eBioscience) was added to the cells to final concentration of 0.5 μg ml<sup>-1</sup>. After 5 min incubation at 37 °C, a baseline measurement of 30 sec was recorded, subsequently anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) was added to a final concentration of 20 μg ml<sup>-1</sup> and measurement continued for 3 min. After stimulation, 1 μg ml<sup>-1</sup> of ionomycin was added to the cells and acquisition continued for 1 more min. To assess calcium influx in P3, cells were incubated in HBSS buffer containing 1 mM probenecid (Thermo Fisher) in the presence of CD3-biotin (OKT3, Biologend) and CD28-biotin (28.2, Biologend) or IgG2a (MOPC-173, Biologend) antibodies for surface staining, and the calcium dye Fluo-8 AM (abcam). After 5 min incubation at 37 °C, a baseline measurement of 30 sec was recorded, streptavidin (abcam) was added and measurement continued. Following antibodies were used for surface staining: from Biologend: CD3-BV711 (RPA-T8), CD4-BV785 (OKT4), CD45RA-PECy7 (H1100); from BD Biosciences: CD27-APC (M-T271); from Invitrogen: CD3-Qdot605 (UCHT1).

**Cell proliferation.** Cells were stained for 10 min with CFSE or VPD-450 violet proliferation dye<sup>65</sup>, washed in PBS and cultured in growth media. After 4 days, dye dilution traces of proliferated cells were compared by flow cytometry.

**Analysis of CTLA-4 mechanisms.** For CTLA-4 cycling experiments (depicted in schematic Fig. 3b), CD4 T cells were isolated from PBMCs and left to recover at least 2 h in complete RPMI media at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere before proceeding. Cells were then seeded to a 96-well U-bottom plate at a density of 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml and left unstimulated or stimulated with anti-CD3/CD28 coated dynabeads. After 16 h incubation, antibodies were added to stain for cycling CTLA-4 according to the following procedure: Anti-CTLA-4-PE (14D3, eBioscience) was added at 37 °C for the indicated time points (60 min, 30 min or 10 min, respectively). At time point zero, cells were placed immediately on ice and stained for surface CTLA-4. T-cell surface stains were added to all wells (anti-CD4-PerCPy5.5 (RPA-T4, eBioscience), anti-CD25-BV605 (2A3, BD Horizon), anti-CD45RA-AF700 (H1100, BD Pharmingen)) were carried out for 30 min on ice. Cells were then washed in PBS and fixed for 1 h using the FOXP3 fixation/permeabilization kit (eBioscience). After washing in permeabilization buffer (eBioscience), intracellular stains were added for 1 h on ice. Cells were washed and analyzed by flow cytometry. Gating for naive and memory T<sub>H1</sub> and T<sub>H17</sub> cells was performed as shown in Fig. S3d. Using FlowJo software (10.4), percent quartiles as well as geometric mean fluorescence intensity values for CTLA-4-positive and FOXP3-positive or -negative final gates were extracted and normalized sample-internally to respective total CTLA-4 stains. Experiments were performed at minimum two independent blood donations of both P1 and P3.

Re-cycling CTLA-4 (depicted in schematic Fig. S3g) was analyzed as follows: Isolated CD4 T cells were stimulated for 16 h as described. In step 1, unconjugated anti-CTLA-4 antibody (Ticilimumab) was added and incubated for 60 min at 37 °C to ensure binding to the cycling portion of CTLA-4. After washing, goat-anti-human-Fc antibody (Lifetech) was then added and left to incubate for another 60 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, to fluorescently label all CTLA-4 that was labelled in step 1 that had re-cycled back via the cell surface during incubation with the secondary antibody. Cells were then harvested and stained for T-cell markers. To avoid stoichiometric hindrance, cells were counter-stained for total CTLA-4 with AF647-conjugated C-19 antibody (Santa Cruz) binding the intracellular portion.



Analysis of soluble ligand uptake by memory  $T_{reg}$  was done as described previously<sup>47</sup>. In detail, CD4<sup>+</sup> T cells were isolated and stimulated with anti-CD3/CD28 coated dynabeads (see above), or left unstimulated. Where applicable, CD80-Ig was added and cells were incubated for 16 h. Subsequently, cells were labelled for T-cell surface markers, fixed and permeabilized as described above, and stained intracellularly with anti-CTLA-4-AP488 antibody (15162 S; Cell Signaling). CD80-Ig was visualized with anti-human IgG-PE antibody (6140-09, Southern Biotech). Where indicated, ligand binding was blocked with anti-CTLA-4 antibody (550405, BD Biosciences) during incubation. For total-uptake controls, respective samples were incubated with CD80-Ig after cell permeabilization. Using FlowJo software, cells were gated on memory  $T_{reg}$ , and fluorescent values for CTLA-4 and CD80 were exported and plotted with GraphPad Prism software. Slopes of best-fit lines were calculated and compared to respective "no ligand" samples.

For analysis of transendocytosis, isolated CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated for 16 h or left unstimulated as described above, and co-cultured with CD80-GFP expressing CHO cells. To block transendocytosis, anti-CTLA-4 (as above) was added to control conditions. Cells were then harvested and stained for T-cell markers and total CTLA-4, as described above. Populations were gated on CD4<sup>+</sup> cells and plotted for CTLA-4 and transendocytosed GFP (CD80). Percent quartiles are depicted, indicating CTLA-4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> populations having transendocytosed CD80 from CHO cells and incorporated (bound to CTLA-4) into T cells.

For analysis of CTLA-4 mobilization, cells were stimulated for 60 min with PMA (20 ng/ml) and ionomycin (1  $\mu$ M) in the presence of CTLA-4 antibody (as above), and subsequently stained for T-cell markers on ice. Cells were gated as shown in Fig. S4a. For reconstitution experiments, PBMCs were transfected for 24 h with pcDNA-GFP-DEP6 or pcDNA-GFP-DEP6<sup>E331K</sup> using the Amaxa Nucleofector kit for primary human T cells, according to the manufacturer's recommendations. Transfection efficiency was around 10% of GFP-expressing CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, and transfected cells were analyzed for the CTLA-4-positive portion.

Cycling assays in Jurkat cells were performed similar to respective studies on primary cells. Jurkat cells carrying mCherry-CTLA-4 were constructed by retroviral transduction. For CTLA-4 cycling, cells were stimulated o/n with OKT3, before cycling CTLA-4-BV421 antibody was added for 10 or 30 min incubation, respectively. Cells were subsequently placed on ice, and then fixed with ICFix solution (eBioscience). Rescue and overexpression experiments were performed as above, by transfecting cells 24 h prior to analysis. Gating as in Fig. S4b.

**Suppression assay.** PBMCs were isolated of one healthy donor, and split into two fractions. One fraction was used for CD4 T-cell isolation by negative selection. Isolated CD4 T cells were labelled with VPD450 dye, and the following cell ratios were seeded: Respective Jurkat: unlabeled PBMCs: VPD450-labelled CD4 T cells (same healthy donor) = 2:1:1. Cells were stimulated with OKT3 and monitored at various time points by Flow cytometry. Suppression of CD4 T-cell proliferation was assessed by tracing VPD450 dye dilution. Gating as in Fig. S4d.

**Immunofluorescence.** PBMCs or expanded T cells were either stimulated with antibodies against CD3/CD28 or left untreated. After a stimulation period of 48 h, cells were harvested and adhered to poly-L-lysine (Sigma)-coated cover slips by incubating cells for 10 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were immediately fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Permeabilization was done by incubation with 0.5% Triton-X100 (Sigma). Cells were blocked with 4% BSA (Roth). For staining the following antibodies were used: DEP6 (H00050619-B01, Abnova; or DEP6-antiser<sup>49</sup>), CTLA-4 (15162 S; Cell Signaling; or sc-376016AP647; Santa Cruz), RAB11 (sc-6565; Santa Cruz), anti-mouse (A-11029, Life Technologies), anti-rabbit (A-21429, Life Technologies), and anti-goat (Life Technologies). Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Roth) for 10 mins. Coverslips were mounted in Prolong<sup>®</sup> Gold antifade reagent (Life Technologies).

**Confocal microscopy.** Confocal microscopy was performed on a Leica SP8, Olympus Fluoview FV10i or Zeiss LSM700 laser scanning confocal microscope, equipped with an X63 or an X40 oil lens. For the evaluation of immunological synapse formation, cell conjugates of primary NK cells and K562 cells were formed, stained and assessed by confocal microscopy<sup>45</sup>. For RAB11-CTLA-4-DEP6 co-localization, line scan analysis and co-localization analysis by Pearson's correlation calculations (JacoP tool) were performed with ImageJ<sup>46</sup>. Quantification of RAB11-CTLA-4 co-localization was done on areas of cells with detectable RAB11-positive vesicles and maximal CTLA-4 expression. The thickness of slices was set to 0.4  $\mu$ m. For P3, images were captured on a Zeiss LSM700 microscope using a pinhole of 1 AU in each channel.

**Molecular cloning.** DEP6 and RAB11 cloning plasmids were bought from DNASU<sup>47</sup> and further subcloned into expression vectors pcDNA-GFP or pTO-STREP-HA. Mutagenesis was achieved with the Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) according to manufacturer's instructions. Plasmid sequences were verified through capillary sequencing.

**CRISPR/Cas9 knockout generation.** sgRNA targeting exon 1 of DEP6 (5'-ACTT GAGCAGTTCCTTGCGC-3') or Renilla control (5'-GGTATAATACACCGCGC TAC-3') were cloned into lentiCRISPR\_v2 plasmid, according to Zhang lab

protocols (<https://www.addgene.org/crispr/zhang/>). Lentivirus was generated from HEK293T cells transfected with respective plasmids by calcium chloride precipitation, as described above. 48 h after transfection, virus was harvested and Jurkat-mCherry-CTLA-4 target cells (generated by similar transduction from a retroviral mCherry-CTLA-4 plasmid) were transduced by spinfection. Puromycin selection (1 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) was initiated the day after, for 8 days. From batch cultures, single-cell dilutions were seeded and proliferating clones were selected and subjected to TIDE gDNA comparison and Western blot, for evaluation of knockout efficiency. gDNA was compared by Sanger sequencing with a guide-covering primer (5'-CCCCAGTGTTCGCTGATTCT-3'). TIDE sequence analysis (<http://tide.deskgen.com/>) of DEP6 knockout versus Renilla control revealed over 80% editing efficiency at insertion position +1 after Cas9 cutting site for DEP6, with no obvious non-edited sequences detected.

**Co-immunoprecipitation.** Co-immunoprecipitation of Strep-HA-tagged RAB11 (mutants) and GFP-tagged DEP6 (mutants) were performed as follows. HEK293T cells were transfected with DNA plasmids encoding Strep-HA- or FLAG-tagged RAB11 or variants, GFP-tagged RAB11 or DEP6 (variant), or MYC-tagged DEP6 (variant), and respectively empty vectors, by calcium chloride precipitation. After incubating for 48 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, cells were lysed in RIPA buffer. Lysates were cleared by high-speed centrifugation and 2 mg of respective supernatants were incubated with Strep/actin sepharose beads (IBA), EZview anti-MYC or anti-FLAG affinity gel in IP buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, PIC cocktail), rotating at 4 °C. Beads were washed three times in IP buffer, and bound proteins were resolved by SDS-PAGE. Proteins were detected by immunoblotting.

**Guanine nucleotide exchange assay.** GEF activity of GST-PH-DH, GST-PH-DH<sup>E331K</sup> or GST control against GST-RAB11 was assessed in exchange buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.01% NP-40), for enabling incorporation of Mant-GTP (Mant-GTP triethylammonium salt, Sigma, 5  $\mu$ M). EDTA (1 mM) was used as positive control. Mant-GTP was monitored at 360/440 nm (excitation/emission) on a SpectraMax spectrophotometric plate reader.

**Statistical analysis.** Data were analyzed with appropriate statistical tests as indicated in respective figure legends. Unpaired t tests were two-sided, Welch's correction was applied. Data are displayed as mean  $\pm$  SD, with 95% confidence intervals (where applicable). Sample sizes and replicates are indicated in figure legends.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

#### Data availability

The source data underlying subpanels of Figs. 2, 3, 5, and 6, and Supplementary Figs. S1-S5 are provided as a Supplementary Source Data file. Relevant data are available from the authors. Next generation sequencing data are deposited at the European Genome-phenome Archive (EGA) which is hosted by the EBI and the CRG, under accession IDs EGAS00001003609 (P1) and EGAS00001003618 (P3 and mother). The data are not available publicly due to restrictions for controlled access, and may be accessible through the relevant Data Access Committee via formal application at the EGA (<https://ega-archive.org>).

Received: 31 August 2018 Accepted: 29 May 2019

Published online: 15 July 2019

#### References

- Pitzalis, C., Jones, G. W., Bombardieri, M. & Jones, S. A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 447–462 (2014).
- Lenardo, M., Lo, B. & Lucas, C. L. Genomics of Immune Diseases and New Therapies. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 121–149 (2016).
- Cvetanovich, G. L. & Hafler, D. A. Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 753–760 (2010).
- Walker, L. S. & Sansom, D. M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.* **36**, 63–70 (2015).
- Zhang, Y. & Allison, J. P. Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 9273–9278 (1997).
- Schneider, H. et al. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J. Immunol.* **163**, 1868–1879 (1999).
- Chuang, E. et al. Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J. Immunol.* **159**, 144–151 (1997).

8. Qureshi, O. S. et al. Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 9429–9440 (2012).
9. Soskic, B., Qureshi, O. S., Hou, T. & Sansom, D. M. A transendocytosis perspective on the CD28/CTLA-4 pathway. *Adv. Immunol.* **124**, 95–136 (2014).
10. Qureshi, O. S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
11. Lo, B. et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* **349**, 436–440 (2015).
12. Gough, S. C., Walker, L. S. & Sansom, D. M. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **204**, 102–115 (2005).
13. Kuehn, H. S. et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* **345**, 1623–1627 (2014).
14. Schubert, D. et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat. Med.* **20**, 1410–1416 (2014).
15. Zeissig, S. et al. Early-onset Crohn's disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4. *Gut* **64**, 1889–1897 (2015).
16. Lopez-Herrera, G. et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 986–1001 (2012).
17. Alangari, 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.* **130**, 481–488 e482 (2012).
18. Burns, S. O. et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 1428–1432 (2012).
19. Gupta, S. et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system. *Hum. Immunol.* **64**, 389–401 (2003).
20. Tanaka, Y. et al. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells. *Immunity* **18**, 403–414 (2003).
21. Becart, S. & Altman, A. SWAP-70-like adapter of T cells: a novel Lck-regulated guanine nucleotide exchange factor coordinating actin cytoskeleton reorganization and Ca<sup>2+</sup> signaling in T cells. *Immunol. Rev.* **232**, 319–333 (2009).
22. Hey, P., Czyzewicz, N., Jones, P. & Sablitzky, P. DEF6, a novel substrate for the Tec kinase ITK, contains a glutamine-rich aggregation-prone region and forms cytoplasmic granules that co-localize with P-bodies. *J. Biol. Chem.* **287**, 31073–31084 (2012).
23. Cote, M. et al. SLAT promotes TCR-mediated, Rap1-dependent LFA-1 activation and adhesion through interaction of its PH domain with Rap1. *J. Cell. Sci.* **128**, 4341–4352 (2015).
24. Becart, S. et al. SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling. *J. Clin. Invest.* **117**, 2164–2175 (2007).
25. Gupta, S. et al. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse. *J. Biol. Chem.* **278**, 43541–43549 (2003).
26. Chen, Q. et al. IRP-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRP-4 transcription factor. *Immunity* **29**, 899–911 (2008).
27. Fanzo, J. C. et al. Loss of IRP-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **116**, 703–714 (2006).
28. Mehta, H., Glogauer, M., Becart, S., Altman, A. & Coggeshall, K. M. Adaptor protein SLAT modulates P-gamma receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **284**, 11882–11891 (2009).
29. Feau, S., Schoenberger, S. P., Altman, A. & Becart, S. SLAT regulates CD8+ T cell clonal expansion in a Cdc42- and NFAT1-dependent manner. *J. Immunol.* **190**, 174–183 (2013).
30. Canonigo-Balancio, A. J., Fos, C., Prod'homme, T., Becart, S. & Altman, A. SLAT/Def6 plays a critical role in the development of Th17 cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **183**, 7259–7267 (2009).
31. Vistica, B. P. et al. SLAT/Def6 plays a critical role in the pathogenic process of experimental autoimmune uveitis (EAU). *Mol. Vis.* **18**, 1858–1864 (2012).
32. Piatoša, B. et al. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytom. B Clin. Cytom.* **78**, 372–381 (2010).
33. Lek, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
34. Consortium, U. K. et al. The UK10K project identifies rare variants in health and disease. *Nature* **526**, 82–90 (2015).
35. Zheng, Y. et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**, 926–940 (2007).
36. Gibson, H. M. et al. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J. Immunol.* **179**, 3831–3840 (2007).
37. Hou, T. Z. et al. Identifying functional defects in patients with immune dysregulation due to LRBA and CTLA-4 mutations. *Blood* **129**, 1458–1468 (2017).
38. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).
39. Quilliam, L. A., Rebhun, J. P. & Castro, A. F. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 391–444 (2002).
40. Sun, C. et al. High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat. Genet.* **48**, 323–330 (2016).
41. Casanova, J. L., Conley, M. E., Seligman, S. J., Abel, L. & Notarangelo, L. D. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* **211**, 2137–2149 (2014).
42. Tivol, E. A. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547 (1995).
43. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* **270**, 985–988 (1995).
44. Li, M. et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 1159–1166 (2012).
45. Park, M. Y. et al. LRBA is essential for allogeneic responses in bone marrow transplantation. *Sci. Rep.* **6**, 36568 (2016).
46. Burnett, D. L., Parish, I. A., Masle-Parquhar, E., Brink, R. & Goodnow, C. C. Murine LRBA deficiency causes CTLA-4 deficiency in Tregs without progression to immune dysregulation. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 775–788 (2017).
47. Gamez-Diaz, L. et al. Immunological phenotype of the murine Lrba knockout. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 789–802 (2017).
48. Serwas, N. K. et al. Atypical manifestation of LRBA deficiency with predominant IBD-like phenotype. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 40–47 (2015).
49. Kostel Bal, S. et al. Multiple Presentations of LRBA Deficiency: a Single-Center Experience. *J. Clin. Immunol.* **37**, 790–800 (2017).
50. Besnard, C. et al. Pediatric-onset Evans syndrome: heterogeneous presentation and high frequency of monogenic disorders including LRBA and CTLA4 mutations. *Clin. Immunol.* **188**, 52–57 (2018).
51. Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. & Abbas, A. K. Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2228–2233 (2015).
52. Maggi, L. et al. Immunosuppressive activity of abatacept on circulating T helper lymphocytes from juvenile idiopathic arthritis patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **171**, 45–53 (2016).
53. Fabre, A. & Badens, C. Human Mendelian diseases related to abnormalities of the RNA exosome or its cofactors. *Intractable Rare Dis. Res.* **3**, 8–11 (2014).
54. Sobajima, T. et al. Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine. *Biol. Open* **4**, 86–94 (2014).
55. Guichard, A., Nizet, V. & Bier, E. RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 624–634 (2014).
56. Gubin, M. M. et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577–581 (2014).
57. Muller, H. et al. VCF.Filter: interactive prioritization of disease-linked genetic variants from sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **45**, W567–W572 (2017).
58. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
59. McKenna, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
60. McLaren, W. et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* **26**, 2069–2070 (2010).
61. Palla, U., Chapman, B. A., Kirchner, R. & Quinlan, A. R. GEMINI: integrative exploration of genetic variation and genome annotations. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003153 (2013).
62. Adzhubei, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
63. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).
64. Kircher, M. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
65. Salzer, E. et al. RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. *Nat. Immunol.* **17**, 1352–1360 (2016).
66. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
67. Seiler, C. Y. et al. DNASU plasmid and PSI: Biology-Materials repositories: resources to accelerate biological research. *Nucleic Acids Res.* **42**, D1253–D1260 (2014).

68. Tosato, P. et al. Lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytom. A* **87**, 81–85 (2015).

### Acknowledgements

We thank the Biomedical Sequencing Facility (CeMM), the Imaging Facility and the Flow Cytometry Facility of the Medical University of Vienna. B.H. thanks Matthias Hämel (LBI-RUD) for assistance. We thank for funding from the Austrian Science Fund (FWF) projects P24999-B13 and P29951-B30, the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013)/ERC grant agreement 310857 (all to K.B.), FWF project T934-B30 (to B.H.), DOC fellowship 24486 of the Austrian Academy of Sciences (to R.C.A.), NIH grant AI068320 (to A.A.), European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP/2007–2013)/ERC Grant agreement 311335, Swedish Research Council, Swedish Foundation for Strategic Research, Wallenberg Foundation, as well as the Stockholm County Council and Karolinska Institutet Center for Innovative Medicine (all to Y.T.B.).

### Author contributions

K.B. conceived and designed the study, and wrote the initial manuscript together with N.K.S. and B.H. N.K.S. and B.H. performed, analyzed and interpreted most of the experiments. R.C.A., S.V.S., Z.S., A. Krolo, Ö.Y.P., L.P., T.Z.H., N.H., E.S.-V., A. Kalinichenko, A. Kennedy, E.M.M., M. Mukherjee, B.T., A.S., W.F.P., J.L.L., J.-N.S., S.G., J.H., W.G., E.S., I.P., L.B., J.T. and P.P.B. performed and analyzed experiments. N.M., M. Meeths, R.K., B.B.-F., P.P., E.F.-W. and W.-D.H., provided clinical care for the three patients and performed clinical routine investigations. J.S.O., E.M., D.S., Y.T.B., A.A. and K.B. provided extensive supervision of the performed experiments. N.K.S., B.H. and K.B. revised the manuscript, with input from D.M., Y.T.B., D.S. and A.A. All authors read the manuscript and agreed to this publication.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10812-x>.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Reprints and permission information** is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**Peer review information:** *Nature Communication* would like to thank Cosima Baldari and other anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Nina K. Serwas<sup>1,2,19,24</sup>, Birgit Hoeger<sup>1,2,3,24</sup>, Rico C. Ardy<sup>1,2</sup>, Sigrun V. Stulz<sup>4</sup>, Zhenhua Su<sup>5</sup>, Nima Memaran<sup>6,20</sup>, Marie Meeths<sup>7,8</sup>, Ana Krolo<sup>1,2</sup>, Özlem Yüce Petronczki<sup>1,2</sup>, Laurène Pfajfer<sup>1,2,9</sup>, Tie Z. Hou<sup>10</sup>, Neil Halliday<sup>10</sup>, Elisangela Santos-Valente<sup>2</sup>, Artem Kalinichenko<sup>1,2</sup>, Alan Kennedy<sup>10</sup>, Emily M. Mace<sup>11,21</sup>, Malini Mukherjee<sup>11</sup>, Bianca Tesi<sup>8</sup>, Anna Schrempf<sup>2</sup>, Winfried F. Pickl<sup>12</sup>, Joanna I. Loizou<sup>2</sup>, Renate Kain<sup>13</sup>, Bettina Bidmon-Fliegenschnee<sup>6</sup>, Jean-Nicolas Schicke<sup>14</sup>, Salomé Glauzy<sup>14</sup>, Jakob Huemer<sup>1,2</sup>, Wojciech Garncarz<sup>1,2</sup>, Elisabeth Salzer<sup>1,2</sup>, Iro Pierides<sup>1,2</sup>, Ivan Bilic<sup>2,22</sup>, Jens Thiel<sup>15</sup>, Peter Priftakis<sup>16</sup>, Pinaki P. Banerjee<sup>11,23</sup>, Elisabeth Förster-Waldl<sup>17</sup>, David Medgyesi<sup>1,2</sup>, Wolf-Dietrich Huber<sup>6</sup>, Jordan S. Orange<sup>11,21</sup>, Eric Meffre<sup>14</sup>, David M. Sansom<sup>10</sup>, Yenan T. Bryceson<sup>4</sup>, Amnon Altman<sup>5</sup> & Kaan Boztug<sup>1,2,3,6,18</sup>

<sup>1</sup>Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria. <sup>2</sup>CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria. <sup>3</sup>St. Anna Children's Cancer Research Institute (CCRI), Vienna, Austria. <sup>4</sup>Centre for Hematology and Regenerative Medicine, Department of Medicine Huddinge, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden. <sup>5</sup>Division of Cell Biology, La Jolla Institute for Allergy & Immunology, La Jolla, CA 92037, USA. <sup>6</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>7</sup>Childhood Cancer Research Unit, Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden. <sup>8</sup>Clinical Genetics Unit, Department of Molecular Medicine and Surgery, and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden. <sup>9</sup>Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan, INSERM UMR1043, CNRS UMR5282, Paul Sabatier University, Toulouse, France. <sup>10</sup>Institute of Immunology and Transplantation, Division of Infection & Immunity, School of Life and Medical Sciences, University College London, Royal Free Hospital, Rowland Hill Street, London NW3 2PF, UK. <sup>11</sup>Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine and Center for Human Immunobiology, Texas Children's Hospital, Houston, TX 77030, USA. <sup>12</sup>Institute of Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>13</sup>Clinical Institute of Pathology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>14</sup>Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06511, USA. <sup>15</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University Medical Center Freiburg, Freiburg 79106, Germany. <sup>16</sup>Astrid Lindgren Children's Hospital, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden. <sup>17</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Neonatology, Pediatric Intensive Care and Neuropediatrics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>18</sup>St. Anna Kinderspital, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>19</sup>Present address: Department of Pathology, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA. <sup>20</sup>Present address: Centre for Paediatrics and Adolescent Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany. <sup>21</sup>Present address: Columbia University Medical Center, Columbia, NY, USA. <sup>22</sup>Present address: Takeda (Shire), Vienna, Austria. <sup>23</sup>Present address: MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA. <sup>24</sup>These authors contributed equally: Nina K. Serwas, Birgit Hoeger.



Supplementary Materials for

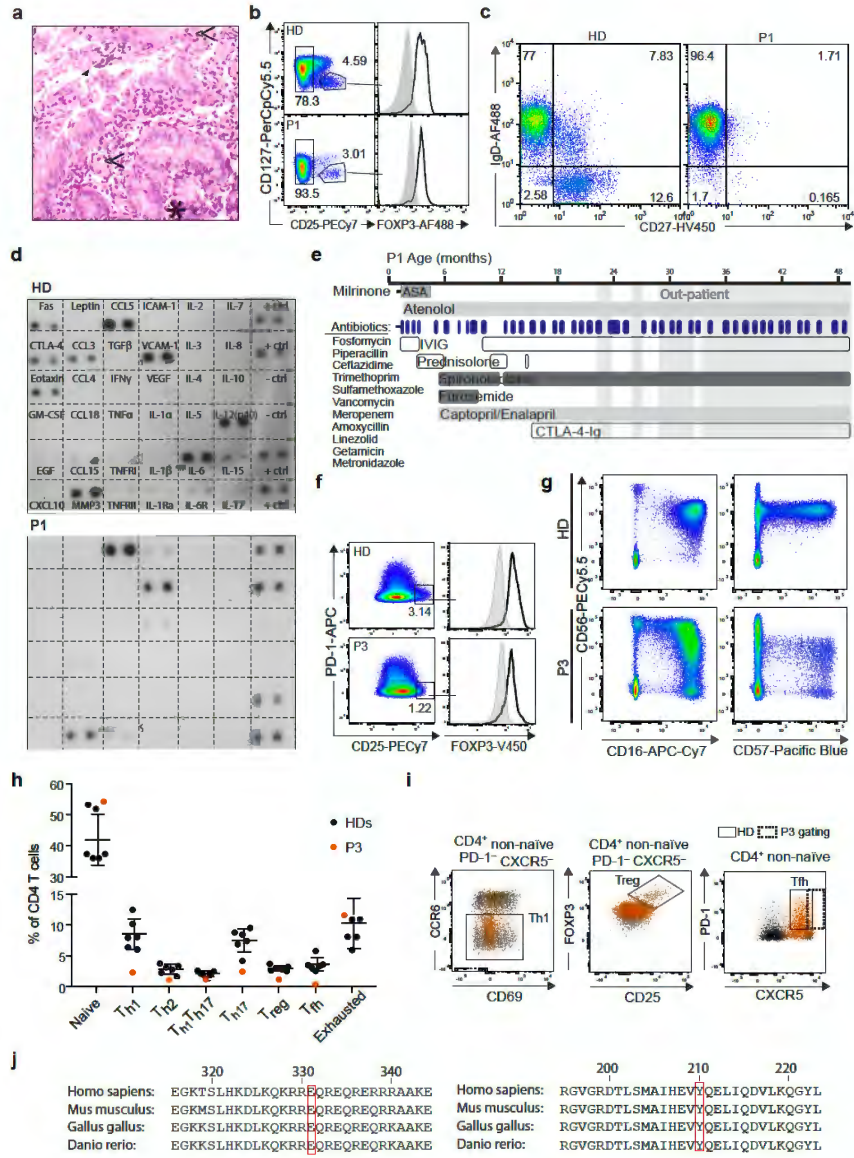
**Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis**

**Serwas<sup>\*</sup>, Hoeger<sup>\*</sup>, et al.**

<sup>\*</sup> equal contribution

Supplementary Figures

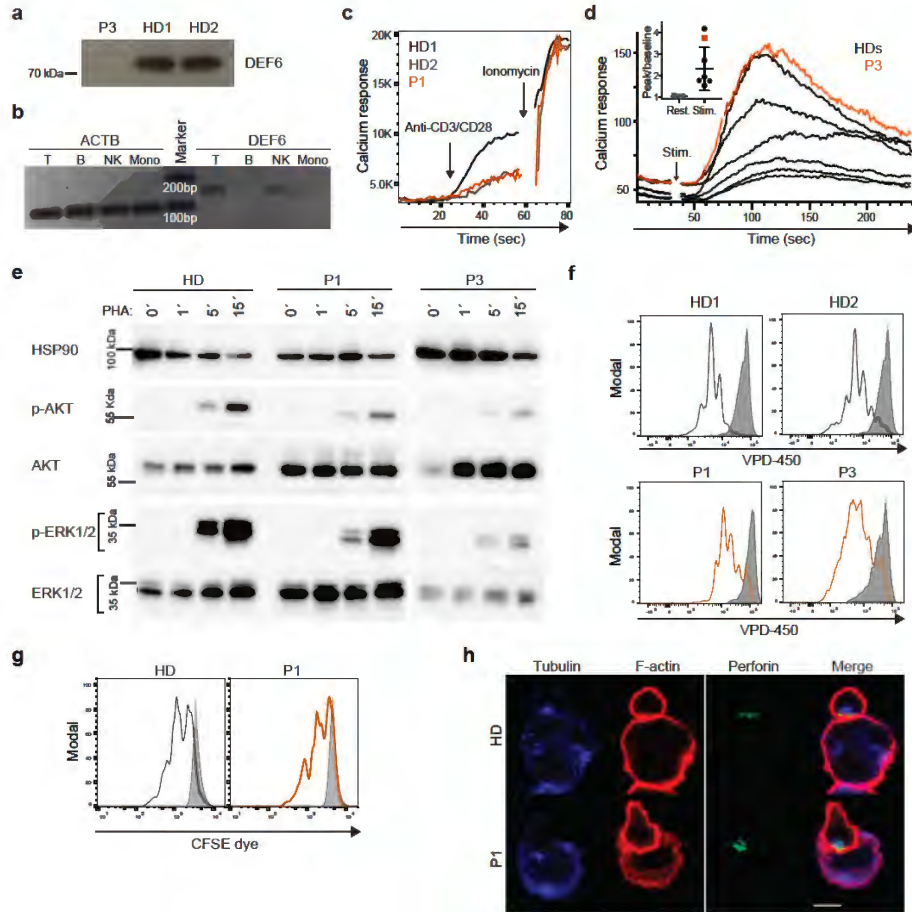
Fig. S1



**Fig. S1:** Extended phenotype of the *DEF6*-mutated patients. **(a)** Duodenal biopsies of P1 at the age of 40 days showed villous atrophy (closed arrows) and an imbalance of leukocytic infiltrate with few plasma cells but increased eosinophils (lined arrows). Apoptotic bodies were visible in the epithelium of the crypts (asterisk) (H&E stain). **(b)**  $T_{regs}$  ( $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}FOXP3^+$ ) are slightly reduced in P1, compared to HD (three donors, one representative shown). **(c)** P1 presented reduced  $CD19^+CD27^+$  memory B cells, in line with her young age. **(d)** Serum cytokine blot of HD (top) and P1 (bottom) showed no systemic increase of proinflammatory cytokines. Representative of two sample shipments. **(e)** Timeline of therapeutic interventions in P1. Further medication: darbepoetin alfa, esomeprazole, cholestyramine; (gray background: out-patient; white background: in-patient (> 2 weeks)). ASA – acetyl salicylic acid. **(f)** Slightly reduced  $T_{regs}$  ( $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD-1^{low}CD25^+FOXP3^+$ ) in P3, compared to HD (representative of 6 donors). **(g)** P3 displays altered distribution of  $CD3^+$  lymphocytes with a considerable decrease of mature ( $CD56^{dim}CD16^+CD57^+$ ), and expanded population of  $CD56^+CD16^+$  cells. **(h)** T-cell lineage phenotyping of P3 and HDs (6 donors). Naïve cells were defined as  $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^-CD25^-FOXP3^-CD45RA^+CCR7^+$  populations. Among non-naïve  $CD4^+$  T cells, following populations were defined:  $T_{h1}$ :  $CD25^-FOXP3^-CCR4^+CXCR3^+CCR6^-$ ,  $T_{h2}$ :  $CD25^-FOXP3^-CCR4^+CXCR3^-CCR6^+$ ,  $T_{h17}$ :  $CD25^-FOXP3^-CCR4^+CXCR3^-CCR6^+$ ,  $T_{h1}T_{h17}$ :  $CD25^-FOXP3^-CCR4^+CXCR3^+CCR6^+$ ,  $T_{regs}$ :  $CXCR5^+PD1^-CD25^+FOXP3^+$ ,  $T_{fh}$  (follicular-helper T cells):  $CD25^-FOXP3^-CXCR5^+PD1^+$ , Exhausted T cells:  $CD25^-FOXP3^-CXCR5^+PD1^+$ . Data are shown as mean  $\pm$  SD. **(i)** FACS plots corresponding to (f). Gating is indicated for  $T_{h1}$ ,  $T_{reg}$  and  $T_{fh}$ , with background shift in the CXCR5 staining and a slightly adapted gate for P3. A representative HD sample was

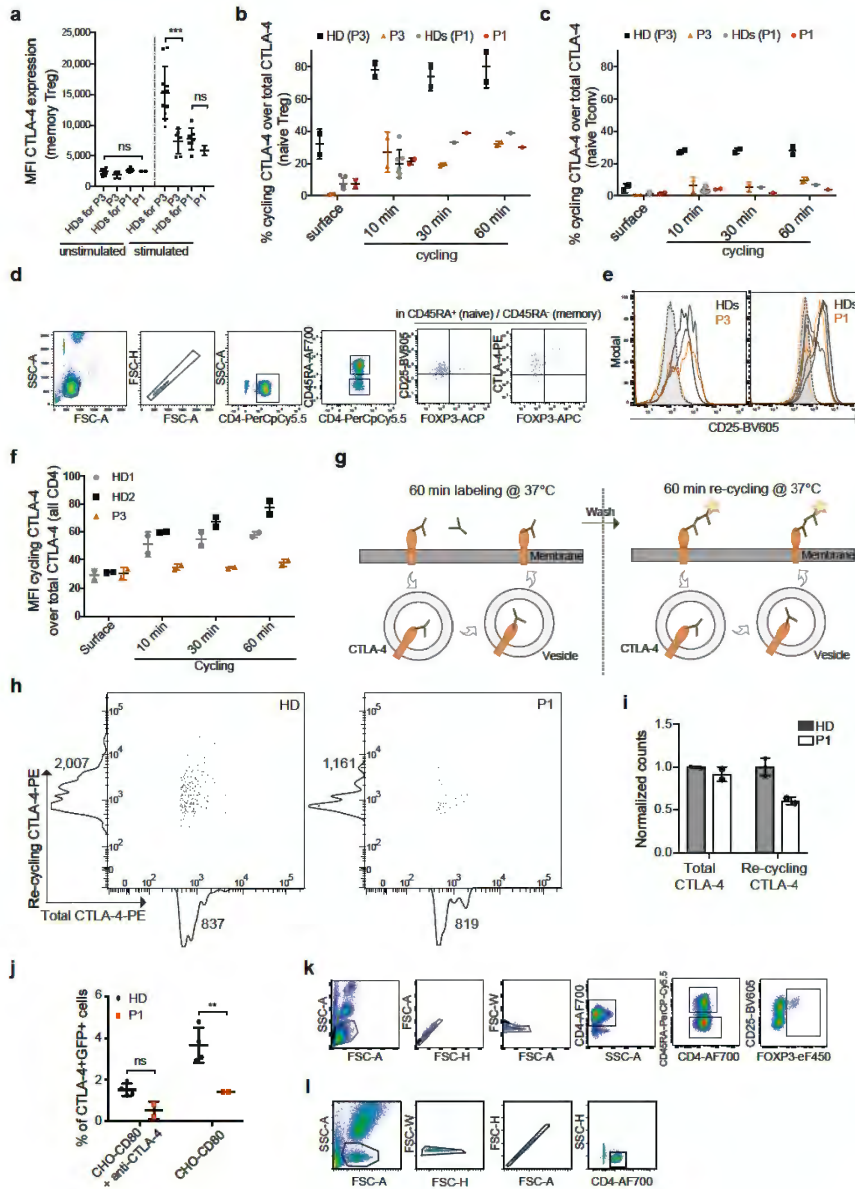
chosen. (j) Amino acids E331 (left) and Y210 (right) in DEF6 are conserved in vertebrates. Source data of Fig. S1 are provided as a Supplementary Source Data file.

Fig. S2



**Fig. S2.** Immunophenotypes of *DEF6*-mutant cells. **(a)** DEF6 expression in P3 and two HDs. Shorter immunoblot exposure as compared to longer exposure shown in Fig. 2e. **(b)** DEF6 is preferentially expressed in T and to a lesser extent NK cells, as analyzed by qPCR. ACTB – beta-actin control, Mono - monocytes. **(c-d)** Calcium influx in response to CD3/CD28 stimulation in primary T cells of P1 **(c)** and P3 **(d)** was in the normal range (compared to 2 **(c)** or 6 **(d)** HDs), traced by flow cytometry. **(e)** Phosphoblotting of feeder-expanded T cells after stimulation with PHA reveals slightly reduced TCR-dependent signaling in the patients, compared to healthy donor. At the indicated time points, cells were lysed and blotted for phospho-AKT, phospho-ERK and control proteins. Images were cropped for visualization. Representative of two Western blots. **(f-g)** Unaffected proliferation abilities of feeder-expanded T cells **(f)** and primary PBMCs **(g)** of patients, compared to healthy controls (HD). Cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies for 5 days. Gray – non-proliferated, black – healthy donors, orange – patients. **(h)** Normal NK cell synapse formation in P1 (>12 analyzed conjugates per individual) after incubation with K562 target cells, as visualized by correct placement of perforin at the synapse edge. Scale bar – 10  $\mu$ m. Source data of Fig. S2 including uncropped immunoblots are provided as a Supplementary Source Data file.

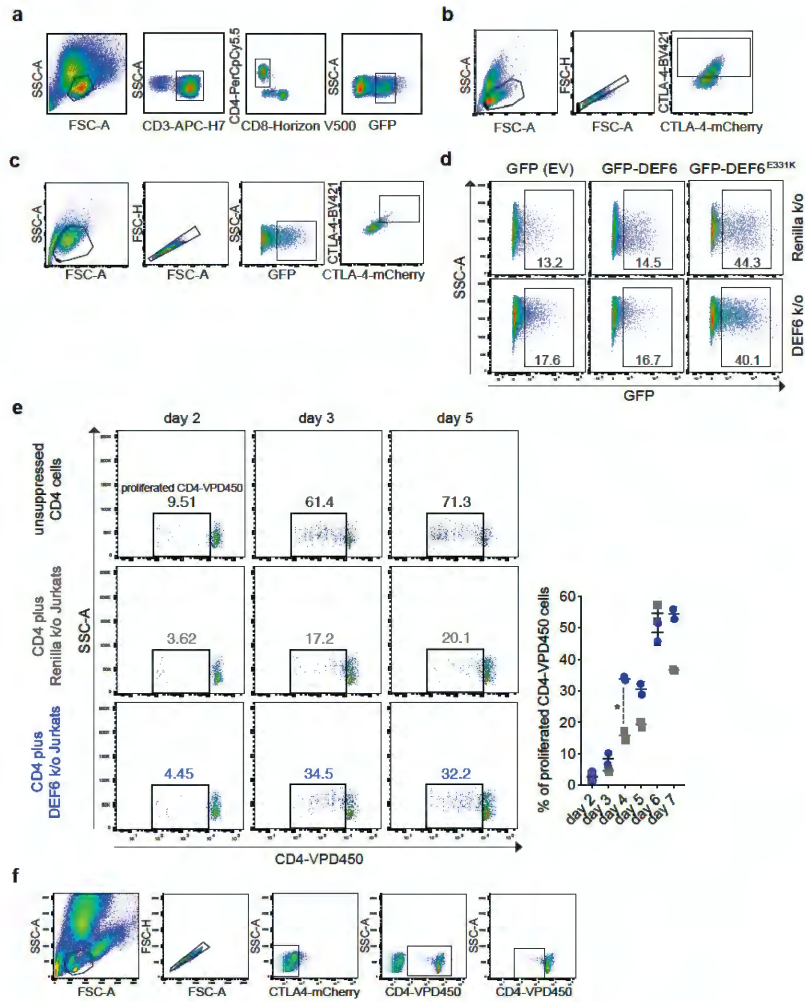
Fig. S3



**Fig. S3.** Additional evidence for the CTLA-4 trafficking defect. **(a)** Raw mean fluorescence intensity data of memory Tregs, referring to Fig. 3a. Data were overlaid with mean  $\pm$  SD, pooled from up to 3 experiments. **(b-c)** Additional cycling data on P1, P3 and respective healthy controls, in naïve T<sub>reg</sub> (b, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) and naïve T<sub>conv</sub> cells (c, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>), corresponding to Fig. 3d-e. Data were overlaid with mean  $\pm$  SD. **(d)** Gating strategy for CTLA-4 cycling experiments, corresponding to Fig. 3c-e. **(e)** Unaffected CD25 upregulation in patient CD4 T cells. Filled gray – unstimulated; unfilled – stimulated; gray/black – HDs; orange – patients. **(f)** Defective cycling in CD4 T cells of P3, as performed for Fig. 3d-e and Fig. S3b-c, calculated for relative mean fluorescence intensities of surface/cycled CTLA-4, normalized to MFI of total CTLA-4. Data were overlaid with mean  $\pm$  SD. **(g)** Schematic representation of CTLA-4 re-cycling to evaluate CTLA-4 re-appearing at outer cell membranes. **(h-i)** Reduced CTLA-4 re-cycling in memory T<sub>regs</sub> of P1. Cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibody bearing beads for 16 hours before the primary non-labeled antibody was added for 1 hour. A second antibody against the Fc portion of the primary antibody was added during the surface stain (recycling portion, see schematic shown in (g)). Total staining was performed after permeabilization. MFI values are shown (h). Cells were gated on CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> populations in isolated CD4 T cells and normalized to total CTLA-4 (i). Data are shown as mean  $\pm$  SD, two independent experiments. **(j)** Quantification of two transendocytosis experiments corresponding to Fig. 4b, normalized to CTLA-4<sup>+</sup> cells. Data were overlaid with mean  $\pm$  SD. Statistics: \*\* p=0.008 (One-way Anova). **(k)** Gating strategy for ligand uptake experiments corresponding to Fig. 4a. **(l)** Gating strategy for transendocytosis experiments corresponding to Fig. 4b. Source data of Fig. S3 are provided as a Supplementary Source Data file.

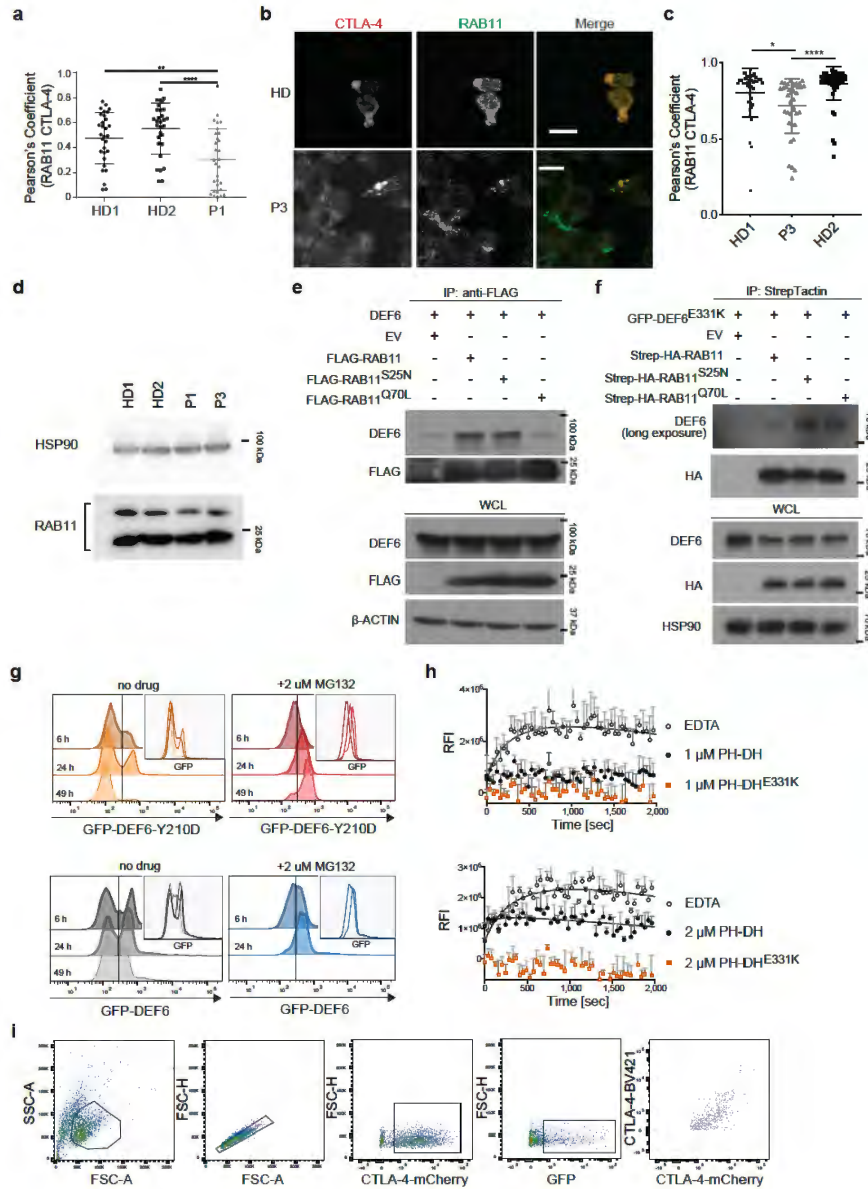


Fig. S4



**Fig. S4.** Additional data on reconstitution and Jurkat knockouts. **(a)** Gating strategy for mobilization and reconstitution experiments in patient cells, corresponding to Fig. 5a-c. **(b)** Gating strategy (sequential) for cycling experiments on Jurkat knockout clones, corresponding to Fig. 5e. **(c)** Gating strategy for reconstitution of Jurkat knockout clones, corresponding to Fig. 5f. **(d)** GFP expression levels of Jurkat knockout clones reconstituted with GFP constructs (indicated) by electroporation, corresponding to Fig. 5f. Gating as in Fig. S4c. **(e)** DEF6 knockout in Jurkat-mCherry-CTLA-4 cells results in reduced suppression tendency against VPD450-labelled CD4 T cells compared to Renilla control, as exemplified by enhanced proliferation of VPD-labelled cells. Cells were seeded at the following ratio. Respective Jurkat : CD4 (VPD450-labelled) : PBMC (unlabeled, same healthy donor) cells = 2:1:1. VPD450 traces of proliferating CD4 T cells were followed over time. Gating as in Fig. S4f. Representative of two independent experiments. Numerical inserts show percentages of proliferated CD4 T cells. Data of both experiments are plotted to the right. Statistics: \* p=0.027 (Unpaired t test). Data were overlaid with mean  $\pm$  SD. **(f)** Gating strategy for suppression assay Fig. S4c. Source data of Fig. S4 are provided as a Supplementary Source Data file.

Fig. S5



**Fig. S5.** Additional data on RAB11 and DEF6. **(a)** Quantification of RAB11/CTLA-4 co-localization after TCR stimulation in selected ROIs reveals a significant reduction in P1 compared to two HDs. Statistics: \*\*  $p=0.005$ ; \*\*\*\*  $p<0.0001$  (One-way Anova). **(b)** Reduced CTLA-4/RAB11 co-localization in P3-derived feeder-expanded stimulated T cells. Representative images of CTLA-4 and RAB11 stains in P3 and a healthy donor (shown one out of two HDs), indicating less-pronounced CTLA-4 localizing to RAB11<sup>+</sup> vesicles in P3. Feeder-expanded T cells were stimulated for 48h with anti-CD3/CD28 antibodies. Scale bar - 10  $\mu\text{m}$ . **(c)** Quantification of CTLA-4/RAB11 co-localization in P3 corresponding to b), analyzed as for P1 (a). Statistics: \*  $p=0.0161$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$  (One-way Anova). Data are shown as mean  $\pm$  SD (a,c). **(d)** Feeder-expanded T cells of both patients show equal RAB11 expression as HDs. **(e-f)** Co-immunoprecipitation of RAB11 variants in HEK293T identifies DEF6 as potential GEF protein for the GTPase. Wildtype DEF6 co-immunoprecipitates with RAB11 and inactive RAB11<sup>S25N</sup>, but not with constitutively active RAB11<sup>Q70L</sup> (e). DEF6<sup>E331K</sup> only minimally co-immunoprecipitates with either RAB11 variant (f). Long exposure times (indicated) of 30 min were necessary to visualize residual mutant DEF6 pulldowns (f, DEF6 blot, long exposure). Shorter exposure did not reveal binding (see the supplementary Source Data file). Additional HA and HSP90 blots (f) are shown in the Source Data file. Equal sample amounts were used for each experiment, sample load was balanced on immunoprecipitated RAB11. One out of two individual experiments are shown. **(g)** DEF6<sup>Y210D</sup> is rapidly degraded after overexpression in Jurkat cells, and can be blocked by proteasomal inhibition. GFP-tagged wildtype (bottom) or mutant (top) DEF6 were electroporated into Jurkat cells and GFP signal was traced over time, in presence or absence of MG132. **(h)** Wildtype but not mutant PH-DH shows GEF activity toward RAB11, as visualized by increased Mant-GTP intensity compared to mutant. Purified proteins were assayed, EDTA served as positive

control. RFI – relative fluorescence intensity. 1  $\mu$ M (top) or 2  $\mu$ M (bottom) GEF protein was used. Datapoints are shown as mean  $\pm$  SD, nonlinear regression curve fitting was applied. One of two representative experiments shown. (i) Gating strategy for RAB11-variant cycling experiments of Fig. 6g-h. All immunoblots in this Figure were cropped for visualization. Source data of Fig. S5 including uncropped immunoblots are provided as a Supplementary Source Data file.

Supplementary Table

Table S1. Characteristics of the segregating variants in the two families.

Gene	Family	Position*	Ref.	Obs.	Protein	Poly-phen-2	SIFT	CADD	TOPMed allele counts**	gnomAD allele counts	ExAC allele counts	ExAC pLI
<i>DEF6</i>	Fam. A	chr6 35286024 (rs541285645)	G	A	CCDS4802; c.G991A; p.E331K	0.978	0.14	23.6	---	Hom: 0, Het: 50 (26162) MAF: 0.001911 (SA), 0.0002674 (total)	Hom: 0, Het: 21 (8886) MAF: 0.00024 (SA)	0.98
<i>DEF6</i>	Fam. B	chr6 35280283	T	G	CCDS4802; c.T628G; p.Y210D	0.858	0.03	26.4	---	---	---	0.98
<i>CR2</i>	Fam. A	chr1 207644154 (rs781255614)	G	A	CCDS31007; c.G1295; p.G432E	1.000	0.02	25.4	Hom: 0, Het: 2 (125568) MAF: 0.000016 (total)	Hom: 0, Het: 163 (282512) MAF: 0.00057 (total)	Hom: 0, Het: 74 (16502) MAF: 0.00045 (SA)	0
<i>SKIV2L</i>	Fam. A	Chr6 31936274	CA	C	CCDS4731; c.C3029delA; p.Q1010fs*15	---	---	29.3	---	---	---	0

Prediction scores were calculated with Polyphen-2 (ref. <sup>1</sup>), SIFT<sup>2</sup> and CADD<sup>3</sup>. Variant counts (in brackets: total analyzed alleles) and frequencies were downloaded from gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) or ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) databases<sup>4</sup>, or the TOPMed database via the Bravo browser (<https://bravo.sph.umich.edu/freeze5/hg38/>). Current genomes include: gnomAD – 10,738, ExAC – 60,706, TOPMed Bravo – 62,784 individuals. MAF frequencies are indicated for identified heterozygotes. (Accession date: March 31, 2019) (Ref.: reference; Obs.: observed; het: heterozygous; hom: homozygous; MAF – minor allele frequency; SA – South Asian; pLI: probability of loss of function intolerance of homozygous/heterozygous variants; --- – not reported; \* human reference genome GRCh37; \*\* positions were converted and extracted for GRCh38 reference genomes).

### Supplementary References

1. Adzhubei, I.A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248-249 (2010).
2. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* **4**, 1073-1081 (2009).
3. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* **46**, 310-315 (2014).
4. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285-291 (2016).

## Annexe 3: Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type 1 regulatory T cells

International Immunology  
doi:10.1093/intimm/dxy083  
Advance Access publication 19 February 2019

© The Japanese Society for Immunology, 2019. All rights reserved.  
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

# Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type 1 regulatory T cells

Delphine Guipouy<sup>1-4</sup>, Julie Gertner-Dardenne<sup>4</sup>, Laurène Pfajfer<sup>1-3</sup>, Yolla German<sup>1-3</sup>, Nathalie Belmonte<sup>4</sup> and Loïc Dupré<sup>1-3, \*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Purpan University Hospital, 1 place du Dr Baylac, 31300 Toulouse, France

<sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31062 Toulouse, France

<sup>3</sup>CNRS, UMR5282, 31300 Toulouse, France

<sup>4</sup>TxCeLL, Allée de la Nertière, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France

Correspondence to: L. Dupré; E-mail: loic.dupre@inserm.fr

Received 8 February 2018, editorial decision 5 December 2018, accepted 20 December 2019

### Abstract

The intrinsic immunosuppressive properties of regulatory T (Treg) cells can be harnessed for therapeutic approaches aiming at down-modulating harmful immune reactions. In this context, expanded type 1 Treg cells (Tr1 cells) specific for ovalbumin (ova-Tr1 cells) have been tested for clinical efficacy in the treatment of autoimmune disorders such as refractory Crohn's disease (CD). The clinical use of these therapeutic products warrants exploration of their mechanism of action. Here, we identified a relationship between the CD activity index and the expression of lytic molecules by the ova-Tr1 cells administered in the previously reported First-in-Man study [Crohn's And Treg cells Study 1 (CATS1) study]. Accordingly, ova-Tr1 cells were found to carry granules containing high levels of lytic molecules, including multiple granzymes and granulysin. These cells displayed a T-cell receptor (TCR)-independent cytotoxic activity, which was preferentially directed toward myeloid cell lines and monocyte-derived dendritic cells. Upon contact with myeloid cells, ova-Tr1 cells induced their apoptosis via a perforin-independent and a granulysin/granzyme-dependent mechanism. As compared to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, ova-Tr1 cells required more time to lyse target cells and displayed a more gradual lytic activity over time. Notably, this activity was sustained over days resulting in the control of myeloid cell populations at a relatively low ratio. Our study reveals that ova-Tr1 cells are endowed with a sustained cytotoxic activity that relies on a unique combination of granulysin and granzymes and that preferentially eliminates myeloid target cells in a TCR-independent manner.

**Keywords:** cell therapy, crohn's disease, cytotoxic activity, monocytes, Tr1 cells

### Introduction

Reinforcing and modulating the immune system has recently become an efficient strategy to tackle the challenges posed by cancers and chronic inflammatory diseases (1–3). Autologous T-cell-based therapies represent one of the immunotherapy approaches being explored today. They include strategies relying on the transfer of either cytotoxic T cells for the elimination of cancer cells (4–6) or regulatory T (Treg) cells to control autoimmune and inflammatory diseases (7, 8). Treg cells are endowed with a suppressive activity (9), which operates through immunosuppressive cytokines (10, 11), metabolism disruption (12) or inhibition of antigen-presenting cell maturation (13). Interestingly, Treg cells can

also mediate a cytotoxic activity toward both effector T cells (14) and myeloid cells, including antigen-presenting cells (15, 16). Importantly, such cytotoxic activity has been reported to be required for the regulatory activity of these cells *in vivo* (17). Type 1 Treg cells (Tr1 cells) are an attractive subset of Treg cells for therapy since they can be generated *in vitro* (18). They also share immunosuppressive and cytotoxic activities (19–21). Nevertheless, the relevance of these activities in the context of therapeutic approaches remains to be evaluated.

An autologous T-cell-based approach consisting of the administration of *in vitro* expanded ovalbumin-specific type



1 Treg cells (ova-Tr1 cells) has been developed for the treatment of Crohn's disease (CD) (20, 22). The phase I/IIa Crohn's And Treg cells Study 1 (CATS 1) clinical study showed the safety of this approach in the context of refractory disease and provided a significant clinical improvement in 8 of the 20 treated patients (23). This clinical response was paralleled by a reduction in pro-inflammatory monocytes in the blood of the patients 3 weeks after injection, suggesting that ova-Tr1 cells might dampen CD-associated inflammation via the control of monocytes. In the present study, we explored whether known Tr1-cell-associated mechanisms might contribute to the control of monocytes by ova-Tr1 cells. The phenotypic analysis of markers of the regulatory and cytotoxic activities expressed by the cells administered to CD patients revealed a relationship between levels of cytotoxic molecules and CD activity index (CDAI) reduction. This interrelationship led us to focus on the cytotoxic potential of those cells using a combination of assays based on flow cytometry and quantitative video microscopy (24). Our study demonstrates that therapeutic Tr1 cells are endowed with an alternative cytotoxic activity that eliminates myeloid cells, independently of T-cell receptor (TCR)-mediated signaling, via a granulysin- and granzyme-dependent mechanism.

## Methods

### Cells

**Ova-Tr1 cells.** The expansion process of autologous ova-Tr1 cells was optimized from the phase I/IIa study for a phase IIb clinical trial to prevent adverse effects from residues of feeder cells (22). Ova-Tr1 cells were produced using an ex vivo cell culture process, which generates ova-specific T lymphocytes in 8–10 weeks. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from individual donors were used as source of ova-Tr1 cells for the manufacturing of the drug substance. Donor PBMCs were enriched in autologous antigen-specific T cells by stimulation with ovalbumin (ova). After limiting dilution plating of the resulting activated cells, T cells demonstrating specificity to ovalbumin and production of ova-Tr1 cytokines were selected for additional expansion and processing. Expansion relied on a stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of rhIL-2 and rhIL-4 (both from Miltenyi). The final drug product consisted of the expanded ova-Tr1 cells that were formulated in a cryopreservation medium, put in vials and frozen.

**CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes.** To generate control cytotoxic T lymphocytes (CTLs), CD8<sup>+</sup> T cells were sorted from healthy donor PBMCs with a FACS Aria sorter (BD Biosciences) and cloned. CTL clones were cultured in RPMI 1640 glutamax (Gibco) supplemented with 5% human serum (PAA), 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 0.1 mM minimum essential medium (MEM) non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen) and stimulated every 2 weeks with irradiated PBMCs and Epstein-Barr virus-transformed JY cells in the presence of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  phytohemagglutinin (PHA), 100 IU  $\text{ml}^{-1}$  rhIL-2 and 5 ng  $\text{ml}^{-1}$  rhIL-15. Control Foxp3<sup>+</sup> Treg cells were isolated from healthy donor PBMCs on the basis of the expression CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> CD25<sup>+</sup> (EasySep Stemcell isolation kit) according to the manufacturer's protocol.

**Target cells.** The U937 (ATCC), THP1 (ATCC), JY (ATCC) and K562 cell lines were cultured in RPMI (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; PAA) and the components described above. The P815 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA) and the components described above. Primary dendritic cells (DCs) were obtained from monocytes following isolation of PBMCs from a healthy donor and 1-h adherence in a flask. DC differentiation was induced during 6 days of culture in RPMI supplemented with 10% FCS and in the presence of 750 IU  $\text{ml}^{-1}$  granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 100 IU  $\text{ml}^{-1}$  rhIL-4. Where indicated, immature DCs were treated with 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of lipopolysaccharide to obtain mature DCs.

### Phenotypic characterization

Ova-Tr1 cells and Foxp3<sup>+</sup> Treg cells were stained for extracellular markers with fluorochrome-coupled antibodies recognizing CD4-VioBlue (VIT4, Miltenyi), CD25-APC (4E3, Miltenyi), CD62L-FITC (145/15, Miltenyi), CD127-PE (MB15-18C9, Miltenyi), CTLA-4-PE (BNI3, Miltenyi), ICOS-PECy7 (ISA-3, eBioscience), GITR-AF488 (eBioA1TR, eBioscience), PD-1-PE (PD1.3.1.3, Miltenyi) and CD39-PE (MZ18-23C8, Miltenyi) for 30 min at 4°C. Intracellular staining was performed after fixation and permeabilization using the Cytotix/Cytoperm kit (BD) with the following antibodies: Foxp3-APC (3G3, Miltenyi), perforin-APC (delta G9, Miltenyi), granulysin-AF488 (RB-1, BD Pharmingen), granzyme A-FITC (CB9, BD Pharmingen), granzyme B-PE (GB-11, BD Pharmingen), granzyme H-PE (03, Interchim), granzyme K-efluor660 (G3H69, eBioscience) and granzyme M (rabbit, polyclonal, ClniSciences). For granzyme M staining, a goat anti-rabbit secondary antibody (ClniSciences) coupled with FITC was added. All data were acquired on a Macsquant 10 cytometer and analyzed using MacsQuantify software (Miltenyi).

### Phospho-ZAP-70 staining

Control CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated for 30 min with anti-CD3/CD28 beads (1:1 ratio). Ova-Tr1 cells were used upon thawing and harvested from the culture every 3 days (in parallel with the cytotoxic assays performed on the same days). After washing, a first step of fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) was performed at room temperature (RT) for 10 min, followed by a permeabilization step with 90% methanol at -20°C overnight. A rabbit polyclonal antibody for phospho-ZAP-70 (Tyr493, Cell Signaling Technology) was used at a dilution of 1:25 for 45 min at RT, then revealed by a secondary anti-rabbit IgG antibody coupled with AF647 (Invitrogen) at a dilution 1:400 for 30 min at RT. Data were acquired on a Macsquant 10 cytometer (Miltenyi) and analyzed using FlowJo software.

### Cytotoxic assays

Ova-Tr1 cells were co-incubated with various target cells, at 1:1, 5:1 and 10:1 effector to target cell ratios (reference number of 25,000 target cells against 25,000, 125,000 and 250,000 effector cells). Cells were pelleted for 1 min at 1500 rpm and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> from 4 to 72 h. Aphidicolin (Sigma) was used at 0.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  during the assay to block target cell proliferation for all target cell lines, but not primary cells. When indicated, blocking antibodies were used at the

concentration of 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (anti-DNAM-1, -FasL, -Trail and -HLA-DP/DQ/DR) (25–27). Anti-DNAM-1 (102511), -FasL, (NOK-1) -Trail (RIK2) and -HLA-DP/DQ/DR (7-5-10-1) monoclonal antibodies (mAbs) were purchased from R&D Systems, Thermo Fischer Scientific, BioLegend and Antibodies-online, respectively. The cytotoxic activity was assessed by quantifying the number of residual alive target cells as described previously (24). These data were acquired on a Macsquant 10 and VYB cytometers (Miltenyi) and analyzed using FlowJo software.

#### Live microscopy recording of cytotoxic activity

Cytotoxic activity was monitored by microscopy in eight-well IBIDI chambers coated with 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of fibronectin (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Effector cells were pre-stained with CellTracker green CMFDA dye (Invitrogen) for 30 min at 37°C/5% CO<sub>2</sub> or CellTrace Calcein red/orange dye (Invitrogen) and then transferred into an IBIDI eight-well chamber together with U937 cells. A 2  $\mu\text{M}$  concentration of NucView 488 caspase-3 substrate (Biotium) or a 200  $\mu\text{M}$  concentration of propidium iodide (PI; Sigma) was added. The cells were imaged at a frame rate of 3 min for NucView experiments or 2 min for PI experiments, using a Leica SP8 confocal microscope equipped with a chamber set at 37°C/5% CO<sub>2</sub> and a 20 $\times$  (0.8 NA) objective. To automatically count caspase-3<sup>+</sup> cells through time, images were binarized and further processed using erosion, dilatation and watershed tools from the ImageJ software (National Institutes of Health). The percentage of caspase-3<sup>+</sup> cells was calculated based on the number of alive target cells enumerated at the beginning of the recording. Measurements of interaction time and PI entry delay were done by cropping regions of interest containing isolated conjugates made of one T cell and one target cell.

#### Analysis of lytic granules by confocal microscopy

Ova-Tr1 cells were seeded onto poly-L-lysine-coated slides. Cells were fixed with 4% PFA for 10 min at 37°C, washed with phosphate-buffered saline (PBS) 3% bovine serum albumin (BSA) and permeabilized with PBS 3% BSA 0.1% saponin for 15 min at RT. F-actin was stained with phalloidin-AF555 for 1 h at RT. Granulysin and granzyme B were revealed with coupled-mAb (anti-granulysin-AF488, RB-1 and anti-granzyme B-AF647, GB-11 both from BD Pharmingen). LAMP-1 was first stained with a primary rabbit antibody (Abcam), then revealed by a goat anti-rabbit-AF405 secondary antibody (Invitrogen). Slides were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired on a LSM 710 confocal microscope equipped with a 63 $\times$  (1.4 NA) oil immersion Plan-Apochromat objective (Carl Zeiss AG).

#### siRNA transfection

Ova-Tr1 cells were harvested and re-suspended in OPTI-MEM medium at 1.10<sup>6</sup> cells in 100  $\mu\text{l}$  and transferred in a 2 mm cuvette (Bio-Rad) alone or together with 2  $\mu\text{g}$  final either of two control siRNA or three siRNA targeting granulysin (Life Technologies, ID 17933, 18028 and 135803). The transfection was performed by electroporation using the Gene Pulser

system (Bio-Rad) with the square wave program: 300 V and 1 pulse of 2 ms. Cells were immediately put back in culture in their culture medium added with cytokines.

#### Suppression assays

Conventional T cells (Tconv) consisted of CD4<sup>+</sup> T-cell blasts generated from human PBMCs with a PHA/IL-2 stimulation. Tconv cells were stained with CellTrace Violet (CTV, ThermoFisher Scientific) while Ova-Tr1 cells were stained with CMFDA (ThermoFisher Scientific). The Tconv and ova-Tr1 cells were plated at the indicated ratio, in the presence of IL-2 (100 U ml<sup>-1</sup> final) and in the presence or not of anti-IL-10 antibody (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Miltenyi, clone JES3-9D7). For the stimulation, CD3/CD28-coated beads were added to the wells at a bead/Tconv cell ratio of 1:2. After 96 h of incubation, each condition was acquired using a MACSQuant10 cytometer and analyzed using FlowJo software.

To assess the suppressive activity of Ova-Tr1 cells toward T<sub>H</sub>17 CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells were purified from human blood and cultured in T<sub>H</sub>17-skewing conditions. These T<sub>H</sub>17 CD4<sup>+</sup> T cells were characterized by *RORC* expression and IL-17A production, as measured by RT-PCR and ELISA, respectively. During the differentiation process, these cells were exposed to the culture supernatant of ova-Tr1 cells that had been stimulated for 48 h with anti-CD3/CD28 antibody-coated beads. *RORC* expression and IL-17A production were compared to the basal levels in order to assess the suppressive activity of different Ova-Tr1 cells.

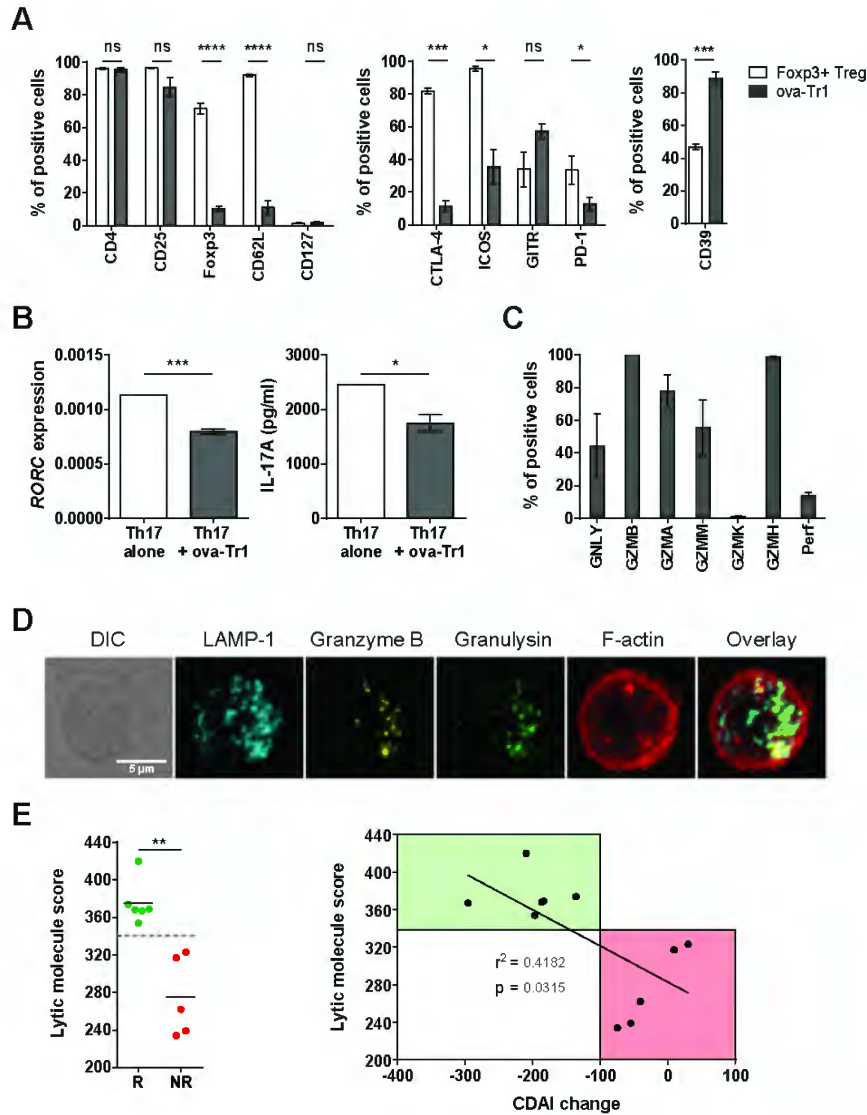
#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software. Statistical significance was determined by performing a one sample *t*-test or a two-tailed unpaired *t*-test, as indicated. Graphs show mean values  $\pm$  SEM. Resulting *P* values are indicated as follows: ns *P* > 0.05; \*0.01 < *P* < 0.05; \*\*0.001 < *P* < 0.01; \*\*\*0.0001 < *P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001.

## Results

#### Expression of granzymes and granulysin by ova-Tr1 cells is linked to clinical response in CD patients

In order to get insight into the mechanism by which ova-Tr1 cells might control refractory CD in the context of adoptive cell therapy, we analyzed the expression of molecules known to mediate regulatory and cytotoxic activities in these cells. Ova-Tr1 cells were defined as CD4<sup>+</sup> T cells expressing high levels of CD25 but low or undetectable expression of Foxp3 and CD62L, in contrast to thymus-derived Treg cells (Fig. 1A). As previously described, ova-Tr1 cells secreted high amounts of IL-10 and IL-13, low amounts of IFN- $\gamma$ , but no IL-4 (23). This analysis also confirms that these cells harbor a Tr1 cytokine profile (19, 28). Analysis of immune checkpoint surface molecules on ova-Tr1 cells showed expression of ICOS and GITR but low levels of CTLA-4 and PD-1. Furthermore, ova-Tr1 cells expressed high levels of the ATP-degrading ectonucleotidase CD39 (29). The suppressive ability of ova-Tr1 cells was first tested as their capacity to inhibit the proliferation of Tconv cells (Supplementary Figure S1A). A partial control of Tconv



**Fig. 1.** Phenotypic characterization of ova-Tr1 cells produced for cellular therapy. (A) Expression of characteristic markers of Treg cells, as indicated. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 2$  for control Foxp3<sup>+</sup> Treg cells and  $n = 6$  for ova-Tr1 clones. (B) Suppressive activity of four ova-Tr1 clones toward a test Th17 cell line, measured as RORC mRNA expression and IL-17A production. The white bars indicate reference values for untreated Th17 cells while the black bars represent mean  $\pm$  SEM values following exposure with supernatants from four ova-Tr1 clones. (C) Expression of lytic molecules measured by flow cytometry, shown as percentage of positive cells. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  ova-Tr1 clones. (D) Visualization of granzyme B and granulysin together with LAMP-1 by confocal microscopy, represented as a maximum intensity projection of a z-stack acquisition through the entire cell. (E) Compiled expression of lytic molecules (addition of percentages of positive cells for each lytic molecule) in ova-Tr1 cells transfused to responder (green) and non-responder (red) patients from the CATS1 phase I/IIa clinical trial. CDAI change corresponds to the difference of CDAI scores at the beginning and the end of the trial. Statistical significances were obtained with unpaired *t*-tests (A and E) or a one sample *t*-test (B). ns  $P > 0.05$ ; \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $0.0001 < P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

cell proliferation was observed at the 10:1 ova-Tr1:TconV ratio. This suppressive activity appeared to not depend on IL-10 as indicated by the apparent lack of effect of anti-IL-10 antibody treatment (Supplementary Figure S1B). Given the central role of T<sub>H</sub>17 cells in CD inflammation, we then tested the ability of ova-Tr1 cells to counteract T<sub>H</sub>17 cell differentiation. For that purpose, we applied the culture supernatant of ova-Tr1 cells that had been stimulated with anti-CD3/CD28 antibody-coated beads onto purified CD4<sup>+</sup> T cells cultured in T<sub>H</sub>17-skewing conditions (Fig. 1B). The supernatants of ova-Tr1 cells dampened both the expression of *RORγ* and the production of IL-17A. Together these data show that ova-Tr1 cells have a moderate suppressive activity toward TconV cell proliferation and T<sub>H</sub>17 cell differentiation.

Tr1 cells have been shown to also mediate their suppressive function via the release of lytic molecules, including granzyme B and perforin (21). We checked the expression of all described granzymes (A, B, H, K and M), as well as perforin and granulysin in the ova-Tr1 cells (Fig. 1C). The tested clones consistently expressed high levels of granzymes A, B, H and M but almost no granzyme K. Interestingly, while the ova-Tr1 cells expressed very low levels of perforin, they expressed granulysin, a cytotoxic molecule that was recently described to be able to cooperate with granzymes to kill pathogens (30). We then studied these cells by confocal microscopy to investigate whether the identified lytic molecules would be localized in granules as expected for cytotoxic T cells. Our analysis confirms the expression of granzyme B and granulysin and shows that these molecules colocalized with the lysosomal marker LAMP-1 (Fig. 1D). Together, these data indicate that ova-Tr1 cells harbor a cytotoxic potential, although they express very low levels of perforin.

Our characterization of the ova-Tr1 cells points to their potential to control inflammatory responses such as those underlying CD *via* suppression of pathogenic T cells and/or *via* a cytotoxic mechanism. We therefore investigated, retrospectively, in the remaining drug products from CATS1 study patients whether the expression of markers of these activities might correlate with the change in CDAl scores. Ova-Tr1 cells infused to patients were studied for the expression of several markers of immunosuppressive and cytotoxic functions, such as costimulatory molecules, CD39, various chemokines receptors, as well as IL-10 secretion. Moreover, the proportion of cells expressing granzymes (A, B, H, K and M), perforin and granulysin was monitored by flow cytometry (representative dot plots are presented in Supplementary Figure S1C) and compiled into a lytic molecule score corresponding to the sum of the percentages of cells expressing each of the lytic molecules separately. This score was compared to the patient CDAl change reached at 5 weeks after injection, when the peak of response was observed in CATS1 (Fig. 1E). A clinical response was defined as a reduction of at least 100 points of the patient CDAl score. The analysis revealed that the lytic molecule score of the infused cells was associated with the clinical response. Indeed, responder patients displayed high lytic molecule scores. In contrast, non-responder patients displayed lower lytic molecule scores than responder patients. While the expression of lytic molecules appeared to be related to the clinical response, we failed to detect any relationship between markers of

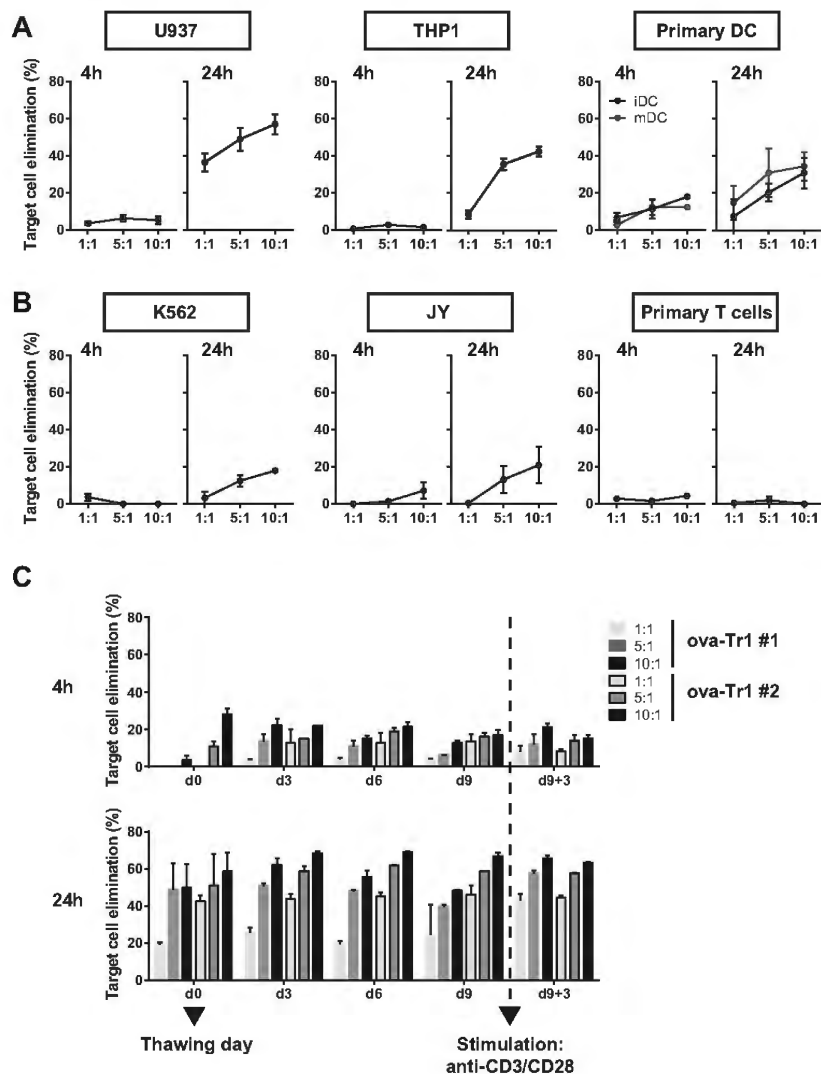
immunosuppressive functions and the CDAl of the infused patients (data not shown). Together, these data indicate that the *in vivo* efficacy of ova-Tr1 cells in the context of CD might be related to the cytotoxic potential of these cells, on the basis of their high expression of numerous granzymes and granulysin. This observation raises the question as to whether ova-Tr1 cells are endowed with a lytic activity and, if so, which pathogenic cells they might target.

#### *Ova-Tr1 cells preferentially eliminate myeloid cells independently from TCR re-stimulation*

We tested the intrinsic cytotoxic activity of ova-Tr1 cells against various hematopoietic cell lineages using a cytometry-based method designed to assess both short-term and long-term cytotoxic activity at reduced effector to target cell ratios (24). Although ova-Tr1 cells displayed only minimal elimination of the myeloid cell lines U937 and THP1 in a 4-h assay, they efficiently eliminated these cells over 24 h, in a ratio-dependent manner (Fig. 2A). The ability of ova-Tr1 cells to eliminate myeloid cells was confirmed with the use of primary cells. Indeed, ova-Tr1 cells efficiently eliminated monocyte-derived DCs, independently from their maturation status. Ova-Tr1 cells displayed only minimal effects on the viability of cells belonging either to the granulocytic series (K562 cells), the B cell lineage (JY cells) or the T-cell lineage (primary CD8<sup>+</sup> T cells) (Fig. 2B). Therefore, the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells appears to be preferentially directed toward cell lines and primary cells belonging to the monocytic lineage. To further dissect the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells, we chose to use the U937 cell line as a model. In the clinical setting, frozen batches of ova-Tr1 cells are thawed and directly administered to patients. We assessed how long the cytotoxic property of ova-Tr1 cells would be maintained in that setting (Fig. 2C). Upon thawing, ova-Tr1 cells displayed a low, but detectable, target cell reduction activity at 4 h, which strongly increased at 24 h. This cytotoxic activity was maintained over the 9 days of *in vitro* culture. To further evaluate their functional stability, ova-Tr1 cells were re-stimulated with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads. Three days after stimulation, ova-Tr1 cells remained as efficient at eliminating U937 cells as they were following thawing. Remarkably, the lytic activity of ova-Tr1 cells appeared to not require TCR triggering upon target cell encounter. This notion was reinforced by the fact that addition of a pan blocking antibody against HLA-DP/DQ/DR failed to inhibit ova-Tr1 cell mediated cytotoxicity (Supplementary Figure S2A). The independence from TCR triggering might be explained by a tonic status of the TCR. In support of this hypothesis, ova-Tr1 cells displayed a high level of phosphorylated form of Zap-70 upon thawing, after 9 days of *in vitro* culture and after re-stimulation (Supplementary Figure S2B and C). Together, these data indicate that the TCR-independent cytotoxic activity of ova-Tr1 cells directed toward myeloid cells is a very stable property that is not affected by *in vitro* culture nor by re-stimulation.

#### *Gradual onset of lytic activity by ova-Tr1 cells against myeloid cells*

Given the increase in cytotoxic activity measured between 4 and 24 h of co-culture with the target cells, we investigated

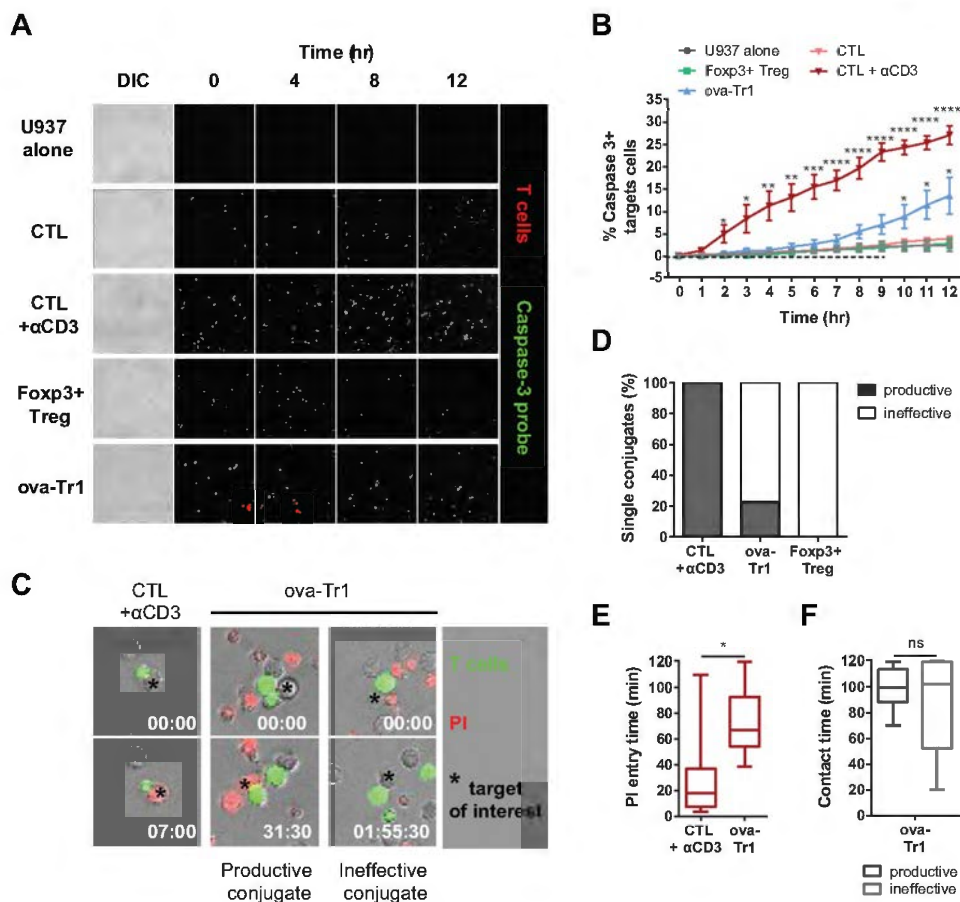


**Fig. 2.** Ova-Tr1 cells preferentially kill myeloid cells. (A) Short-term (4 h) and long-term (24 h) killing assay against different myeloid cell lines (U937, THP1) and primary monocyte-derived myeloid cells (IDC and mDC). Mean  $\pm$  SEM  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (B) Short-term (4 h) and long-term (24 h) killing assay against a granulocyte cell line (K562), a lymphoid cell line (JY) and primary CD8<sup>+</sup> T cells. Mean  $\pm$  SEM  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (C) Sustainment of lytic activity by ova-Tr1 cells during a cycle of *in vitro* culture, from thawing up to after re-stimulation, against U937 target cells. Mean  $\pm$  SD of an experiment in duplicates with  $n = 2$  ova-Tr1 clones.

the kinetics of the ova-Tr1 cell cytotoxic activity by monitoring the events of U937 cell death by live microscopy (Fig. 3A and B). For that purpose, U937 cells were loaded with the NucView fluorescent probe that reveals caspase-3 activation. We used this approach to compare in parallel the cytotoxic

activity of ova-Tr1 cells, CTLs and Foxp3<sup>+</sup> Treg cells. As expected, CTLs did not display any cytotoxic activity toward U937 cells without an exogenous stimulus. However, in the presence of anti-CD3 antibody, expected to bind Fc receptors on the target cells (31) they eliminated a high proportion





**Fig. 3.** Killing kinetics of ova-Tr1 cells. Target U937 cells were seeded in the presence of ova-Tr1 cells, Foxp3<sup>+</sup> Treg cells or CTLs (red) at an E:T ratio of 1:1 for 12 h. The Nucview 488 caspase-3 substrate was used to track individual target cell apoptosis by live microscopy. (A) Representative snapshots showing the activation of caspase-3<sup>+</sup> target cells after co-culture with the indicated effector cells. (B) Quantification of videos as the percentage of target cells activating caspase-3 over time. Mean ± SEM of *n* = 2 experiments in triplicates. The same experiment for 2 h, PI was used to track the lethal hit delivery by live microscopy. (C) Representative snapshots showing conjugates triggering PI entry in the target cell. (D) Single conjugates (one T cell and one target cell) were categorized as productive or ineffective depending on PI entry in the target cell. *n* = 26 conjugates per T-cell type. (E) Delay between the first contact with the target cell and PI entry. (F) Contact time with target cells, either for 'productive' or 'ineffective' contacts. Statistical significances were calculated with unpaired *t*-tests. ns *P* > 0.05; \*0.01 < *P* < 0.05; \*\*0.001 < *P* < 0.01; \*\*\*0.0001 < *P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001.

of target cells within a few hours. Distinctly from CTLs, ova-Tr1 cells were able to activate caspase-3 in U937 cells without addition of anti-CD3 antibody. This apoptosis activation further demonstrates that ova-Tr1 cells are endowed with a cytotoxic activity leading to the apoptosis of myeloid target cells. The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells was characterized by a slow onset followed by a gradual increase of apoptotic target cells. As an additional control, we tested the ability of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells to eliminate U937 cells. However, Foxp3<sup>+</sup>

Treg cells did not display any lytic activity in this experimental model system.

To further explore the mode of action of ova-Tr1-cell-mediated elimination of myeloid target cells, we performed live microscopy experiments in the presence of a high concentration of PI to reveal target cell membrane permeabilization as a consequence of a lethal hit delivery (32). These experiments reveal that upon contact with U937 cells, ova-Tr1 cells were able to deliver a lethal hit, confirming their identity as genuine

cytotoxic T cells (Fig. 3C). However, while every CTL forming a conjugate with a U937 cell, in the presence of an anti-CD3 antibody, led to an event of PI burst within 2 h, only one fourth of the ova-Tr1 cells were able to do so (Fig. 3D). The limited proportion of ova-Tr1 cells demonstrating a killing activity within the 2-h observation time frame might be explained by the increased delay with which they eventually killed target cells. Indeed, the time between contact and PI entry was on average 65 min for ova-Tr1 cells as compared to 20 min for CTLs (Fig. 3E). The ova-Tr1 cells that did not kill within the 2-h time frame formed conjugates with U937 cells that were as prolonged as some from killer cells, thereby excluding the failure to recognize target cells as a reason for the lack of cytotoxicity (Fig. 3F). As expected from the previous set of experiments, Foxp3 Treg cells failed to induce a detectable PI burst in the U937 cells, confirming the specificity of ova-Tr1 cells in the killing of myeloid target cells. In conclusion, the gradual onset of U937 cell lysis by ova-Tr1 cells observed at the population level might be explained, at least in part, by a delay between initial contact and lethal hit delivery.

#### *Ova-Tr1 cells sustain their lytic activity toward myeloid cells over days*

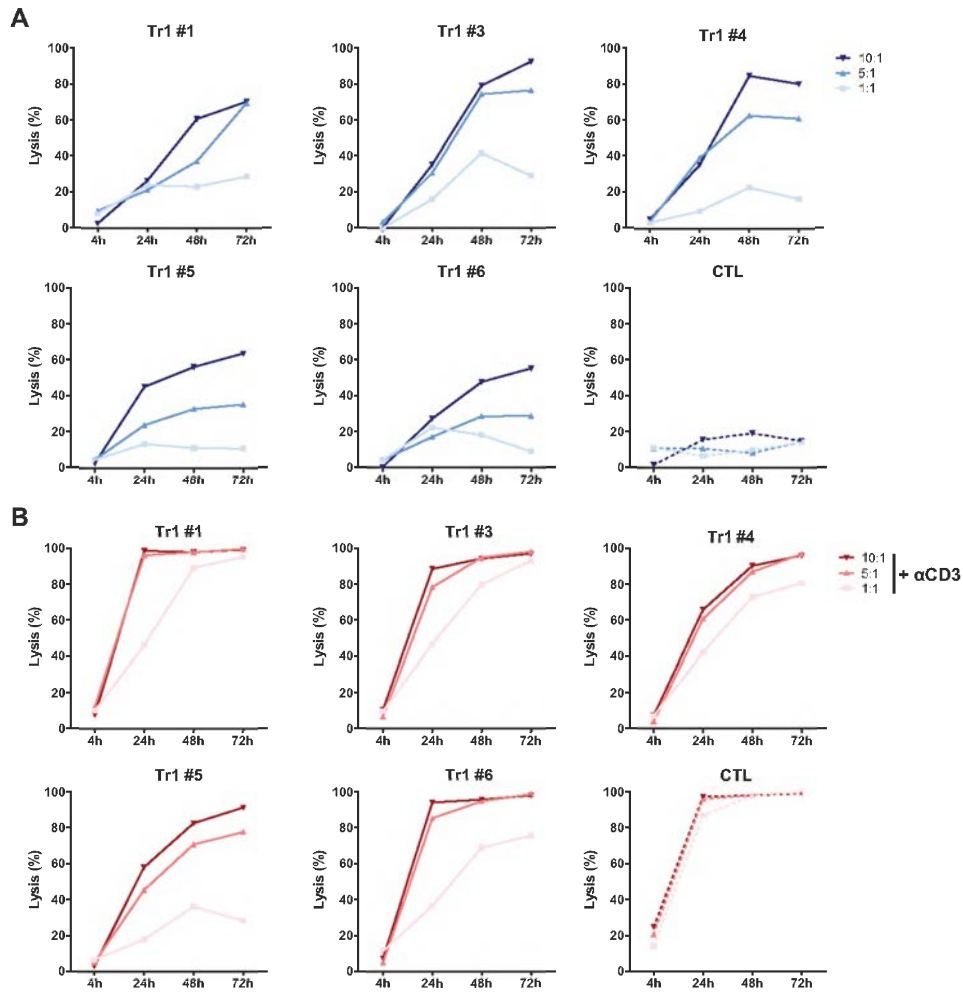
Given the gradual onset of lytic activity in the ova-Tr1 cells, we investigated their ability to control myeloid cell populations over prolonged interaction times. For this purpose, ova-Tr1 cells were co-cultured with U937 cells for 4, 24, 48 and 72 h at the E:T ratios of 1:1, 5:1 and 10:1. Several of the ova-Tr1 clones tested demonstrated a cumulative killing activity over 48–72 h, leading to near elimination of the U937 cell population at the 10:1 ratio in the absence of exogenous TCR stimulation (Fig. 4A). A CTL clone tested in parallel as a control displayed only minor spontaneous killing activity toward the U937 cells. Although ova-Tr1 cells did not require TCR triggering to eliminate U937 cells, we tested whether TCR triggering might potentiate the cytotoxic activity of these cells. Upon addition of anti-CD3 antibodies, the five tested clones displayed increased cytotoxic activity toward the U937 cells (Fig. 4B). Indeed, the exogenous trigger of the TCR in ova-Tr1 cells raised their killing kinetics and increased their overall efficiency at a low E:T ratio. Remarkably, two of the five tested clones displayed comparable killing kinetics and efficiency as the CTL clone tested in parallel. The potentiating effect of the anti-CD3 antibody might be explained by an accelerated onset of the lytic activity, as observed by video microscopy (Supplementary Figure S3A). This was related to a slight increase in the proportion of ova-Tr1 cells that inflicted a PI burst in their opposing target cells (Supplementary Figure S3B) and to a trend toward shortened lethal hit delivery (Supplementary Figure S3C). This analysis highlights the fact that the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells against myeloid cells is sustained over days and can be potentiated upon TCR triggering.

#### *The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells is mediated by granzymes and granulysin*

To further elucidate the mechanism of action of ova-Tr1 cells, we investigated which effector molecules might mediate their

cytotoxic activity. The relatively slow, gradual and sustained activity is suggestive of a lytic molecular pathway relying on 'low triggering' death receptors such as TRAIL or Fas/FasL. To test this hypothesis, we performed cytotoxic assays in the presence or absence of blocking antibodies against TRAIL and FasL (Fig. 5A and B). Neither antibody inhibited the cytotoxic activity of the ova-Tr1 cells, implying that the corresponding molecular pathways are not involved in this process. DNAM-1 has previously been identified as the major trigger of the lytic activity of Tr1 cells (21). However, this receptor appeared not to be involved in the cytotoxic activity of the ova-Tr1 cells since the blocking antibody approach also failed to affect this activity (Fig. 5C), although it was able to reduce the lytic activity of NK-92 cells used as a control (Supplementary Figure S4A).

We have previously reported that the cumulative killing activity of CTLs over a prolonged time is mediated by perforin and granzymes, rather than the Fas/FasL pathway (24). Given the expression of high levels of granzymes within vesicles resembling lytic granules, we tested their contribution to the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells. The serine protease inhibitor 3,4DCI, known to block the activity of granzymes, totally inhibited ova-Tr1-cell-mediated lysis of U937 cells (Fig. 5D), thereby identifying granzymes as major effectors of the cytotoxic activity of these cells. Unlike classical cytotoxic lymphocytes, ova-Tr1 cells express very low levels of perforin, which is required to allow membrane permeabilization and delivery of granzymes in cytotoxic T cells and NK cells. We investigated whether those levels might, however, permit a slow release of granzymes in accordance with the killing kinetics of those cells. When concanamycin A was used to inhibit the maturation of perforin, it failed to affect the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells (Fig. 5E), although it was able to reduce the lytic activity of control CTLs (Supplementary Figure S4B). This experiment indicates that perforin is not involved in the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells. Our phenotypic characterization revealed that ova-Tr1 cells expressed high levels of granulysin, a molecule of activated cytotoxic lymphocytes that mediates killing of bacteria via membrane destabilization properties (30, 33). Since no specific inhibitor of granulysin has been described, we tested its contribution to the cytotoxic activity of ova-Tr1 by inhibiting its expression with siRNA. As assessed by flow cytometry, a substantial inhibition of granulysin expression (up to 70%) was reached 72 h after electroporation of ova-Tr1 cells with specific siRNA (Supplementary Figure S4C). Very clearly, the 24-h lytic activity of ova-Tr1 cells was reduced (>50%) upon electroporation with the siRNA targeting granulysin as compared to the control siRNA (Fig. 5F). We then plotted the level of cytotoxic activity and granulysin expression stemming from two independent experiments in which two ova-Tr1 clones were electroporated, either without siRNA or with control or granulysin siRNA (Supplementary Figure S4D). This analysis shows a positive relationship between granulysin expression in these different cells and their lytic activity, reinforcing the notion that granulysin is a key molecule to control Tr1-cell-mediated cytotoxic activity. Together, our data point to a combined action of granulysin and granzymes as the mechanism by which ova-Tr1 cells kill myeloid target cells.



**Fig. 4.** Sustained lytic activity of ova-Tr1 cells over prolonged time periods. (A) U937 target cells were co-incubated with different ova-Tr1 clones and CTLs at the E:T ratios 1:1, 5:1 and 10:1. Absolute counts of residual live target cells were measured after 4, 24, 48 and 72 h of co-culture. Lysis percentage was obtained based on the number of target cells alone. (B) The same experiments as in A with 10 µg ml<sup>-1</sup> anti-CD3 antibodies added during the co-culture. Representative experiment of two (*n* = 5 ova-Tr1 clones and *n* = 2 ova-Tr1 clones).

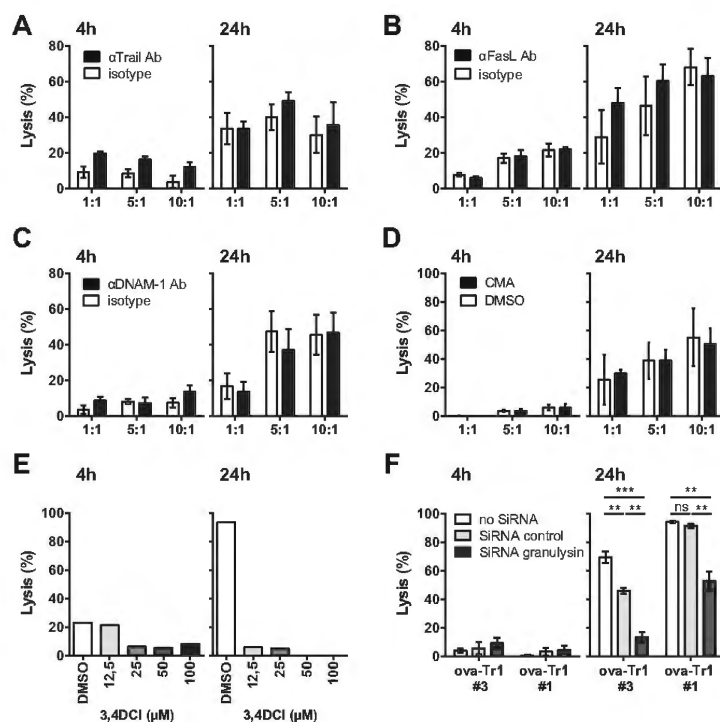
**Discussion**

Our study aimed at exploring the biology of therapeutic ova-Tr1 cells and identified cytotoxicity toward myeloid cells as a clinically relevant activity. The retrospective analysis of the cells infused to CD patients in the phase I/IIa CATS1 clinical study (23) indicated that expression of lytic molecules, rather than markers of suppression, is related to the CDAI change in individual patients. Analysis of lytic molecule

expression revealed that the ova-Tr1 cells administered to the patients expressed a wide array of lytic molecules including the granzymes A, B, H and M as well as granulysin. To our knowledge, we are the first to report the expression of granzymes H, granzyme M and granulysin in a Treg cell population (14–16, 34, 35). Importantly, our analysis shows that the cumulative expression of lytic molecules in the administered ova-Tr1 cells correlated with the reduction of the CDAI score

Downloaded from https://academic.oup.com/intimm/advance-article-abstract/doi/10.1093/intimm/dxy083/5342159 by University of Glasgow user on 21 February 2019





**Fig. 5.** Identification of the molecular pathway for ova-Tr1 cell lytic activity. (A) Cytotoxic assay in the presence of a blocking antibody against TRAIL or isotype control at the indicated E:T ratio. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (B) Cytotoxic assay in the presence of a blocking antibody against FasL or isotype control. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (C) Cytotoxic assay in the presence of a blocking antibody against DNAM-1 or isotype control. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (D) Cytotoxic assay at a 5:1 E:T ratio in the presence of a serine proteases inhibitor (3,4 DCI) or DMSO.  $N = 1$  ova-Tr1 clone. (E) Cytotoxic assay in the presence of concanamycin A or dimethyl sulfoxide (DMSO). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  ova-Tr1 clones. (F) Cytotoxic assay at a 5:1 ratio using electroporated ova-Tr1 cells (no SIRNA, control SIRNA or granulysin-targeting SIRNA pools). This assay was initiated 48 h after electroporation. Mean  $\pm$  SD of a representative experiment out of two, each performed in triplicates.

measured in the treated patients. This finding justified a further exploration of the biology of ova-Tr1 cells, with a focus on their potential cytotoxic activity.

By employing a combination of flow cytometry, confocal microscopy and live cell imaging, we demonstrated that ova-Tr1 cells are genuine cytotoxic lymphocytes. Indeed, these cells were able to efficiently kill cells of the monocytic lineage in a contact-dependent manner. Ova-Tr1 cells were found to establish prolonged contacts with target cells. Upon contact, they destabilized the plasma membrane of the target cells as observed by the entry of PI. Furthermore, target cells were found to undergo apoptosis as shown by the activation of caspase-3. Similarly to other cytotoxic lymphocytes such as CTLs or NK cells, ova-Tr1 cells were loaded with a high content of LAMP-1<sup>+</sup> granules containing lytic molecules. However, our in-depth characterization of the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells revealed that in many aspects they used an alternative lytic pathway as compared with CD8<sup>+</sup> CTLs. Indeed, they appeared to preferentially target cells of the

monocytic lineage, to kill over prolonged time periods independently from TCR triggering and to rely on granulysin, rather than perforin, for the lytic process. Given the described cross-talk between NK cells and monocytes (36), it is tempting to speculate that ova-Tr1 cells might resemble NK cells and utilize an NK cell receptor as a trigger for their cytotoxic activity toward myeloid cells. Our experiments indicate that the receptors NKG2D, NKp46 and NKp30 expressed at the surface of ova-Tr1 cells were not involved (data not shown). We can, however, not exclude that an additional NK cell receptor might mediate or contribute to the ova-Tr1 cell killing of myeloid cells.

Our study demonstrates a preferential lytic activity of therapeutic ova-Tr1 cells toward myeloid cells, especially monocytic cells. This information is in line with the observation that in the CATS1 clinical study, responder CD patients displayed a reduction of circulating pro-inflammatory monocytes after ova-Tr1 infusion. A comparable specificity for target cells of the myeloid lineage has been previously reported for Tr1 cells (21, 37). Such

specificity might be a property of the Tr1 cell subset since classical human Treg cells are able to lyse a broader spectrum of target cells, such as T cells, B cells, monocytes and DCs (16).

The lytic capacity of Tr1 cells was previously described to occur via a mechanism based on the lytic molecules perforin and granzyme B and a requirement of DNAM-1 and CD2 for activation, independently of TCR engagement (21). Despite a similar TCR independence, DNAM-1 did not seem to be involved in the lytic activity of the ova-Tr1 cells studied here. Interestingly, we show that although the TCR was not the trigger for the lytic activity of ova-Tr1 cells, it could potentiate it. The reactivity of the TCR might be explained by the recurrent *in vitro* stimulation applied to the ova-Tr1 cells during their generation that may lead to a tonic state. Accordingly, a high level of phosphorylated ZAP-70 was measured in the expanded ova-Tr1 cells. This feature applied both to the drug product upon thawing and following *in vitro* culture and re-stimulation. We therefore favor a model in which such tonic TCR signals might combine with signals originating from co-receptors to trigger the lytic activity of ova-Tr1 cells.

Whereas high granzyme loads are usually accompanied by perforin expression in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (38), we observed here that the ova-Tr1 lytic activity relied on granzymes but was independent of perforin. Interestingly, these cells were found to express high levels of granulysin, a protein shown to facilitate granzyme diffusion and to exert additional cytotoxic activities (30, 39). The antibody used in our study does not distinguish the two reported granulysin isoforms. However, the fact that the granulysin staining colocalized with LAMP-1 by confocal microscopy (Fig. 1D) suggests that the 9 kDa cytolytic isoform of granulysin was detected. Indeed, it has been reported that the 9 kDa and not the 15 kDa isoform colocalizes with LAMP-1 in NK cells (40). Using siRNA, we provide clear evidence that granulysin is mediating the killing of myeloid cells by the ova-Tr1 cells. To our knowledge, we are the first to report on the activity of granulysin in a Treg cell subset. Interestingly, our data suggest that granulysin might operate as a "spare wheel" for perforin to deliver granzymes within target myeloid cells. Indeed, granulysin is able to perturb membranes and was shown in particular to allow granzyme delivery into intracellular pathogens (30, 33). Alternatively, granulysin might activate target cell apoptosis directly, as shown previously for CTLs and NK cells (39). However, the observation that serine protease inhibition in ova-Tr1 cells led to full inhibition of their lytic activity indicates that granulysin did not promote killing independently from the granzyme molecules.

Ova-Tr1 cells displayed a sustained lytic activity over very prolonged time periods relying on a gradual onset of their cytotoxicity. Indeed, ova-Tr1 cells appeared to kill slowly with an increased delay between contact and lethal hit delivery as compared to CTLs. In addition, ova-Tr1 cells did not all engage at once in killing target cells, at least over the 2-h observation period. Such features are expected to contribute to the sustainment of the lytic activity measured over 3 days of interaction with target cells. The sustained lytic activity of ova-Tr1 cells might be the reflection of an alternative lytic pathway involving granulysin instead of perforin. It is also possible that the latter activity is intrinsic to CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cells, since those cells have been shown to exhibit a delayed

onset of their lytic activity compared to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (41). The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells characterized here might limit exhaustion or activation-induced cell death. This type of activity would be an advantage to sustain activity in the context of a chronic disease.

In summary, we here provide evidence that ova-Tr1 cells, used in refractory CD adoptive cell therapy, eliminate pro-inflammatory myeloid cells as a major mechanism of action. Ova-Tr1 cells mediate the killing of myeloid cells via an alternative lytic pathway, which does not require TCR re-stimulation nor perforin. Ova-Tr1 cells are unique cytotoxic lymphocytes in that they use a combination of granulysin and granzymes to mediate a sustained lytic activity. Moreover, in the context of CD, in which inflammatory myeloid cells contribute to the pathogenesis (42–44), a cytotoxic activity toward these cells is relevant for therapy. Finally, our precise characterization of the cytotoxic activity of ova-Tr1 toward myeloid targets unveils their mechanism of action and provides relevant assays to monitor their activity in the context of clinical trials.

#### Funding

This work was funded by the Cifre convention (2014/0916) between the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), France. The ANRT funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

#### Acknowledgements

We wish to thank the entire Cell Processing Team at TxCell and in particular Nadia Lounnas-Mourey, Fatima Benali and Justine Desnouveau for providing the ova-Tr1 cells for this study. We thank Nabila Jabrane-Ferrat for providing target cell lines. We also wish to thank Fatima-Ezzahra L'Faqih-Olive, Valérie Duplan-Eche, Anne-Laure Isoache and Paul Menut from the CPTP cytometry platform, as well as Sophie Allart, Raïssa Houmadi, Astrid Carivet and Danièle Daviaud from the CPTP microscopy platform. We are grateful to Hans Yssel, Salvatore Valitutti, Sabina Müller, Pauline Gonnord, Liza Filali, Javier Rey-Barroso, Marie-Pierre Puissegur, Arnaud Foussat, Nathalie Clerget and Héléne Asnagli for support, technical advice and discussion. D.G. performed the experiments, analyzed the results and wrote the paper; J.G.-D. performed the phenotypic characterization of ova-Tr1, designed the research and supervised the experiments; L.P. performed the suppression experiments; Y.G. performed the MHC-II blockade experiments; N.B. participated in the CATS1 study, designed the research and supervised the experiments; L.D. designed the research, supervised the experiment analysis and wrote the paper.

**Conflicts of interest statement:** The authors disclose the following: D.G., J.G.-D. and N.B. are or were employed by TxCell. L.D., L.P. and Y.G. disclose no conflicts of interest.

#### References

- Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M. and Schneck, J. 2015. Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med. J.* 6:90004.
- Gregori, S., Passerini, L. and Roncarolo, M. G. 2015. Clinical outlook for type-1 and FOXP3(+) T regulatory cell-based therapy. *Front. Immunol.* 6:593.
- June, C. H. 2007. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.* 117:1466.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C. *et al.* 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 25:243.

- 5 Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M. *et al.* 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17:4550.
- 6 Mulé, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L. and Rosenberg, S. A. 1984. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 225:1487.
- 7 Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J. *et al.* 2009. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T regulatory cells. *Clin. Immunol.* 133:22.
- 8 Marek-Trzonkowska, N., Mysliwiec, M., Dobyszuk, A. *et al.* 2012. Regulatory T cells preserves B-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 35:1817.
- 9 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151.
- 10 Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I. *et al.* 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.* 172:834.
- 11 Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 194:629.
- 12 Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W. *et al.* 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257.
- 13 Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. and Ivars, F. 2005. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240.
- 14 Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174:1783.
- 15 Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. and Ley, T. J. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840.
- 16 Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. and Ley, T. J. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589.
- 17 Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A. *et al.* 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635.
- 18 Gregori, S., Goudy, K. S. and Roncarolo, M. G. 2012. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front. Immunol.* 3:30.
- 19 Groux, H., Garra, A. O., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. 1998. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Transfus. Med. Rev.* 12:230.
- 20 Foussat, A., Cottrez, F., Brun, V., Fournier, N., Breitmayer, J. P. and Groux, H. 2003. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the control of inflammation. *J. Immunol.* 171:5018.
- 21 Magnani, C. F., Alberigo, G., Bacchetta, R. *et al.* 2011. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* 41:1652.
- 22 Brun, V., Bastian, H., Neveu, V. and Foussat, A. 2009. Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* 9:609.
- 23 Desreumaux, P., Foussat, A., Allez, M. *et al.* 2012. Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 143:1207.
- 24 Vasconcelos, Z., Müller, S., Guipouy, D. *et al.* 2015. Individual human cytotoxic T lymphocytes exhibit intracloacal heterogeneity during sustained killing. *Cell Rep.* 11:1474.
- 25 Fernández, L., Valentin, J., Zalacain, M., Leung, W., Patiño-García, A. and Pérez-Martínez, A. 2015. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett.* 368:54.
- 26 Stel, A. J., Ten Cate, B., Jacobs, S. *et al.* 2007. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J. Immunol.* 178:2287.
- 27 Sato, K., Nakaoka, T., Yamashita, N. *et al.* 2005. TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *J. Immunol.* 174:4025.
- 28 Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S. and Roncarolo, M. G. 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur. J. Immunol.* 32:2237.
- 29 Mascianfroni, I. D., Takenaka, M. C., Yeste, A. *et al.* 2015. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ . *Nat. Med.* 21:638.
- 30 Waich, M., Dotiwala, F., Mullik, S. *et al.* 2014. Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* 157:1309.
- 31 Scallon, B., McCarthy, S., Radwonuk, J. *et al.* 2007. Quantitative *in vivo* comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. *Int. Immunopharmacol.* 7:761.
- 32 Lopez, J. A., Jenkins, M. R., Rudd-Schmidt, J. A. *et al.* 2013. Rapid and unidirectional perforin pore delivery at the cytotoxic immune synapse. *J. Immunol.* 191:2328.
- 33 Chun, F. Z., Ling, L. M., Jones, G. J., Gill, M. J., Krensky, A. M., Kubes, P. and Mody, C. H. 2007. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* 109:2049.
- 34 Velaga, S., Ukena, S. N., Dringenberg, U. *et al.* 2015. Granzyme a is required for regulatory T-cell mediated prevention of gastrointestinal graft-versus-host disease. *PLoS One* 10:e0124927.
- 35 Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L. *et al.* 2012. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.* 5:161.
- 36 Michel, T., Hentges, F. and Zimmer, J. 2012. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front. Immunol.* 3:403.
- 37 Locafaro, G., Andolfi, G., Russo, F. *et al.* 2017. IL-10-engineered human CD4<sup>+</sup> Tr1 cells eliminate myeloid leukemia in an HLA class I-dependent mechanism. *Mol. Ther.* 25:2254.
- 38 Takeuchi, A. and Saito, T. 2017. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4<sup>+</sup> T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.* 8:1.
- 39 Saini, R. V., Wilson, C., Finn, M. W., Wang, T., Krensky, A. M. and Clayberger, C. 2011. Granulysin delivered by cytotoxic cells damages endoplasmic reticulum and activates caspase-7 in target cells. *J. Immunol.* 186:3497.
- 40 Clayberger, C., Finn, M. W., Wang, T. *et al.* 2012. 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity. *J. Immunol.* 188:6119.
- 41 Hildemann, S. K., Eberlein, J., Davenport, B., Nguyen, T. T., Victorino, F. and Homann, D. 2013. High efficiency of antiviral CD4<sup>+</sup> killer T cells. *PLoS One* 8:e60420.
- 42 Linton, L., Karlsson, M., Grundström, J. *et al.* 2012. HLA-DR(hi) and CCR9 define a pro-inflammatory monocyte subset in IBD. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 3:e29.
- 43 Griseri, T., McKenzie, B. S., Schiering, C. and Powrie, F. 2012. Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity* 37:1116.
- 44 Siddiqui, K. R., Laffont, S. and Powrie, F. 2010. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32:557.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Kollmar, M. Polyphyly of nuclear lamin genes indicates an early eukaryotic origin of the metazoan-type intermediate filament proteins. *Sci Rep* **5**, (2015).
2. Bf, P. Actin and coordination of metabolic processes. *Biochem Int* **6**, 757–765 (1983).
3. Dustin, P. Structure and Chemistry of Microtubules. in *Microtubules* (ed. Dustin, P.) 19–93 (Springer, 1984). doi:10.1007/978-3-642-69652-7\_5.
4. Perrin, B. J. & Ervasti, J. M. The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 630–634 (2010).
5. Zhao, Z. *et al.* Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific Reports* **4**, 1–13 (2014).
6. Omary, M. B., Coulombe, P. A. & McLean, W. H. I. Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases. *N Engl J Med* **351**, 2087–2100 (2004).
7. Sanghvi-Shah, R. & Weber, G. F. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
8. Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* **27**, 230–236 (1995).
9. Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268**, 16321–16326 (1993).
10. Aaronson, R. P. & Blobel, G. Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1007–1011 (1975).
11. McKeon, F. D., Kirschner, M. W. & Caput, D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**, 463–468 (1986).
12. Wen, Q. & Janmey, P. A. Polymer physics of the cytoskeleton. *Curr Opin Solid State Mater Sci* **15**, 177–182 (2011).
13. Pollard, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
14. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44–49 (1990).

15. Perry, G. W. & Wilson, D. L. On the Identification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulin Subunits. *Journal of Neurochemistry* **38**, 1155–1159 (1982).
16. Goodson, H. V. & Jonasson, E. M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
17. Fuchs, E. & Cleveland, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514–519 (1998).
18. Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U. & Magin, T. M. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int. Rev. Cytol.* **223**, 83–175 (2003).
19. Herrmann, H. *et al.* Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains. *Journal of Molecular Biology* **264**, 933–953 (1996).
20. Pollard, T. D. & Goldman, R. D. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
21. Kelemen, G. H. Intermediate Filaments Supporting Cell Shape and Growth in Bacteria. in *Prokaryotic Cytoskeletons: Filamentous Protein Polymers Active in the Cytoplasm of Bacterial and Archaeal Cells* (eds. Löwe, J. & Amos, L. A.) 161–211 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-53047-5\_6.
22. Voter, W. A. & Erickson, H. P. The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J. Biol. Chem.* **259**, 10430–10438 (1984).
23. Kuchnir Fygenon D, null, Flyvbjerg, null, Sneppen, null, Libchaber, null & Leibler, null. Spontaneous nucleation of microtubules. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **51**, 5058–5063 (1995).
24. Barra, H. S., Rodriguez, J. A., Arce, C. A. & Caputto, R. A Soluble Preparation from Rat Brain That Incorporates into Its Own Proteins [<sup>14</sup>C]arginine by a Ribonuclease-Sensitive System and [<sup>14</sup>C]tyrosine by a Ribonuclease-Insensitive System. *Journal of Neurochemistry* **20**, 97–108 (1973).

25. Song, Y. & Brady, S. T. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in Cell Biology* **25**, 125–136 (2015).
26. Candi, E. *et al.* A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *PNAS* **95**, 2067–2072 (1998).
27. Manning, null. Polymer persistence length characterized as a critical length for instability caused by a fluctuating twist. *Phys Rev A Gen Phys* **34**, 668–670 (1986).
28. Ghavanloo, E. Persistence length of collagen molecules based on nonlocal viscoelastic model. *J Biol Phys* **43**, 525–534 (2017).
29. Charrier, E. E. & Janmey, P. A. Mechanical properties of intermediate filament proteins. *Methods Enzymol* **568**, 35–57 (2016).
30. Brown, M. J., Hallam, J. A., Colucci-Guyon, E. & Shaw, S. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J. Immunol.* **166**, 6640–6646 (2001).
31. Plodinec, M. *et al.* The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system. *J. Struct. Biol.* **174**, 476–484 (2011).
32. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* **120**, 923–934 (1993).
33. Ross, J. L., Ali, M. Y. & Warshaw, D. M. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 41–47 (2008).
34. Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M. & Ross, J. L. Mechanics of microtubules. *J Biomech* **43**, 23–30 (2010).
35. Barlan, K. & Gelfand, V. I. Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).
36. Schafer, D. A., Jennings, P. B. & Cooper, J. A. Rapid and Efficient Purification of Actin from Nonmuscle Sources. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**, 166–171 (1998).

37. Weber, A., Nachmias, V. T., Pennise, C. R., Pring, M. & Safer, D. Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry* **31**, 6179–6185 (1992).
38. Crockford, D., Turjman, N., Allan, C. & Angel, J. Thymosin beta4: structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1194**, 179–189 (2010).
39. Xue, B., Leyrat, C., Grimes, J. M. & Robinson, R. C. Structural basis of thymosin-β4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4596–E4605 (2014).
40. Yeoh, S., Pope, B., Mannherz, H. G. & Weeds, A. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J. Mol. Biol.* **315**, 911–925 (2002).
41. Maciver, S. K., Zot, H. G. & Pollard, T. D. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* **115**, 1611–1620 (1991).
42. Hayden, S. M., Miller, P. S., Brauweiler, A. & Bamburg, J. R. Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. *Biochemistry* **32**, 9994–10004 (1993).
43. Blanchoin, L. & Pollard, T. D. Interaction of Actin Monomers with *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/Cofilin) and Profilin. *J. Biol. Chem.* **273**, 25106–25111 (1998).
44. Kurita, S., Gunji, E., Ohashi, K. & Mizuno, K. Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes to Cells* **12**, 663–676 (2007).
45. Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. & Uemura, T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233–246 (2002).
46. Ohta, Y. *et al.* Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells* **8**, 811–824 (2003).
47. Gohla, A., Birkenfeld, J. & Bokoch, G. M. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* **7**, 21–29 (2005).



48. Paavilainen, V. O., Oksanen, E., Goldman, A. & Lappalainen, P. Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J Cell Biol* **182**, 51–59 (2008).
49. Amberg, D. C., Basart, E. & Botstein, D. Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 28–35 (1995).
50. Voegtli, W. C., Madrona, A. Y. & Wilson, D. K. The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates Cofilin-mediated actin depolymerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 34373–34379 (2003).
51. Mohri, K., Vorobiev, S., Fedorov, A. A., Almo, S. C. & Ono, S. Identification of functional residues on *Caenorhabditis elegans* actin-interacting protein 1 (UNC-78) for disassembly of actin depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 31697–31707 (2004).
52. Iida, K. & Yahara, I. Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **4**, 21–32 (1999).
53. Clark, M. G. *et al.* A genetic dissection of Aip1p's interactions leads to a model for Aip1p-cofilin cooperative activities. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1971–1984 (2006).
54. Okada, K., Ravi, H., Smith, E. M. & Goode, B. L. Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2855–2868 (2006).
55. Okada, K. *et al.* *Xenopus* actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J. Biol. Chem.* **277**, 43011–43016 (2002).
56. Okada, K., Obinata, T. & Abe, H. XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J. Cell. Sci.* **112** ( Pt 10), 1553–1565 (1999).
57. Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G. & Amberg, D. C. Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J. Cell Biol.* **145**, 1251–1264 (1999).
58. Ono, S. Functions of actin-interacting protein 1 (AIP1)/WD repeat protein 1 (WDR1) in actin filament dynamics and cytoskeletal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **506**, 315–322 (2018).

59. Mentel, M. *et al.* WDR1 is a novel EYA3 substrate and its dephosphorylation induces modifications of the cellular actin cytoskeleton. *Scientific Reports* **8**, 1–16 (2018).
60. Li, J. *et al.* Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1–Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nature Cell Biology* **9**, 276–286 (2007).
61. Akhter, A. *et al.* Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity* **37**, 35–47 (2012).
62. Santic, M., Molmeret, M. & Abu Kwaik, Y. Maturation of the Legionella pneumophila-Containing Phagosome into a Phagolysosome within Gamma Interferon-Activated Macrophages. *Infect Immun* **73**, 3166–3171 (2005).
63. Harris, E. S., Li, F. & Higgs, H. N. The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 20076–20087 (2004).
64. Gurel, P. S. *et al.* INF2-mediated severing through actin filament encirclement and disruption. *Curr. Biol.* **24**, 156–164 (2014).
65. Edwards, M. *et al.* Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 677–689 (2014).
66. Littlefield, R., Almenar-Queralt, A. & Fowler, V. M. Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nat. Cell Biol.* **3**, 544–551 (2001).
67. Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. & Pollard, T. D. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* **127**, 107–115 (1994).
68. Goley, E. D. & Welch, M. D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 713–726 (2006).
69. Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6181–6186 (1998).

70. Amann, K. J. & Pollard, T. D. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *PNAS* **98**, 15009–15013 (2001).
71. Veltman, D. M. & Insall, R. H. WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2880–2893 (2010).
72. Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A. & Mitchison, T. J. Interaction of Human Arp2/3 Complex and the *Listeria monocytogenes* ActA Protein in Actin Filament Nucleation. *Science* **281**, 105–108 (1998).
73. Higgs, H. N., Blanchoin, L. & Pollard, T. D. Influence of the C Terminus of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASp) and the Arp2/3 Complex on Actin Polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212–15222 (1999).
74. Goley, E. D., Rodenbusch, S. E., Martin, A. C. & Welch, M. D. Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Mol. Cell* **16**, 269–279 (2004).
75. Burianek, L. E. & Soderling, S. H. Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 258–266 (2013).
76. Derry, J. M., Ochs, H. D. & Francke, U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635–644 (1994).
77. Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H. & Geha, R. S. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14671–14676 (1997).
78. Volkman, B. F., Prehoda, K. E., Scott, J. A., Peterson, F. C. & Lim, W. A. Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell* **111**, 565–576 (2002).
79. Chou, H.-C. *et al.* WIP Regulates the Stability and Localization of WASP to Podosomes in Migrating Dendritic Cells. *Curr Biol* **16**, 2337–2344 (2006).

80. de la Fuente, M. A. *et al.* WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 926–931 (2007).
81. Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A. & Rosen, M. K. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151–158 (2000).
82. Cory, G. O. C., Cramer, R., Blanchoin, L. & Ridley, A. J. Phosphorylation of the WASP-VCA Domain Increases Its Affinity for the Arp2/3 Complex and Enhances Actin Polymerization by WASP. *Molecular Cell* **11**, 1229–1239 (2003).
83. Rohatgi, R., Ho, H. Y. & Kirschner, M. W. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* **150**, 1299–1310 (2000).
84. Padrick, S. B. *et al.* Hierarchical Regulation of WASP/WAVE Proteins. *Mol Cell* **32**, 426–438 (2008).
85. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiological Reviews* **88**, 489–513 (2008).
86. Stovold, C. F., Millard, T. H. & Machesky, L. M. Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol.* **6**, 11 (2005).
87. Chen, B. *et al.* Rac1 GTPase activates the WAVE regulatory complex through two distinct binding sites. *eLife* **6**,.
88. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. & Kirschner, M. W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790–793 (2002).
89. Takenawa, T. & Suetsugu, S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 37–48 (2007).
90. Suetsugu, S. *et al.* Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J. Cell Biol.* **173**, 571–585 (2006).
91. Rotty, J. D., Wu, C. & Bear, J. E. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 7–12 (2013).
92. Chen, Z. *et al.* Structure and Control of the Actin Regulatory WAVE Complex. *Nature* **468**, 533–538 (2010).

93. Lebensohn, A. M. & Kirschner, M. W. Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol. Cell* **36**, 512–524 (2009).
94. Ismail, A. M., Padrick, S. B., Chen, B., Umetani, J. & Rosen, M. K. The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 561–563 (2009).
95. Koronakis, V. *et al.* WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *PNAS* **108**, 14449–14454 (2011).
96. Russo, A. J., Mathiowetz, A. J., Hong, S., Welch, M. D. & Campellone, K. G. Rab1 recruits WHAMM during membrane remodeling but limits actin nucleation. *Mol. Biol. Cell* **27**, 967–978 (2016).
97. Campellone, K. G., Webb, N. J., Znameroski, E. A. & Welch, M. D. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**, 148–161 (2008).
98. Shen, Q.-T. *et al.* Structural insights into WHAMM-mediated cytoskeletal coordination during membrane remodeling. *J. Cell Biol.* **199**, 111–124 (2012).
99. Alekhina, O., Burstein, E. & Billadeau, D. D. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *J Cell Sci* **130**, 2235–2241 (2017).
100. Zech, T. *et al.* The Arp2/3 activator WASH regulates  $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated invasive migration. *J Cell Sci* **124**, 3753–3759 (2011).
101. Gomez, T. S. & Billadeau, D. D. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* **17**, 699–711 (2009).
102. Derivery, E. *et al.* The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* **17**, 712–723 (2009).
103. Hao, Y.-H. *et al.* Regulation of WASH-Dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination. *Cell* **152**, 1051–1064 (2013).
104. Breitsprecher, D. & Goode, B. L. Formins at a glance. *J Cell Sci* **126**, 1–7 (2013).
105. Evangelista, M. *et al.* Bni1p, a Yeast Formin Linking Cdc42p and the Actin Cytoskeleton During Polarized Morphogenesis. *Science* **276**, 118–122 (1997).

106. Block, J. *et al.* FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* **22**, 1005–1012 (2012).
107. Pellegrin, S. & Mellor, H. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* **15**, 129–133 (2005).
108. Bartolini, F. & Gundersen, G. G. Formins and Microtubules. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 164–173 (2010).
109. Michelot, A. *et al.* The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell* **17**, 2296–2313 (2005).
110. Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
111. Matsudaira, P. Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin. Cell Biol.* **5**, 165–174 (1994).
112. Borrego-Diaz, E. *et al.* Crystal structure of the actin-binding domain of alpha-actinin 1: evaluating two competing actin-binding models. *J. Struct. Biol.* **155**, 230–238 (2006).
113. Gould, K. I., Bretscher, A., Esch, F. S. & Hunter, T. cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *The EMBO Journal* **8**, 4133–4142 (1989).
114. Tsukita, S., Hieda, Y. & Tsukita, S. A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J. Cell Biol.* **108**, 2369–2382 (1989).
115. Tsukita, S. & Tsukita, S. Isolation of cell-to-cell adherens junctions from rat liver. *J. Cell Biol.* **108**, 31–41 (1989).
116. Lankes, W. T. & Furthmayr, H. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8297–8301 (1991).
117. Sato, N. *et al.* A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *Journal of Cell Science* **103**, 131–143 (1992).

118. Sauvanet, C., Wayt, J., Pelaseyed, T. & Bretscher, A. Structure, Regulation, and Functional Diversity of Microvilli on the Apical Domain of Epithelial Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 593–621 (2015).
119. Canals, D. *et al.* Differential effects of ceramide and sphingosine 1-phosphate on ERM phosphorylation: probing sphingolipid signaling at the outer plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **285**, 32476–32485 (2010).
120. Lodish, H. *et al.* Myosin: The Actin Motor Protein. *Molecular Cell Biology*. 4th edition (2000).
121. Hartman, M. A. & Spudich, J. A. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **125**, 1627–1632 (2012).
122. Zaidel-Bar, R., Zhenhuan, G. & Luxenburg, C. The contractome – a systems view of actomyosin contractility in non-muscle cells. *J Cell Sci* **128**, 2209–2217 (2015).
123. Inoue, Y., Tsuda, S., Nakagawa, K., Hojo, M. & Adachi, T. Modeling myosin-dependent rearrangement and force generation in an actomyosin network. *Journal of Theoretical Biology* **281**, 65–73 (2011).
124. Varland, S., Vandekerckhove, J. & Drazic, A. Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control. *Trends in Biochemical Sciences* **44**, 502–516 (2019).
125. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* **24**, R453–R462 (2014).
126. Shartava, A. *et al.* A posttranslational modification of beta-actin contributes to the slow dissociation of the spectrin-protein 4.1-actin complex of irreversibly sickled cells. *J. Cell Biol.* **128**, 805–818 (1995).
127. Farah, M. E., Sirotkin, V., Haarer, B., Kakhniashvili, D. & Amberg, D. C. Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. *Cytoskeleton* **68**, 340–354 (2011).
128. Fiaschi, T. *et al.* Redox Regulation of  $\beta$ -Actin during Integrin-mediated Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**, 22983–22991 (2006).
129. García-Ortiz, A. *et al.* eNOS S-nitrosylates  $\beta$ -actin on Cys374 and regulates PKC- $\theta$  at the immune synapse by impairing actin binding to profilin-1. *PLoS Biol.* **15**, e2000653 (2017).

130. Dalle-Donne, I. *et al.* Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radical Biology and Medicine* **32**, 927–937 (2002).
131. Zhan, X. & Desiderio, D. M. The human pituitary nitroproteome: detection of nitrotyrosyl-proteins with two-dimensional Western blotting, and amino acid sequence determination with mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1180–1186 (2004).
132. Xu, Q., Huff, L. P., Fujii, M. & Griendling, K. K. Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system. *Free Radic. Biol. Med.* **109**, 84–107 (2017).
133. Fedorova, M., Kuleva, N. & Hoffmann, R. Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1185–1193 (2009).
134. Hung, R.-J., Pak, C. W. & Terman, J. R. Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical. *Science* **334**, 1710–1713 (2011).
135. Grintsevich, E. E. *et al.* Catastrophic disassembly of actin filaments via Mical-mediated oxidation. *Nat Commun* **8**, 2183 (2017).
136. Castro, J. P., Ott, C., Jung, T., Grune, T. & Almeida, H. Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 916–925 (2012).
137. Lewis, M. R. & Lewis, W. H. Mitochondria in Tissue Culture. *Science* **39**, 330–333 (1914).
138. Moore, A. S. & Holzbaur, E. L. F. Mitochondrial-cytoskeletal interactions: dynamic associations that facilitate network function and remodeling. *Curr Opin Physiol* **3**, 94–100 (2018).
139. Quintero, O. A. *et al.* Human Myo19 is a novel myosin that associates with mitochondria. *Curr Biol* **19**, 2008–2013 (2009).
140. Pathak, D., Sepp, K. J. & Hollenbeck, P. J. Evidence That Myosin Activity Opposes Microtubule-Based Axonal Transport of Mitochondria. *J Neurosci* **30**, 8984–8992 (2010).
141. Ji, W., Hatch, A. L., Merrill, R. A., Strack, S. & Higgs, H. N. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* **4**, e11553 (2015).



142. Li, S. *et al.* Transient assembly of F-actin on the outer mitochondrial membrane contributes to mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* **208**, 109–123 (2015).
143. Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. N. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* **339**, 464–467 (2013).
144. Manor, U. *et al.* A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* **4**, (2015).
145. Simonetti, B. & Cullen, P. J. Actin-dependent endosomal receptor recycling. *Current Opinion in Cell Biology* **56**, 22–33 (2019).
146. Hao, Y.-H. *et al.* USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Molecular Cell* **59**, 956–969 (2015).
147. Robertson, D., Paterson, H. F., Adamson, P., Hall, A. & Monaghan, P. Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 471–480 (1995).
148. Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P. & Neefjes, J. RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dial. *Journal of Cell Science* **118**, 2661–2670 (2005).
149. Murphy, C. *et al.* Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* **384**, 427–432 (1996).
150. Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J. & Voeltz, G. K. ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell* **159**, 1027–1041 (2014).
151. Dong, R. *et al.* Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell* **166**, 408–423 (2016).
152. Gurel, P. S., Hatch, A. L. & Higgs, H. N. Connecting the Cytoskeleton to the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Current Biology* **24**, R660–R672 (2014).
153. Lynch, C. D. *et al.* Filamin depletion blocks endoplasmic spreading and destabilizes force-bearing adhesions. *MBoC* **22**, 1263–1273 (2011).

154. Tabb, J. S., Molyneaux, B. J., Cohen, D. L., Kuznetsov, S. A. & Langford, G. M. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of Cell Science* **111**, 3221–3234 (1998).
155. Egea, G., Lázaro-Diéguéz, F. & Vilella, M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–178 (2006).
156. Dippold, H. C. *et al.* GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell* **139**, 337–351 (2009).
157. Copeland, S. J., Thurston, S. F. & Copeland, J. W. Actin- and microtubule-dependent regulation of Golgi morphology by FHDC1. *Mol Biol Cell* **27**, 260–276 (2016).
158. Vertii, A., Hehnly, H. & Doxsey, S. The Centrosome, a Multitalented Renaissance Organelle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
159. Elric, J. & Etienne-Manneville, S. Centrosome positioning in polarized cells: Common themes and variations. *Experimental Cell Research* **328**, 240–248 (2014).
160. Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. Communication, the centrosome and the immunological synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, 20130463 (2014).
161. Chang, J. T. *et al.* Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* **315**, 1687–1691 (2007).
162. Gomez, T. S. *et al.* Formins Regulate the Actin-Related Protein 2/3 Complex-Independent Polarization of the Centrosome to the Immunological Synapse. *Immunity* **26**, 177–190 (2007).
163. Obino, D. *et al.* Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. *Nature Communications* **7**, 10969 (2016).
164. Inoue, D. *et al.* Actin filaments regulate microtubule growth at the centrosome. *EMBO J.* **38**, (2019).
165. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–263 (2014).

166. Gerace, L. & Blobel, G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277–287 (1980).
167. Tang, C. W. *et al.* The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells. *J. Cell. Sci.* **121**, 1014–1024 (2008).
168. Lammerding, J. *et al.* Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J. Biol. Chem.* **281**, 25768–25780 (2006).
169. Schäpe, J., Prauße, S., Radmacher, M. & Stick, R. Influence of Lamin A on the Mechanical Properties of Amphibian Oocyte Nuclei Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **96**, 4319–4325 (2009).
170. Ohnishi, T., Kawamura, H. & Yamamoto, T. [EXTRACTION OF A PROTEIN RESEMBLING ACTIN FROM THE CELL NUCLEUS OF THE CALF THYMUS]. *J. Biochem.* **54**, 298–300 (1963).
171. Ishikawa, H., Bischoff, R. & Holtzer, H. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J. Cell Biol.* **43**, 312–328 (1969).
172. Jockusch, B. M., Brown, D. F. & Rusch, H. P. Synthesis and some properties of an actin-like nuclear protein in the slime mold *Physarum polycephalum*. *J. Bacteriol.* **108**, 705–714 (1971).
173. Lane, N. J. INTRANUCLEAR FIBRILLAR BODIES IN ACTINOMYCIN D-TREATED OOCYTES. *J Cell Biol* **40**, 286–291 (1969).
174. Holaska, J. M. & Wilson, K. L. An emerin ‘proteome’: purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechano-sensing and nuclear architecture. *Biochemistry* **46**, 8897–8908 (2007).
175. Iida, K., Iida, H. & Yahara, I. Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **165**, 207–215 (1986).
176. Pendleton, A., Pope, B., Weeds, A. & Koffer, A. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 14394–14400 (2003).

177. Kelsch, D. J. & Tootle, T. L. Nuclear actin: from discovery to function. *Anat Rec (Hoboken)* **301**, 1999–2013 (2018).
178. Parisi, N. *et al.* Initiation of DNA replication requires actin dynamics and formin activity. *EMBO J.* **36**, 3212–3231 (2017).
179. Fuchsova, B., Serebryanny, L. A. & de Lanerolle, P. Nuclear actin and myosins in adenovirus infection. *Exp. Cell Res.* **338**, 170–182 (2015).
180. Dopie, J., Skarp, K.-P., Rajakylä, E. K., Tanhuanpää, K. & Vartiainen, M. K. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E544–552 (2012).
181. Machado, C. & Andrew, D. J. D-Titin. *J Cell Biol* **151**, 639–652 (2000).
182. Machado, C., Sunkel, C. E. & Andrew, D. J. Human Autoantibodies Reveal Titin as a Chromosomal Protein. *J Cell Biol* **141**, 321–333 (1998).
183. Zastrow, M. S., Flaherty, D. B., Benian, G. M. & Wilson, K. L. Nuclear Titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science* **119**, 239–249 (2006).
184. Liem, R. K. H. Cytoskeletal Integrators: The Spectrin Superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
185. Ungewickell, E., Bennett, P. M., Calvert, R., Ohanian, V. & Gratzer, W. B. In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte. *Nature* **280**, 811–814 (1979).
186. Yang, C. H., Lambie, E. J. & Snyder, M. NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J. Cell Biol.* **116**, 1303–1317 (1992).
187. Harborth, J., Wang, J., Gueth-Hallonet, C., Weber, K. & Osborn, M. Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J* **18**, 1689–1700 (1999).
188. Gueth-Hallonet, C., Wang, J., Harborth, J., Weber, K. & Osborn, M. Induction of a Regular Nuclear Lattice by Overexpression of NuMA. *Experimental Cell Research* **243**, 434–452 (1998).
189. Mehta, I. S., Elcock, L. S., Amira, M., Kill, I. R. & Bridger, J. M. Nuclear motors and nuclear structures containing A-type lamins and emerin: is there a functional link? *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1384–1388 (2008).

190. Philimonenko, V. V. *et al.* Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1165–1172 (2004).
191. Vreugde, S. *et al.* Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol. Cell* **23**, 749–755 (2006).
192. Stroud, M. J. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex proteins in cardiomyopathy. *Biophys Rev* **10**, 1033–1051 (2018).
193. Stroud, M. J., Banerjee, I., Lowe, J. & Chen, J. LINC complex proteins in cardiac structure, function, and disease. *Circ Res* **114**, 538–548 (2014).
194. Méjat, A. & Misteli, T. LINC complexes in health and disease. *Nucleus* **1**, 40–52 (2010).
195. Dahl, K. N. & Kalinowski, A. Nucleoskeleton mechanics at a glance. *J Cell Sci* **124**, 675–678 (2011).
196. Starr, D. A. KASH and SUN proteins. *Curr Biol* **21**, R414–R415 (2011).
197. Mislow, J. M. K. *et al.* Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* **525**, 135–140 (2002).
198. Haque, F. *et al.* Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J. Biol. Chem.* **285**, 3487–3498 (2010).
199. Liu, L., Luo, Q., Sun, J. & Song, G. Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. *Experimental Cell Research* **348**, 56–65 (2016).
200. Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Millat, G. & Méjat, A. Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J Rare Dis* **12**, (2017).
201. Rocha-Perugini, V. & González-Granado, J. M. Nuclear envelope lamin-A as a coordinator of T cell activation. *Nucleus* **5**, 396–401 (2014).
202. Olins, A. L. *et al.* The LINC-less granulocyte nucleus. *Eur J Cell Biol* **88**, 203–214 (2009).
203. Chhabra, E. S. & Higgs, H. N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1110–1121 (2007).
204. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp. Cell Res.* **59**, 393–398 (1970).

205. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. II. 'RRuffling'. *Exp. Cell Res.* **60**, 437–444 (1970).
206. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture: III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Experimental Cell Research* **62**, 389–398 (1970).
207. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture: IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research* **67**, 359–367 (1971).
208. Weiner, O. D. *et al.* A PtdInsP 3 - and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nature Cell Biology* **4**, 509–513 (2002).
209. Srinivasan, S. *et al.* Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **160**, 375–385 (2003).
210. Weiner, O. D. *et al.* Hem-1 Complexes Are Essential for Rac Activation, Actin Polymerization, and Myosin Regulation during Neutrophil Chemotaxis. *PLOS Biology* **4**, e38 (2006).
211. Yang, H. W., Collins, S. R. & Meyer, T. Locally excitable Cdc42 signals steer cells during chemotaxis. *Nat. Cell Biol.* **18**, 191–201 (2016).
212. Van Keymeulen, A. *et al.* To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J Cell Biol* **174**, 437–445 (2006).
213. Lacalle, R. A. *et al.* Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *J Cell Biol* **179**, 1539–1553 (2007).
214. Lokuta, M. A. *et al.* Type I $\gamma$  PIP Kinase Is a Novel Uropod Component that Regulates Rear Retraction during Neutrophil Chemotaxis. *MBoC* **18**, 5069–5080 (2007).
215. Wong, K., Van Keymeulen, A. & Bourne, H. R. PDZRhoGEF and myosin II localize RhoA activity to the back of polarizing neutrophil-like cells. *J Cell Biol* **179**, 1141–1148 (2007).
216. Morin, N. A. *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *J. Exp. Med.* **205**, 195–205 (2008).

217. Pestonjamas, K. N. *et al.* Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood* **108**, 2814–2820 (2006).
218. Kumar, S. *et al.* Cdc42 regulates neutrophil migration via crosstalk between WASp, CD11b, and microtubules. *Blood* **120**, 3563–3574 (2012).
219. Szczur, K., Zheng, Y. & Filippi, M.-D. The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. *Blood* **114**, 4527–4537 (2009).
220. Ludwig, A. *et al.* Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *J. Cell Biol.* **191**, 771–781 (2010).
221. Martinelli, S. *et al.* Ezrin/Radixin/Moesin Proteins and Flotillins Cooperate to Promote Uropod Formation in T Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
222. Liu, X. *et al.* Moesin and myosin phosphatase confine neutrophil orientation in a chemotactic gradient. *J Exp Med* **212**, 267–280 (2015).
223. Abercrombie, M. & Ambrose, E. J. Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Experimental Cell Research* **15**, 332–345 (1958).
224. Buccione, R., Orth, J. D. & McNiven, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 647–657 (2004).
225. Valdivia, A., Goicoechea, S. M., Awadia, S., Zinn, A. & Garcia-Mata, R. Regulation of circular dorsal ruffles, macropinocytosis, and cell migration by RhoG and its exchange factor, Trio. *Mol Biol Cell* **28**, 1768–1781 (2017).
226. Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. & McNiven, M. A. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1085–1096 (2003).
227. Kurokawa, K. & Matsuda, M. Localized RhoA Activation as a Requirement for the Induction of Membrane Ruffling. *Mol Biol Cell* **16**, 4294–4303 (2005).
228. Vidali, L., Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y. & Kwiatkowski, D. J. Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2377–2390 (2006).

229. Isogai, T. *et al.* Initiation of lamellipodia and ruffles involves cooperation between mDia1 and the Arp2/3 complex. *J Cell Sci* **128**, 3796–3810 (2015).
230. Sakata, D. *et al.* Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J. Exp. Med.* **204**, 2031–2038 (2007).
231. Bornschlöggl, T. How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia. *Cytoskeleton* **70**, 590–603 (2013).
232. Heckman, C. A. & Plummer, H. K. Filopodia as sensors. *Cell. Signal.* **25**, 2298–2311 (2013).
233. Yang, C. & Svitkina, T. Filopodia initiation. *Cell Adh Migr* **5**, 402–408 (2011).
234. Vignjevic, D. *et al.* Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol* **174**, 863–875 (2006).
235. Machesky, L. M. & Li, A. Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol* **3**, 263–270 (2010).
236. Zanet, J. *et al.* Fascin promotes filopodia formation independent of its role in actin bundling. *J Cell Biol* **197**, 477–486 (2012).
237. Heiman, M. G. & Shaham, S. Twigs into branches: how a filopodium becomes a dendrite. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 86–91 (2010).
238. Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. & Jones, G. E. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142–1149 (2001).
239. Calle, Y., Chou, H.-C., Thrasher, A. J. & Jones, G. E. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J. Pathol.* **204**, 460–469 (2004).
240. Burns, S. *et al.* Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil. Cytoskeleton* **57**, 118–132 (2004).
241. Bañón-Rodríguez, I. *et al.* The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 213–223 (2011).
242. Konietzny, A., Bär, J. & Mikhaylova, M. Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, (2017).



243. Ma, L., Greenwood, J. A. & Schachner, M. CRP1, a Protein Localized in Filopodia of Growth Cones, Is Involved in Dendritic Growth. *J Neurosci* **31**, 16781–16791 (2011).
244. Arikath, J. Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis. *Front Cell Neurosci* **6**, (2012).
245. Bosch, M. *et al.* Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* **82**, 444–459 (2014).
246. Spence, E. F., Kanak, D. J., Carlson, B. R. & Soderling, S. H. The Arp2/3 Complex Is Essential for Distinct Stages of Spine Synapse Maturation, Including Synapse Unsilencing. *J. Neurosci.* **36**, 9696–9709 (2016).
247. Yamakita, Y. *et al.* Fascin1 Promotes Cell Migration of Mature Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **186**, 2850–2859 (2011).
248. Kim, M. K. & Kim, J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv.* **9**, 11230–11238 (2019).
249. Verdijk, P. *et al.* Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *European Journal of Immunology* **34**, 156–164 (2004).
250. Bruehl, R. E., Springer, T. A. & Bainton, D. F. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy.: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2017) doi:10.1177/44.8.8756756.
251. von Andrian, U. H., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Erlandsen, S. L. & Butcher, E. C. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* **82**, 989–999 (1995).
252. Abitorabi, M. A., Pachynski, R. K., Ferrando, R. E., Tidswell, M. & Erle, D. J. Presentation of integrins on leukocyte microvilli: a role for the extracellular domain in determining membrane localization. *J. Cell Biol.* **139**, 563–571 (1997).
253. Majstoravich, S. *et al.* Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood* **104**, 1396–1403 (2004).

254. Pavalko, F. M. *et al.* The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J. Cell Biol.* **129**, 1155–1164 (1995).
255. Berlin, C. *et al.* alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**, 413–422 (1995).
256. Marzesco, A.-M. *et al.* Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Lett.* **583**, 897–902 (2009).
257. Marzesco, A.-M. *et al.* Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell. Sci.* **118**, 2849–2858 (2005).
258. Kim, H.-R. & Jun, C.-D. T Cell Microvilli: Sensors or Senders? *Front. Immunol.* **10**, (2019).
259. BRENCHLEY, J. M. *et al.* Expansion of activated human naïve T-cells precedes effector function. *Clin Exp Immunol* **130**, 431–440 (2002).
260. Heng, Y.-W. & Koh, C.-G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 1622–1633 (2010).
261. Green, R. A., Paluch, E. & Oegema, K. Cytokinesis in Animal Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**, 29–58 (2012).
262. Cheffings, T. H., Burroughs, N. J. & Balasubramanian, M. K. Actomyosin Ring Formation and Tension Generation in Eukaryotic Cytokinesis. *Curr. Biol.* **26**, R719–R737 (2016).
263. Chen, A., Arora, P. D., McCulloch, C. A. & Wilde, A. Cytokinesis requires localized  $\beta$ -actin filament production by an actin isoform specific nucleator. *Nature Communications* **8**, 1530 (2017).
264. Hercyk, B. S., Onwubiko, U. N. & Das, M. E. Coordinating septum formation and the actomyosin ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology* **112**, 1645–1657 (2019).
265. Knoblich, J. A. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* **132**, 583–597 (2008).

266. Thauinat, O. & Batista, F. D. Daughter B cells are not created equal: Asymmetric segregation of antigen during B cell division. *Cell Cycle* **11**, 2219–2220 (2012).
267. Farina, F. *et al.* Local actin nucleation tunes centrosomal microtubule nucleation during passage through mitosis. *The EMBO Journal* **38**, e99843 (2019).
268. Hughes, C. E. & Nibbs, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* **285**, 2944–2971 (2018).
269. Legler, D. F. & Thelen, M. New insights in chemokine signaling. *F1000Res* **7**, (2018).
270. Thelen, M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat. Immunol.* **2**, 129–134 (2001).
271. Scarselli, M., Annibale, P. & Radenovic, A. Cell Type-specific  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Clusters Identified Using Photoactivated Localization Microscopy Are Not Lipid Raft Related, but Depend on Actin Cytoskeleton Integrity. *J. Biol. Chem.* **287**, 16768–16780 (2012).
272. Kusumi, A. *et al.* Paradigm Shift of the Plasma Membrane Concept from the Two-Dimensional Continuum Fluid to the Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **34**, 351–378 (2005).
273. Martínez-Muñoz, L. *et al.* Separating Actin-Dependent Chemokine Receptor Nanoclustering from Dimerization Indicates a Role for Clustering in CXCR4 Signaling and Function. *Molecular Cell* **70**, 106-119.e10 (2018).
274. Wang, X., Hossain, M., Bogoslawski, A., Kubes, P. & Irimia, D. Chemotaxing neutrophils enter alternate branches at capillary bifurcations. *Nature Communications* **11**, 2385 (2020).
275. Prentice-Mott, H. V. *et al.* Directional memory arises from long-lived cytoskeletal asymmetries in polarized chemotactic cells. *PNAS* **113**, 1267–1272 (2016).
276. Malet-Engra, G. *et al.* Collective cell motility promotes chemotactic prowess and resistance to chemorepulsion. *Curr. Biol.* **25**, 242–250 (2015).
277. Rey-Barroso, J. *et al.* Switching between individual and collective motility in B lymphocytes is controlled by cell-matrix adhesion and inter-cellular interactions. *Scientific Reports* **8**, 5800 (2018).

278. Schoppmeyer, R. & van Buul, J. D. The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. *Current Opinion in Physiology* **19**, 1–9 (2021).
279. Barreiro, O. *et al.* Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J. Cell Biol.* **183**, 527–542 (2008).
280. van Wetering, S. *et al.* Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **115**, 1837–1846 (2002).
281. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal* **20**, 1126–1167 (2014).
282. Alon, R. & Buul, J. D. van. Leukocyte Breaching of Endothelial Barriers: The Actin Link. *Trends in Immunology* **38**, 606–615 (2017).
283. Usatyuk, P. V., Parinandi, N. L. & Natarajan, V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *J. Biol. Chem.* **281**, 35554–35566 (2006).
284. Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 690–701 (2008).
285. Proebstl, D. *et al.* Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* **209**, 1219–1234 (2012).
286. Izdebska, M., Zielińska, W., Hałas-Wiśniewska, M. & Grzanka, A. Involvement of Actin in Autophagy and Autophagy-Dependent Multidrug Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
287. Singh, S. S. *et al.* Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* **37**, 1142–1158 (2018).
288. Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D. L., Lenk, S. E. & Dunn, W. A. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J. Cell. Physiol.* **152**, 458–466 (1992).

289. Aguilera, M. O., Berón, W. & Colombo, M. I. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* **8**, 1590–1603 (2012).
290. Mi, N. *et al.* CapZ regulates autophagosomal membrane shaping by promoting actin assembly inside the isolation membrane. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1112–1123 (2015).
291. Rottner, K., Hänisch, J. & Campellone, K. G. WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends Cell Biol.* **20**, 650–661 (2010).
292. Coutts, A. S. & La Thangue, N. B. Actin nucleation by WH2 domains at the autophagosome. *Nat Commun* **6**, 7888 (2015).
293. Hu, X. & Mullins, R. D. LC3 and STRAP regulate actin filament assembly by JMY during autophagosome formation. *J. Cell Biol.* **218**, 251–266 (2019).
294. Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M. & La Thangue, N. B. A TPR motif cofactor contributes to p300 activity in the p53 response. *Mol. Cell* **8**, 71–84 (2001).
295. Giardini, P. A., Fletcher, D. A. & Theriot, J. A. Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *PNAS* **100**, 6493–6498 (2003).
296. Mooseker, M. S. & Tilney, L. G. Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **67**, 725–743 (1975).
297. Kast, D. J., Zajac, A. L., Holzbaur, E. L. F., Ostap, E. M. & Dominguez, R. WHAMM Directs the Arp2/3 Complex to the ER for Autophagosome Biogenesis through an Actin Comet Tail Mechanism. *Curr. Biol.* **25**, 1791–1797 (2015).
298. Kast, D. J. & Dominguez, R. WHAMM links actin assembly via the Arp2/3 complex to autophagy. *Autophagy* **11**, 1702–1704 (2015).
299. Xia, P. *et al.* WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *The EMBO Journal* **32**, 2685–2696 (2013).
300. Xia, P. *et al.* RNF2 is recruited by WASH to ubiquitinate AMBRA1 leading to downregulation of autophagy. *Cell Res.* **24**, 943–958 (2014).

301. Zavodszky, E. *et al.* Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun* **5**, (2014).
302. Singh, M. K. *et al.* Localization of RalB signaling at endomembrane compartments and its modulation by autophagy. *Scientific Reports* **9**, 8910 (2019).
303. Bodemann, B. O. *et al.* RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* **144**, 253–267 (2011).
304. Simicek, M. *et al.* The deubiquitylase USP33 discriminates between RALB functions in autophagy and innate immune response. *Nat Cell Biol* **15**, 1220–1230 (2013).
305. Gurkar, A. U. *et al.* Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature Communications* **4**, 2189 (2013).
306. Kuballa, P., Nolte, W. M., Castoreno, A. B. & Xavier, R. J. Autophagy and the Immune System. *Annual Review of Immunology* **30**, 611–646 (2012).
307. Liu, E., Van Grol, J. & Subauste, C. S. ATG5 BUT NOT ATG7 IN DENDRITIC CELLS ENHANCES IL-2 AND IFN- $\gamma$  PRODUCTION BY TOXOPLASMA GONDII-REACTIVE CD4+ T CELLS. *Microbes Infect* **17**, 275–284 (2015).
308. Lee, H. K. *et al.* In Vivo Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Immunity* **32**, 227–239 (2010).
309. Ikeda, Y. *et al.* Rac1 switching at the right time and location is essential for Fc $\gamma$  receptor-mediated phagosome formation. *J Cell Sci* **130**, 2530–2540 (2017).
310. Barger, S. R. *et al.* Membrane-cytoskeletal crosstalk mediated by myosin-I regulates adhesion turnover during phagocytosis. *Nature Communications* **10**, 1249 (2019).
311. Brandt, D. T. *et al.* Dial1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J. Cell Biol.* **178**, 193–200 (2007).
312. Evans, E., Leung, A. & Zhelev, D. Synchrony of cell spreading and contraction force as phagocytes engulf large pathogens. *J. Cell Biol.* **122**, 1295–1300 (1993).

313. Masters, T. A., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y. & Gauthier, N. C. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 11875–11880 (2013).
314. Araki, N., Hatae, T., Furukawa, A. & Swanson, J. A. Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fc $\gamma$ -receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *J. Cell. Sci.* **116**, 247–257 (2003).
315. Scott, C. C. *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol* **169**, 139–149 (2005).
316. Griffin, F. M., Griffin, J. A., Leider, J. E. & Silverstein, S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* **142**, 1263–1282 (1975).
317. Jaumouillé, V. & Waterman, C. M. Physical Constraints and Forces Involved in Phagocytosis. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
318. Allen, L. A. & Aderem, A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**, 627–637 (1996).
319. Rougerie, P., Miskolci, V. & Cox, D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunological Reviews* **256**, 222–239 (2013).
320. Azzouz, D. & Palaniyar, N. ApoNETosis: discovery of a novel form of neutrophil death with concomitant apoptosis and NETosis. *Cell Death & Disease* **9**, 1–3 (2018).
321. Schulz, M. *et al.* Monocyte-derived extracellular trap (MET) formation induces aggregation and affects motility of human spermatozoa in vitro. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **65**, 357–366 (2019).
322. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).

323. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. & Sendo, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology* **59**, 229–240 (1996).
324. Remijsen, Q. *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* **21**, 290–304 (2011).
325. Itakura, A. & McCarty, O. J. T. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C348–C354 (2013).
326. Neubert, E. *et al.* Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun* **9**, 3767 (2018).
327. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **191**, 677–691 (2010).
328. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A. & Papayannopoulos, V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Reports* **8**, 883–896 (2014).
329. Sharma, D. & Kanneganti, T.-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology* **213**, 617–629 (2016).
330. Franklin, B. S. *et al.* ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* **15**, 727–737 (2014).
331. Burger, D., Fickentscher, C., de Moerloose, P. & Brandt, K. J. F-actin dampens NLRP3 inflammasome activity via Flightless-I and LRRFIP2. *Scientific Reports* **6**, 29834 (2016).
332. Jin, J. *et al.* LRRFIP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages by promoting Flightless-I-mediated caspase-1 inhibition. *Nat Commun* **4**, 2075 (2013).
333. Lee, P. P. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates autophagy and inflammasome activity in innate immune cells. *Nature Communications* **8**, 1576 (2017).



334. Kim, M. L. *et al.* Aberrant actin depolymerization triggers the pyrin inflammasome and autoinflammatory disease that is dependent on IL-18, not IL-1 $\beta$ . *J. Exp. Med.* **212**, 927–938 (2015).
335. Kim, J. Y. *et al.* Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochemical Pharmacology* **79**, 431–443 (2010).
336. Waite, A. L. *et al.* Pyrin and ASC Co-Localize to Cellular Sites that Are Rich in Polymerizing Actin: *Experimental Biology and Medicine* (2009) doi:10.3181/0806-RM-184.
337. Misawa, T. *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **14**, 454–460 (2013).
338. Zhang, Y. *et al.* A Membrane Potential- and Calpain-Dependent Reversal of Caspase-1 Inhibition Regulates Canonical NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep* **24**, 2356–2369.e5 (2018).
339. Krueger, A., Willenzon, S., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E. & Förster, R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* **115**, 1906–1912 (2010).
340. Radtke, F. *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–558 (1999).
341. Littman, D. R. How Thymocytes Achieve Their Fate. *The Journal of Immunology* **196**, 1983–1984 (2016).
342. Brugnera, E. *et al.* Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* **13**, 59–71 (2000).
343. Cotta-de-Almeida, V. *et al.* Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *PNAS* **104**, 15424–15429 (2007).
344. Seeland, I. *et al.* The actin remodeling protein cofilin is crucial for thymic  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T-cell development. *PLOS Biology* **16**, e2005380 (2018).
345. Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C. & von Boehmer, H. Crucial role of the pre-T-cell receptor  $\alpha$  gene in development of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* **375**, 795–798 (1995).

346. Machesky, L. M. *et al.* Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J* **328**, 105–112 (1997).
347. Föger, N., Rangell, L., Danilenko, D. M. & Chan, A. C. Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science* **313**, 839–842 (2006).
348. Shioh, L. R. *et al.* The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nat. Immunol.* **9**, 1307–1315 (2008).
349. Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. *Annual Review of Immunology* **30**, 69–94 (2012).
350. Manna, S. *et al.* Histone H3 Lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation. *Nat Commun* **6**, (2015).
351. Fu, C. *et al.* JMJD3 regulates CD4<sup>+</sup> T cell trafficking by targeting actin cytoskeleton regulatory gene *Pdlim4*. *J Clin Invest* **129**, 4745–4757 (2019).
352. Vallenius, T. *et al.* The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of  $\alpha$ -actinin with F-actin. *Experimental Cell Research* **293**, 117–128 (2004).
353. Guryanova, O. A., Drazba, J. A., Frolova, E. I. & Chumakov, P. M. Actin cytoskeleton remodeling by the alternatively spliced isoform of PDLIM4/RIL protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 26849–26859 (2011).
354. Paul, M. S. & Ohashi, P. S. The Roles of CD8<sup>+</sup> T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends in Cell Biology* **0**, (2020).
355. Taylor, M. D. *et al.* Nuclear Role of WASp in the Pathogenesis of Dysregulated TH1 Immunity in Human Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science Translational Medicine* **2**, 37ra44-37ra44 (2010).
356. Sarkar, K., Sadhukhan, S., Han, S.-S. & Vyas, Y. M. SUMOylation-disrupting WAS mutation converts WASp from a transcriptional activator to a repressor of NF- $\kappa$ B response genes in T cells. *Blood* **126**, 1670–1682 (2015).

357. Trifari, S. *et al.* Defective Th1 Cytokine Gene Transcription in CD4+ and CD8+ T Cells from Wiskott-Aldrich Syndrome Patients. *The Journal of Immunology* **177**, 7451–7461 (2006).
358. Wambre, E., James, E. A. & Kwok, W. W. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Current Opinion in Immunology* **24**, 700–706 (2012).
359. Britton, G. J. *et al.* PKC $\theta$  links proximal T cell and Notch signaling through localized regulation of the actin cytoskeleton. *eLife* **6**, e20003 (2017).
360. Tsooulidis, N. *et al.* T cell receptor–triggered nuclear actin network formation drives CD4+ T cell effector functions. *Science Immunology* **4**, (2019).
361. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **126**, 898–907 (2010).
362. Oleinika, K., Mauri, C. & Salama, A. D. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* **15**, 11–26 (2019).
363. Westerberg, L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* **105**, 1144–1152 (2005).
364. Keppler, S. J. *et al.* Wiskott-Aldrich Syndrome Interacting Protein Deficiency Uncovers the Role of the Co-receptor CD19 as a Generic Hub for PI3 Kinase Signaling in B Cells. *Immunity* **43**, 660–673 (2015).
365. Antón, I. M. *et al.* WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* **16**, 193–204 (2002).
366. Randall, K. L. *et al.* Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat. Immunol.* **10**, 1283–1291 (2009).
367. Park, H. *et al.* A point mutation in the murine Hem1 gene reveals an essential role for Hematopoietic Protein 1 in lymphopoiesis and innate immunity. *J Exp Med* **205**, 2899–2913 (2008).
368. Pore, D. *et al.* Ezrin Tunes the Magnitude of Humoral Immunity. *The Journal of Immunology* **191**, 4048–4058 (2013).

369. Freeman, S. A. *et al.* Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *J. Immunol.* **187**, 5887–5900 (2011).
370. Saci, A. & Carpenter, C. L. RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling. *Mol. Cell* **17**, 205–214 (2005).
371. Natkanski, E. *et al.* B cells use mechanical energy to discriminate antigen affinities. *Science* **340**, 1587–1590 (2013).
372. Batista, F. D. & Neuberger, M. S. B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J* **19**, 513–520 (2000).
373. Spillane, K. M. & Tolar, P. B cell antigen extraction is regulated by physical properties of antigen-presenting cells. *J Cell Biol* **216**, 217–230 (2017).
374. Yuseff, M.-I. *et al.* Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. *Immunity* **35**, 361–374 (2011).
375. Pierobon, P. & Lennon-Duménil, A.-M. To use or not to use the force: How B lymphocytes extract surface-tethered antigens. *J Cell Biol* **216**, 17–19 (2017).
376. Grakoui, A. *et al.* The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* **285**, 221–227 (1999).
377. Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
378. Allenspach, E. J. *et al.* ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* **15**, 739–750 (2001).
379. Freiberg, B. A. *et al.* Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nature Immunology* **3**, 911–917 (2002).
380. Dustin, M. L., Chakraborty, A. K. & Shaw, A. S. Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002311 (2010).

381. Bretscher, P. & Cohn, M. A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science* **169**, 1042–1049 (1970).
382. Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. Cd28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annual Review of Immunology* **14**, 233–258 (1996).
383. Kabouridis, P. S., Magee, A. I. & Ley, S. C. S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* **16**, 4983–4998 (1997).
384. Zhang, W., Triple, R. P. & Samelson, L. E. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**, 239–246 (1998).
385. Bi, K. *et al.* Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 556–563 (2001).
386. Zumerle, S., Molon, B. & Viola, A. Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation. *Front Immunol* **8**, (2017).
387. Yokosuka, T. & Saito, T. The Immunological Synapse, TCR Microclusters, and T Cell Activation. in *Immunological Synapse* (eds. Saito, T. & Batista, F. D.) 81–107 (Springer, 2010). doi:10.1007/978-3-642-03858-7\_5.
388. Roy, N. H. & Burkhardt, J. K. The Actin Cytoskeleton: A Mechanical Intermediate for Signal Integration at the Immunological Synapse. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, (2018).
389. Haller, P. D. von, Donohoe, S., Goodlett, D. R., Aebersold, R. & Watts, J. D. Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *PROTEOMICS* **1**, 1010–1021 (2001).
390. Dupré, L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* **17**, 157–166 (2002).
391. Yi, J., Wu, X. S., Crites, T. & Hammer, J. A. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *MBoC* **23**, 834–852 (2012).

392. Murugesan, S. *et al.* Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *J. Cell Biol.* **215**, 383–399 (2016).
393. Rossoth, B. *et al.* The TCR is randomly distributed on the plasma membrane of resting antigen-experienced T cells. *Nat Immunol* **19**, 821–827 (2018).
394. Hammer, J. A. & Burkhardt, J. K. Controversy and Consensus Regarding Myosin II Function at the Immunological Synapse. *Curr Opin Immunol* **25**, 300–306 (2013).
395. Hashimoto-Tane, A. *et al.* Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity* **34**, 919–931 (2011).
396. Babich, A. *et al.* F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLC $\gamma$ 1 signaling during T cell activation. *J Cell Biol* **197**, 775–787 (2012).
397. Dustin, M. L. & Cooper, J. A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunology* **1**, 23–29 (2000).
398. Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A. & Unanue, E. R. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *PNAS* **94**, 3909–3913 (1997).
399. Simonson, W. T. N., Franco, S. J. & Huttenlocher, A. Talin1 Regulates TCR-Mediated LFA-1 Function. *The Journal of Immunology* **177**, 7707–7714 (2006).
400. Houmadi, R. *et al.* The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Contributes to the Assembly of the LFA-1 Nanocluster Belt at the Lytic Synapse. *Cell Rep* **22**, 979–991 (2018).
401. Comrie, W. A., Babich, A. & Burkhardt, J. K. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* **208**, 475–491 (2015).
402. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751–761 (2001).
403. Ritter, A. T. *et al.* Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* **42**, 864–876 (2015).
404. Krzewski, K., Chen, X. & Strominger, J. L. WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2568–2573 (2008).

405. Orange, J. S. *et al.* Wiskott–Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11351–11356 (2002).
406. Rak, G. D., Mace, E. M., Banerjee, P. P., Svitkina, T. & Orange, J. S. Natural Killer Cell Lytic Granule Secretion Occurs through a Pervasive Actin Network at the Immune Synapse. *PLOS Biology* **9**, e1001151 (2011).
407. Iizuka, Y. *et al.* UNC-45A Is a Nonmuscle Myosin IIA Chaperone Required for NK Cell Cytotoxicity via Control of Lytic Granule Secretion. *J.I.* **195**, 4760–4770 (2015).
408. Bousfiha, A. *et al.* The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* **38**, 129–143 (2018).
409. Picard, C. *et al.* International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J. Clin. Immunol.* **38**, 96–128 (2018).
410. Samarghitean, C., Ortutay, C. & Vihinen, M. Systematic Classification of Primary Immunodeficiencies Based on Clinical, Pathological, and Laboratory Parameters. *The Journal of Immunology* **183**, 7569–7575 (2009).
411. Adams, N., Hoehndorf, R., Gkoutos, G. V., Hansen, G. & Hennig, C. PIDO: the primary immunodeficiency disease ontology. *Bioinformatics* **27**, 3193–3199 (2011).
412. Rezaei, N. *et al.* Introduction on Primary Immunodeficiency Diseases. in *Primary Immunodeficiency Diseases: Definition, Diagnosis, and Management* (eds. Rezaei, N., Aghamohammadi, A. & Notarangelo, L. D.) 1–81 (Springer, 2017). doi:10.1007/978-3-662-52909-6\_1.
413. Arkwright, P. D. & Gennery, A. R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1238**, 7–14 (2011).
414. Leechawengwongs, E. & Shearer, W. T. Lymphoma complicating primary immunodeficiency syndromes. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 305–312 (2012).

415. Buckley, R. H. *et al.* Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **340**, 508–516 (1999).
416. Rae, W. *et al.* Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clinical Genetics* **93**, 647–655 (2018).
417. Heimall, J. R. *et al.* Use of Genetic Testing for Primary Immunodeficiency Patients. *J Clin Immunol* **38**, 320–329 (2018).
418. Arts, P. *et al.* Exome sequencing in routine diagnostics: a generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies. *Genome Medicine* **11**, 38 (2019).
419. Latham, S. L. *et al.* Variants in exons 5 and 6 of ACTB cause syndromic thrombocytopenia. *Nature Communications* **9**, 4250 (2018).
420. Takenouchi, T., Kosaki, R., Niizuma, T., Hata, K. & Kosaki, K. Macrothrombocytopenia and developmental delay with a de novo CDC42 mutation: Yet another locus for thrombocytopenia and developmental delay. *Am. J. Med. Genet. A* **167A**, 2822–2825 (2015).
421. Newell-Litwa, K. A., Horwitz, R. & Lamers, M. L. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech* **8**, 1495–1515 (2015).
422. Seri, M. *et al.* MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* **82**, 203–215 (2003).
423. Fernandez-Prado, R., Carriazo-Julio, S. M., Torra, R., Ortiz, A. & Perez-Gomez, M. V. MYH9-related disease: it does exist, may be more frequent than you think and requires specific therapy. *Clin Kidney J* **12**, 488–493 (2019).
424. Bouafia, A. *et al.* Loss of ARHGEF1 causes a human primary antibody deficiency. *J Clin Invest* **129**, 1047–1060 (2019).
425. Record, J. *et al.* Immunodeficiency and severe susceptibility to bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1. *Blood* **126**, 1527–1535 (2015).
426. Kuhns, D. B. *et al.* Cytoskeletal abnormalities and neutrophil dysfunction in WDR1 deficiency. *Blood* **128**, 2135–2143 (2016).



427. Pfajfer, L. *et al.* Mutations affecting the actin regulator WD repeat-containing protein 1 lead to aberrant lymphoid immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1589-1604.e11 (2018).
428. Lanzi, G. *et al.* A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med* **209**, 29–34 (2012).
429. Pfajfer, L. *et al.* WIP deficiency severely affects human lymphocyte architecture during migration and synapse assembly. *Blood* **130**, 1949–1953 (2017).
430. Somech, R. *et al.* Disruption of Thrombocyte and T Lymphocyte Development by a Mutation in ARPC1B. *The Journal of Immunology* **199**, 4036–4045 (2017).
431. Kahr, W. H. A. *et al.* Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nature Communications* **8**, 14816 (2017).
432. Nunoi, H. *et al.* A heterozygous mutation of  $\beta$ -actin associated with neutrophil dysfunction and recurrent infection. *PNAS* **96**, 8693–8698 (1999).
433. Brigida, I. *et al.* T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood* **132**, 2362–2374 (2018).
434. Cook, S. A. *et al.* HEM1 deficiency disrupts mTORC2 and F-actin control in inherited immunodysregulatory disease. *Science* **369**, 202–207 (2020).
435. Randzavola, L. O. *et al.* Loss of ARPC1B impairs cytotoxic T lymphocyte maintenance and cytolytic activity. *J. Clin. Invest.* **129**, 5600–5614 (2019).
436. Salzer, E. *et al.* The cytoskeletal regulator HEM1 governs B cell development and prevents autoimmunity. *Science Immunology* **5**, (2020).
437. Lagresle-Peyrou, C. *et al.* X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 1681-1689.e8 (2016).
438. Chen, E. J. H., Shaffer, M. H., Williamson, E. K., Huang, Y. & Burkhardt, J. K. Ezrin and Moesin Are Required for Efficient T Cell Adhesion and Homing to Lymphoid Organs. *PLOS ONE* **8**, e52368 (2013).

439. Smith, E. J. *et al.* Clinical, Molecular, and Genetic Characteristics of PAPA Syndrome: A Review. *Curr Genomics* **11**, 519–527 (2010).
440. Wise, C. A. *et al.* Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 961–969 (2002).
441. Dedeoglu, F. & Kim, S. 14 - Autoinflammatory Disorders. in *Pediatric Allergy: Principles and Practice (Third Edition)* (eds. Leung, D. Y. M., Szeftler, S. J., Bonilla, F. A., Akdis, C. A. & Sampson, H. A.) 133-142.e3 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-323-29875-9.00014-8.
442. Wu, Y., Spencer, S. D. & Lasky, L. A. Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 5765–5770 (1998).
443. Li, J. *et al.* A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J* **17**, 7320–7336 (1998).
444. Cong, F. *et al.* Cytoskeletal Protein PSTPIP1 Directs the PEST-Type Protein Tyrosine Phosphatase to the c-Abl Kinase to Mediate Abl Dephosphorylation. *Molecular Cell* **6**, 1413–1423 (2000).
445. Dowbenko, D., Spencer, S., Quan, C. & Lasky, L. A. Identification of a novel polyproline recognition site in the cytoskeletal associated protein, proline serine threonine phosphatase interacting protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 989–996 (1998).
446. Badour, K. *et al.* The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Acts Downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 Adaptors to Promote Formation of the Immunological Synapse. *Immunity* **18**, 141–154 (2003).
447. Yang, H. & Reinherz, E. L. CD2BP1 Modulates CD2-Dependent T Cell Activation via Linkage to Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)-PEST. *The Journal of Immunology* **176**, 5898–5907 (2006).
448. Starnes, T. W. *et al.* The F-BAR protein PSTPIP1 controls extracellular matrix degradation and filopodia formation in macrophages. *Blood* **123**, 2703–2714 (2014).

449. Janssen, W. J. M. *et al.* Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1 (PSTPIP1) controls immune synapse stability in human T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1947–1955 (2018).
450. Standing, A. S. I. *et al.* Autoinflammatory periodic fever, immunodeficiency, and thrombocytopenia (PFIT) caused by mutation in actin-regulatory gene WDR1. *J. Exp. Med.* **214**, 59–71 (2017).
451. Kueh, H. Y., Charras, G. T., Mitchison, T. J. & Briehner, W. M. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* **182**, 341–353 (2008).
452. Moshous, D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**, 1594-1603.e9 (2013).
453. Mace, E. M. & Orange, J. S. Lytic immune synapse function requires filamentous actin deconstruction by Coronin 1A. *PNAS* **111**, 6708–6713 (2014).
454. Stray-Pedersen, A. *et al.* Compound Heterozygous CORO1A Mutations in Siblings with a Mucocutaneous-Immunodeficiency Syndrome of Epidermodysplasia Verruciformis-HPV, Molluscum Contagiosum and Granulomatous Tuberculoid Leprosy. *J Clin Immunol* **34**, 871–890 (2014).
455. Yee, C. S. *et al.* Recurrent viral infections associated with a homozygous CORO1A mutation that disrupts oligomerization and cytoskeletal association. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 879-888.e2 (2016).
456. Punwani, D. *et al.* Coronin-1A: Immune Deficiency in Humans and Mice. *J Clin Immunol* **35**, 100–107 (2015).
457. Schober, T. *et al.* A human immunodeficiency syndrome caused by mutations in CARMIL2. *Nature Communications* **8**, 14209 (2017).
458. Salzer, E. *et al.* RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. *Nat. Immunol.* **17**, 1352–1360 (2016).

459. Ambruso, D. R. *et al.* Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *PNAS* **97**, 4654–4659 (2000).
460. Rosenzweig, S. D. & Holland, S. M. 11 - Defects of Innate Immunity. in *Pediatric Allergy: Principles and Practice (Third Edition)* (eds. Leung, D. Y. M., Szeffler, S. J., Bonilla, F. A., Akdis, C. A. & Sampson, H. A.) 101-111.e3 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-323-29875-9.00011-2.
461. Dupré, L., Boztug, K. & Pfajfer, L. Actin Dynamics at the T Cell Synapse as Revealed by Immune-Related Actinopathies. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
462. Benhamron, S., Pattanayak, S. P., Berger, M. & Tirosh, B. mTOR Activation Promotes Plasma Cell Differentiation and Bypasses XBP-1 for Immunoglobulin Secretion. *Mol Cell Biol* **35**, 153–166 (2015).
463. Shamriz, O. *et al.* Exogenous interleukin-2 can rescue in-vitro T cell activation and proliferation in patients with a novel capping protein regulator and myosin 1 linker 2 mutation. *Clinical & Experimental Immunology* **200**, 215–227 (2020).
464. Duguet, F. *et al.* Proteomic Analysis of Regulatory T Cells Reveals the Importance of Themis1 in the Control of Their Suppressive Function. *Mol Cell Proteomics* **16**, 1416–1432 (2017).
465. Liang, Y. *et al.* The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nature Immunology* **14**, 858–866 (2013).
466. Chae, H.-D., Siefiring, J. E., Hildeman, D. A., Gu, Y. & Williams, D. A. RhoH Regulates Subcellular Localization of ZAP-70 and Lck in T Cell Receptor Signaling. *PLOS ONE* **5**, e13970 (2010).
467. Wang, H., Zeng, X., Fan, Z. & Lim, B. RhoH modulates pre-TCR and TCR signalling by regulating LCK. *Cellular Signalling* **23**, 249–258 (2011).
468. Troeger, A. & Williams, D. A. Hematopoietic-specific Rho GTPases Rac2 and RhoH and human blood disorders. *Experimental Cell Research* **319**, 2375–2383 (2013).

469. Oda, H., Tamehiro, N., Patrick, M. S., Hayakawa, K. & Suzuki, H. Differential requirement for RhoH in development of TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  IELs and other types of T cells. *Immunology Letters* **151**, 1–9 (2013).
470. Crequer, A. *et al.* Human RHOH deficiency causes T cell defects and susceptibility to EV-HPV infections. *J Clin Invest* **122**, 3239–3247 (2012).
471. Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A. & Kolls, J. K. The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs and Skin. *Annu Rev Pathol* **8**, 477–512 (2013).
472. Tamehiro, N. *et al.* Ras homolog gene family H (RhoH) deficiency induces psoriasis-like chronic dermatitis by promoting TH17 cell polarization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 1878–1891 (2019).
473. Kurkchubasche, A. G., Panepinto, J. A., Tracy, T. F., Thurman, G. W. & Ambruso, D. R. Clinical features of a human Rac2 mutation: a complex neutrophil dysfunction disease. *J. Pediatr.* **139**, 141–147 (2001).
474. Accetta, D. *et al.* Human phagocyte defect caused by a Rac2 mutation detected by means of neonatal screening for T-cell lymphopenia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 535-538.e1–2 (2011).
475. Gu, Y. & Williams, D. A. RAC2 GTPase deficiency and myeloid cell dysfunction in human and mouse. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **24**, 791–794 (2002).
476. Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T. & Bokoch, G. M. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* **254**, 1512–1515 (1991).
477. Walmsley, M. J. *et al.* Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* **302**, 459–462 (2003).
478. Meller, N., Merlot, S. & Guda, C. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *Journal of Cell Science* **118**, 4937–4946 (2005).
479. Kearney, C. J., Randall, K. L. & Oliaro, J. DOCK8 regulates signal transduction events to control immunity. *Cellular & Molecular Immunology* **14**, 406–411 (2017).

480. Keles, S. *et al.* DOCK8 Regulates STAT3 Activation and Promotes Th17 Cell Differentiation. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 1384-1394.e2 (2016).
481. Fukui, Y. *et al.* Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* **412**, 826–831 (2001).
482. Sanui, T. *et al.* DOCK2 regulates Rac activation and cytoskeletal reorganization through interaction with ELMO1. *Blood* **102**, 2948–2950 (2003).
483. Dobbs, K. *et al.* Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *New England Journal of Medicine* **372**, 2409–2422 (2015).
484. Mao, H. *et al.* RASGRP1 mutation in autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **142**, 595-604.e16 (2018).
485. Jun, J. E., Rubio, I. & Roose, J. P. Regulation of Ras Exchange Factors and Cellular Localization of Ras Activation by Lipid Messengers in T Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
486. Mentlik, A. N., Sanborn, K. B., Holzbaur, E. L. & Orange, J. S. Rapid Lytic Granule Convergence to the MTOC in Natural Killer Cells Is Dependent on Dynein But Not Cytolytic Commitment. *Mol Biol Cell* **21**, 2241–2256 (2010).
487. Su, H. C. & Orange, J. S. The Growing Spectrum of Human Diseases Caused by Inherited CDC42 Mutations. *J Clin Immunol* **40**, 551–553 (2020).
488. Takenouchi, T., Okamoto, N., Ida, S., Uehara, T. & Kosaki, K. Further evidence of a mutation in CDC42 as a cause of a recognizable syndromic form of thrombocytopenia. *American Journal of Medical Genetics Part A* **170**, 852–855 (2016).
489. Motokawa, M. *et al.* A hot-spot mutation in CDC42 (p.Tyr64Cys) and novel phenotypes in the third patient with Takenouchi-Kosaki syndrome. *Journal of Human Genetics* **63**, 387–390 (2018).
490. Martinelli, S. *et al.* Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics* **102**, 309–320 (2018).
491. He, T., Huang, Y., Ling, J. & Yang, J. A New Patient with NOCARH Syndrome Due to CDC42 Defect. *J Clin Immunol* **40**, 571–575 (2020).

492. Gernez, Y. *et al.* Severe autoinflammation in 4 patients with C-terminal variants in cell division control protein 42 homolog (CDC42) successfully treated with IL-1 $\beta$  inhibition. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **144**, 1122-1125.e6 (2019).
493. Bucciol, G. *et al.* Systemic Inflammation and Myelofibrosis in a Patient with Takenouchi-Kosaki Syndrome due to CDC42 Tyr64Cys Mutation. *J Clin Immunol* **40**, 567–570 (2020).
494. Lam, M. T. *et al.* A novel disorder involving dyshematopoiesis, inflammation, and HLH due to aberrant CDC42 function. *J. Exp. Med.* (2019) doi:10.1084/jem.20190147.
495. Kalita, K., Kuzniewska, B. & Kaczmarek, L. MKLs: co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1444–1447 (2012).
496. Small, E. M. The Actin–MRTF–SRF Gene Regulatory Axis and Myofibroblast Differentiation. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **5**, 794–804 (2012).
497. Olson, E. N. & Nordheim, A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 353–365 (2010).
498. Cheng, E. *et al.* Role for MKL1 in megakaryocytic maturation. *Blood* **113**, 2826–2834 (2009).
499. Smith, E. C. *et al.* MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood* **120**, 2317–2329 (2012).
500. Kustermans, G., Benna, J. E., Piette, J. & Legrand-Poels, S. Perturbation of actin dynamics induces NF- $\kappa$ B activation in myelomonocytic cells through an NADPH oxidase-dependent pathway. *Biochem J* **387**, 531–540 (2005).
501. Abdollahpour, H. *et al.* The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood* **119**, 3450–3457 (2012).
502. Sherkat, R. *et al.* EBV lymphoproliferative-associated disease and primary cardiac T-cell lymphoma in a STK4 deficient patient: A case report. *Medicine* **96**, e8852 (2017).
503. Dang, T. S. *et al.* Defective Leukocyte Adhesion and Chemotaxis Contributes to Combined Immunodeficiency in Humans with Autosomal Recessive MST1 Deficiency. *J Clin Immunol* **36**, 117–122 (2016).

504. Halacli, S. O. *et al.* STK4 (MST1) deficiency in two siblings with autoimmune cytopenias: A novel mutation. *Clinical Immunology* **161**, 316–323 (2015).
505. Crequer, A. *et al.* Inherited MST1 Deficiency Underlies Susceptibility to EV-HPV Infections. *PLOS ONE* **7**, e44010 (2012).
506. Nehme, N. T. *et al.* MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood* **119**, 3458–3468 (2012).
507. Schipp, C. *et al.* EBV Negative Lymphoma and Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Phenotype Extend the Clinical Spectrum of Primary Immunodeficiency Caused by STK4 Deficiency. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
508. Volpi, S. *et al.* A combined immunodeficiency with severe infections, inflammation, and allergy caused by ARPC1B deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 2296–2299 (2019).
509. Kuijpers, T. W. *et al.* Combined immunodeficiency with severe inflammation and allergy caused by ARPC1B deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **140**, 273-277.e10 (2017).
510. Shoham, N. G. *et al.* Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13501–13506 (2003).
511. Ting-Beall, H. P., Lee, A. S. & Hochmuth, R. M. Effect of cytochalasin D on the mechanical properties and morphology of passive human neutrophils. *Ann Biomed Eng* **23**, 666–671 (1995).
512. Camilli, G. *et al.* Impaired phagocytosis directs human monocyte activation in response to fungal derived  $\beta$ -glucan particles. *European Journal of Immunology* **48**, 757–770 (2018).
513. Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H. & Shi, F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death & Disease* **10**, 1–11 (2019).
514. He, Y., Hara, H. & Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 1012–1021 (2016).
515. Pétrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**, 1583–1589 (2007).



516. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K<sup>+</sup> efflux is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
517. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
518. Oviedo-Orta, E. & Howard Evans, W. Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta* **1662**, 102–112 (2004).
519. Lu, Y. *et al.* Effect of gap junctions on RAW264.7 macrophages infected with H37Rv. *Medicine (Baltimore)* **97**, (2018).
520. Eugeni, E. A., Brañes, M. C., Berman, J. W. & Sáez, J. C. TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J. Immunol.* **170**, 1320–1328 (2003).
521. Maes, M. *et al.* A novel therapeutic antibody screening method using bacterial high-content imaging reveals functional antibody binding phenotypes of Escherichia coli ST131. *Scientific Reports* **10**, 12414 (2020).
522. German, Y. *et al.* Morphological profiling of human T and NK lymphocytes identifies actin-mediated control of the immunological synapse. *bioRxiv* 2020.01.17.910091 (2020)  
doi:10.1101/2020.01.17.910091.
523. Fried, S., Matalon, O., Noy, E. & Barda-Saad, M. WIP: more than a WASp-interacting protein. *Journal of Leukocyte Biology* **96**, 713–727 (2014).
524. Savoy, D. N., Billadeau, D. D. & Leibson, P. J. Cutting Edge: WIP, a Binding Partner for Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, Cooperates with Vav in the Regulation of T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **164**, 2866–2870 (2000).
525. Cianferoni, A., Ramesh, N., Gallego, M. & Geha, R. S. Wiskott-Aldrich protein (WASP) is important for NFAT and AP1 activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, S255 (2004).
526. Hermann-Kleiter, N. & Baier, G. NFAT pulls the strings during CD4<sup>+</sup> T helper cell effector functions. *Blood* **115**, 2989–2997 (2010).

527. Hirayama, A., Adachi, R., Otani, S., Kasahara, T. & Suzuki, K. Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 720–728 (2007).
528. Bird, L. Stop–Go signals for T cells. *Nature Reviews Immunology* **6**, 708–709 (2006).
529. Semmrich, M. *et al.* Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J. Exp. Med.* **201**, 1987–1998 (2005).
530. Balkow, S. *et al.* LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood* **116**, 1885–1894 (2010).
531. Eich, C. *et al.* Proteome Based Construction of the Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1) Interactome in Human Dendritic Cells. *PLOS ONE* **11**, e0149637 (2016).
532. Lafouresse, F. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4+ T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* **137**, 183–196 (2012).
533. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Daszkiewicz, W., Schleicher, M. & Müller-Taubenberger, A. Actin-Interacting Protein 1 Contributes to Intranuclear Rod Assembly in *Dictyostelium discoideum*. *Scientific Reports* **7**, 40310 (2017).
534. Sepulveda, F. E. & de Saint Basile, G. Hemophagocytic syndrome: primary forms and predisposing conditions. *Current Opinion in Immunology* **49**, 20–26 (2017).
535. Faitelson, Y. & Grunebaum, E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and primary immune deficiency disorders. *Clin. Immunol.* **155**, 118–125 (2014).
536. Caution, K. *et al.* Caspase-11 and caspase-1 differentially modulate actin polymerization via RhoA and Slingshot proteins to promote bacterial clearance. *Scientific Reports* **5**, 1–13 (2015).
537. Li, X. *et al.* Activation of Nlrp3 Inflammasomes Enhances Macrophage Lipid-Deposition and Migration: Implication of a Novel Role of Inflammasome in Atherogenesis. *PLoS One* **9**, (2014).
538. Yu, S. *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome promotes the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* **43**, 1113–1124 (2020).

539. Cui, K., Ardell, C. L., Podolnikova, N. P. & Yakubenko, V. P. Distinct Migratory Properties of M1, M2, and Resident Macrophages Are Regulated by  $\alpha$ D $\beta$ 2 and  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin-Mediated Adhesion. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
540. Thome, S., Begandt, D., Pick, R., Salvermoser, M. & Walzog, B. Intracellular  $\beta$ 2 integrin (CD11/CD18) interacting partners in neutrophil trafficking. *Eur. J. Clin. Invest.* **48 Suppl 2**, e12966 (2018).
541. Fagerholm, S. C., Guenther, C., Llorca Asens, M., Savinko, T. & Uotila, L. M. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. *Front Immunol* **10**, (2019).
542. Morrison, V. L. *et al.* Loss of beta2-integrin-mediated cytoskeletal linkage reprogrammes dendritic cells to a mature migratory phenotype. *Nature Communications* **5**, 5359 (2014).
543. Wang, B. *et al.* Macrophage  $\beta$ 2-Integrins Regulate IL-22 by ILC3s and Protect from Lethal *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Cell Reports* **26**, 1614-1626.e5 (2019).
544. Schmid-Burgk, J. L. *et al.* Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2911–2917 (2015).
545. Kuijpers, T. W. *et al.* Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest* **100**, 1725–1733 (1997).
546. Alon, R. & Etzioni, A. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol.* **24**, 561–566 (2003).
547. Etzioni, A. *et al.* Recurrent Severe Infections Caused by a Novel Leukocyte Adhesion Deficiency. *New England Journal of Medicine* **327**, 1789–1792 (1992).
548. Franklin, B. S., Latz, E. & Schmidt, F. I. The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunol. Rev.* **281**, 74–87 (2018).

## RÉSUMÉ

Le cytosquelette d'actine est, avec les microtubules et les filaments intermédiaires, un composant essentiel des cellules eucaryotes. Son dynamisme, sa structure et les différents régulateurs qui le contrôlent permettent de soutenir différentes fonctions cellulaires. L'importance de cette structure est d'ailleurs révélée par l'existence d'immunodéficiences primaires, maladies génétiques rares, causées par des mutations touchant les régulateurs du cytosquelette d'actine. À ce jour, 20 déficiences en protéines régulatrices ont été découvertes et étudiées, nous permettant ainsi de mieux comprendre les rôles spécifiques de chaque régulateur dans le contrôle des fonctions immunitaires. Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier le rôle de plusieurs régulateurs du cytosquelette d'actine dans les fonctions cellulaires immunitaires telle que WIP, WDR1, ou encore ARPC1B. J'ai en effet démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> provenant de patient WIP déficient avaient un défaut de cytotoxicité et de migration due à une organisation et polarisation de l'actine anormale. J'ai ensuite pu contribuer à une étude collaborative sur 3 patients déficients en la protéine ARPC1B, où nous avons pu décrire un défaut de la formation de la synapse immunologique. Après avoir décrit le rôle des régulateurs de polymérisation de l'actine, j'ai eu l'opportunité d'étudier la protéine WDR1, protéine impliquée dans la dépolymérisation des microfilaments. L'étude du compartiment lymphoïde de 6 patients porteurs de mutations dans le gène WDR1 a permis de démontrer que WDR1 avait un impact dans le développement des lymphocytes B ainsi que leur différenciation mais avait un impact moindre sur le compartiment lymphocytaire T.

En conclusion, mes travaux de thèse ont eu pour but de comprendre plus précisément le rôle des régulateurs d'actine dans les fonctions immunitaires. Mieux comprendre ces mécanismes de régulation permettra un meilleur diagnostic des patients immunodéficients et de trouver éventuellement de nouvelles cibles de traitement pour les maladies auto inflammatoires.

## ABSTRACT

Together with microtubules and intermediate filaments, the actin cytoskeleton is an essential structural component of cells. Its dynamism, its structure and the different regulators sustain multiple cellular functions. The crucial role of the actin cytoskeleton in the functioning of the immune system is best pointed out by the severity of primary immunodeficiencies (PID), genetic diseases, caused by mutations in genes encoding actin cytoskeleton regulators. To date, 20 deficiencies in these proteins as well as upstream regulators have recently been discovered and studied, allowing to better understand the roles of individual actin regulators in controlling the immune cell functions. During my PhD, I had the opportunity to study the roles of several actin regulators in immune cell functions such as WIP, WDR1 and ARPC1B. I described that WIP deficient T lymphocytes fail to form a complete immunological synapse and they display a migration capacity defect towards chemokines, due to an abnormal polarization and actin remodeling. I then contributed to a collaborative study on ARPC1B deficiency and observed that T lymphocytes from patients showed an abnormal immunological synapse formation. After studying the role of actin polymerization promoting factors, I investigated the role of WDR1, an actin filament severing protein. I had the opportunity to study 6 patients carrying mutation in the WDR1 gene. In the lymphoid cell compartment, I described that WDR1 deficiency leads to a dysregulation of actin level and has major impact on B cell differentiation but more limited impact on T cell signaling.

In conclusion, my work has been designed in the way to understand more precisely the role of actin regulators and their roles in immune cellular process. Better understand those mechanisms of regulation will help further to the diagnosis of PID patients and eventually find new target for treatment.