



HAL
open science

Des déficiences génétiques comme modèles naturels pour l'étude de la régulation des checkpoints immunitaires et la caractérisation des réponses auto-immunes

Laure Delage

► To cite this version:

Laure Delage. Des déficiences génétiques comme modèles naturels pour l'étude de la régulation des checkpoints immunitaires et la caractérisation des réponses auto-immunes. Immunologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5190 . tel-04619430

HAL Id: tel-04619430

<https://theses.hal.science/tel-04619430>

Submitted on 20 Jun 2024

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

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

Université de Paris

École doctorale n°562 Bio Sorbonne Paris Cité

*Laboratoire Immunogénétique des maladies auto-immunes pédiatriques,
UMR1163, Institut Imagine (Paris)*

Des déficiences génétiques comme modèles naturels pour l'étude de la régulation des checkpoints immunitaires et la caractérisation des réponses auto-immunes

Par **Laure DELAGE**

Thèse de doctorat en Immunologie
Dirigée par le Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2021

Devant un jury composé de :

M. le Pr Olivier LAMBOTTE, Université Paris-Saclay	Rapporteur
M. le Pr Matthieu MAHEVAS, Université Paris-Est Créteil	Rapporteur
Mme le Dr. Eliane PIAGGIO, Université PSL	Examinatrice
Mme le Pr. Isabelle PELLIER, Université d'Angers	Examinatrice
M le Pr. Eric TARTOUR, Université de Paris	Examinateur
M. le Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT, Université de Paris	Directeur de thèse
M. le Dr Benoit PASQUIER, SANOFI	Membre invité



Des déficiences génétiques comme modèles naturels pour l'étude de la régulation des checkpoints immunitaires et la caractérisation des réponses auto-immunes

Résumé :

Des mutations récessives de NBEAL2 ont été décrites chez des patients atteints du syndrome des plaquettes grises (SPG). Ce syndrome se caractérise par une macrothrombopénie, avec des plaquettes dénuées de granules-alpha, conduisant à des troubles de la coagulation, souvent associés à une splénomégalie. NBEAL2 a un rôle crucial dans le trafic des granules-alpha plaquettaires. En outre, notre laboratoire a montré que les patients avec un déficit en NBEAL2 peuvent présenter des caractéristiques cliniques semblables aux syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns ; suggérant un rôle de NBEAL2 dans l'homéostasie immunitaire et la tolérance. L'étude d'une cohorte internationale plus large de patients SPG a permis de confirmer et de décrire de nouvelles anomalies immunitaires chez ces patients SPG (maladies auto-immunes, autoanticorps, lymphopénies). Si le rôle de NBEAL2 dans le trafic des granules est souvent étudié, le mécanisme exact conduisant au développement des manifestations auto-immunes reste inconnu. NBEAL2 appartient à une famille de protéines, impliquées dans le trafic vésiculaire, qui possèdent toutes un domaine BEACH conservé. Dans cette famille, une des protéines la plus proches de NBEAL2 est LRBA. LRBA est impliquée dans le recyclage de CTLA-4, qui joue un rôle crucial dans l'inhibition des réponses immunitaires et la tolérance. Des mutations récessives de LRBA conduisent à des signes cliniques semblables aux déficiences partielles en CTLA-4 : auto-immunité, infiltrations lymphocytaires et lymphopénie B progressive. En condition physiologique, LRBA empêche la dégradation lysosomale de CTLA-4 et permet son recyclage à la membrane plasmique. Par analogie avec LRBA, nous avons étudié l'importance de NBEAL2 dans le trafic intracellulaire des checkpoints immunitaires et nous avons apporté de nouvelles connaissances sur son rôle dans les lymphocytes. NBEAL2 est ainsi une protéine d'échafaudage, se liant à LRBA, et impliquée dans le trafic de CTLA-4 ainsi que le trafic vésiculaire en général. Ces travaux apportent de nouvelles connaissances sur la régulation de CTLA-4 dans les lymphocytes T activés, une nouvelle liste de partenaires de la protéine NBEAL2 a été identifiée et un nouveau modèle pour le trafic vésiculaire dans lequel est impliqué NBEAL2 a été proposé. Enfin, ces travaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à l'auto-immunité chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises, et pourraient conduire à un diagnostic plus précoce et un traitement adapté.

Mots clefs : Syndrome des plaquettes grises ; SPG ; CTLA-4 ; NBEAL2 ; LRBA ; domaine BEACH ; protéine contenant un domaine BEACH ; trafic vésiculaire ; recyclage ; dégradation lysosomale ; granule lytique ; interactome ; checkpoint immunitaire ; auto-immunité

Genetic deficiencies as natural models to study the immune-checkpoints regulation and to better characterize the autoimmune response

Abstract:

Recessive NBEAL2 mutations have been reported in patients with Gray Platelet Syndrome (GPS). This syndrome is characterized by a macro-thrombocytopenia, with platelets lacking alpha-granules, leading to bleeding disorders, often associated with splenomegaly. NBEAL2 plays a crucial role in the trafficking of alpha-granules in platelets. Moreover, our lab has also described NBEAL2 deficiencies in patients presenting clinical features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome, suggesting a role of NBEAL2 in immune homeostasis and tolerance. A broader international cohort of GPS patients has been described, revealing immune system abnormalities (autoimmune diseases, autoantibodies, lymphopenia). If the role of NBEAL2 in the traffic of granules is often investigated, the exact mechanism leading to the development of autoimmune manifestations in GPS patients remains unknown. NBEAL2 belongs to a protein family involved in vesicular trafficking, all of which possess a conserved BEACH domain. Within this BEACH-domain containing proteins family, one of the closest members to NBEAL2 is LRBA. LRBA is involved in the recycling of CTLA-4, an inhibitory immune checkpoint. CTLA-4 plays a crucial role in the regulation of immune responses and tolerance. Recessive mutations of LRBA lead to similar clinical features as CTLA-4 deficiency: autoimmunity, lymphocytic infiltrations, and progressive B lymphopenia. Physiologically, LRBA prevents the lysosomal degradation of CTLA-4 and allows its recycling to the membrane. By analogy with LRBA, we investigated the importance of NBEAL2 in immune checkpoints intracellular trafficking and we brought new insights on its role in lymphocytes. Thus, NBEAL2 is a scaffold protein, binding LRBA, and involved in CTLA-4 trafficking as well as in vesicular trafficking in general. This work brings new knowledge to the regulation of CTLA-4 in activated T lymphocytes, a list of new partners for NBEAL2 protein and a new model of vesicular trafficking in which NBEAL2 is involved. Finally, a better understanding of the mechanisms leading to autoimmunity in patients with gray platelets syndrome could lead to better diagnosis and treatment management.

Keywords: Gray platelet syndrome; GPS; CTLA-4; NBEAL2; LRBA; BEACH domain; BEACH-domain containing protein; vesicular traffic; recycling; lysosomal degradation; lytic granule; interactome; immune checkpoint; autoimmunity

Remerciements

Ces travaux n'auraient jamais vu le jour sans le soutien de plusieurs personnes que je souhaite remercier chaleureusement à travers ces quelques lignes.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèses, les Docteurs Frédéric Rieux-Laucat et Benoit Pasquier. Merci de la confiance que vous m'avez accordée en me proposant ce projet, et de la liberté que vous m'avez laissée pour le mener à bien.

Je remercie le Professeur Olivier Lambotte, le Professeur Matthieu Mahévas, le Professeur Isabelle Pellier, le Docteur Eliane Piaggio et le Professeur Eric Tartour de m'avoir fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mes travaux.

Je souhaite remercier l'ensemble de mon équipe à l'institut Imagine, à commencer par les figures permanentes de ce laboratoire. Un grand merci à Aude, Fabienne, Marie-Claude et Olivier auprès de qui j'ai énormément appris. Merci également à tous ceux qui ont partagé une partie de mon aventure en 321-322, et notamment Laura, Saji, Alizée, Sonia, Jérôme, Caroline, Charlotte, Boris, Marie, Vithura, Yohann, Camille et Quentin.

J'aimerais également remercier toute mon équipe à Sanofi : Eve, Charlotte, Carolina, Solana, Ellen, Sandrine, Delphine, et Rami. Merci pour votre soutien bienveillant et votre disponibilité. Une mention toute particulière à Erwan sans qui beaucoup d'expériences n'auraient jamais vu le jour. Je souhaite remercier chaleureusement toute l'équipe de Chilly, qui m'a accueilli et offert une aide précieuse. Merci Armelle et surtout Jean-Luc, pour les discussions scientifiques et les fous rires.

Je tiens aussi à remercier nos voisins et très appréciés collègues du laboratoire du Dr Mickaël Ménager : Camille, Briec, Marine, Victor, Maxime, Tina et Francesco. Enfin, merci à l'ensemble de la grande famille Imagine, pour tous les conseils et les sourires qui font vivre notre Institut.

Je remercie sincèrement les patients et les membres de leurs familles, ainsi que tous les médecins et les membres du CEDI sans qui cette recherche serait impossible.

Je suis reconnaissante à tous ceux qui ont eu la patience de relire et de corriger ce manuscrit, et en particulier à Dorothée qui a été présente depuis le début.

Je souhaite dédier cette thèse à celles et ceux qui constituent des piliers de ma vie :

A mes Maitres d'armes, qui m'ont fait grandir, sur la piste et en dehors,

A mon équipe, ces femmes incroyables aux couleurs de l'arc-en-ciel,

A toute ma famille, mes parents et mes sœurs, à qui je dois tout,

Et enfin à Paul.

Avertissement

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une thèse CIFRE entre SANOFI et l'institut Imagine, et sont soumis à l'accord de confidentialité suivant :

CIFRE CONTRACT AGREEMENT

« PARTIES » : SANOFI AVENTIS R&D – IMAGINE-INSTITUT DES MALADIES GENETIQUES

Réf Sanofi : 181004

Réf Imagine : COLLAB2019-FRL-SANOFI

Réf IT 191140A10

Article 8 –CONFIDENTIALITY

8.1. Each PARTY undertakes to keep secret and confidential any CONFIDENTIAL INFORMATION received from the other PARTY as part of the establishment, negotiation and execution of the AGREEMENT, and belonging to that other PARTY or its AFFILIATES or on which said PARTY or its AFFILIATES has rights. It will refrain from disclosing any CONFIDENTIAL INFORMATION and using it for any other purpose than for the purposes of carrying out the PROGRAM, except with the prior written consent of the other PARTY.

It will use the CONFIDENTIAL INFORMATION only for the purposes of the AGREEMENT and, in general, it undertakes not to in any way call into question the rights of the other PARTY on the CONFIDENTIAL INFORMATION above referred.

Each PARTY undertakes that the CONFIDENTIAL INFORMATION that it receives from the other PARTY is disclosed internally only to the members of its staff or working on its premises or in collaboration within the framework of the present ones having to know for the purposes of the execution of the PROGRAM and are used by them only within the framework of the AGREEMENT. Each PARTY is strongly respectful of the confidentiality of the CONFIDENTIAL INFORMATION received from the other PARTY by its staff and / or by any person attached to its service for any reason whatsoever.

Liste des principales abréviations

AA	Acide aminé
ACAD	Mort autonome des cellules activées [Activated cell autonomous death]
ACP	Analyse en composante principale
AD	Autosomal dominant
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHAI	Anémie hémolytique auto-immune [Autoimmune hemolytic anemia]
AICD	Mort cellulaire post-activation [Activation-induced cell death]
AIRE	Auto-immune regulator
ALPS	Syndrome lymphoprolifératif auto-immun [Autoimmune lymphoproliferative syndrome]
AOS	Syndrome d'Adams-Oliver
AP-1	Adaptin protein complex 1
APC	Cellule présentatrice d'antigène [Antigen presenting cell]
APECED	Polyendocrinopathie auto-immune de type 1 [Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy]
AS	Spondylarthrite ankylosante [Ankylosing spondylitis]
AR	Autosomal récessif
ARM	Armadillo-like domain
ARN	Acide ribonucléique
AVC	Accident vasculaire cérébral
BCL-2	B cell lymphoma-2
BCR	Récepteur des cellules B [B cell Receptor]
BDCP	Protéine contenant le domaine BEACH [BEACH domain containing protein]
BEACH	Beige et Chediak-Higashi
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CADD	Combined Annotation-Dependant Depletion
CAMRQ	Cerebellar ataxia, mental retardation and disequilibrium syndrome
CAR	Récepteurs chimériques d'antigène [chimeric antigen receptors]
CCDC88B	Coiled-Coil Domain Containing 88B
cDC	Cellule dendritique classique [classical dendritic cell]
cDNA	ADN complémentaire [complementary DNA]
CHAI	CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration
CHS	Syndrome de Chediak-Higashi [Chediak-Higashi Syndrome]
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	CytoMégaloVirus
ConA	Concanavalin A
CP	Composante principale
CTLA-4	Cytotoxique T-Lymphocyte-associated Antigen 4
CytoF	Cytométrie par temps de vol [Cytometry by Time Of Flight]
DC	Cellule dendritique [dendritic cell]
DEG	gène différenciellement exprimé [differentially expressed genes]

DICS	Déficit immunitaire combiné sévère
DICV	Déficit immunitaire commun variable
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort [Death inducing signaling complex]
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DOCK	Dedicator Of Cytokinesis
DSP	dithiobis(succinimidyl propionate)
DTT	dithiothréitol
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EFS	Etablissement Français du Sang
EV	Vésicule extracellulaire [extracellular vesicle]
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAN	Factor associated with N-Smase activation
FASL	Ligand de FAS
FBS	Serum de veau fœtal [Fetal Bovine serum]
FDA	Food and Drug Administration
FGN	Fibrinogène
FoxP3	Forkhead box P3
Gal9	Galectine-9
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GEF	Guanine Exchange Factor
GITR	Glucocorticoid-induced TNF Receptor-related protein
GOF	Gain de fonction [Gain of function]
GPS	Syndrome des plaquettes grises [Gray Platelet Syndrome]
HEK	Cellule rénale embryonnaire humaine [Human embryonic kidney cell]
HLA	Human leukocyte antigen
HLH	Lymphohistiocytose hémophagocytaire
HPV	Papillomavirus humain
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSC	cellule souche hématopoïétique [hematopoietic stem cell]
HVEM	Herpesvirus entry mediator
IBD	Maladie inflammatoire de l'intestin [inflammatory bowel disease]
ICOS	Inducible T-cell co-stimulator
ICOSL	ICOS ligand
IDO	Indoleamine 2, 3-dioxygénase
IF	Immunofluorescence
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP	Immuno-précipitation

iPSC	Cellule souche pluripotente induite
IPEX	Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
KO	Knock-out
LAG3	Lymphocyte activation gene 3
LC-MS	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse [liquid chromatography – mass spectrometry]
LIGHT	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14
LMMJ	Leucémie myélomonocytaire juvénile
LOF	Perte de fonction [loss of function]
LRBA	LPS-responsive beige-like anchor protein
LYST	Lysosomal trafficking regulator
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T cells
MET	Microscopie électronique en transmission
moDC	cellule dendritique dérivée de monocyte
MOMP	Membrane externe mitochondriale
MS	Sclérose en plaque [multiple sclerosis]
MVB	corps multivésiculaire [multivesicular body]
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBEAL2	Neurobeachin like 2
NHEJ	junction d'extrémités non homologues [Non-Homologous End-Joining]
NK	Natural killer cell
NSD	N-Smase activating Domain
NSMAF	Neutral sphingomyelinase activation-associated factor
NT	Nucleotide
OCS	Système canaliculaire ouvert [open canalicular system]
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OX40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4
PBC	Cholangite biliaire primitive [primary biliary cholangitis]
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique [Peripheral blood mononuclear cells]
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFA	Para-formaldéhyde
PH	Pleckstrin-homology

PHA	Phytohemaglutinine
PMA	Phorbol myristate acetate
PMV	Microvésicule plaquettaire [platelet microvesicle]
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PTI	Purpura thrombopénique idiopathique ou immunologique
PVDF	polyfluorure de vinylidène
PVR	Récepteur du poliovirus
RA	Arthrite rhumatoïde
RAB	Ras related protein
RALD	RAS-associated autoimmune leukoproliferative disorder
RE	Réticulum endoplasmique
RNP	complexe ribonucléoprotéique
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SAVI	Vasculopathie de l'enfant associée à STING [STING associated vasculopathy with onset in infancy]
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEE	Staphylococcal enterotoxin type E
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLE	Lupus érythémateux disséminé [systemic lupus erythematosus]
Smu	Mutation somatique
SNP	Polymorphisme nucléotidique [single nucleotide polymorphism]
STING	Stimulator of Interferon Genes
SVF	Sérum de veau fœtal
SS	Syndrome de Sjögren
T1D	Diabète de type 1
TA	Température ambiante
TBS	TRIS buffered saline
TBST	TRIS buffered saline with Tween
TCR	Récepteur des cellules T [T cell receptor]
TFH	T follicular helper cell
TGF	Facteur de croissance transformant [Transforming Growth Factor]
THD	Domaine d'homologie au TNF [TNF homology domain]
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3
TLR	Récepteur Toll-like [Toll-like receptor]
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
TOD2	Tryptophan 2,3-dioxygenase
TPM	Transcripts par million
TPO	Thrombopoïétine
TReg	Cellule T régulatrice
TRIS	tris(hydroxyméthyl)aminométhane

TSP1	Thrombospondine 1
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	Unique Molecular Identifiers
VISTA	V domain-containing Ig suppressor of T-cell activation
VWF	Facteur de Von Willebrand
WAS	Syndrome de Wiskott-Aldrich
WB	Western Blot
WDFY	WD repeat and FYVE domain-containing
WDR	WD repeat-containing protein
WES	Whole exome sequencing
WT	Wild type
XLR	Récessif lié à l’X

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
AVERTISSEMENT	5
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	6
TABLE DES MATIERES	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION	19
1. IMMUNITE ADAPTATIVE ET TOLERANCE AU SOI	19
1.1. IMMUNITE HUMORALE	19
1.2. IMMUNITE CELLULAIRE	21
1.3. PRESENTATION ANTIGENIQUE ET VARIABILITE DU TCR.....	22
1.4. TOLERANCE CENTRALE	22
1.5. TOLERANCE PERIPHERIQUE	24
1.6. APOPTOSE	25
1.7. PERTE DE TOLERANCE ET MALADIES MONOGENIQUES ASSOCIEES	26
2. ROLE DES CHECKPOINTS DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE	29
2.1. LA SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES	30
2.2. LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS TNF	31
2.3. CHECKPOINTS & CANCER	31
2.4. MUTATIONS DE CHECKPOINTS & AUTO-IMMUNITE	32
3. CTLA-4	34
3.1. DESCRIPTION GENERALE.....	34
3.2. SIGNALISATION INHIBITRICE DE CTLA-4.....	34
3.3. TRAFIC VESICULAIRE DE CTLA-4.....	35
3.4. DEFICITS EN CTLA-4 CHEZ L'HUMAIN.....	37
4. LES BEACH PROTEINES	40
4.1. PRESENTATION GENERALE	40
4.2. PROTEINES BEACH ET MALADIES ASSOCIEES	42
5. LE SYNDROME DES PLAQUETTES GRISES	48
5.1. SYMPTOMES	48
5.2. MUTATIONS RECESSIVES DE NBEAL2.....	48
5.3. MODELES MURINS	49
5.4. NBEAL2 ET LES GRANULES ALPHA	51
5.5. NBEAL2 ET IMMUNITE.....	52
6. PLAQUETTES : DESCRIPTION ET LIEN AVEC L'IMMUNITE	53
6.1. BIOGENESE DES PLAQUETTES	54
6.2. CYCLE DE VIE PLAQUETTAIRE	55
6.3. STRUCTURE DE LA PLAQUETTE	56

6.4.	LES NOMBREUSES FONCTIONS PLAQUETTAIRES.....	58
6.5.	LE PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE.....	61
6.6.	DEFAUTS PLAQUETTAIRES CONSTITUTIFS ET IMMUNITE.....	63

HYPOTHESES ET OBJECTIFS..... 67

MATERIELS ET METHODES..... 68

1.	ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	68
1.1.	RECRUTEMENT DES PATIENTS.....	68
1.2.	PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS.....	68
1.3.	PREPARATION DES CELLULES T.....	68
2.	CULTURES CELLULAIRES.....	69
2.1.	MILIEUX DE CULTURES.....	69
2.2.	ACTIVATION ET CULTURE DES LYMPHOCYTES T PRIMAIRES.....	69
2.3.	GENERATION DE LIGNEES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (iPSC).....	70
3.	BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BIOCHIMIE.....	71
3.1.	EXTRACTION DE L'ADN.....	71
3.2.	EXTRACTION DE L'ARN ET RETRO-TRANSCRIPTION.....	71
3.3.	SEQUENÇAGE.....	71
3.4.	ANALYSE PAR RT-QPCR.....	72
3.5.	EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES PROTEINES.....	73
3.6.	WESTERN BLOT NBEAL2.....	73
4.	IMMUNOPHENOTYPAGES MULTIPARAMETRIQUES.....	74
4.1.	CYTOMETRIE EN FLUX.....	74
4.2.	CYTOMETRIE DE MASSE.....	75
5.	DOSAGES PROTEIQUES DANS LES PLASMAS.....	76
5.1.	DOSAGE DE FASL ET DE LA VITAMINE B12.....	76
5.2.	LEGENDPLEX.....	76
5.3.	DOSAGE DES AUTOANTICORPS PLASMATIQUES.....	77
6.	EDITION GENETIQUE AVEC LE SYSTEME CRISPR/Cas9.....	77
6.1.	STRATEGIE DE DESIGN DES GUIDES ARN.....	77
6.2.	PROTOCOLE DETAILLE.....	79
7.	ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.....	82
7.1.	SEQUENÇAGE ARN BULK.....	82
7.2.	SEQUENÇAGE ARN SUR CELLULES UNIQUES.....	82
8.	ANALYSES PROTEOMIQUES.....	83
8.1.	IMMUNOPRECIPITATION.....	83
8.2.	INTERACTOME DE NBEAL2 EN SPECTROMETRIE DE MASSE.....	87
8.3.	PROTEOMES TOTAUX EN SPECTROMETRIE DE MASSE.....	88
9.	TESTS FONCTIONNELS.....	89
9.1.	TESTS D'APOPTOSE ET D'AICD.....	89
9.2.	TESTS DE DEGRANULATION DES CELLULES T CD8+.....	89
9.3.	TESTS DE PROLIFERATION.....	90
10.	STRATEGIE D'ANALYSES DES EXOMES.....	90
11.	ANALYSES BIOINFORMATIQUES.....	91
11.1.	ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.....	91
11.2.	ANALYSES DES PROFILS IMMUNOLOGIQUES.....	94
11.3.	ANALYSES PROTEOMIQUES.....	95

RESULTATS	97
1. NBEAL2 JOUE UN ROLE DANS LE TRAFIC DE CTLA-4	97
2. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES SUR CELLULES UNIQUES DES DEFICIENCES EN CTLA-4	99
2.1. OBJECTIFS DE L'ETUDE	99
2.2. ÉCHANTILLONS ANALYSES	100
2.3. COMPARAISON DES PATIENTS AVEC UN DEFICIT EN CTLA-4.....	102
2.4. DEUXIEME OBJECTIF : EFFET DU TRAITEMENT PAR ABATACEPT ET ANALYSE DES PORTEURS SAINS DE MUTATIONS DE CTLA-4.....	108
2.5. TROISIEME OBJECTIF : ANALYSE D'UNE PATIENTE PRESENTANT UNE MUTATION HOMOZYGOTE DE CTLA-4 .	108
3. DOCK11	109
3.1. COHORTE ET SYMPTOMES CLINIQUES	110
3.2. IMPACT DES MUTATIONS.....	111
3.3. MARQUEURS BIOLOGIQUES	112
3.4. ANALYSES FONCTIONNELLES	112
3.5. PERSPECTIVES SUR DOCK11	114
4. CCDC88B	115
4.1. FONCTIONS BIOLOGIQUES CONNUES DE CCDC88B	115
4.2. SYMPTOMES CLINIQUES ET PHENOTYPES	116
4.3. ANALYSE D'EXOMES EN TRIO.....	116
4.4. SEQUENÇAGE SANGER ET QPCR.....	117
4.5. ANALYSES FONCTIONNELLES	117
4.6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	118
5. AUTRES ANALYSES D'EXOMES	118
5.1. PATIENTS LRBA/NBEAL2	118
5.2. TIGIT	120
6. LES THROMBOPENIES MIXTES EXISTENT-ELLES ?	125
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	127
1. NBEAL2	127
1.1. NBEAL2 ET GRANULES.....	127
1.2. NBEAL2 : SYSTEME IMMUNITAIRE ET PLAQUETTES, UN VASE COMMUNICANT ?	128
1.3. NBEAL2 ET CANCER	128
1.4. NBEAL2 ET LA REGULATION DU TRANSCRIPTOME	129
1.5. NBEAL2 ET LE TRAFIC DE CTLA-4 : VERS DE NOUVELLES VOIES THERAPEUTIQUES.....	130
2. LES PARTENAIRES PROTEIQUES DE NBEAL2	133
2.1. PERSPECTIVES GENERALES	133
2.2. COMPARAISON AUX AUTRES PARTENAIRES DECRITS DE NBEAL2	134
2.3. LA FAMILLE DES PROTEINES DOCK.....	135
2.4. MODELE/MECANISMES REGULES PAR LES BEACH PROTEINES.....	136
3. ROLE DES PLAQUETTES DANS L'AUTO-IMMUNITE	137
4. PERSPECTIVES SUR LES DEFICITS EN CHECKPOINTS IMMUNITAIRES	138
4.1. EXISTE-T-IL UNE REDONDANCE DES CHECKPOINTS IMMUNITAIRES ?	138
4.2. PENETRANCE INCOMPLETE DES MUTATIONS DE CTLA-4	139
4.3. LE ROLE DE CTLA-4 AU-DELA DES LYMPHOCYTES T	140
CONCLUSIONS	143
CONTRIBUTIONS A D'AUTRES PUBLICATIONS	144

ANNEXES	145
ANNEXE 1 : PARTICIPATION A D'AUTRES PROJETS DE SEQUENÇAGE SUR CELLULES UNIQUES	145
PROJET STING.....	145
PROJET RALD	145
PATHOLOGIES LIEES A UNE DEREGLATION DE L'INTERFERON.....	146
DICS (DEFICIT IMMUNITAIRE COMBINE SEVERE)	146
ANNEXE 2 : ARTICLE 1	148
ANNEXE 3 : ARTICLE 2	149
ANNEXE 4 : ARTICLE 3	150
ANNEXE 5 : ARTICLE 4	151
ANNEXE 6 : LISTE DES PRIMERS PCR POUR LE SEQUENÇAGE EN SANGER	152
ANNEXE 7 : LISTE DES PRIMERS UTILISES POUR LES RT-QPCR	153
ANNEXE 8 : PANELS D'ANTICORPS UTILISES POUR L'ETUDE DE L'EXPRESSION DES CHECKPOINTS IMMUNITAIRES SUR LES LYMPHOCYTES T	153
ANNEXE 9 : PANELS D'ANTICORPS UTILISES POUR L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES PBMC EN PARALLELE DES EXPERIENCES DE SC RNA SEQ	155
ANNEXE 10 : PANEL CYTOF UTILISE	157
ANNEXE 11 : PANEL DES 128 AUTOANTIGENES TESTES PAR ANTIGEN MICROARRAY	159
ANNEXE 12 : LISTE DES GENES PID (PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY) UTILISES POUR L'ANALYSE DES EXOMES	161
ANNEXE 13 : LISTE DES GENES ASSOCIES A DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES OU A DES THROMBOPENIES CONSTITUTIONNELLES POUR L'ANALYSE D'EXOME	164
ANNEXE 14 : GENERATION D'UNE LIGNEE DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES	165
ANNEXE 15 : COMPARAISON DE NOS RESULTATS D'INTERACTOME NBEAL2 A CEUX DE MAYER ET AL, 2018, BLOOD.	166
BIBLIOGRAPHIE	171

Table des illustrations

Figure 1: Réponses humorales T-dépendante ou T-indépendante ³	20
Figure 2: Exemple de co-stimulation via CD28 et activation des lymphocytes T ³	21
Figure 3: Maturation et sélection des lymphocytes T restreints par le CMH ³	23
Figure 4: Voies de signalisation de l'apoptose ¹⁴	26
Figure 5: Aperçu non exhaustif des différents checkpoints immunitaires et de leurs ligands ²⁹	29
Figure 6: Structure et séquence de PD-1, un exemple de récepteur de la superfamille des immunoglobulines ³²	30
Figure 7: Echappement des tumeurs aux réponses immunitaires ³	32
Figure 8: Schéma des modèles de signalisations induites par CTLA-4 dans le lymphocyte T ⁶¹	35
Figure 9: Trafic vésiculaire de CTLA-4 chez un individu sain (gauche) et chez un individu atteint d'une déficience en LRBA ou DEF6 (droite). ⁶⁵	36
Figure 10: Comparaison des différents symptômes entre les déficits connus en CTLA-4 ⁶⁵ . .	39
Figure 11: Schéma des protéines de la famille BEACH et de leurs principaux domaines ⁷⁶ ...	41
Figure 12: Transcripts par million (TPM) pour l'ensemble des gènes codant des BDCPs, par sous-types cellulaires immunologiques.....	42
Figure 13: Mécanisme proposé pour expliquer le rôle de WDFY4 dans la présentation croisée. ¹⁰⁸	45
Figure 14: Modèle proposé illustrant le rôle de NSMAF dans la voie non-canonique de l'autophagie ¹²³	47
Figure 15: Rôle de NBEAL2 dans la biogénèse et la rétention des granules- α dans les mégacaryocytes ¹³⁶	51
Figure 16: Schéma résumant la mégacaryopoïèse ¹⁴⁷	54
Figure 17: Schéma de la thrombopoïèse ¹⁴⁷	55
Figure 18: Le cycle de vie plaquettaire ¹⁵⁰	55
Figure 19: Contenus des granules plaquettaires classés par fonction ¹⁵³	56
Figure 20: Liste des récepteurs plaquettaires humains classés par fonctions ¹⁵³	58
Figure 21: Exemples du rôle des plaquettes dans l'immunité ¹⁵⁷	59
Figure 22: Rôle des plaquettes dans le développement des métastases et l'évasion tumorale ¹⁶⁰	61
Figure 23: Les divers mécanismes pouvant être à l'origine d'un PTI ¹⁶³	62
Figure 24: Principe expérimental du séquençage WES (Whole Exome sequencing) ¹⁹⁷	71
Figure 25: Positions, au niveau protéique, des guides RNA utilisés pour générer des KO de NBEAL2 ou de LRBA par le système CRISPR-Cas9	79
Figure 26: Schéma du protocole utilisant le système CRISPR-Cas9 pour générer des cellules T primaires activées KO NBEAL2 ou LRBA.....	79
Figure 27: Présentation des groupes de patients analysés par séquençage en cellules uniques sur PBMC	100
Figure 28: Répartition par âge des échantillons étudiés en séquençage sur cellules uniques	101
Figure 29: UMAP permettant de visualiser les données et les clusters de cellules obtenus ..	103
Figure 30: Représentation des proportions de cellules pour chaque cluster identifié sur la UMAP	105
Figure 31: Voies de signalisation de l'apoptose sous-exprimées chez les patients NBEAL2, pouvant expliquer leur excès de lymphocytes CD8 ⁺ mémoires	106

Figure 32: Sur-expression des voies d'activation des cellules B dans le cluster des B naïves chez les patients NBEAL2, expliquant leur léger excès de cellules B.....	107
Figure 33: Analyses des voies de signalisation dérégulées dans les macro-clusters pour chaque groupe de patients (grâce au logiciel IPA).....	107
Figure 34: Modèle spéculatif du rôle de DOCK11 dans la polymérisation de l'actine ²¹⁶	109
Figure 35: Arbres génétiques des familles DOCK11.....	110
Figure 36: Position des mutations DOCK11 au niveau protéique.....	111
Figure 37: Position des mutations de TIGIT au niveau protéique.....	121
Figure 38: Arbres génétiques des patients présentant un variant pathogénique de TIGIT	121
Figure 39: Phénotypage du patient 2 porteur d'une mutation hétérozygote de TIGIT.....	123
Figure 40: Expression de TIGIT sur les TReg du contrôle et du patient après culture.....	123
Figure 41: Transcripts par million dans les sous types cellulaires de PBMC, des différents gènes codant les protéines de la famille DOCK.....	135
Figure 42: Arbre génétique de la famille présentant une mutation hétérozygote de CTLA-4, dont certains membres sont des porteurs sains, illustrant la pénétrance incomplète de cette mutation.....	140
Figure 43: Expression de CTLA-4 par les cellules dendritiques ²⁷⁰	141

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de gènes causant des manifestations auto-immunes par rupture des mécanismes de tolérance ³	27
Tableau 2 : Déficiences génétiques en checkpoints immunitaires décrites chez l'Homme	33
Tableau 3: Thrombopénies héréditaires avec des anomalies hématologiques et/ou des susceptibilités aux hémopathies malignes.....	64
Tableau 4: Défauts plaquettaires héréditaires sans thrombopénies mais avec des anomalies hématologiques et des susceptibilité aux hémopathies malignes.....	65
Tableau 5: Panel d'anticorps utilisé pour le marquage intracellulaire de CTLA-4 sur les cellules T	74
Tableau 6: Liste des guides RNA utilisés pour générer les KO par CRISPR-Cas9.....	78
Tableau 7 : Formation des complexes ribonucléoprotéiques entre la Cas9 et les guides ARN80	
Tableau 8: Composition du tampon de lyse pour les immunoprécipitations	84
Tableau 9: Principales caractéristiques des donneurs et patients étudiés en séquençage en cellules uniques	101
Tableau 10: Détails des mutations DOCK11 et des scores de prédiction	111
Tableau 11: Principaux symptômes des patients de la cohorte DOCK11	111
Tableau 12: Nombre de cellules T CD8 ⁺ et NK exprimant la perforine et moyenne d'intensité de fluorescence de la perforine sur ces populations	116
Tableau 13: Caractéristiques des mutations CCDC88B	117
Tableau 14: Caractéristiques des mutations de LYST et G6PD trouvés chez le patient	117
Tableau 15: Mutations hétérozygotes délétères de NBEAL2 et LRBA chez deux patients atteints d'auto-immunité	119
Tableau 16: Détails des mutations de TIGIT trouvées pour ces patients.....	121
Tableau 17: Autres mutations délétères associées à de l'auto-immunité trouvées dans les exomes des patients TIGIT	122
Tableau 18: Variants et principales caractéristiques cliniques des patients retenus après analyse des exomes en utilisant la liste de gènes associées aux plaquettes	126
Tableau 19: Primers pour confirmer les mutations de la cohorte de patients atteints du syndrome des plaquettes grises	152
Tableau 20: primers PCR pour confirmer les mutations des patients porteurs d'une mutation hétérozygote de LRBA et d'une mutation hétérozygote de NBEAL2.....	152
Tableau 21: Primers PCR pour confirmer les mutations des patients porteurs d'une mutation hémizyote de DOCK11	152
Tableau 22: Primers utilisés pour les expériences de RT-qPCR.....	153
Tableau 23: Panel d'anticorps pour l'étude de l'expression des checkpoints immunitaires inhibiteurs sur les lymphocytes T - mise au point sur le cytomètre spectral Sony SP6800...	153
Tableau 24: Panel d'anticorps pour l'étude de l'expression des checkpoints immunitaires activateurs sur les lymphocytes T - mise au point sur le cytomètre spectral Sony SP6800...	154
Tableau 25: Panel pour marquer les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques..	155
Tableau 26: Panel pour marquer les lymphocytes T	155
Tableau 27: Panel pour marquer les cellules NK, MAIT et les TReg	156
Tableau 28: Liste des anticorps du panel CyTOF Maxpar Direct Immune Profiling (Fluidigm) et des 8 marqueurs supplémentaires – panel pouvant être réalisé sur sang total ou sur PBMC	157
Tableau 29: Liste des 128 autoantigènes plasmatiques testés grâce au « antigen microarray »	159

Tableau 30: Liste des gènes utilisés lors de l'analyse des exomes à la recherche de déficits immunitaires.....	161
Tableau 31: Liste des 122 gènes associés à des fonctions plaquettaires.....	164
Tableau 32: Comparaison des protéines trouvés dans l'interactome de Mayer et al, avec les protéines trouvées dans notre interactome NBEAL2.....	169

Introduction

Au laboratoire d'immunogénétique des maladies auto-immunes pédiatriques de l'Institut Imagine, nous nous intéressons aux causes génétiques et aux mécanismes des déficits immunitaires. Nous nous concentrons notamment sur des maladies auto-immunes qui apparaissent lorsque le système immunitaire s'attaque aux cellules saines de l'organisme. Les maladies auto-immunes affectent 3 à 5% de la population mondiale ¹. Le déclenchement des symptômes peut être causé par plusieurs facteurs, parmi lesquels : des mutations génétiques, une régulation épigénétique ou des facteurs environnementaux ^{1,2}. Nous nous intéresserons ici à des défauts génétiques causant des déficits immunitaires primaires. Afin de comprendre l'impact de ces mutations sur le système immunitaire, nous commencerons par une brève description du mécanisme de tolérance au soi.

1. Immunité adaptative et tolérance au soi

Le système immunitaire se divise schématiquement en deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée constitue la première ligne de défenses de l'organisme contre des pathogènes. Cette réponse immunitaire est immédiate et peu spécifique du type d'agents pathogènes.

Si un agent pathogène n'est pas éliminé par le système immunitaire inné, alors les mécanismes plus élaborés de l'immunité adaptative se mettent en place, notamment grâce aux lymphocytes B et T. Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons particulièrement aux cellules T. Mais il est important de souligner que les lymphocytes B, à travers la production d'anticorps, jouent un rôle important et sont également impliqués dans la physiopathologie des maladies auto-immunes.

1.1. Immunité humorale

L'immunité humorale permet d'éliminer des pathogènes extracellulaire grâce à leur neutralisation par les anticorps (ou immunoglobulines), sécrétés par les cellules B (alors appelées plasmocytes). L'activation des cellules B naïves et leur différenciation en plasmocytes constituent des étapes clés de cette branche de l'immunité adaptative ³.

Les cellules B naïves possèdent des récepteurs BCR (B cell receptor), ou immunoglobulines membranaires, leur permettant de reconnaître des agents pathogènes extracellulaires. Les cellules B sont alors capables de s'activer, de proliférer par expansion clonale et de se différencier en plasmocytes sécrétant des anticorps. Suivant la nature de l'antigène détecté, antigène protéique ou antigène polysaccharidique, deux réponses à anticorps se mettent en place : celle dépendante de cellules T auxiliaires ou celle indépendante des cellules T.

Lorsque la cellule B est activée par un antigène polysaccharidique, elle est capable de se différencier en plasmocytes possédant une faible durée de vie et sécrétant des anticorps IgM de faible affinité (Figure 1, panel bas).

Lors d'une réponse humorale à un antigène peptidique, la cellule B activée ingère et apprête l'antigène, ce qui lui permet de le présenter à des lymphocytes T auxiliaires également spécifiques de cet antigène. Des signaux de co-stimulation activent alors la cellule B et entraînent sa prolifération, le processus d'hypermutation somatique des régions variables et une commutation isotypique, lui permettant de sécréter différentes sous classes d'immunoglobulines : IgG (1 à 4), IgA ou IgE ^{4, 5} (Figure 1, panel haut ³).

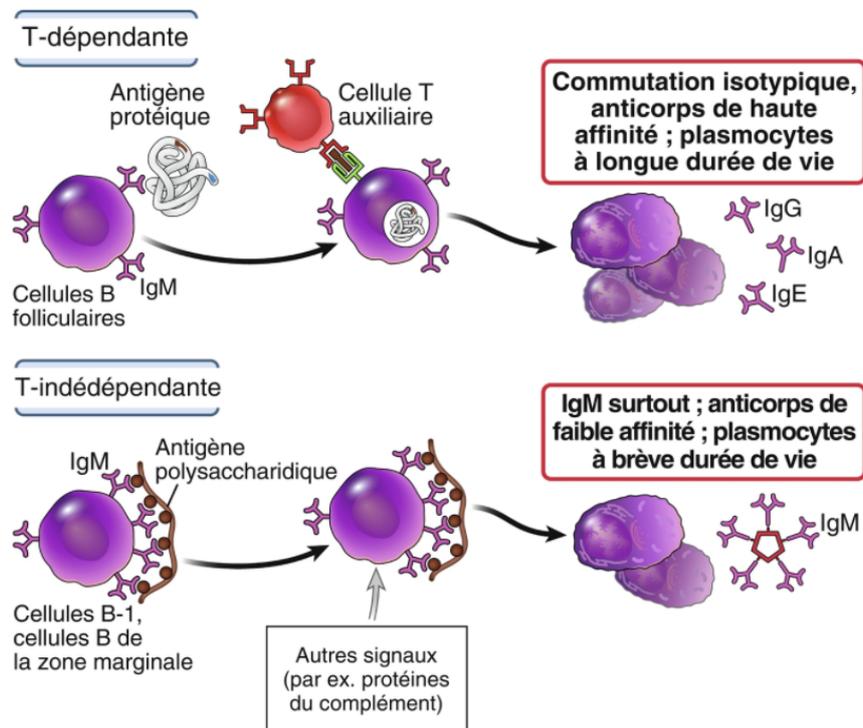


Figure 1: Réponses humorales T-dépendante ou T-indépendante ³.

En réponse à un antigène protéique, la production d'anticorps sera initiée grâce à l'aide de lymphocytes T auxiliaires (panel haut). Les anticorps produits seront soumis à une commutation isotypique et seront de fortes affinités. Les plasmocytes les sécrétant auront une longue durée de vie. En réponse à un antigène non protéique, les lymphocytes B peuvent s'activer sans l'aide des cellules T auxiliaires. Des anticorps IgM de faible affinité seront produits par des plasmocytes à brève durée de vie ³.

L'isotype de l'anticorps dépendra de la nature du pathogène extracellulaire (IgG : neutralisation des microbes et des toxines ; IgE : immunité contre les helminthes ; IgA : immunité des muqueuses) et permet une réponse immunitaire efficace ³.

Dans le centre germinatif, l'action des T auxiliaires permet également d'affiner la réponse humorale en sélectionnant les clones de lymphocytes B qui, suite aux mutations somatiques, présentent des immunoglobulines avec une forte affinité pour l'antigène. Ces lymphocytes B de haute affinité se différencieront en plasmocytes à longue durée de vie ou en cellules B mémoires. Les cellules B mémoires assurent une réponse rapide à un pathogène déjà rencontré par l'organisme ⁶.

1.2. Immunité cellulaire

Les cellules T participent à l'immunité cellulaire en défendant l'organisme contre des pathogènes intracellulaires. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) présentent aux cellules T naïves, les peptides antigéniques sur les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) ainsi que des molécules de co-stimulation. L'activation du lymphocyte T n'a lieu que si le peptide antigénique présenté par la molécule de CMH est reconnu par le récepteur TCR (T-cell receptor) et si les ligands de co-stimulation se lient à leurs récepteurs. Il faut donc un double signal afin que la réponse immunitaire s'enclenche. Parmi les molécules de co-stimulation les plus étudiées, B7-1 (CD80)/ B7-2 (CD86) se lient au récepteur CD28, permettant l'activation des lymphocytes T (Figure 2 ³). D'autres couples ligand/récepteur peuvent entrer en jeu et permettent la transduction d'un signal de co-stimulation ou d'inhibition de la réponse immune ³. Leurs rôles sont détaillés au chapitre 2.

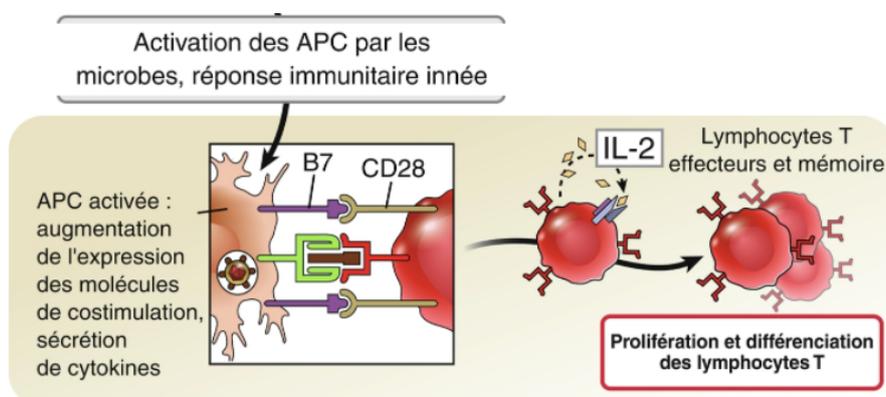


Figure 2: Exemple de co-stimulation via CD28 et activation des lymphocytes T ³

Les APC activées augmentent l'expression de molécules de co-stimulation (comme CD28), ce qui permet l'activation des lymphocytes T après reconnaissance du peptide antigénique présenté par la molécule de CMH. Les lymphocytes T subissent ensuite une expansion clonale, stimulée par l'IL-2 et les cytokines des APC. Ils prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs et mémoires.

Après reconnaissance de ces peptides, les lymphocytes T naïfs subissent une expansion clonale induite par la présence de cytokines sécrétées par les APC ou par les lymphocytes T eux-mêmes (comme l'interleukine-2). Les cellules T prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. Ces lymphocytes rejoignent alors les sites infectieux via la circulation sanguine conduisant à l'élimination des antigènes pathogènes. La dernière phase de la réponse immunitaire adaptative est le retour à l'homéostasie grâce à l'apoptose, mort cellulaire programmée permettant l'autodestruction des cellules T clonales, et la survie de certaines cellules T mémoires ⁷.

1.3. Présentation antigénique et variabilité du TCR

La présentation des antigènes aux cellules T se fait via les molécules du CMH. Chaque lymphocyte T est capable de reconnaître de nombreux peptides antigéniques présentés par une molécule du CMH, mais seuls les plus affins induiront une activation ^{8, 9}. Les molécules du CMH de type I (CMH-I) et de type II (CMH-II) peuvent présenter des peptides issus de protéines du soi ou des protéines du non-soi ³.

Les cellules T se lient aux molécules du CMH par leur récepteur TCR. Afin d'assurer la reconnaissance des multiples peptides antigéniques, le système immunitaire assure la production de lymphocytes T avec une large variété de TCR. Cette variabilité est assurée par le système de recombinaison VDJ des chaînes α et β qui constituent le TCR.

Les recombinaisons aléatoires des récepteurs TCR des cellules T permet la génération d'un large répertoire de récepteurs (environ 10^{12}), ce qui permet au système immunitaire de reconnaître tous les antigènes microbiens. Cette grande capacité combinatoire fait la force de notre système immunitaire adaptatif. Cependant des récepteurs capables de reconnaître des antigènes du soi sont nécessairement produits lors de ce processus. Il existe donc plusieurs mécanismes afin d'empêcher que ces cellules auto-réactives prolifèrent, permettant d'assurer la tolérance au soi⁷.

Pour les cellules B, il existe de la même manière un système de recombinaison aléatoire VDJ qui permet d'obtenir des BCR avec une grande diversité.

1.4. Tolérance centrale

Les lymphocytes T sont sélectionnés au cours de leur maturation dans les organes lymphoïdes primaires (thymus), afin de ne conserver que ceux présentant une spécificité utile (Figure 3 ³).

Les lymphocytes T exprimant un récepteur reconnaissant un peptide présenté par le CMH-I vont se différencier en T-CD8+ alors que ceux reconnaissant un peptide présenté par le CMH-II se différencieront en T-CD4+ (sélection positive). Ainsi les cellules pro-T n'exprimant pas de récepteurs fonctionnels meurent par apoptose (mort par négligence). Les cellules T immatures reconnaissant fortement des peptides des protéines du soi seront éliminées par sélection négative.

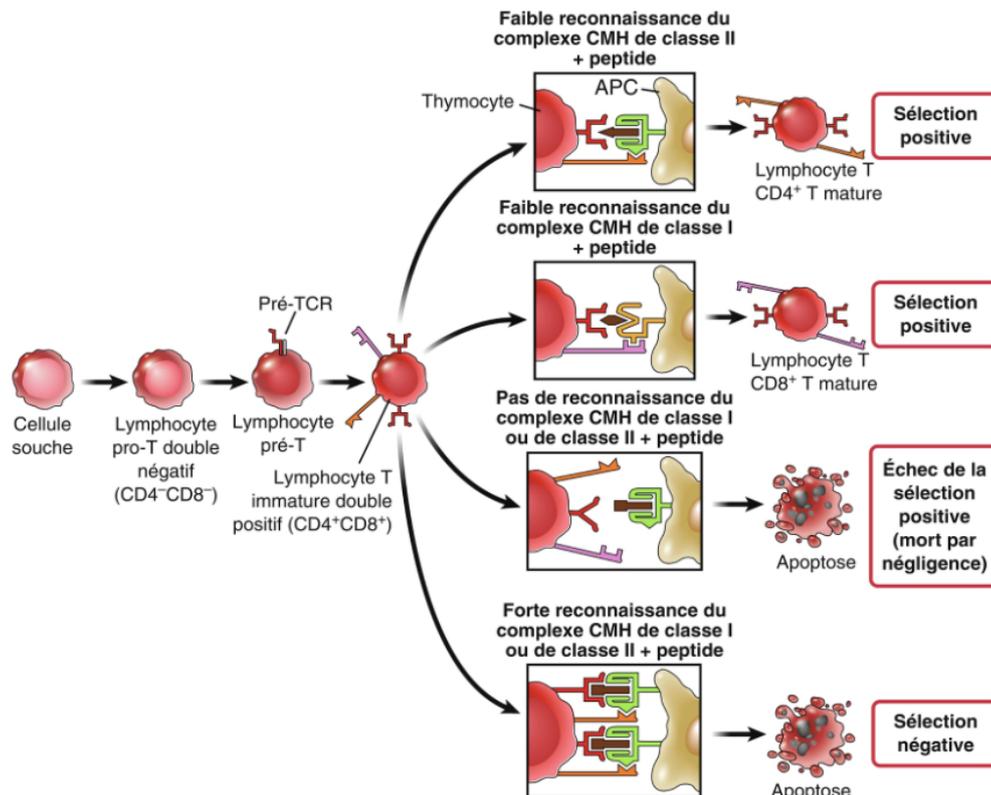


Figure 3: Maturation et sélection des lymphocytes T restreints par le CMH ³

Les lymphocytes T suivent plusieurs étapes de maturation dans le thymus dont une des dernières étapes permet aux lymphocytes T immatures double positifs (CD4+ CD8+) d'exprimer le TCR complet. Une sélection s'opère ensuite, permettant de garder les lymphocytes T reconnaissant le CMH de classe II, qui deviendront des lymphocytes T CD4+ ; ainsi que les lymphocytes T reconnaissant le CMH de classe I, qui deviendront des lymphocytes T CD8+. Les lymphocytes T immatures incapables d'exprimer un TCR fonctionnel mourront par apoptose (mort par négligence). Les lymphocytes T reconnaissant fortement les complexes CMH, mourront également par apoptose (sélection négative, permettant la tolérance centrale). ³

Une partie des cellules CD4+ immatures auto-réactives deviennent des lymphocytes T régulateurs (TReg) et migrent vers les tissus. Malgré cette sélection négative, des cellules T auto-réactives peuvent arriver à maturation et migrer vers les tissus, c'est alors que les mécanismes de tolérance périphérique entrent en jeu ³.

De la même manière, les lymphocytes B immatures sont sélectionnés dans la moelle osseuse afin d'empêcher les clones reconnaissant des antigènes du soi de proliférer (apoptose ou anergie) ⁶.

1.5. Tolérance périphérique

L'activation d'un lymphocyte T nécessite la reconnaissance de l'antigène et d'une molécule de co-stimulation. Lorsque cette dernière est absente, les cellules T deviennent anergiques (absence de réponse fonctionnelle) ou rentrent en apoptose. En effet, la reconnaissance du peptide antigénique par le TCR ne suffit pas à déclencher l'activation de cellules T naïves. Ce mécanisme de co-stimulation assure donc la tolérance en empêchant des lymphocytes T auto-réactifs de proliférer, car les molécules de co-stimulation ne sont exprimées sur les APC qu'en réponse aux agents pathogènes.

Enfin le dernier mécanisme de la tolérance au soi est régi par les lymphocytes T régulateurs (TReg). Les TReg peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T par plusieurs mécanismes. Ils peuvent produire des cytokines (IL-10, TGF- β) qui inhiberont l'activation des cellules T et des cellules dendritiques ¹⁰. Les TReg expriment également fortement le récepteur à l'interleukine-2 (CD25). Cette cytokine est un facteur de croissance essentielle pour la prolifération des lymphocytes T. Les TReg peuvent accaparer l'interleukine-2 (IL-2) grâce à la forte expression de CD25, et ainsi en dépriver les cellules T en prolifération ¹¹.

De plus, les TReg expriment de façon constitutive le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) et un récepteur inhibiteur CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) ¹². CTLA-4 est un checkpoint immunitaire (point de contrôle immunologique) inhibiteur qui rentrent en compétition avec CD28 (activateur) en se liant aux récepteurs CD80/CD86 ³. CTLA-4 est capable de bloquer ou d'épuiser ses ligands CD80/CD86 par transendocytose, ce qui réduit leurs expressions à la surface des APC ^{12, 13}. Les APC sont alors incapables de co-stimuler et d'activer les lymphocytes T via CD28 ¹². Le rôle de CTLA-4, ainsi que sa biologie, et d'autres checkpoints immunitaires seront décrits plus en détails au chapitre 3.

De façon similaire, les lymphocytes B matures auto-réactifs reconnaissant un antigène du soi sans coopération avec un lymphocyte T auxiliaire seront inactivés (par anergie, édition du récepteur ou engagement de récepteurs inhibiteurs) ou détruits par apoptose ⁶. Si des lymphocytes B auto-réactifs subsistent, ils pourront produire des autoanticorps ciblant des tissus sains, ce qui pourrait participer au développement de manifestations auto-immunes.

1.6. Apoptose

L'apoptose est un mécanisme critique pour le maintien de la tolérance au soi. Il existe différentes voies de signalisation permettant d'induire l'apoptose. Elles sont résumées dans la Figure 4 ¹⁴. On distingue la voie intrinsèque qui est principalement régulée par les mitochondries, de la voie extrinsèque déclenchée par les récepteurs de mort exprimés à la surface des cellules.

La voie intrinsèque implique l'activité de protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (comme BIM, BAX, BAK), situées à la membrane des mitochondries, elles favorisent leur perméabilité, l'activation du cytochrome c, la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases ^{14, 15, 16}.

La phosphorylation des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, notamment par la voie des récepteurs tyrosine kinases (RTK) permet leur inhibition et la régulation négative de la voie intrinsèque ¹⁴.

La voie extrinsèque est déclenchée par la liaison des récepteurs de morts cellulaires, comme FAS, à leurs ligands. Via le recrutement de la molécule adaptatrice FADD, une cascade d'activation de cystéine-protéases (les caspases) est déclenchée et entraîne la mort cellulaire ^{14, 15, 16}.

Les cellules immunitaires cytotoxiques peuvent également induire l'apoptose en relarguant des granzymes et de la perforine vers la cellule cible. La perforine permet aux granzymes (sérines protéases) de rentrer dans la cellule par des pores membranaires et ainsi déclencher l'apoptose de la cellule cible ^{14, 15, 16}.

Enfin d'autres facteurs extracellulaires (pH, hypoxie...) ou intracellulaires (stress du réticulum endoplasmique, dommages de l'ADN...) peuvent activer la transcription de gènes pro-apoptotiques ¹⁴.

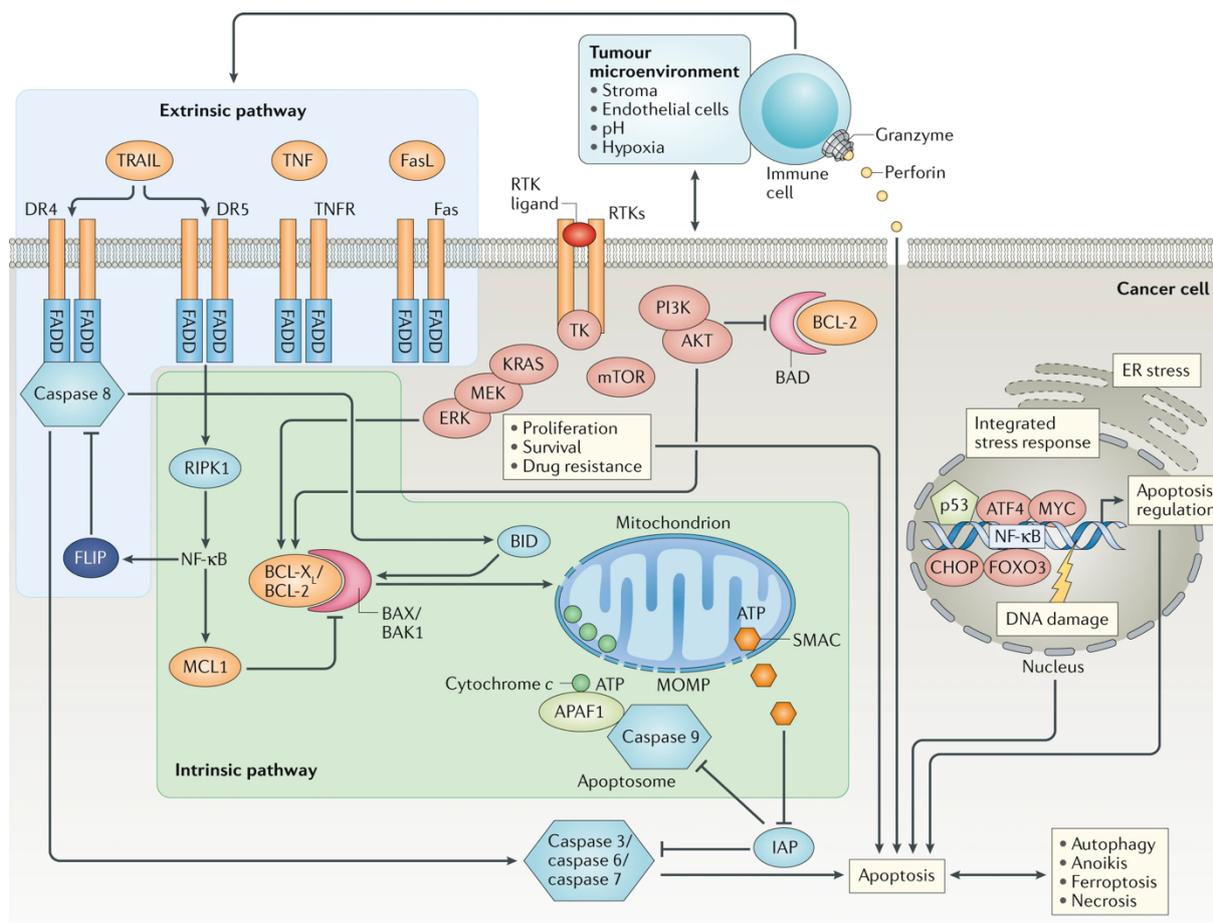


Figure 4: Voies de signalisation de l'apoptose ¹⁴

La voie intrinsèque de l'apoptose implique l'activité de protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 situées dans la membrane externe mitochondriale, favorisant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale (MOMP), la libération du cytochrome c, l'activation des caspases et l'apoptose.

La voie de l'apoptose extrinsèque est activée lorsque les ligands activent les récepteurs de la mort, recrutant FADD et la caspase 8 et/ou la caspase 10 pour former le complexe de signalisation induisant la mort (DISC). L'activation de la caspase 8 ou 10 au niveau du DISC entraîne l'activation des caspases effectrices et l'apoptose.

Les voies en aval des récepteurs tyrosine kinases (RTK) favorisent la prolifération cellulaire et régulent négativement la voie intrinsèque, en partie par la phosphorylation des protéines BCL-2. Les récepteurs TNFR et TRAIL peuvent activer NF-κB, qui active la transcription des gènes anti-apoptotiques dans le noyau, atténuant ainsi la mort cellulaire et favorisant la survie.

Les cellules immunitaires produisent des granzymes, qui sont des protéases à sérine qui induisent l'apoptose dans les cellules cibles, et la perforine, qui forme des pores dans les cellules cibles pour médier la mort cellulaire induite par les granzymes.

Enfin, les voies de réponse aux dommages de l'ADN et de réponse au stress cellulaire activent finalement des gènes pro-apoptotiques qui induisent la mort cellulaire, en plus de TP53.

RE, réticulum endoplasmique ; TK, tyrosine kinase.

1.7. Perte de tolérance et maladies monogéniques associées

Les maladies auto-immunes se développent à la suite d'une rupture de tolérance, centrale ou périphérique. Des lymphocytes T auto-réactifs ou des lymphocytes B reconnaissant des antigènes du soi et pouvant sécrétés des auto-anticorps ne sont plus contrôlés. Si l'apparition de manifestations auto-immunes est multifactorielle, certains défauts monogéniques sont

responsables d'une perte de tolérance et de déficits immunitaires avec auto-immunité. Les principaux déficits sont décrits dans le Tableau 1 ³.

Tableau 1: Exemples de gènes causant des manifestations auto-immunes par rupture des mécanismes de tolérance ³.

Gènes mutés	Mode de transmission	Maladie	Mécanisme conduisant à l'auto-immunité	Type de tolérance impactée
<i>AIRE</i>	AD, AR	APECED	Sélection négative des T auto-réactif défectueuse par absence d'expression des autoantigènes dans le thymus, dont l'expression est régulée par le gène <i>AIRE</i>	Centrale
<i>CTLA-4</i>	AD	CHAI	TReg déficients, perte d'homéostasie par manque d'expression du checkpoint inhibiteur CTLA-4	Périphérique
<i>CD25</i>	AR	IPEX-like	TReg déficients	Périphérique
<i>FoxP3</i>	XLR	IPEX	TReg déficients	Périphérique
<i>FAS</i>	AD ou Smu	ALPS	Apoptose défectueuse	Périphérique
<i>FASL</i>	AD	ALPS-like	Apoptose défectueuse	Périphérique

AD : autosomal Dominant / *AR* : Autosomal récessif / *XLR* : récessif lié à l'X / *Smu* : mutation somatique / *CHAI* : *CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration* / *APECED* : Polyendocrinopathie auto-immune / *IPEX* : Polyendocrinopathies et entéropathies liées à l'X / *ALPS* : syndrome lymphoprolifératif auto-immun

Dans la suite des paragraphes, nous détaillerons les différentes maladies présentes dans le tableau.

APECED (Polyendocrinopathie auto-immune)

Ce syndrome est causé par des mutations du gène *AIRE* (Autoimmune Regulator) ¹⁷.

AIRE est un facteur de transcription exprimé par les cellules épithéliales médullaires thymiques et pilote l'expression de nombreux antigènes spécifiques des tissus périphériques. L'expression thymique de ces auto-antigènes permet une sélection négative des lymphocytes auto-réactifs ayant une affinité élevée pour ces auto-antigènes ¹⁸.

Ainsi, les patients porteurs de mutations du gène *AIRE* présentent une tolérance centrale défectueuse et développent une polyendocrinopathie auto-immune. Ce syndrome se manifeste par une candidose cutanéomuqueuse, et la destruction auto-immune d'un nombre variable d'organes endocriniens. Le diagnostic est posé si deux des symptômes suivants sont trouvés : candidose, hypoparathyroïdie et insuffisance corticosurrénale. Les patients peuvent également développer une hépatite auto-immune, une malabsorption intestinale, une alopecie ou un vitiligo ^{17, 19}.

IPEX (Polyendocrinopathies et entéroopathies liées à l’X)

FoxP3 (Forkhead box P3) est un facteur de transcription fortement exprimé par les TReg, essentiel à leur fonctionnement et donc au maintien de la tolérance périphérique. Le gène *FoxP3* se situe sur le chromosome X. Les polyendocrinopathies et entéroopathies liées à l’X (IPEX) sont associées à une transmission récessive par mutation hémizygotés délétères de *FoxP3*^{20, 21}. L’IPEX est un trouble immunologique caractérisé par l’apparition dans la petite enfance d’une diarrhée sévère due à une entéroopathie, un diabète de type 1 et une dermatite. D’autres symptômes peuvent également inclure une hypothyroïdie, une anémie hémolytique auto-immune, une thrombocytopénie, une lymphadénopathie, une hépatite et une néphrite. Ce syndrome peut être fatal avant l’âge de 2 ans s’il n’est pas traité de manière agressive. Les options thérapeutiques à long terme comprennent l’immunosuppression et la greffe de cellules souches hématopoïétiques²².

Un syndrome similaire est causé par des mutations récessives de *CD25*. Ce récepteur de l’interleukine-2 permet de transmettre les signaux d’activation et de prolifération aux lymphocytes T. Ce récepteur est constitutivement exprimé par les TReg. Il sera également progressivement exprimé par les cellules T après activation. L’expression de *CD25* est clé dans le maintien de la tolérance au soi²³.

ALPS-FAS (Syndrome lymphoprolifératif autoimmun lié à FAS)

FAS (CD95) est un récepteur de mort cellulaire permettant de déclencher une voie apoptotique par liaison à son ligand FASL. En cas de déficience en FAS, les patients présentent un défaut d’apoptose des lymphocytes en périphérie, d’où la présence d’organes lymphoïdes secondaires hypertrophiés²⁴.

Au niveau clinique, les patients présentent des splénomégalies, des hépatomégalies, des adénopathies, des lymphocytoses, des hypergammaglobulinémies et des cytopénies²⁵.

Au niveau biologique, les patients présentent des taux plasmatiques de vitamine B12, IL-10 et FASL élevés, ainsi qu’un excès de lymphocytes T double négatifs (cellules définies par les marqueurs TCRab+ CD4- CD8-, CD45RA+, CD57+)²⁵.

Des mutations d’autres acteurs des voies d’apoptose (FASL, FADD, caspase 8...) peuvent aboutir à une apoptose défectueuse et des syndromes semblables à l’ALPS-FAS^{26, 27, 28}.

2. Rôle des checkpoints dans la réponse immunitaire

Les checkpoints immunitaires sont un ensemble de récepteurs ayant une influence sur la réponse immunitaire. Ces récepteurs sont des molécules de co-stimulation (checkpoints activateurs) ou de co-inhibition (checkpoints inhibiteurs). Elles sont essentielles soit pour déclencher une réponse cellulaire soit pour assurer le maintien de la tolérance au soi.

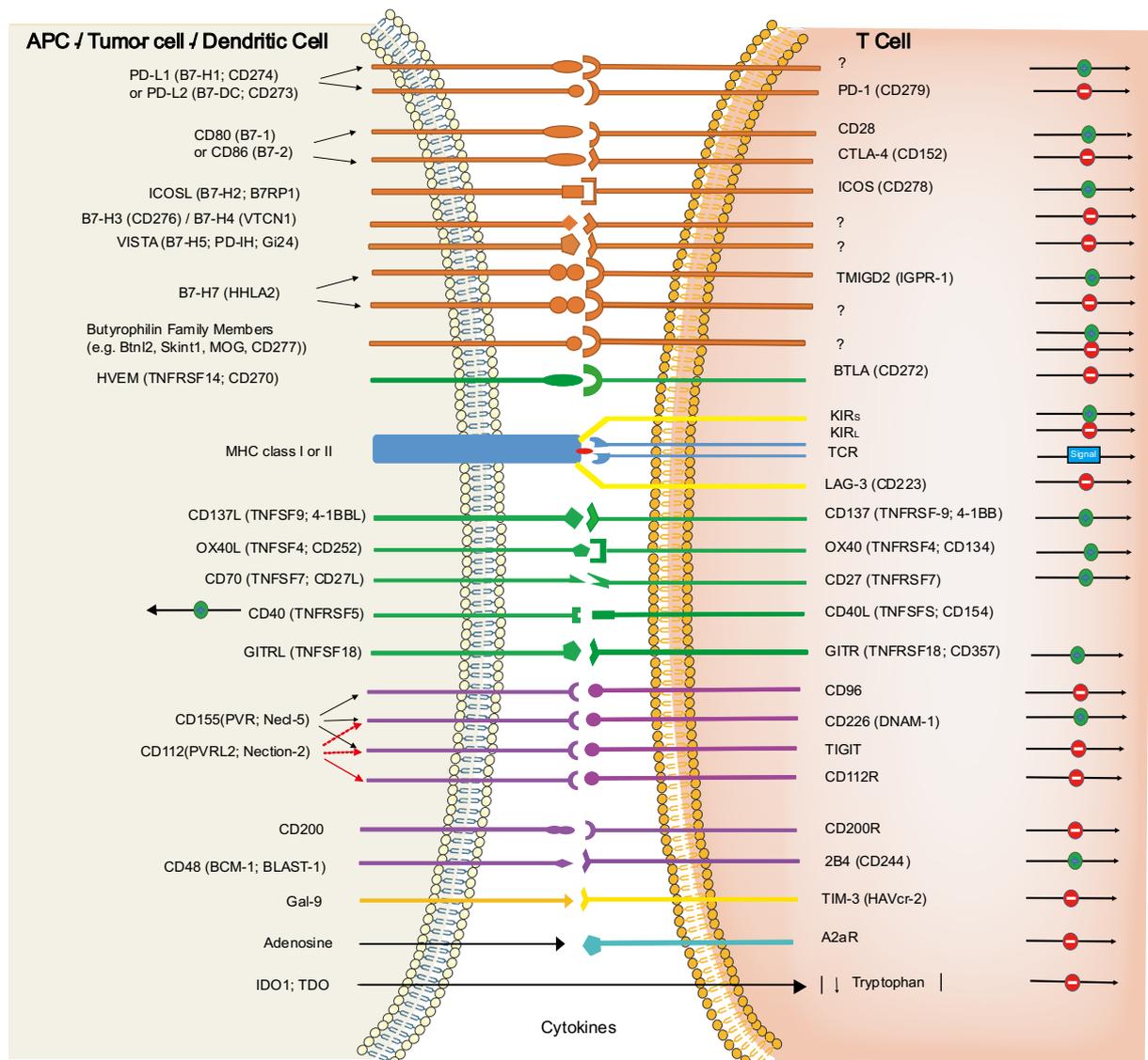


Figure 5: Aperçu non exhaustif des différents checkpoints immunitaires et de leurs ligands ²⁹.

L'effet activateur ou inhibiteur des différents checkpoints sur le lymphocyte T sont précisés par les flèches (-) rouges (inhibiteur) ou (+) vertes (activateur).

Comme les ligands CD86/CD80 et leurs récepteurs CD28/CTLA-4, ces protéines permettent de transduire les seconds signaux nécessaires au développement ou à l'arrêt de la réponse immunitaire ³.

Il existe un grand nombre de checkpoints immunitaires et leur liste n'est pas connue de façon exhaustive. La Figure 5 illustre la complexité et la diversité de ces récepteurs, ainsi que le signal envoyé (co-stimulation ou inhibition) quand ces récepteurs se lient à leurs ligands ²⁹. L'ensemble des checkpoints n'y est pas représenté, une liste plus exhaustive peut être consultée dans le « *SnapShot: APC/T Cell Immune Checkpoints* » de Shrager et Kiel ³⁰.

Les checkpoints peuvent être regroupés en familles selon leurs structures protéiques. On distingue notamment deux grandes familles : la superfamille des immunoglobulines et la superfamille des récepteurs TNF.

2.1. La superfamille des immunoglobulines

Cette famille comprend les récepteurs de la famille B7/CD28 représentée en orange dans la Figure 5, mais également les récepteurs tels que TIGIT, TIM3 et LAG3 (en violet et jaune sur la Figure 5). Elle est composée de couples récepteurs/ligands permettant une co-inhibition (PD-1/PDL-1-2, CTLA-4/CD80-86, TIGIT/CD112 ou CD155, TIM3/Gal-9) et de récepteurs/ligands de co-stimulation (CD28/CD80-86, ICOS/ICOSL, CD226/CD155) ³¹.

Les membres de cette superfamille ont un domaine extracellulaire qui a une structure IgV semblable aux immunoglobulines et un domaine cytoplasmique qui permet de transduire le signal via des motifs tyrosines comme les ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation), ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif). Ces motifs permettent d'activer différentes voies de signalisation de kinases (SHP, ..) et de transduire le signal de co-stimulation ou au contraire d'inhiber la voie de signalisation ³¹.

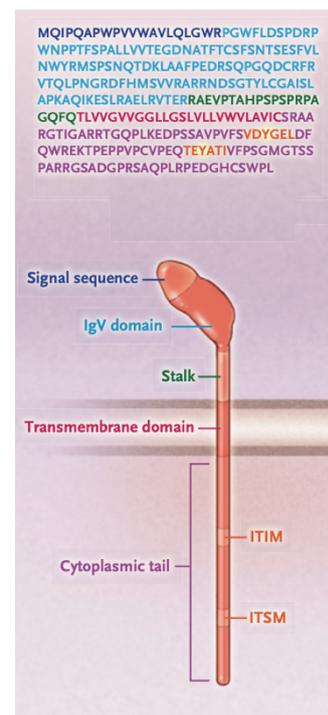


Figure 6: Structure et séquence de PD-1, un exemple de récepteur de la superfamille des immunoglobulines ³².

A titre d'exemple, la séquence d'acides aminés et la structure de PD-1 est représentée en Figure 6³². La séquence signal est représentée en violet, le domaine semblable à la région variable des immunoglobulines (IgV) en bleu clair, le segment transmembranaire en rouge et le motif d'inhibition à base de tyrosine (ITIM) et le motif de commutation à base de tyrosine (ITSM) en orange³².

2.2. La superfamille des récepteurs TNF

BTLA (B and T cell lymphocyte attenuator) est un checkpoint immunitaire qui se situe à la frontière entre la superfamille des immunoglobulines car il possède un domaine extracellulaire IgV, mais BTLA se lie à des ligands (HVEM, LIGHT) appartenant à la superfamille des récepteurs TNF (tumeur necrosis factor).

Cette famille comprend des TNF récepteurs et leurs ligands, et sont principalement associés à des signaux de co-stimulation, ils sont représentés en vert sur la Figure 5 (OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, GITR/GITRL, CD27/CD70, CD40/CD40L).

Les membres de cette superfamille sont structurés en trimère. Chaque monomère forme une structure composée de feuillettes qui définissent le domaine d'homologie du TNF (THD). Les monomères individuels s'auto-assemblent en homo-trimères non covalents. Malgré une homologie de séquence faible à modérée, tous les membres du TNFSF présentent une homologie structurelle élevée³³.

Les membres de la superfamille des récepteurs du TNF activent diverses fonctions cellulaires, de la production d'interférons de type 1 à la modulation de la survie des cellules T activées par l'antigène³⁴.

Dans cette famille de récepteurs du TNF, il n'y a pas que des checkpoints immunitaires mais aussi des récepteurs de morts et leurs ligands comme TRAIL, FAS ou FASL par exemple.³³

2.3. Checkpoints & cancer

Lorsqu'une cellule devient cancéreuse, le système immunitaire est capable de reconnaître et de détruire cette cellule. L'immunité anti-tumorale peut se mettre en place lorsque des lymphocytes T s'activent après reconnaissance d'antigènes tumoraux. Pour assurer leur survie, certaines cellules tumorales développent des mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire, comme décrit à la Figure 7³. Ainsi la cellule tumorale peut ne pas être reconnue par les lymphocytes T (absence de production d'antigènes tumoraux ou de molécules du CMH)

ou inhiber l'activation des lymphocytes T en exprimant les ligands des récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules T et en sécrétant des cytokines immunosuppressives comme le TGF- β par exemple ³.

Vu l'importance du système immunitaire en cancérologie, différentes stratégies thérapeutiques se concentrent sur la stimulation de l'immunité anti-tumorale du patient.

Diverses immunothérapies ont été développées : transfert au patient d'anticorps ou de cellules T spécifiques de la tumeur (autologues ou exprimant des CAR : chimeric antigen receptor), des vaccins, ou encore des anticorps bloquant les récepteurs immunitaires (anti-CTLA-4 approuvé par la FDA en 2011 contre le mélanome, anti-PD-1 en 2014).

Cette dernière option est très efficace lorsque le patient répond au traitement (25 à 40% des cas) ³. Cependant, les checkpoints immunitaires ont un rôle clé dans la tolérance au soi. Ainsi les thérapies de blocage de ces récepteurs entraînent souvent des effets indésirables et l'apparition de symptômes auto-immuns ou inflammatoires : vitiligo, hépatite, diabète auto-immun, vascularite, thyroïdite, thrombopénie, anémie... ³⁵ qui peuvent conduire à la suspension du traitement et à la rechute cancéreuse.

2.4. Mutations de checkpoints & auto-immunité

De façon similaire, des patients présentant des mutations dans les gènes codant des récepteurs immunitaires sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires. Si certains de ces déficits immunitaires sont décrits depuis longtemps, d'autres ont été découverts récemment (déficiences en PD-1³⁶ ou en CD28³⁷ en 2021).

Le Tableau 2 illustre les mutations dans des gènes codant pour des récepteurs immunitaires et conduisant à des déficits immunitaires chez l'Homme ³⁸.

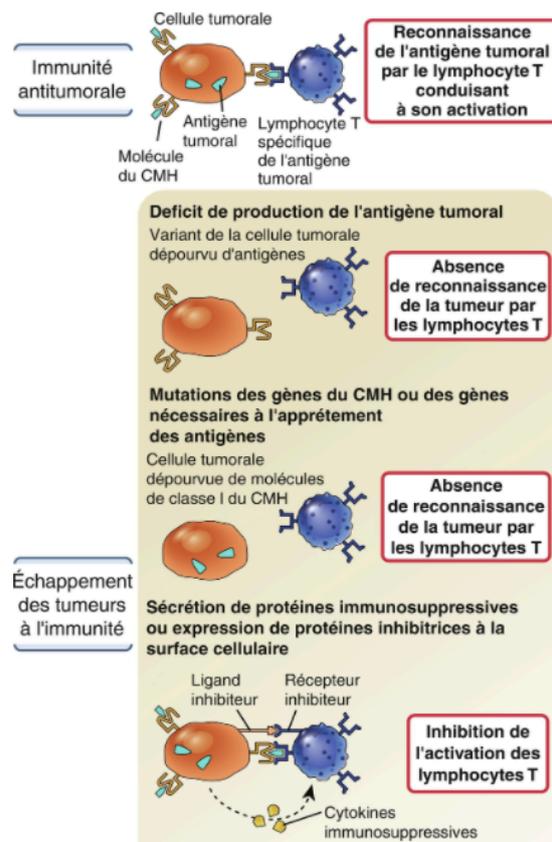


Figure 7: Echappement des tumeurs aux réponses immunitaires ³.

Name	Locus	OMIM Pheno.	inheritance	Immunophenotype and Ig levels	Main clinical symptoms	Ref.
4-1BB	1p36.23	NA	AR	normal T and B circulating cells, Low IgG, low IgA, poor responses to T cell-dependent and T cell independent antigens, decreased T cell proliferation, IFN γ secretion, cytotoxicity	EBV lymphoproliferation, B cell lymphoma, chronic active EBV infection	39
OX40	1p36.33	615593	AR	normal number of T cells, low antigen specific memory CD4+; normal number of B cells, low memory B cells; normal Ig	Impaired immunity to HHV8, Kaposi's sarcoma	40
CD28	2q33.2	NA	AR	Normal distribution of lymphocytes subsets	Extreme susceptibility to HPV cutaneous infection	36
CTLA-4	2q33.2	616100	AD, incomplete penetrance	Low circulating B and T cells, defective TReg functions.	Autoimmune cytopenia, enteropathy, interstitial lung disease, extra-lymphoid lymphocytic infiltration, recurrent infections	41 42
ICOS	2q33.2	607594	AR	Low Ig, normal T and B cells	Recurrent infections, autoimmunity, gastroenteritis, granulomas	43 44 45
PD-1	2q37.3	NA	AR	V δ 2+ γ δ T cells, MAIT, CD56 bright NK cells were significantly reduced, severe impairment of IFN- γ and TNF production	Lymphoproliferative syndrome, susceptibility to mycobacterial infection, pulmonary autoimmunity in the only patient described	46
TIM3	5q33.3	618398	AR	In B cells, Increased inflammasome activity due to defective checkpoint signaling	Panniculitis, HLH, polyclonal cutaneous T cell infiltrates or T cell lymphoma	47 48
CD27	12p13.31	615122	AR	Normal T cells, no memory B cells, hypogammaglobulinemia; poor Ab responses to some vaccines/infections	Features triggered by EBV infection, HLH, aplastic anemia, low iNKT cells, B-lymphoma	49 50 51
CD70	19p13.3	618261	AR	Normal number, low TReg, poor activation and function. Decreased memory B cells, hypogammaglobulinemia	poor Ab responses to some vaccines/infections. EBV susceptibility, Hodgkin lymphoma; autoimmunity in some patients	52 53
CD40	20q13.12	606843	AR	Normal	Neutropenia, opportunistic infections, gastrointestinal and biliary tract and liver disease, Cryptosporidium infections	54 55 56
ICOSL	21q22.3	NA	AR	Low numbers of T and B cells, low Ig, neutropenia	Viral and bacterial recurrent infections, neutropenia	57
CD40L	Xq26.3	308230	XLR	T normal to low, sIgM+IgD+ naïve B cells present; IgM normal or high, other Ig isotypes low, memory B cells absent	Severe and opportunistic infections, idiopathic neutropenia; hepatitis and cholangitis, Cryptosporidium infections, cholangiocarcinoma; autoimmune blood cytopenias; peripheral neuroectodermal tumors	58 59

Tableau 2 : Déficiences génétiques en checkpoints immunitaires décrites chez l'Homme

3. CTLA-4

Parmi ces checkpoints immunitaires, nous nous intéresserons plus particulièrement à CTLA-4 dans la suite de ces travaux. Une description plus approfondie de ce checkpoint immunitaire inhibiteur est donnée dans ce chapitre.

3.1. Description générale

Le gène *CTLA-4* se situe sur la bande q33 du chromosome 2 et se compose de quatre exons, qui codent une petite protéine de 223 acides aminés, soit 24,6 kDa. L'exon 1 code le peptide signal et une partie du domaine extracellulaire, l'exon 2 le domaine de liaison aux ligands, l'exon 3 le domaine transmembranaire et l'exon 4 le domaine intracellulaire. CTLA-4 forme des homodimères. La région extracellulaire est caractérisée par un seul domaine de type V d'immunoglobuline (Ig) et contient un motif MYPPPY qui est essentiel pour la liaison à CD80 et CD86, ainsi que le site de dimérisation. Le motif AYVKM est situé dans le domaine cytoplasmique qui s'avère essentiel pour la transendocytose et la cascade de recyclage de CTLA-4 ⁶⁰.

3.2. Signalisation inhibitrice de CTLA-4

CTLA-4 régule l'activation des lymphocytes T par plusieurs mécanismes non mutuellement exclusifs, ils sont schématisés et expliqués à la Figure 8 ⁶¹.

Les mécanismes proposés sont la compétition des ectodomains avec CD28 pour la liaison aux molécules CD80/CD86 et la perturbation de sa localisation au niveau de la synapse immunologique, la modulation de la signalisation du TCR par la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la tyrosine phosphatase SHP-2 ^{61, 62}. CTLA-4 peut aussi interférer avec la composition des radeaux lipidiques et la régulation de leur trafic. Enfin CTLA-4 peut permettre l'augmentation de la motilité des cellules T conduisant à des périodes de contact réduites entre les lymphocytes T et les APC ^{61, 62}.

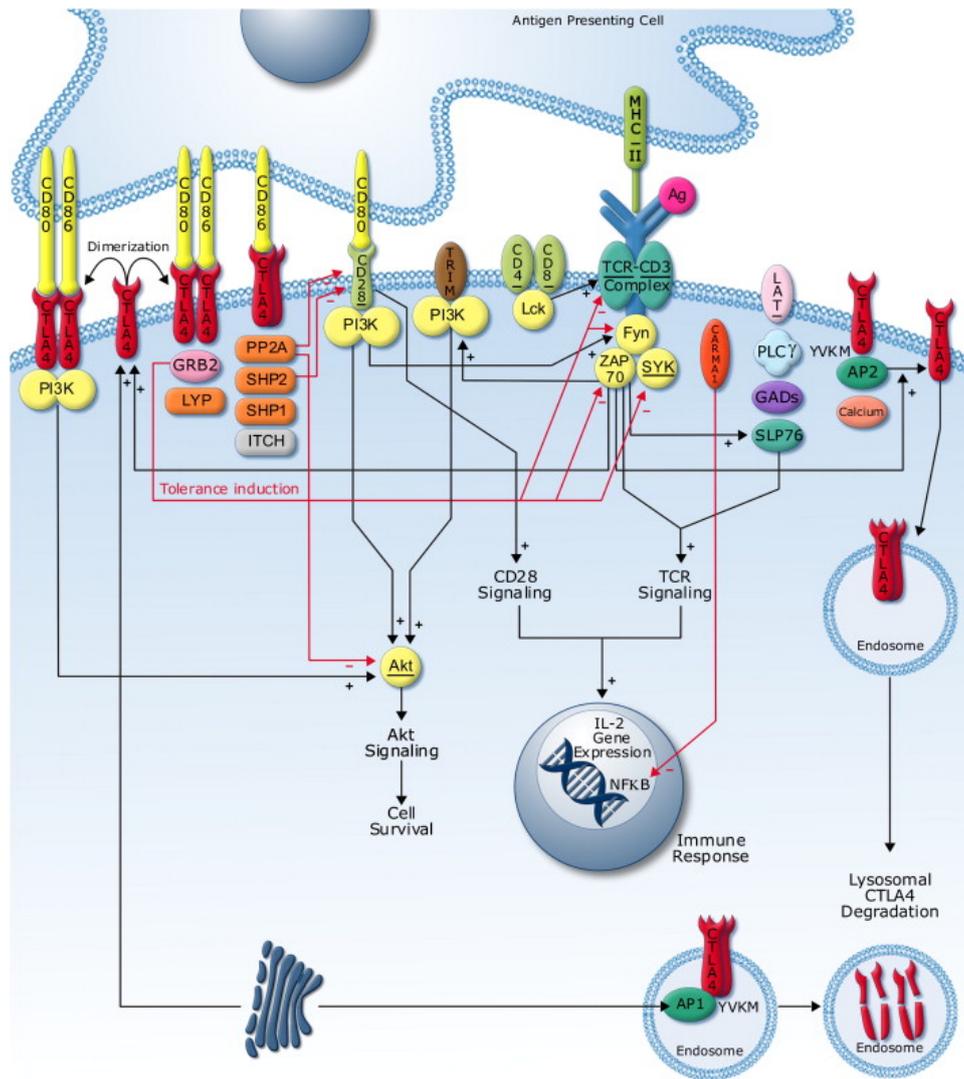


Figure 8: Schéma des modèles de signalisations induites par CTLA-4 dans le lymphocyte T ⁶¹

CTLA-4 régule l'activation des lymphocytes T par plusieurs mécanismes, tels que la compétition ectodomaine avec CD28 pour la liaison aux ligands CD80/CD86, ce qui entraîne le blocage de la formation du complexe CARMA1 médiée par CD28 et l'inhibition subséquente de la signalisation NF-κB. Un autre mécanisme de l'activité inhibitrice de CTLA-4 implique des interactions directes avec le complexe TCR-CD3 au niveau de la synapse immunologique et des protéines impliquées dans la signalisation en aval après l'activation du TCR, via son association avec les tyrosine phosphatases SHP1 et SHP2 et la sérine/thréonine phosphatase PP2A. SHP1 et SHP2 déphosphorylent les protéines de signalisation du TCR, tandis que PP2A cible les résidus phosphosérine/thréonine et inhibe l'interaction CD8-PI3K et Akt. L'expression de surface de CTLA-4 et le trafic intracellulaire sont contrôlés par AP-1, qui transporte l'excès de CTLA-4 du Golgi vers les compartiments lysosomaux pour la dégradation, et par AP-2, qui régule l'endocytose au niveau de la membrane plasmique.

CTLA-4 : antigène cytotoxique de lymphocyte T 4 ; CARMA1 : CARTE-MAGUK1 ; NF-κB : facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des cellules B activées ; TCR : récepteur des cellules T ; SHP1 et 2 : Src homologie région 2 domaine contenant la phosphatase-1 et 2 ; PP2A : protéine phosphatase 2A ; PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinase ; AP-1 : Protéine activatrice 1.

3.3. Trafic vésiculaire de CTLA-4

La transendocytose est un mécanisme important pour la fonction inhibitrice de CTLA-4. Les Treg ou les lymphocytes T effecteurs, exprimant CTLA-4, peuvent ainsi capturer les ligands

CD80 et CD86 des APC par transendocytose ^{63, 64}. Les ligands sont alors retirés de la membrane des APC et dégradés à l'intérieur de la cellule exprimant CTLA-4 ⁶³. Une quantité suffisante de CTLA-4 disponible à la surface des TReg est requise pour l'élimination de ses ligands (CD80/CD86) et l'inhibition des réponses des lymphocytes T.

De plus, CTLA-4, exprimé de façon constitutive par les TReg, est internalisé et recyclé de façon constante. Cette internalisation, comme la transendocytose, est contrôlée par la clathrine adapter protein-2 (AP2) qui interagit avec le motif YVKM dans la queue cytoplasmique de CTLA-4. Après internalisation, CTLA-4 peut être soit recyclé vers la membrane plasmique (grâce à LRBA et DEF6 notamment), soit dégradé dans le lysosome après internalisation (grâce au complexe AP-1) ^{60, 65}. Le trafic vésiculaire de CTLA-4 est illustré sur la partie gauche de la Figure 9 ⁶⁵.

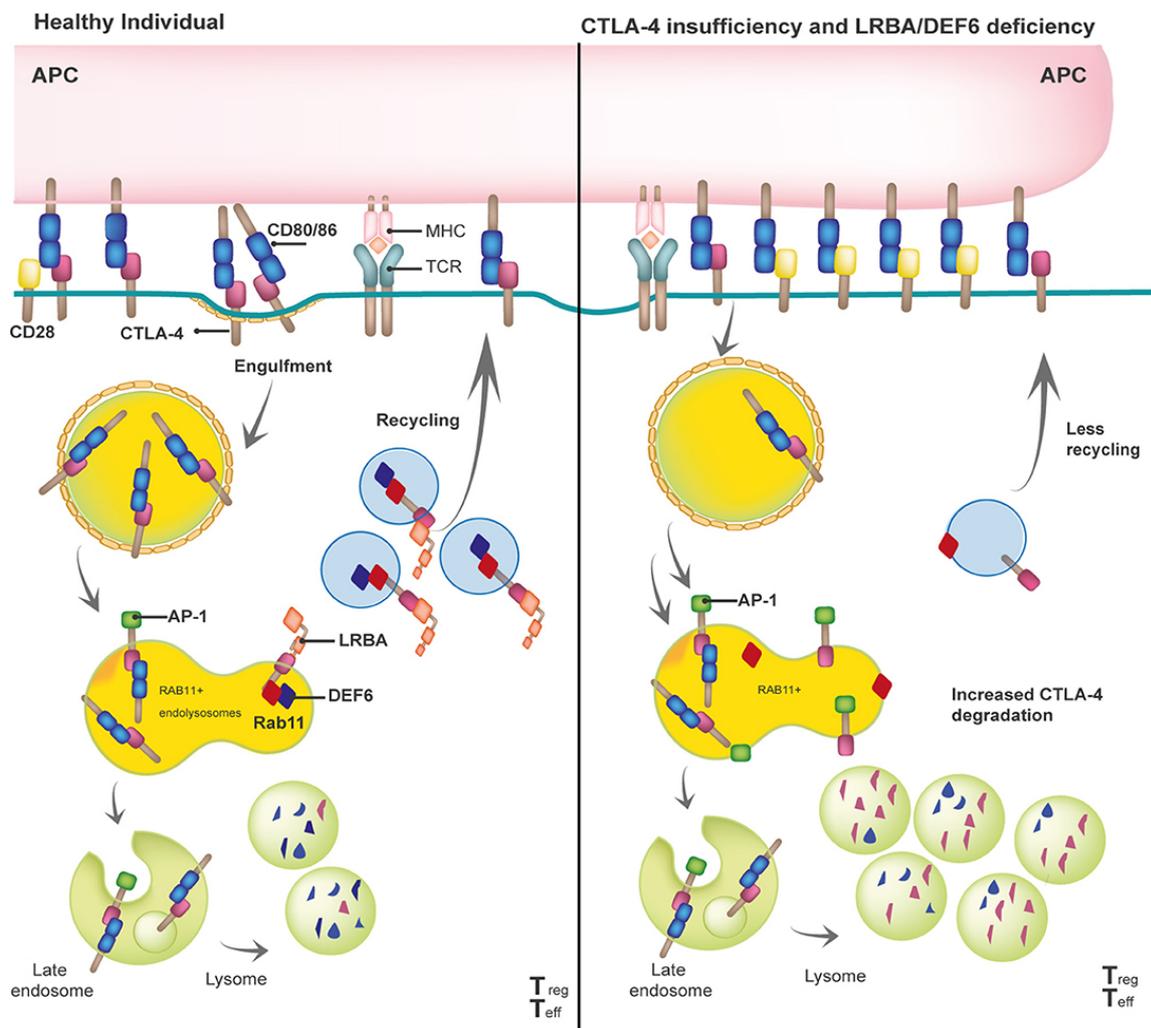


Figure 9: Trafic vésiculaire de CTLA-4 chez un individu sain (gauche) et chez un individu atteint d'une déficience en LRBA ou DEF6 (droite). ⁶⁵.

Des mutations dans les gènes codant des protéines essentielles au recyclage en CTLA-4 peuvent entraîner des déficiences en CTLA-4 illustrées dans la partie droite de la Figure 9 et détaillées au paragraphe 3.4 ⁶⁵.

3.4. Déficits en CTLA-4 chez l'humain

3.4.1. Mutations hétérozygotes de *CTLA-4*

Des polymorphismes nucléotidiques (SNP) de *CTLA-4* ont rapidement été associés avec des manifestations auto-immunes (diabète de type 1, maladie de Basedow, thyroïdite auto-immune, lupus...) mais sans validation fonctionnelle ^{66,67}. En 2014, les premières descriptions de mutations hétérozygotes perte de fonction de *CTLA-4* sont publiées ^{41,42}. Il y est décrit des patients avec des déficits immunitaires communs variables (DICV) ou un déficit sélectif en IgA. Ils présentent également des infections récurrentes des voies respiratoires en lien avec une hypogammaglobulinémie, des cytopénies auto-immunes, des entéropathies auto-immunes et/ou des maladies pulmonaires infiltrantes granulomateuses. Au niveau cellulaire, les cellules T des patients sont lymphoprolifératives. Les TReg ont une expression diminuée de CD25 et du facteur de transcription FoxP3. Les sous-types de cellules B sont aussi anormaux avec une accumulation de cellules B auto-réactives CD21^{low}, accompagnés d'une diminution du nombre de cellules B circulantes. Ce syndrome a été nommé CHAI pour CTLA4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration. ⁴¹

Les souris CTLA-4 ^{-/-} sont viables mais développent très tôt un syndrome lymphoprolifératif auto-immun léthal, les souris CTLA-4 ^{-/wt} ne présentent quant-à-elles, pas de phénotype particulier ^{68,69}.

Le mode de transmission est autosomal dominant et la pénétrance est incomplète. Il existe donc des porteurs sains de mutations *CTLA-4* hétérozygotes qui ne développeront pas de symptômes cliniques.

3.4.2. Mutations récessives de *DEF6*

DEF6 est impliqué dans le trafic de CTLA-4. Ainsi des mutations récessives de *DEF6* peuvent perturber le trafic de ce checkpoint. DEF6 est aussi connu sous le nom de IBP (IRF4 binding protein) ou encore SLAT (SWAP-70-like adaptator of T cells). DEF6 est un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) ⁷⁰.

Les GEF catalysent l'activation des Ras homology GTPases (Rho-GTPases) en permettant le passage de la forme inactive liée à la GDP à la forme active liée à la GTP ⁷¹. Les Rho-GTPases ont un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus cellulaires, et notamment la formation du cytosquelette.

En 2019 et 2021, des mutations récessives du gène *DEF6* sont rapportées chez 3 familles consanguines non apparentées ^{72,73}. Les patients avec une déficience en *DEF6* présentent des infections récurrentes à l'EBV (virus d'Epstein-Barr) et des manifestations auto-immunes systémiques à début pédiatrique ⁷³. Le trafic de CTLA-4 chez ces patients semble impacté par la diminution de la protéine *DEF6*. En effet les mutations de *DEF6* perturbent le recyclage de CTLA-4, qui est moins exprimé à la surface des cellules T, ce qui entraîne une moins bonne transendocytose de ses ligands CD80/CD86. Ce défaut de recyclage est expliqué par les auteurs par une interaction altérée entre *DEF6*, un GEF, et *RAB11*, une GTPase essentielle des vésicules de recyclage de CTLA-4. Ainsi les cellules KO *DEF6* présentent moins de vésicules CTLA-4+ *RAB11*+ et l'interaction physique entre *DEF6* et *RAB11* est réduite, suggérant le rôle de *DEF6* dans le recyclage de CTLA-4 ⁷². Ces données sont également renforcées par le traitement avec succès d'un des patients *DEF6* par abatacept (CTLA-4-Ig).

3.4.3. Mutations récessives de *LRBA*

L'importance du trafic de CTLA-4 à la surface membranaire est aussi illustrée par les déficiences génétiques en *LRBA*. En 2012, le premier patient porteur d'une mutation récessive de *LRBA* est décrit ⁷⁴. Plus tard, l'implication de *LRBA* dans le trafic de CTLA-4 est analysée de façon plus détaillée ⁷⁵, et des patients atteints de déficience en *LRBA* sont traités avec succès par abatacept (CTLA-4-Ig). *LRBA* est une protéine de la famille des protéines BEACH (Beige and Chediak-Higashi), et intervient dans le trafic vésiculaire. Les autres membres de la famille BEACH sont détaillés au chapitre 4.

Dans l'étape de recyclage de CTLA-4, *LRBA* joue un rôle important. Lo et al ont montré que *LRBA* co-localise et interagit avec CTLA-4 dans les vésicules endosomales avec CTLA-4 via son motif YVKM ⁷⁵. L'interaction entre *LRBA* et CTLA-4 permet d'éviter la dégradation du récepteur dans les lysosomes et déclenche son recyclage vers la membrane plasmique.

3.4.4. Comparaison des déficiences en CTLA-4 connues

La comparaison entre ces trois déficiences (*CTLA-4*, *DEF6*, *LRBA*) permet de soulever les différences et les similitudes observées dans ces trois déficits génétiques ⁶⁵.

Une haplo insuffisance en *CTLA-4* causée par une mutation hétérozygote ou des défauts de recyclage causés par des mutations récessives de *LRBA* ou *DEF6*, causent une perte de tolérance et des manifestations auto-immunes variables.

Il existe de légères différences dans les phénotypes cliniques de CTLA-4, LRBA et DEF6, qui pourrait également être liées à des biais de recrutements de ces cohortes (Figure 10). L'insuffisance en CTLA-4 est une maladie autosomique dominante avec une pénétrance clinique d'environ 70 %. En revanche, une transmission autosomique récessive et des niveaux élevés de pénétrance sont observés pour les déficiences en LRBA et DEF6.

Bien que leurs principaux mécanismes immunologiques semblent converger en termes d'expression à la surface cellulaire et de disponibilité de CTLA-4 pour la régulation des cellules T et la fonction des cellules TReg, des caractéristiques supplémentaires sont attendues qui dépendent de l'expression tissu-spécifique et des fonctions physiologiques des trois protéines.

De plus, on ne sait toujours pas pourquoi les individus porteurs de la même mutation – en particulier d'une même famille - ont parfois des présentations cliniques qui varient énormément en ce qui concerne le moment de l'apparition et la gravité de l'atteinte des organes, alors qu'ils se présentent à un âge très similaire avec un modèle identique de caractéristiques cliniques dans d'autres familles. Comme pour d'autres maladies immunitaires, un ensemble de facteurs modificateurs peuvent être en cause, tels que des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) dans les voies de signalisation, les modificateurs épigénétiques, ou des facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle et provoquer cette diversité ⁶⁵.

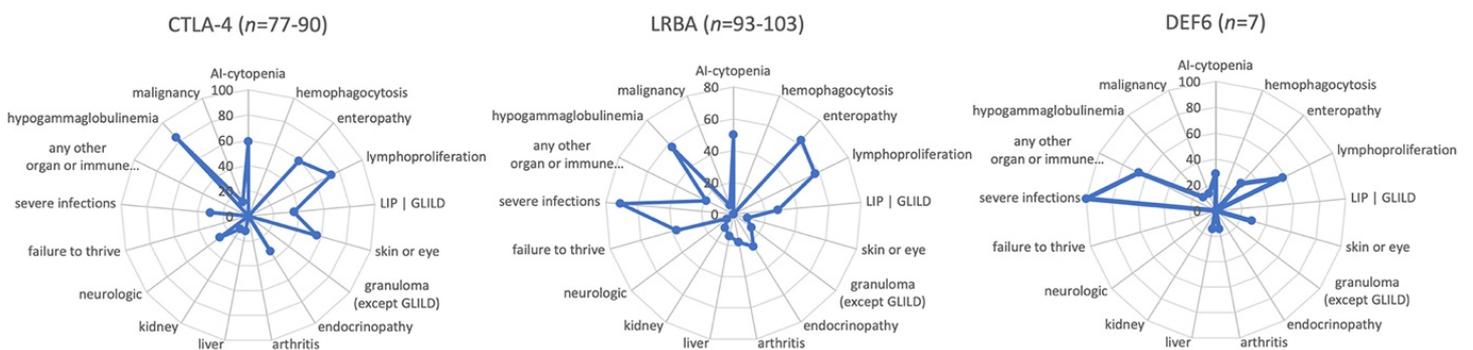


Figure 10: Comparaison des différents symptômes entre les déficits connus en CTLA-4 ⁶⁵.

Les différents symptômes sont visualisés sous la forme d'un kaléidoscope grâce au score de l'activité d'immunodéficiency et de dérégulation (IDDA). Les caractéristiques phénotypiques des maladies indiquées ci-dessus ont été tirées de grandes revues de cohortes publiées (CTLA-4, déficit en LRBA) ou de petites séries de cas de sept patients présentant un déficit en DEF6.

Les abréviations des symptômes sont les suivantes : AI-cytopenia (cytopénie auto-immune) ; LIP (pneumonie interstitielle lymphocytaire) ; GLILD (maladie pulmonaire interstitielle lymphocytaire granulomateuse)

4. Les BEACH protéines

LRBA fait partie de la famille des protéines BEACH. Dans la suite de ce chapitre nous nous intéresserons aux 9 membres qui composent cette famille, à leur fonction ainsi qu'aux maladies associées à des mutations dans les gènes codant ces protéines. Ce paragraphe nous permettra de mettre en avant les similitudes observées parmi les membres de cette famille, et par la suite de décrire NBEAL2, la protéine d'intérêt dans ce projet de thèse.

4.1. Présentation générale

Le domaine BEACH (Beige and Chediak-Higashi) est caractéristique d'une famille de 9 protéines : les BDCPs (BEACH domain containing proteins) ⁷⁶. Impliquées dans le trafic vésiculaire ou les dynamiques membranaires, leurs fonctions exactes demeurent encore méconnues.

A l'exception de NSMAF, les BDCPs sont de grandes protéines, contenant des domaines protéiques relativement uniques à leur famille, rendant la description de leurs fonctions biologiques difficiles par analogie avec d'autres séquences peptidiques ⁷⁷. Elles contiennent différents domaines protéiques (Figure 11) ⁷⁶.

Le domaine BEACH, d'environ 280 aa (acides aminés) est très conservé dans l'ensemble des protéines de la famille, à l'exception de WDR81 ⁷⁶. La structure cristalline du domaine BEACH est assez originale car il contient plusieurs parties hydrophobes qui ne sont pas tout à fait des feuillets β du fait de leur extension particulière. De plus, le domaine BEACH interagit fortement avec le domaine PH (pleckstrin-homology), pourtant faiblement conservé dans la famille des BDCPs ⁷⁷. Les domaines PH-like sont connus pour avoir des fonctions diverses et notamment se lier à des phospholipides, des phospho-tyrosines ou participer à des interactions protéines-protéines ⁷⁸.

Les domaines WD40 répétés peuvent permettre l'assemblage de complexes multiprotéiques, dans lesquels les domaines WD servent d'échafaudage pour les interactions de protéines hétéromères ⁷⁶.

Six des neuf BDCPs contiennent un domaine lectine de type Concanavalline A (ConA). Les lectines se lient aux glucides. Burgess et al. ont proposé que le domaine ConA dans les BDCPs pourrait être impliqué dans la liaison des oligosaccharides associée au trafic et au tri des protéines le long de la voie de sécrétion, en particulier en relation avec les composants de la machinerie de fusion des vésicules ⁷⁹.

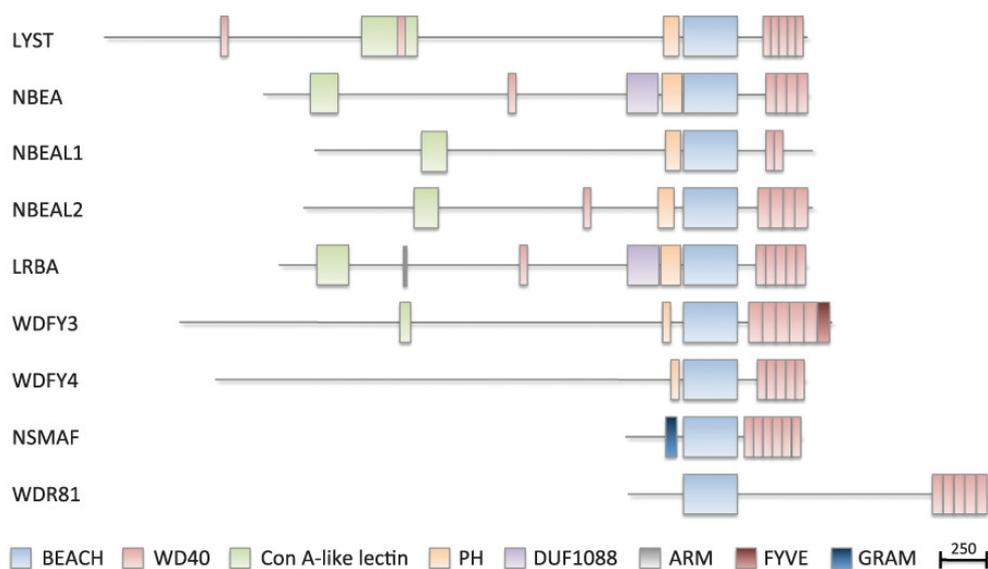


Figure 11: Schéma des protéines de la famille BEACH et de leurs principaux domaines ⁷⁶

Le domaine BEACH est aligné pour les neuf protéines et le schéma est à l'échelle, où la barre d'échelle représente 250 acides aminés. Notez la similitude en nombre et en positions des domaines répétés WD40 suivants et des domaines PH précédant le domaine BEACH dans sept des neuf protéines. D'autres domaines reconnus incluent la lectine de type ConA, les domaines DUF1088, ARM, FYVE et GRAM. ⁷⁶

Chez l'homme, des mutations dans l'une de ces protéines entraînent différentes maladies, avec peu de similarité clinique. De plus, les mutations sur ces grandes protéines ne semblent pas localisées à un seul domaine. Il n'existe pas de « hot-spot » dans le domaine BEACH notamment. Enfin, puisque nous nous intéresserons plus particulièrement aux cellules du système immunitaire, le nombre de transcripts par million a été représenté par sous type cellulaires en fonction des différentes BDCPs (Figure 12, réalisée grâce à l'outil CellTypeScore du site DICE Immunology <https://tools.dice-database.org/celltypescore/>).

Si certains transcripts sont exprimés de façon « ubiquitaire » (LRBA, NBEAL2, NSMAF, WDR81 et LYST sur un moindre niveau) ; d'autres semblent spécifiques de certaines cellules. En effet, WDFY3 est spécifique aux monocytes, WDFY4 quant-à-lui, est très fortement exprimé dans les cellules B naïves. NBEA et NBEAL1 sont les transcripts BDCPs les moins représentés dans les sous populations de cellules immunitaires. Si nous nous attardons plus spécifiquement sur le détail de ce graphe, on peut noter que les transcripts de LRBA sont présents en quantité similaire dans l'ensemble des sous-types cellulaires, à l'exception des monocytes.

Les transcripts de NBEAL2 sont souvent les plus abondants dans les cellules du système immunitaire, mais on peut remarquer qu'ils sont particulièrement exprimés dans les cellules ayant un phénotype mémoire : les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (TH1, TH2, TH17...) ou TReg mémoire ; alors que le nombre de transcripts est plus faible dans les cellules T naïve par

exemple. Cette observation pourrait suggérer un rôle prépondérant de NBEAL2 dans les lymphocytes T mémoires.

On peut également noter que les transcrits de *LYST* sont principalement retrouvés dans les monocytes, les cellules B naïves et les cellules NK. L'importance de *LYST* dans les cellules NK est mentionné au paragraphe suivant.

Enfin, il est notable que les transcrits de *NBEAL2* sont parmi les plus abondants dans les sous-types cellulaires étudiés ici.

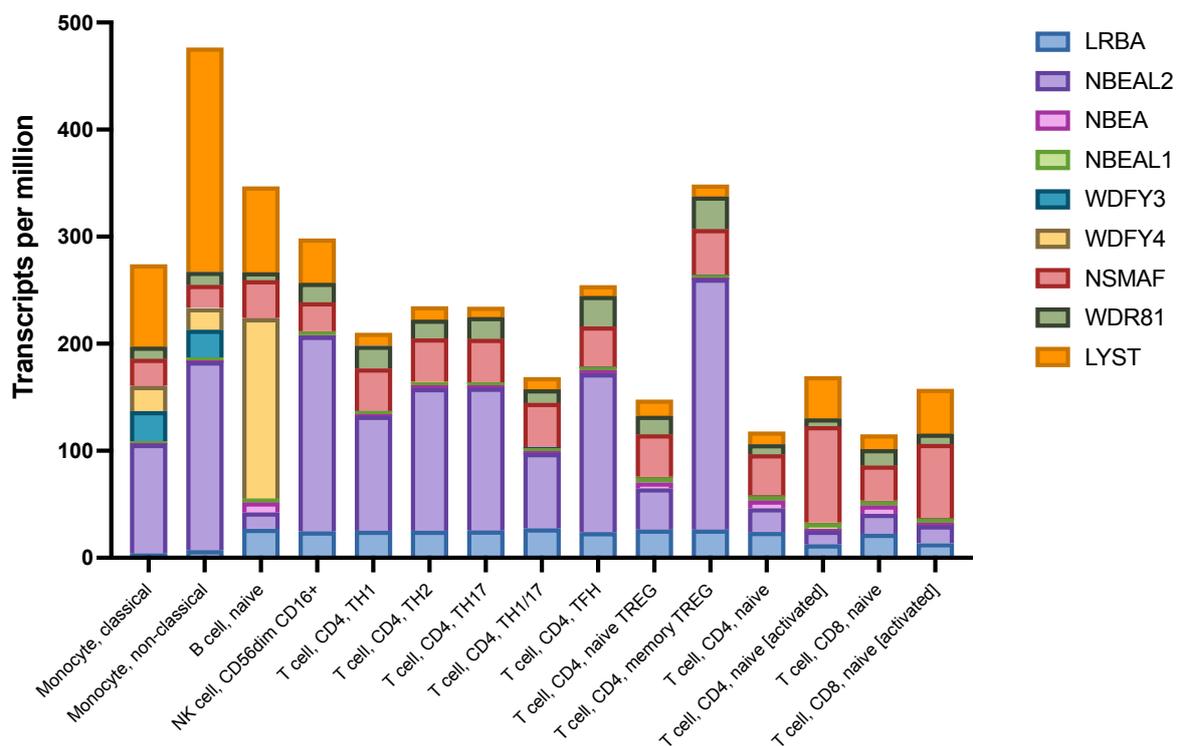


Figure 12: Transcripts par million (TPM) pour l'ensemble des gènes codant des BDCPs, par sous-types cellulaires immunologiques

Les données représentées sur cette figure ont été adaptées de de l'outil CellTypeScore de la base de données DICE Immunology (<https://tools.dice-database.org/celltypescore/>)

4.2. Protéines BEACH et maladies associées

S'intéresser aux différentes protéines de cette famille, peut permettre de mieux comprendre leur implication dans le trafic vésiculaire par analogie. Dans la suite de cette partie, nous étudierons successivement les différents membres de cette famille et les pathologies humaines associées.

LYST

Des mutations récessives du gène *LYST* (lysosomal trafficking regulator) entraînent le syndrome de Chediak-Higashi (CHS) ^{80 81}. Les patients souffrent d'albinisme oculo-cutané partiel, de saignements prolongés, de défauts immunologiques, d'atteintes neurologiques, et sont susceptibles de développer une lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH) ⁸².

Les cellules des patients CHS possèdent moins de lysosomes et ceux-ci sont élargis. Cependant la déplétion de *LYST* dans les cellules humaines n'a pas d'effet sur la fusion des lysosomes avec les endosomes et les autophagosomes, seuls la taille et le nombre de lysosomes sont impactés ⁸³.

Les conséquences fonctionnelles de ces lysosomes anormaux sont observables dans différents sous-types cellulaires. Ainsi les mélanosomes ne sont pas transférés correctement aux cellules épithéliales, causant l'hypo-pigmentation ⁸⁴. Les neutrophiles ont une activité anti-bactérienne diminuée à cause de leurs granules anormaux. La cytotoxicité des lymphocytes T et des cellules NK est diminuée car leur capacité d'exocytose est partielle ⁸⁵. Enfin les plaquettes présentent un défaut de granules denses, conduisant à des troubles de la coagulation, sans pour autant que le nombre de plaquettes soit diminué.

Le modèle murin avec des mutations récessives dans le gène *Beige* récapitule le phénotype clinique humain ⁸⁶.

NBEA

NBEA est un gène candidat pour l'autisme et les troubles neurologiques. En 2018, une cohorte de 24 mutations hétérozygotes de novo ont été décrites comme responsables de troubles neuro-développementaux incluant un retard du développement et/ou une déficience intellectuelle. La moitié des patients présentaient des caractéristiques autistiques et une majorité était sujet à des crises d'épilepsie dès l'enfance ⁸⁷.

NBEA code pour la protéine neurobeachin principalement exprimée dans le cerveau. *NBEA* régule la transmission synaptique en ayant un rôle dans le transport des récepteurs aux neurotransmetteurs vers les synapses et la formation des dendrites ⁸⁸. De plus, en utilisant des neurones KO pour le gène *NBEA*, le rôle des différents domaines de la protéine a récemment été décrit. Ainsi, le domaine PH-BEACH semble suffisant pour rétablir à lui seul la transmission post-synaptique et le nombre normal de dendrites. Le domaine Armadillo (ARM) faciliterait la formation des filopodes et des dendrites ⁸⁹.

Les souris homozygotes *NBEA* KO meurent après la naissance par asphyxie à cause des défauts de transmission synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires des voies respiratoires ⁹⁰.

NBEAL1

Le rôle de la protéine Neurobeachin-like 1 est peu décrit dans la littérature. Des mutations hétérozygotes de *NBEAL1* ont été associées avec un risque accru de développer un cancer du sein ⁹¹ ou un gliome ⁹².

Récemment, NBEAL1 a été décrite comme étant associée au Golgi et ayant un rôle dans le métabolisme du cholestérol. NBEAL1 est exprimée abondamment dans les artères. Une diminution de l'expression de NBEAL1 dans les artères augmente le risque de développer une maladie coronarienne chez l'homme ⁹³. Aucun modèle murin n'est décrit dans la littérature.

WDFY3

WDFY3 (WD repeat and FYVE domain-containing 3), aussi connu sous le nom de Alfy (Autophagy-Linked FYVE) est une protéine essentielle dans les processus d'autophagie ou d'aggégophagie ⁹⁴. WDFY3 interagit notamment avec un récepteur de l'autophagie p62 ⁹⁵.

Wdfy3 a aussi un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité des mitochondries en régulant leur renouvellement par mitophagie, un processus nécessaire au maintien des circuits neuronaux et de la plasticité synaptique. Le déséquilibre de ce processus peut ouvrir la voie à une pénurie d'énergie et avoir des répercussions sur la neurotransmission, particulièrement liée au métabolisme des neurotransmetteurs ^{96, 97}.

Des variants pathogéniques de *WDFY3* sont associés à un risque accru de déficience intellectuelle/retard de développement ⁹⁸, de macrocéphalie ⁹⁹, de microcéphalie ¹⁰⁰ et de troubles neuropsychiatriques, tel que l'autisme ¹⁰¹.

Chez la souris, des mutations homozygotes de *WDFY3* entraîne une létalité périnatale, une macroencéphalie et des défauts de connectivité neuronale dans le cerveau ^{102, 103}.

WDFY4

Des variants délétères du gène *WDFY4* (WD repeat and FYVE domain-containing 4), ont été associés avec une prédisposition au lupus érythémateux disséminé ou à la dermatomyosite amyopathique ^{104, 105}.

Le rôle de WDFY4 dans la pathogénicité du lupus est mal connu mais pourrait être lié à son rôle dans l'autophagie dans les cellules B. Chez la souris, l'inactivation conditionnelle de

WDFY4 dans la lignée B, entraîne une diminution du nombre de cellules B et un défaut de transition des cellules pro à pré-B dans la moelle osseuse. Les réponses anticorps développées par ces souris sont diminuées. Ces cellules B *WDFY4* ^{-/-} présentent un nombre d'autophagosomes plus important et des protéines de la voie d'autophagie non-canonique surexprimées. Ces résultats fournissent un nouveau lien fonctionnel sous-jacent au mécanisme du lupus dans lequel *WDFY4* influence le destin des cellules B via l'autophagie non canonique¹⁰⁶. Récemment le rôle de *WDFY4* dans la présentation croisée des antigènes viraux et tumoraux a également été mis en évidence chez la souris¹⁰⁷. Au cours du processus de présentation croisée, les antigènes viraux ou tumoraux sont présentés aux cellules T CD8⁺ par les cellules dendritiques classiques (cDC1) via leurs molécules MHC de classe I. En utilisant des souris *WDFY4* ^{-/-}, les auteurs ont montré que les souris KO possédaient une population de cellules cDC1 normales et capables de produire de l'interleukine 12 nécessaire à la protection contre des infections à *Toxoplasma gondii*.

Ainsi *WDFY4* ne semble pas avoir d'impact sur l'immunité innée. De plus, *WDFY4* n'est pas nécessaire pour la présentation des molécules MHC de classe II. Cependant, les souris *WDFY4* ^{-/-} n'étaient pas capables de produire une réponse T CD8⁺ spécifique *in vivo* en réponse aux virus de la cowpox et du Nil occidental, ou à induire le rejet d'une tumeur ; révélant le rôle essentiel de *WDFY4* dans la présentation croisée¹⁰⁷.

Le mécanisme proposé est illustré Figure 13¹⁰⁸. Des récepteurs spécifiques aux cellules cDC1, comme CLEC9A, permettent de capturer les antigènes tumoraux et de les envoyer dans les vésicules de recyclage RAB11⁺, où *WDFY4* est très exprimé. *WDFY4* s'ancre à la protéine HSP90AB1 sur les membranes des endosomes et facilite la translocation des antigènes en vue de leur dégradation et leur présentation sur les molécules MHC de classe I aux cellules T CD8⁺¹⁰⁸.

Ce rôle de *WDFY4* dans la présentation croisée n'a pas encore été démontré chez l'homme.

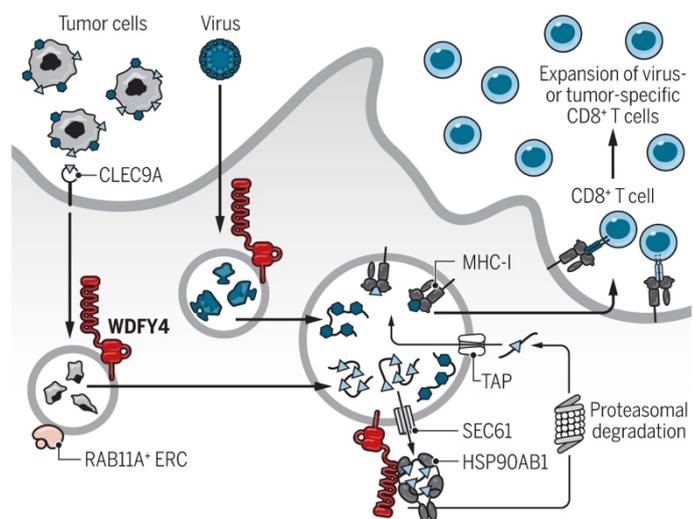


Figure 13: Mécanisme proposé pour expliquer le rôle de *WDFY4* dans la présentation croisée.¹⁰⁸

Des récepteurs spécialisés sur les cDC1, tels que CLEC9A, acheminent l'antigène vers RAB11A+ compartiments de recyclage endosomaux (ERC), où *WDFY4* est fortement exprimé. *WDFY4* ancre HSP90AB1 aux membranes endosomales pour faciliter la translocation de l'endosome au cytosol de l'antigène en vue de sa dégradation, de son chargement sur les molécules MHC-I et de sa présentation aux cellules T CD8⁺.

WDR81

Des mutations récessives de *WDR81* ont été décrites comme responsables d'un syndrome d'ataxie cérébelleuse avec retard mental et déséquilibre (CAMRQ2) ^{109, 110, 111} ; mais aussi dans des cas d'hydrocéphalies ^{112, 113} ou de microcéphalies sévères ¹¹⁴.

WDR81 semble avoir un rôle dans l'autophagie en permettant l'élimination des protéines ubiquitinées et agrégées. L'interaction entre WDR81 et p62, un récepteur d'autophagie, facilite la reconnaissance des protéines Ub et leur élimination. Chez les souris *WDR81* KO, il y a accumulations de protéines ubiquitinées et de p62 dans les neurones corticaux et striataux du cerveau ¹¹⁵. A noter que les rôles de WDFY3 et de WDR81 sont probablement différents dans le processus d'autophagie, même si tous les deux se lient à p62. WDFY3 semble agir en tant que protéine d'échafaudage (scaffold protein) pendant l'interaction entre les effecteurs de l'autophagie et la membrane des phagophores sans être dégradée ⁹⁵. WDR81 ne semble pas perturber ces assemblages et il est dégradé en même temps que p62 et les protéines à dégrader ¹¹⁵.

NSMAF

NSMAF (neutral sphingomyelinase activation-associated factor) est une exception dans la famille des BEACH protéines. Aussi appelée FAN, pour factor associated with N-sphingomyélinase activation, c'est la protéine la plus courte avec seulement 948 AA.

Elle contient les domaines BEACH et WD, mais possède un segment N-terminal très court avant le domaine BEACH et elle ne possède pas de domaine de type ConA. NSMAF est la seule BDCP qui contient un domaine GRAM, remplaçant le domaine de type PH observé dans les autres membres de la famille.

NSMAF a un rôle dans la voie de signalisation du TNF (tumor necrosis factor), car elle interagit avec le domaine NSD (N-Smase activating Domain) de la forme 55 kDa du récepteur du TNF ¹¹⁶. Comme NSMAF transmet le signal du TNF, qui lui-même a de nombreux rôles dans l'immunité, on peut se demander si NSMAF participe à la réponse immunitaire.

NSMAF se lie à CD40, un récepteur de prolifération lymphocytaire ¹¹⁷. De plus, NSMAF a un rôle pro-apoptotique, permettant au TNF de délivrer des signaux à caspase 8 et à d'autres caspases ¹¹⁷. L'interaction entre NSMAF et caspase 2 a récemment été mise en évidence ¹¹⁸. Un effet du signal pro-apoptotique via NSMAF est de rendre les lysosomes perméables, et cette perméabilité est bloquée lorsqu'une forme dominante négative de NSMAF est exprimée ¹¹⁹.

Enfin, le signal TNF via NSMAF stimule la formation de filopodes et la polymérisation de l'actine ¹²⁰.

Comme pour LYST, les cellules déficientes en NSMAF ont des lysosomes agrandis, mais pas de manière aussi extrême ¹²¹. Le rôle de NSMAF (FAN) a aussi été décrit dans la voie non-canonique de l'autophagie, comme schématisé en Figure 14 ^{122, 123}.

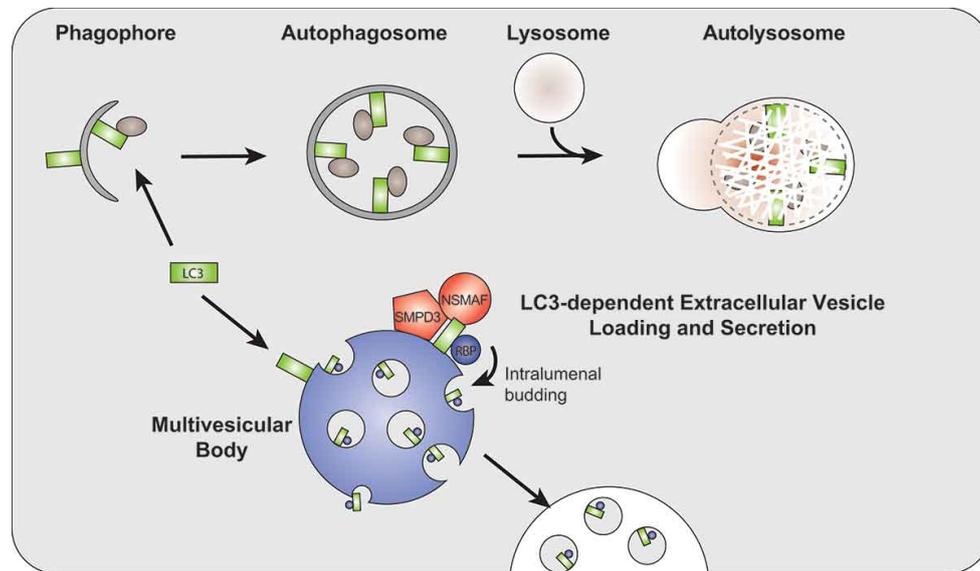


Figure 14: Modèle proposé illustrant le rôle de NSMAF dans la voie non-canonique de l'autophagie ¹²³

Modèle proposé pour la formation et la sécrétion de vésicules extracellulaires dépendantes de LC3. En plus de ses fonctions dans l'autophagie classique, LC3 participe à la sécrétion de protéines et d'ARN dans les vésicules extracellulaires (EV). Ces vésicules sont contenues dans des corps multi-vésiculaires (MVB) et sont libérées sous forme de vésicules extracellulaires lors de la fusion du MVB avec la membrane plasmique. Cette nouvelle voie de sécrétion liée à l'autophagie nécessite la machinerie de conjugaison LC3, le recrutement dépendant de SMPD3 et LC3 de NSMAF.

LRBA

Comme vu précédemment aux paragraphes 3.4.3 et 3.4.4, des mutations récessives de *LRBA* sont responsables d'une déficience de CTLA-4. En l'absence de LRBA, le recyclage de CTLA-4 dans les vésicules RAB11+ n'est plus fait et le checkpoint immunitaire est dégradé dans les lysosomes. Ainsi, LRBA, comme les autres BDCPs, a un rôle dans le trafic vésiculaire et la dégradation des protéines dans le cytoplasme.

NBEAL2

Enfin des mutations récessives de *NBEAL2* sont responsables du syndrome des plaquettes grises (GPS) ¹²⁴. Le rôle de cette protéine est décrit et détaillé spécifiquement dans le chapitre suivant.

Conclusion sur les protéines BEACH

Cette revue de la littérature sur les membres de la famille des protéines BEACH nous suggère le rôle crucial de ces membres dans le trafic vésiculaire. De plus, plusieurs d'entre elles ont un rôle dans l'autophagie (WDR81, NSMAF, WDFY3, WDFY4).

Quatre protéines BEACH sont associées à des pathologies humaines, toutes causées par des mutations récessives des gènes codant ces protéines. Il s'agit de maladies affectant les lignées hématopoïétiques (mutations de *LYST*, *NBEAL2* et *LRBA*) ou les neurones (mutations de *WDR81*). Des modèles murins suggèrent un rôle de WDFY4 dans le système immunitaire via son rôle dans l'autophagie et la présentation croisée des antigènes en favorisant leur dégradation. De même, des modèles murins suggèrent un rôle neurologique de NBEA et WDFY3. Ainsi les protéines BEACH semblent être cruciales pour le bon fonctionnement des neurones ou des cellules issus de lignées hématopoïétiques.

5. Le syndrome des plaquettes grises

5.1. Symptômes

En 1971, le syndrome des plaquettes grises est décrit pour la première fois chez un jeune garçon de 11 ans présentant des hématomes récurrents et une thrombocytopénie ¹²⁵. Après inspection au microscope électronique, les auteurs décrivent des plaquettes larges, d'une couleur grise inhabituelle car elles sont dépourvues de granules- α , et contiennent de grandes vacuoles. Les mégacaryocytes présentent également un défaut granulaire.

Le syndrome des plaquettes grises est une maladie rare dont la prévalence exacte est inconnue. Les patients présentent des macro-thrombocytopénies modérées, parfois accompagnées de splénomégalies et peuvent développer des myélofibroses. L'origine physiopathologiques supposée de ces myélofibroses est le relargage dans la moelle osseuse du contenu des granules alpha mégacaryocytaires. ¹²⁶

5.2. Mutations récessives de NBEAL2

La cause génétique du syndrome des plaquettes grises a été mise en évidence en 2011 par trois descriptions distinctes et concomitantes dans la revue *Nature Genetics* ^{124, 127, 128}. Ainsi des mutations récessives de *NBEAL2* expliquent ce phénotype clinique. *NBEAL2* est localisé sur le chromosome 3 au locus 3p21.1-22 ¹²⁸. Le gène se divise en 54 exons et peut donner lieu à la

production de 5 transcripts codant pour des protéines. Le transcript principal code pour une protéine de 2754 aa (environ 300 kDa) ¹²⁹.

5.3. Modèles murins

5.3.1. Rôle plaquettaire de NBEAL2

Les modèles de souris NBEAL2 KO récapitulent le phénotype GPS humain, et nous permettent de modéliser cette maladie rare. Ainsi les souris KO développent une splénomégalie, une macro-thrombocytopenie, et une biogénèse imparfaite des granules- α dans les mégacaryocytes, entraînant une absence de granules- α dans les plaquettes ^{130, 131, 132, 133}. Le KO du gène orthologue à NBEAL2 chez le poisson zèbre entraîne un saignement de la queue spontanée dans 41% des embryons et l'abrogation complète des thrombocytes. En revanche, les érythrocytes matures ne sont pas affectés ¹²⁷ ce qui démontre un rôle conservé de NBEAL2 dans la thrombopoïèse au cours de l'évolution.

Dans les modèles murins, les plaquettes des souris NBEAL2^{-/-} ont une altération de l'adhérence, de l'agrégation et de l'activité coagulante *ex vivo*, qui se traduit par une formation défectueuse de thrombus artériel et une protection contre l'infarctus cérébral thrombo-inflammatoire dans un modèle d'AVC aigu. Les granules- α sont indispensables pour arrêter efficacement le saignement post-traumatique mais ils ne sont pas nécessaires au maintien de l'intégrité vasculaire en l'absence de blessure. Enfin, la sécrétion défectueuse de ces granules altère spécifiquement le développement d'un tissu cicatriciel après une blessure ¹³⁰.

L'analyse microscopique des mégacaryocytes extraits de la moelle osseuse des souris KO a permis de détecter des anomalies. Lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, leur maturation et leur survie sont réduites, et ils présentent des anomalies du développement, y compris une distribution extracellulaire anormale du facteur de Von Willedebrand ¹³¹. Même si les mégacaryocytes présentent des problèmes de maturation, cela n'impacte pas la formation des pro-plaquettes. Le manque de NBEAL2 n'affecte pas non plus la formation ou le transport des granules- α vers les pro-plaquettes naissantes. Ainsi NBEAL2 aurait plutôt un rôle dans la rétention du cargo contenu dans les granules- α ¹³².

Chez les souris KO, les mégacaryocytes ont également un profil pro-inflammatoire et un manque de granules- α ; favorisant l'apparition de myélofibrose ¹³².

Le rôle des plaquettes ne se limite pas au maintien de l'homéostasie comme nous le verrons au paragraphe 6.4. Pour tester le rôle de NBEAL2 dans la tumorigénèse, Guerrero et al ont injecté

à des souris KO des cellules de mélanomes murins et évalué l'apparition de métastases dans les poumons au bout de 10 jours. De façon surprenante, les souris KO *NBEAL2*^{-/-} présentent une réduction de 80% de métastases dans leurs poumons, comparées au groupe contrôle¹³². Afin de montrer le rôle des plaquettes dans cette protection contre les métastases, les souris KO ont été transfusées avec des plaquettes de souris sauvages, et le nombre de métastases a presque atteint celui des souris contrôles¹³².

5.3.2. Rôle immunologique de NBEAL2

Enfin, le rôle de NBEAL2 chez la souris a aussi été analysé dans certaines cellules du système immunitaire.

Dans les mastocytes, NBEAL2 régule l'activation de l'axe de signalisation Shp1-STAT5 et la composition du signalosome c-Kit/STAT. De plus, NBEAL2 intervient dans la formation des granules et restreint l'expression des facteurs de transcription IRF8, GATA2 et MITF ainsi que de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, qui sont essentiels à la différenciation et à la production de cytokines par les mastocytes. Enfin, le nombre de mastocytes est diminué chez les souris KO. De manière inattendue, la réaction anaphylactique rapide médiée par FcεRI, qui dépend fortement des mastocytes producteurs d'histamine, n'est pas altérée chez les souris *NBEAL2* KO. Ce résultat est confirmé par des taux d'histamine et de cytokine similaires entre les souris sauvages et KO en réponse à un choc anaphylactique. Ces données indiquent que le nombre réduits de mastocytes est compensé par une réactivité accrue des mastocytes restants ou par d'autres types cellulaires¹³⁴.

NBEAL2 semble également essentiel dans le développement d'une réponse immunitaire contre des pathogènes, via les neutrophiles et les cellules NK (natural killer). Les neutrophiles déficients en NBEAL2 montrent une réduction sévère du contenu de leurs granules, et ce dans tous les sous-ensembles de granules. Cependant, les neutrophiles *NBEAL2*^{-/-} présentent une meilleure capacité oxydative des phagocytes comparés aux neutrophiles contrôles. Ce stress oxydatif est associé à une expression accrue des composants cytosoliques du complexe NADPH oxydase. Les cellules NK *NBEAL2*^{-/-} sont également dysfonctionnelles et présentent une dégranulation réduite. Ces anomalies sont associées à une sensibilité accrue aux infections bactériennes (*Staphylococcus aureus*) et virales (CMV murin) *in vivo*, montrant une réponse immunitaire diminuée chez les souris KO¹³⁵.

5.4. NBEAL2 et les granules alpha

La fonction de NBEAL2 dans le trafic et la maturation des granules- α au sein des plaquettes semble cruciale. Un modèle a récemment été proposé pour illustrer l'importance plaquettaire de NBEAL2 (Figure 15) ¹³⁶.

Le contenu des granules- α est un mélange de protéines synthétisées par le mégacaryocyte et de protéines extérieures endo-cytosées. Le fibrinogène (FGN) endocytosé passe des endosomes précoces associés à RAB5 (Ras-related protein in brain 5) aux endosomes tardifs associés à RAB7, puis aux vésicules contenant de la P-sélectine. En parallèle, la cargaison synthétisée par les mégacaryocytes (ex : VWF, TSP1) suit une route convergente après avoir quitté le Golgi. NBEAL2 se localise dans les granules et interagit avec la P-sélectine. En l'absence de NBEAL2, la cargaison des granules est acheminée vers des endosomes de recyclage associés à RAB11 et finalement externalisée. Cela empêche la maturation normale des granules α , produisant les structures vides observées dans les plaquettes NBEAL2-KO murines ou humaines ¹³⁶.

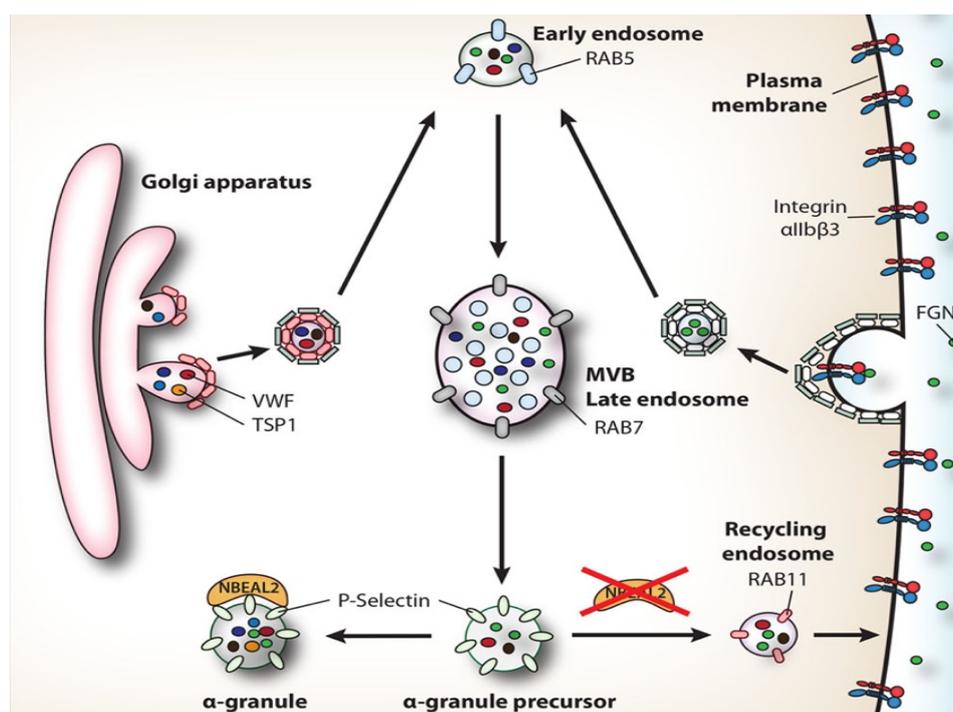


Figure 15: Rôle de NBEAL2 dans la biogénèse et la rétention des granules- α dans les mégacaryocytes ¹³⁶.

Modèle du rôle de NBEAL2 dans le trafic et la maturation des granules- α . Le FGN (fibrinogène) endocytosé passe par des endosomes précoces RAB5+ aux endosomes tardifs RAB7+, puis aux vésicules contenant de la P-sélectine. Le contenu des granules- α synthétisé par les mégacaryocytes (MK) (par exemple, VWF [facteur de Von Willebrand], TSP1 [thrombospondine 1]) suit une route convergente après avoir quitté le Golgi. NBEAL2 se localise dans les granules- α et interagit avec la P-sélectine. En l'absence de NBEAL2, le contenu des granules est acheminé vers des endosomes de recyclage RAB11+ et finalement externalisé. Ce déficit en NBEAL2 empêche la maturation normale des granules- α , produisant les structures vides observées dans les plaquettes NBEAL2-nulles de souris et humaines.

Enfin, récemment, Lo et al ont montré que la protéine SEC22B résidente du reticulum endoplasmique (RE) est requise pour la biogenèse des granules- α , et qu'elle peut se lier à NBEAL2 via une région spécifique, située juste avant le domaine PH (1798-1903 AA). NBEAL2 a le potentiel de se lier simultanément à SEC22B et à la P-sélectine membranaire des granule- α . Cette interaction tripartite peut faciliter les processus impliqués dans la maturation des granules- α , où les rôles fonctionnels précis de SEC22B et du RE restent encore à déterminer¹³⁷.

5.5. NBEAL2 et immunité

Parmi les premiers patients GPS décrits, peu de symptômes liés au système immunitaire ont été initialement rapportés. De 2001 à 2012, on note cependant quelques cas d'infections récurrentes dans certains cas^{138, 139, 140}, ou encore des anomalies des granules dans les neutrophiles^{138, 141, 142}. Ces phénotypes cliniques, concordent avec les modèles murins¹³⁵.

En 2015, quatre familles avec des marqueurs biologiques de l'ALPS et des symptômes auto-immuns sont décrites, mettant encore plus en exergue le rôle de NBEAL2 dans le système immunitaire¹⁴³. Ces patients présentent des niveaux plasmatiques de vitamine B12 et de FasL augmentés ainsi que des auto-anticorps nucléaires ou anti-plaquettes.

En 2020, l'étude de 47 patients GPS souligne les anomalies immunologiques et les symptômes auto-immuns retrouvés dans cette cohorte internationale¹⁴⁴.

Parmi ces anomalies, Sims et al¹⁴⁴ décrivent que 26% des patients présentent une maladie auto-immune : thyroïdite d'Hashimoto, polyarthrite rhumatoïde, alopecie, lupus érythémateux discoïde, vitiligo ou syndrome lympho-prolifératif auto-immun atypique. Parmi les 29 patients dont la recherche d'auto-anticorps a été faite, 59% d'entre eux avaient au moins un résultat positif avec notamment des anti-thyroperoxidase, des anticorps périnucléaires anti-cytoplasme des neutrophiles, des facteurs rhumatoïdes ou des anticorps antinucléaires. De plus environ 20% des patients avaient des infections récurrentes, ce qui rappelle les observations faites chez la souris KO *NBEAL2*¹³⁵.

Le nombre de leucocytes total était significativement diminué chez les patients GPS. Les nombres de plaquettes, de neutrophiles, de monocytes et de basophiles étaient également diminués¹⁴⁴. Les neutrophiles et les éosinophiles présentaient une granulocytose réduite. Afin d'explorer ces différences, l'étude du profil transcriptomique et protéomique chez 5 patients GPS et 5 donneurs sains a été réalisée sur les plaquettes, les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T CD4+¹⁴⁴. Ces analyses ont révélé que les neutrophiles et les monocytes des

patients avaient un contenu granulaire diminué ¹⁴⁴. Cette différence se fait au niveau protéique uniquement, suggérant que le rôle de NBEAL2 n'est pas transcriptionnel pour ces sous-types cellulaires. Quant aux lymphocytes T CD4+, ils surexpriment des marqueurs d'activation, à la fois en termes d'expression génétique et protéique. Enfin l'analyse des protéines plasmatiques pour 11 patients a montré une signature pro-inflammatoire et hépatique ¹⁴⁴.

L'étude de Sims et al établit clairement l'impact de NBEAL2 sur le système immunitaire, cependant les mécanismes ne sont pas explicités. De plus l'ensemble des cellules du système immunitaire n'est pas étudié. Les lymphocytes T CD8+ et les cellules NK ne sont pas évoqués, alors que leur fonction cytotoxique pourrait être impactée à la vue des modèles murins et du rôle de NBEAL2 dans la biogénèse des granules.

Enfin, en 2021, Aarts et al explore le rôle de NBEAL2 dans les neutrophiles ¹⁴⁵. Ils montrent notamment que les neutrophiles des patients GPS possèdent un nombre de granules spécifiques réduit et une NETose défectueuse ¹⁴⁵. La NETose est la formation de pièges extracellulaires par les neutrophiles. Les pièges sont capables de retenir des pathogènes extracellulaires et sont de grandes structures extracellulaires composées de protéines cytosoliques et granulaires, assemblées sur un échafaudage de chromatine décondensée provenant des neutrophiles ¹⁴⁶.

Étant donné que les patients atteints de GPS ne souffrent pas excessivement d'infections, la conséquence de la teneur réduite en granules spécifiques et de l'absence de NETose pour l'immunité innée reste à explorer ¹⁴⁵.

Cependant, nous pouvons noter que le rôle de NBEAL2 dans la rétention des granules spécifiques dans le cytoplasme des neutrophiles est établi, de façon similaire à la rétention des granules- α dans les mégacaryocytes ^{136, 145}.

6. Plaquettes : description et lien avec l'immunité

Les mégacaryocytes sont de grandes cellules polynuclées, issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ce sont les précurseurs des plaquettes, produites par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes. Les plaquettes sont des fragments cellulaires anuclées, et ont un rôle crucial dans l'équilibre du milieu intérieur, l'homéostasie.

6.1. Biogénèse des plaquettes

La mégacaryopoïèse (génération des mégacaryocytes) dans la moelle osseuse est résumée sur la Figure 16 ¹⁴⁷. A partir d'une cellule souche hématopoïétique immature et en réponse à la thrombopoïétine (TPO), une cascade d'événements se produit afin d'obtenir un mégacaryoblaste.

Tout d'abord l'endomitose nucléaire permet une réplication du matériel génétique sans division cellulaire, puis une synthèse des granules et des organites s'opère. Et enfin la maturation, l'expansion du cytoplasme et la formation d'un réseau de microtubules émanant du centrosome sont observés ¹⁴⁸.

Un promégacaryocyte est ensuite formé par désassemblage des centrosomes et migration des microtubules vers la membrane plasmique. Il y a alors formation de pseudopodes épais, comme décrit à la Figure 17 ¹⁴⁷.

Les protusions (proplaquettes) de la membrane continuent à se former par glissement des microtubules du mégacaryocyte. Les organites et les granules migrent aux extrémités de ces proplaquettes grâce aux microtubules, où les plaquettes naissantes s'assemblent.

La formation de proplaquettes continue dans tout le mégacaryocyte tandis que la courbure et la ramification des extrémités membranaires s'accroissent au niveau des proplaquettes existantes. L'ensemble du cytoplasme du mégacaryocyte est converti en une masse de proplaquettes, qui sont libérées de la cellule, et déversées dans la circulation sanguine ^{147, 148}.

Ainsi le rôle des microtubules et du cytosquelette est essentiel dans la maturation des mégacaryocytes et la formation des plaquettes.

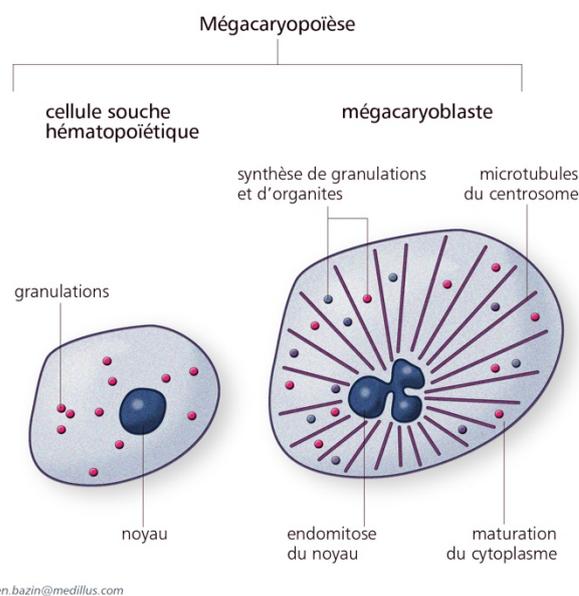


Figure 16: Schéma résumant la mégacaryopoïèse ¹⁴⁷.

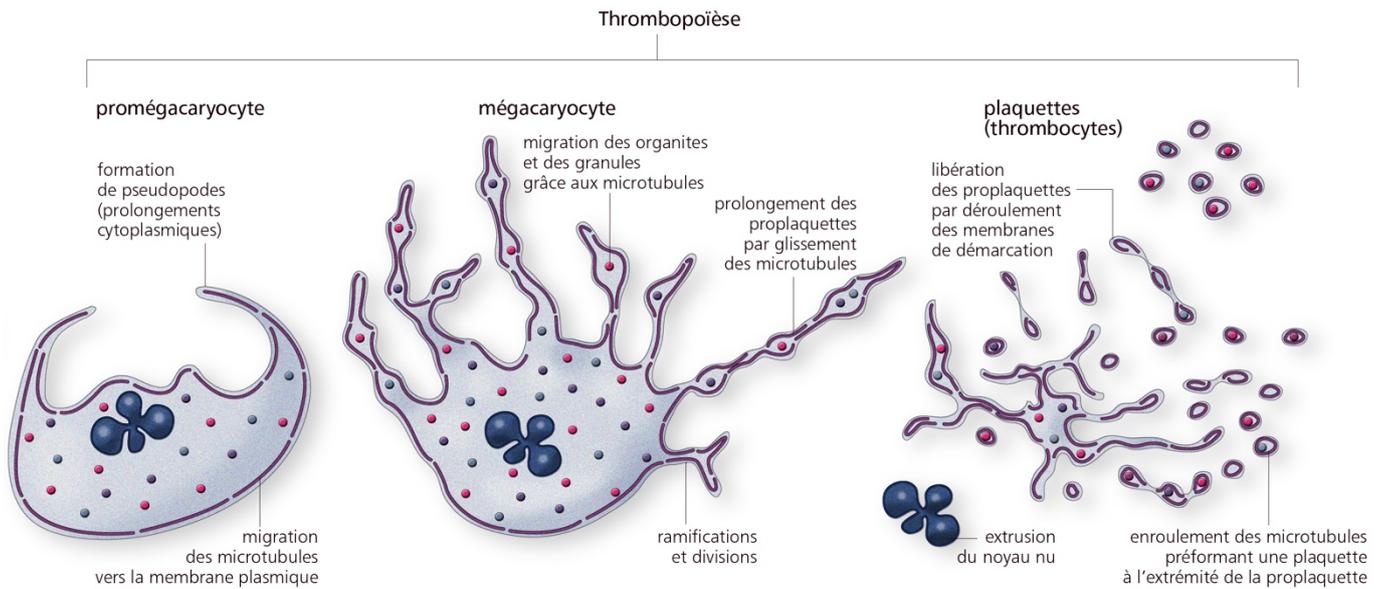


Figure 17: Schéma de la thrombopoïèse ¹⁴⁷.

6.2. Cycle de vie plaquettaire

La durée de vie de plaquettes est de 5 à 10 jours. Chez l'humain, le nombre de plaquettes est compris entre 150 et 400 milliards par litre de sang. Chaque jour un adulte doit produire environ 100 milliards de plaquettes afin de maintenir ce nombre ¹⁴⁹. Cette production est principalement régulée par la thrombopoïétine, un facteur de croissance, sécrétée principalement par le foie, mais aussi les reins et les muscles lisses.

Le cycle de vie plaquettaire est décrit à la Figure 18 ¹⁵⁰. Brièvement, la sécrétion de TPO par le foie conduit à la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en mégacaryocytes et à la production de plaquettes dans la circulation sanguine. Après avoir joué leurs rôles, elles seront soit éliminées par les macrophages, soit exprimeront des marqueurs de sénescence.

Les plaquettes sénescents seront reconnues par les hépatocytes et phagocytées par les cellules de Kupffer (macrophages spécifiques du tissu hépatique), ce qui stimulera la production de TPO et la génération de nouvelles plaquettes.

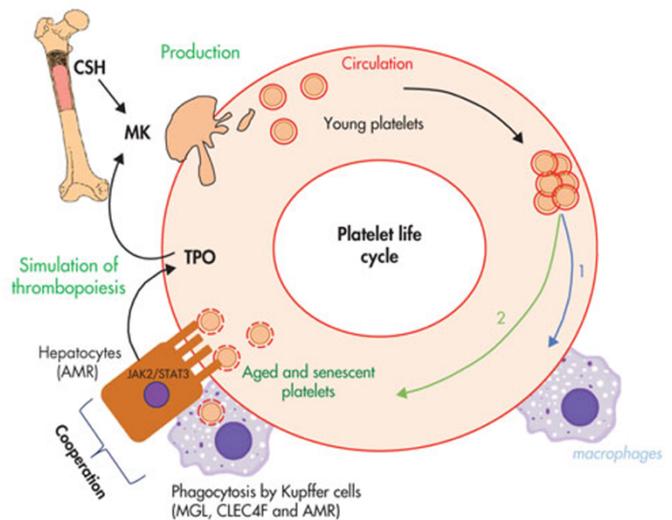


Figure 18: Le cycle de vie plaquettaire ¹⁵⁰.

6.3. Structure de la plaquette

Les plaquettes contiennent différents organites et granules, et expriment à leur surface différents récepteurs.

6.3.1. Granules

Les granules- α , les granules denses et les lysosomes sont les trois types de granules plaquettaires. Les granules- α sont les plus abondants (50 à 80 par plaquette), ils possèdent des formes hétérogènes et une taille comprise entre 200 et 500 nm^{151, 152}. Les plaquettes- α contiennent un grand nombre de protéines participant à la coagulation, à la cicatrisation des plaies, à l'angiogénèse ou à l'inflammation. Les granules denses (5 à 8 par plaquette), jouent un rôle dans l'homéostasie et la formation de thrombus en sécrétant leur contenu. Enfin, les lysosomes (< 4 par plaquette) contiennent principalement des hydrolases acides et joueraient un rôle dans la digestion endosomale¹⁵². Les molécules contenues dans ces granules ont différentes fonctions, comme résumé en Figure 19¹⁵³.

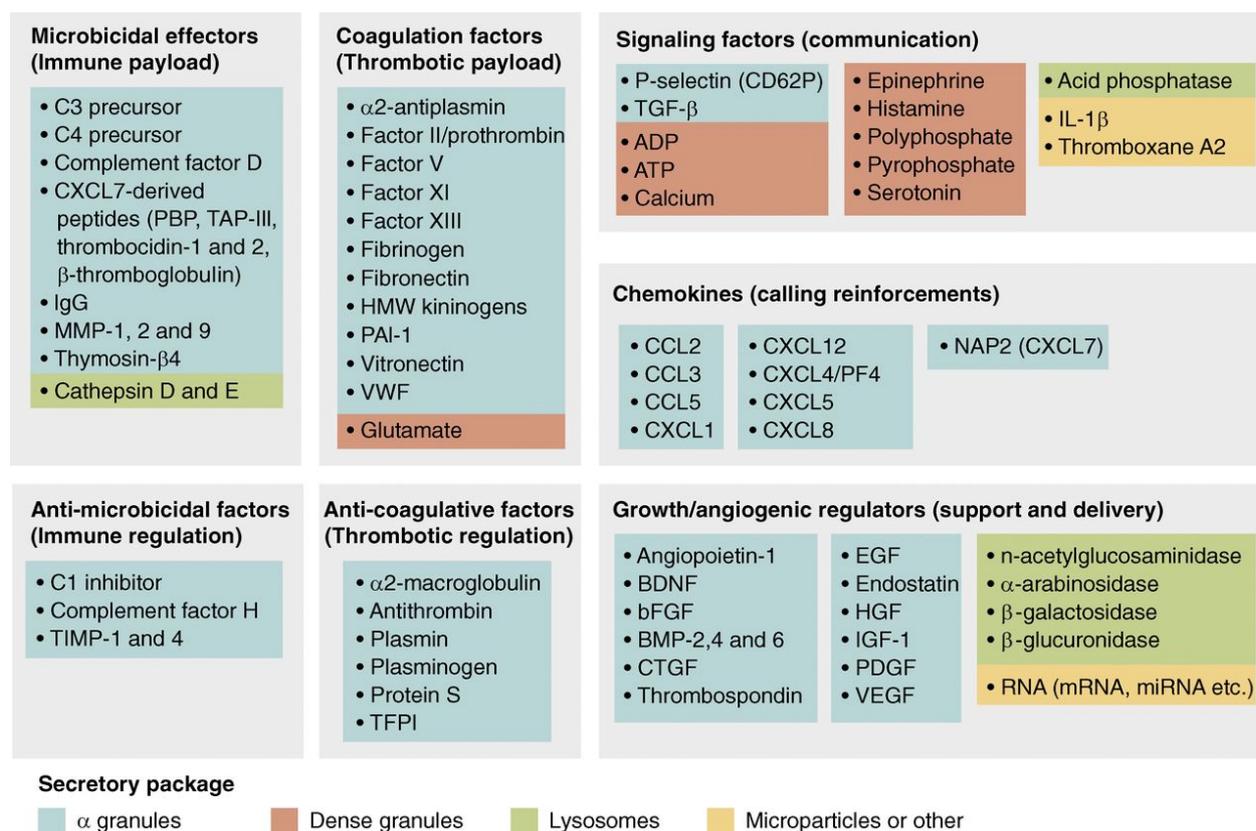


Figure 19: Contenus des granules plaquettaires classés par fonction¹⁵³

Liste des médiateurs bioactifs libérés par les plaquettes humaines classés selon leurs principaux rôles fonctionnels. Beaucoup de ces médiateurs jouent plusieurs rôles mais ne sont catégorisés qu'une seule fois. CXCL7 est unique parmi les chimiokines car il est clivé en plusieurs peptides distincts avec des fonctions variables.

6.3.2. Système canaliculaire ouvert (OCS)

Le système canaliculaire ouvert est une structure spécifique des plaquettes. Il est constitué de tunnels, formant une structure spongieuse à l'intérieur de la plaquette. Son rôle est encore méconnu. L'OCS se forme à partir d'invaginations de la membrane plasmique. Les plaquettes ont une faible capacité à produire des protéines, et une grande partie d'entre elles est absorbée depuis l'extérieur vers le cytoplasme plaquettaire via l'OCS. Cette structure joue également un rôle très important dans le relargage des protéines stockées dans la plaquette. Lors de l'activation plaquettaire, les granules fusionnent avec la membrane de l'OCS, libérant ainsi leurs contenus ¹⁵⁴.

6.3.3. Mitochondries

Les plaquettes contiennent des mitochondries (5 à 8 par plaquette). Ces organites sont essentiels à la production de l'énergie nécessaire à la plaquette pour sécréter le contenu de ses granules, s'agréger et former des caillots. De plus, les mitochondries auraient un rôle dans l'apoptose plaquettaire ¹⁵⁵.

6.3.4. Cytosquelette

Le cytosquelette plaquettaire est constitué notamment d'actine, de tubuline et de spectrine. Le cytosquelette joue un rôle primordial. Il maintient la forme discoïde des plaquettes non stimulées et réduit les forces de cisaillement exercées sur les thrombocytes dans la circulation sanguine. Pendant l'activation plaquettaire, le cytosquelette se remodèle rapidement, permettant une réponse rapide aux dommages vasculaires, en changeant la forme des plaquettes, qui peuvent alors s'agréger ¹⁵⁶.

6.3.5. Récepteurs membranaires

La membrane des plaquettes contient des récepteurs membranaires qui leur permettent d'interagir et de répondre à leur environnement extérieur. L'activation des plaquettes peut être générée par une réaction à un stress mécanique ou biologique, à la suite de la liaison d'un de ces récepteurs à son ligand. Il existe de nombreux récepteurs aux fonctions diverses. Une liste non exhaustive de ces récepteurs, de leurs fonctions et de leurs rôles dans l'immunité ou l'hémostase est donnée en Figure 20 ¹⁵³.

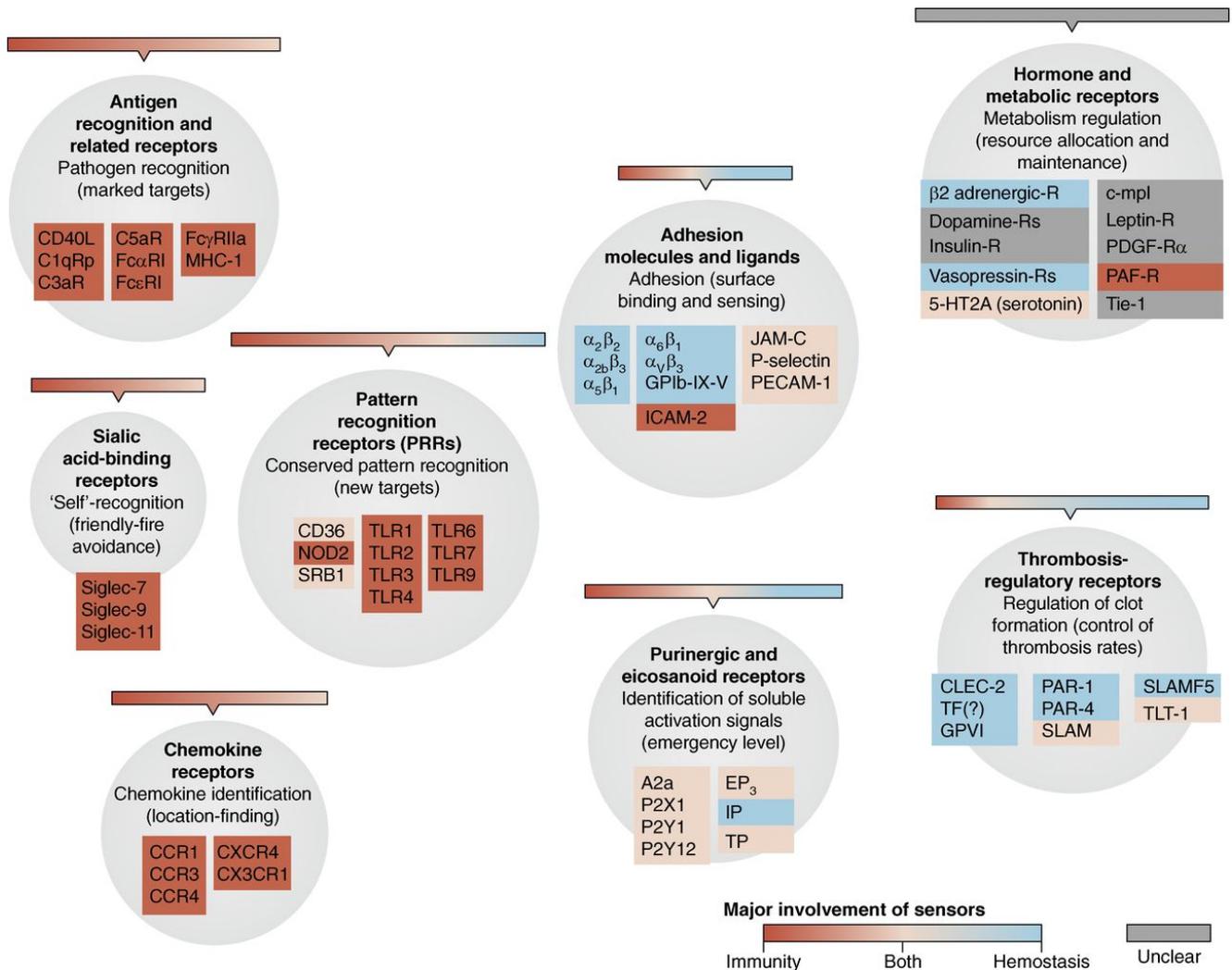


Figure 20: Liste des récepteurs plaquettes humains classés par fonctions ¹⁵³.

Liste des récepteurs des plaquettes humaines classés selon leurs principales fonctions. Les aires des cercles correspondent proportionnellement au nombre de membres indiqué ici. L'implication majeure de chaque molécule dans l'hémostase, l'immunité ou les deux est codée par couleur : rouge pour l'immunité, bleu pour l'hémostase et orange pour les deux. Les récepteurs de contributions peu claires à l'hémostase ou à l'immunité sont indiqués en gris.

6.4. Les nombreuses fonctions plaquettaires

Les plaquettes possèdent de nombreuses fonctions. En plus des fonctions d'hémostases (thrombose, coagulation, cicatrisation), les plaquettes ont aussi un rôle dans la signalisation en relarguant des chimiokines, des cytokines ou des facteurs de croissance ¹⁵⁵. De plus les plaquettes ont un rôle immuno-régulateur sur lequel nous nous attarderons ici.

En Figure 21, trois exemples du rôle des plaquettes activées dans l'immunité sont décrits ¹⁵⁷.

Ainsi, les plaquettes peuvent reconnaître des bactéries via leurs récepteurs TLR4 et entraîner leurs destructions. Les plaquettes expriment également le récepteur CD154 (CD40 ligand) après

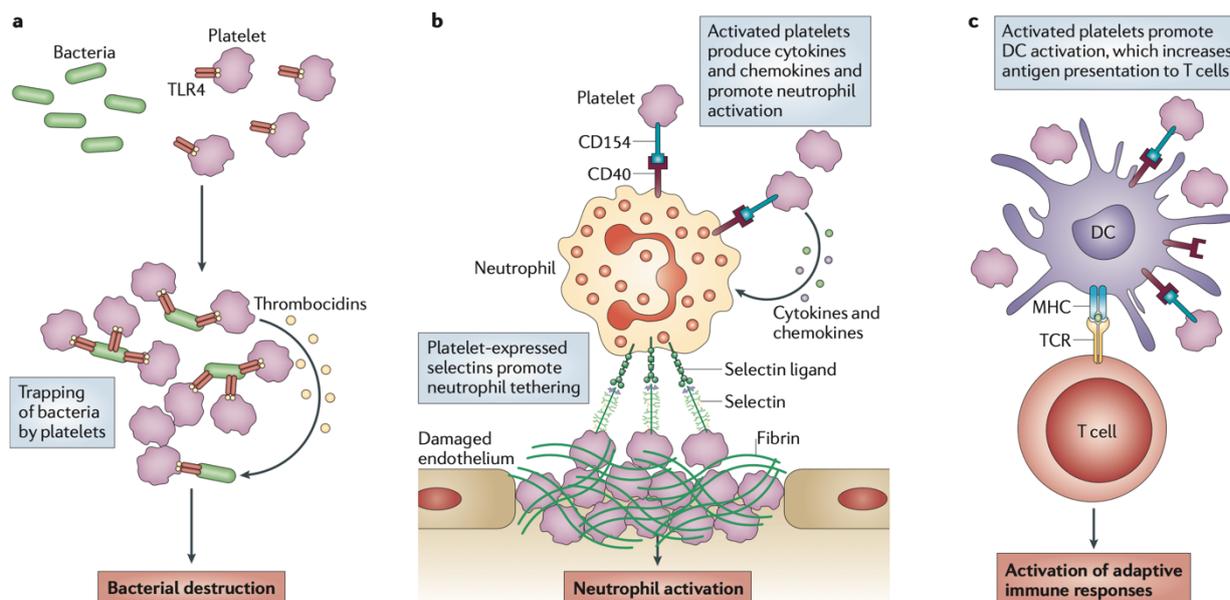


Figure 21: Exemples du rôle des plaquettes dans l'immunité ¹⁵⁷.

a) L'expression du récepteur de type Toll (TLR) plaquettaire permet aux plaquettes activées de se lier et de capturer les bactéries. Par la suite, les plaquettes peuvent tuer directement les bactéries en produisant des thromboxanes ou en s'agrégeant des bactéries et les « piégeant » pour leur élimination par les phagocytes professionnels.

b) Il est maintenant clair que les plaquettes peuvent également interagir de manière hétérotypique avec une grande variété de cellules, y compris les leucocytes. Les plaquettes activées favorisent l'ancrage et l'activation des neutrophiles par l'expression de sélectines, de CD154 (également connu sous le nom de CD40L) et de cytokines et chimiokines inflammatoires.

c) De même, les plaquettes activées peuvent également favoriser l'activation des monocytes et des cellules dendritiques, notamment via les interactions CD40-CD154. Cela conduit à une présentation accrue de l'antigène aux cellules T et améliore les réponses immunitaires adaptatives.

activation ^{157, 158}. L'activation des neutrophiles peut avoir lieu après la fixation du CD40L plaquettaire aux molécules de CD40 présentes à la surface des polynucléaires. Les plaquettes sécrètent également des cytokines et chimiokines inflammatoires, permettant le recrutement de diverses cellules immunitaires. L'axe CD40/CD40L peut également servir à stimuler l'activation des cellules dendritiques, entraînant l'augmentation de la présentation antigénique aux cellules T et permettant le lien entre immunité adaptative et innée ¹⁵⁷.

De plus, CD40L à la surface des plaquettes peut induire une commutation isotypique dans les lymphocytes B et augmente les réponses des lymphocytes T CD8⁺. CD40L peut également être clivé de la surface de la plaquette pour générer du sCD40L (CD40L soluble) ou être conditionné dans des microvésicules plaquettaires (PMV) qui sont libérées dans la circulation pour la dissémination et le contrôle à distance de la réponse immunitaire ¹⁵⁹.

Plus récemment, il a été démontré que les plaquettes et les mégacaryocytes, peuvent également capter, traiter et présenter des antigènes étrangers et auto-antigènes aux lymphocytes T CD8+, leur conférant la capacité de modifier directement les réponses immunitaires adaptatives ¹⁵⁹.

On estime que les plaquettes expriment environ 80 000 molécules du CMH-I à leur surface, cependant, il existe des controverses concernant la fonctionnalité et l'origine de ces molécules sur les plaquettes. Néanmoins, il est maintenant connu que les plaquettes et les mégacaryocytes possèdent toutes les molécules nécessaires à la maturation et à la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+, y compris un protéasome complet et des molécules co-stimulatrices. Bien que la surface de la plaquette contienne principalement des molécules de MHC-I dénaturées, les plaquettes ont au niveau intracellulaire un grand pool de molécules de MHC-I fonctionnelles entièrement intactes qui sont exprimées lors de l'activation ^{157, 159}.

Enfin les plaquettes ont un rôle dans la progression des métastases cancéreuses, comme illustré à la Figure 22 ¹⁶⁰.

Brièvement, les cellules tumorales circulantes peuvent interagir avec les plaquettes et les leucocytes activés et former des hétéroagrégats. Les plaquettes activées et le fibrinogène protègent les cellules tumorales de la lyse des cellules NK, et permettent l'évasion tumorale.

Ces agrégats facilitent également l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium et la migration transendothéliale des cellules tumorales, permettant l'invasion de nouveaux tissus et la formation de métastases ¹⁶¹.

Une illustration la capacité des plaquettes à participer à la propagation des métastases est donnée par le cas des souris *NBEAL2*^{-/-}. Comme nous l'avons vu au paragraphe 5.3.1, les souris qui présentent un déficit en *NBEAL2* caractérisé par une macrothrombocytopenie, l'absence de granules- α et une fonction plaquettaire anormale, sont résistantes au développement de métastase cancéreux ¹⁶².

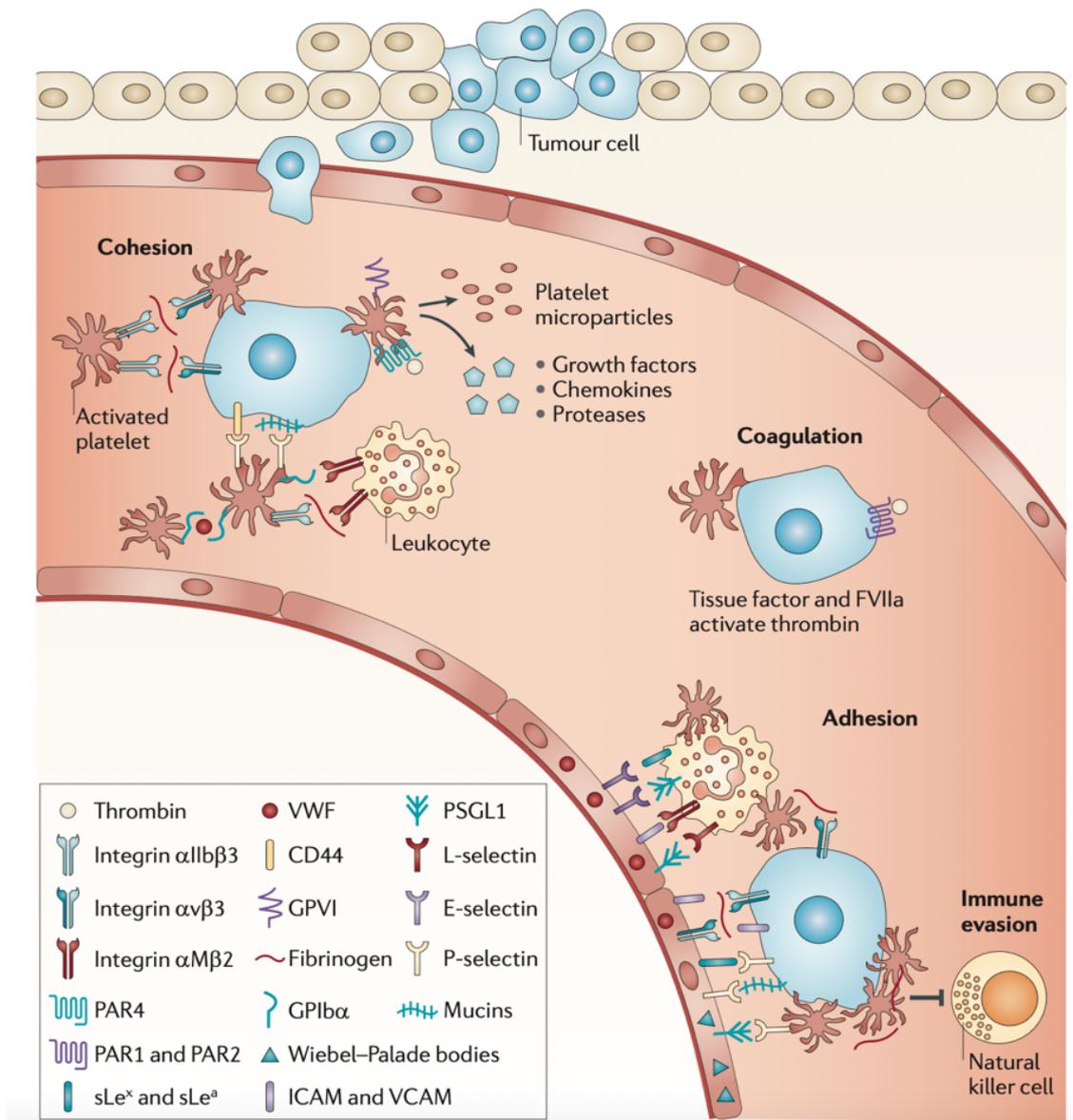


Figure 22: Rôle des plaquettes dans le développement des métastases et l'évasion tumorale ¹⁶⁰.

Les cellules tumorales circulantes peuvent interagir avec les plaquettes et les leucocytes activés et former des hétéroagrégats qui favorisent la fixation des cellules tumorales à l'endothélium et contribuent ainsi à la métastase. Pendant la coagulation, les étapes de coagulation initiées par les plaquettes peuvent activer des récepteurs sur les cellules tumorales (par exemple, le récepteur activé par la protéase 1 (PAR1) et PAR2) et favoriser la libération de facteur tissulaire qui améliore encore l'activité procoagulante. Au cours de l'adhésion, l'adhésion transitoire initiale impliquant les sélectines, les mucines, le CD44 et d'autres glycoconjugués contenant du sialyl Lewis X/A est suivie d'une fixation ferme qui est médiée par les intégrines et les molécules d'adhésion cellulaires. Au cours de l'évasion immunitaire, les protéines plasmatiques multivalentes forment des ponts intercellulaires, et les plaquettes activées et le fibrinogène protègent les cellules tumorales de la lyse des cellules tueuses naturelles au cours de la métastase hématogène.

6.5. Le purpura thrombopénique immunologique

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est une maladie auto-immune caractérisée par une faible numération plaquettaire ($< 100.10^9/L$) en l'absence de causes sous-jacentes. La physiopathologie du PTI est complexe et partiellement comprise, elle résulte très probablement

de multiples facteurs. Elle implique notamment une clairance plaquettaire rapide en raison de la destruction médiée par des auto-anticorps et des anomalies des mégacaryocytes conduisant à une altération de la production de plaquettes ¹⁶³. Les différents mécanismes responsables de la destruction plaquettaire dans le PTI sont résumés dans la Figure 23 ¹⁶³. Les plaquettes peuvent être détruites directement par les lymphocytes T cytotoxiques. La clairance anormale des plaquettes peut également être due à des auto-anticorps ciblant les plaquettes ou leurs progéniteurs : les mégacaryocytes. Enfin, le PTI peut également être causé par une rupture de tolérance périphérique due à des TReg anormaux et qui n'assurent plus leur fonction régulatrice. La gravité des symptômes peut varier d'un patient à l'autre et le diagnostic peut être difficile car il se fait par élimination d'autres causes probables ¹⁶⁴.

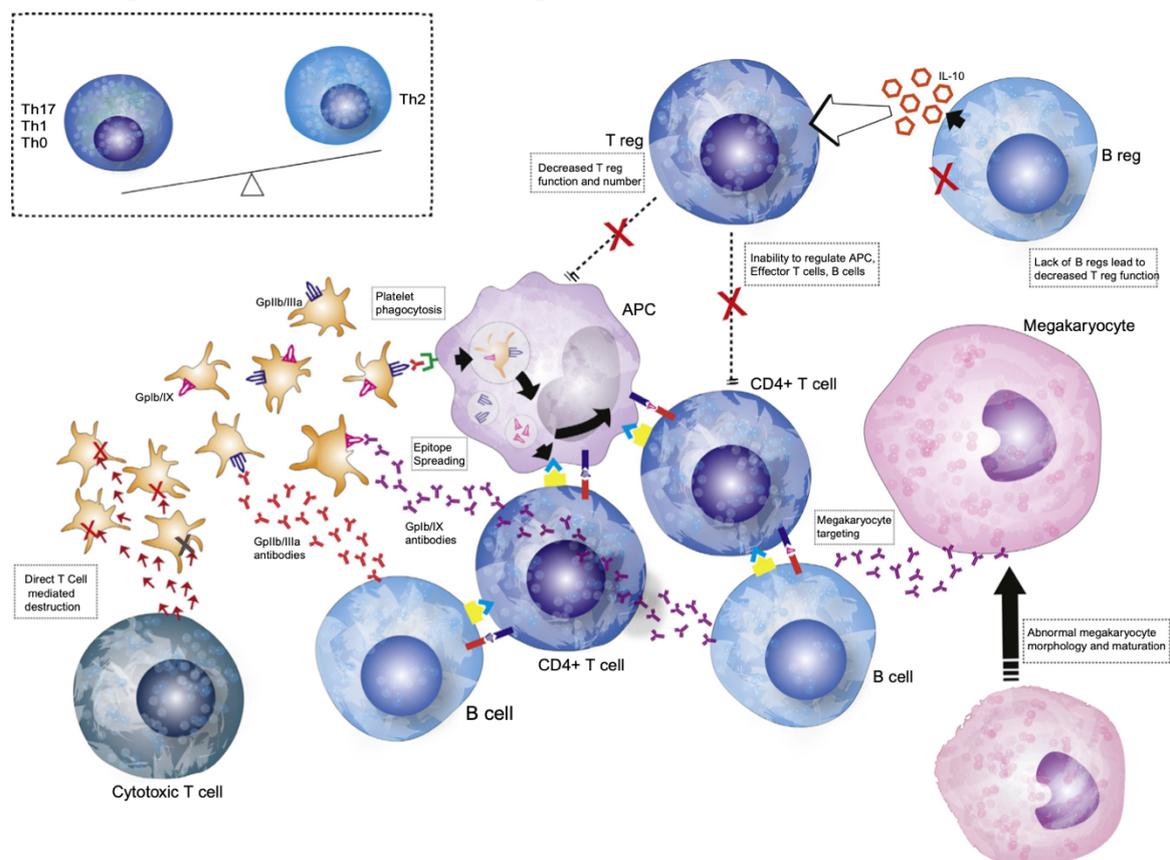


Figure 23: Les divers mécanismes pouvant être à l'origine d'un PTI ¹⁶³.

Des auto-anticorps ciblant les glycoprotéines plaquettares, le plus souvent la glycoprotéine IIB/IIIa entraînent l'opsonisation des plaquettes opsonisées par les APC. Une fois phagocytées, les plaquettes sont dégradées et des épitopes cryptiques à des glycoprotéines plaquettares supplémentaires sont exposés. Les APC expriment ensuite la glycoprotéine IIB/IIIa ainsi que d'autres glycoprotéines plaquettares à leur surface, qui sont reconnues par les lymphocytes T CD4 positifs. Les clones de cellules T interagissent avec les cellules B, augmentant ainsi la production d'anticorps. Les auto-anticorps peuvent aussi cibler les mégacaryocytes, ce qui entraîne une diminution du nombre de mégacaryocytes matures et une maturation anormale des mégacaryocytes.

Les cellules T cytotoxiques peuvent cibler directement les plaquettes indépendamment de la destruction induite par les anticorps. Les TReg ou les cellules B régulatrices qui favorisent la tolérance au soi peuvent être en nombre réduit et présenter une fonction anormale dans le PTI.

Il y a une augmentation des réponses des lymphocytes T pro-inflammatoires dans le PTI. L'équilibre est déplacé vers l'activation des CD4+ Th0/Th1 et Th17 et une diminution des réponses Th2.

6.6. Défauts plaquettaires constitutifs et immunité

Les défauts plaquettaires constitutifs résultent de mutations dans des gènes essentiels au développement mégacaryocytaire ou aux plaquettes. Ils forment un groupe de maladies rares aux symptômes variables, avec des susceptibilités plus ou moins grandes aux saignements. Ils peuvent être associés à des défauts quantitatifs (thrombocytopénies, thrombocytoses) ou qualitatifs (impact de la fonction plaquettaire ou mégacaryocytaire)¹⁶⁵. Grâce au recours au séquençage de nouvelle génération, de nouveaux gènes responsables de thrombopénies constitutives sont trouvés et doivent être analysés avec attention^{166, 167}.

Ces défauts plaquettaires héréditaires peuvent être associés ou non à d'autres symptômes, ou à des susceptibilités à développer des hémopathies malignes et/ou aux néoplasmes solides^{168,169,170}. Dans le Tableau 3 et le Tableau 4, nous avons listé les défauts plaquettaires associés à des anomalies hématologiques et/ou des susceptibilités aux hémopathies malignes¹⁶⁸.

Les gènes impliqués dans ces défauts plaquettaires associés à des anomalies hématologiques sont principalement des facteurs de transcriptions, des gènes du cytosquelette ainsi que des gènes importants dans la biogénèse, la rétention ou le contenu des granules plaquettaires.

Il semble assez naturel que les gènes codant des facteurs de transcriptions soient responsables d'autres symptômes dans d'autres types de cellules, et notamment les cellules hématopoïétiques. De la même manière, les gènes impliqués dans le cytosquelette ont probablement un rôle plus large. Cependant, il existe des thrombopénies héréditaires non syndromiques causées par des variants délétères dans d'autres gènes du cytosquelette (TPM4, ACTN1, TUBB1, par exemple). Enfin le rôle de gènes impliqués dans la biologie des granules plaquettaires peut être intéressant à étudier, car les granules sont présents dans de nombreuses cellules immunitaires (granulocytes, NK, lymphocytes T cytotoxiques) ou encore les cellules de la peau ou les cellules- β du pancréas.

Fonctions plaquettaires	Syndromes associés (entrée OMIM)	Gènes	Transmission	Taille des plaquettes	Anomalies hématologiques et susceptibilité aux hémopathies malignes	Réf.
THROMBOPENIES HEREDITAIRES						
Facteurs de transcription	Thrombocytopénie amegacaryocytaire 2 avec synostose radiolanaire (616738)	MECOM	AD	Taille normale	Déficiences des cellules B	171
Facteurs de transcription	Trouble plaquettaire, familial, avec malignité myéloïde associée (601399)	RUNX1	AD	Taille normale	Risque accru de leucémie myéloblastique (>40%)	172
Facteurs de transcription	Thrombocytopénie liée à <i>ANKRD26</i> (188000)	ANKRD26	AD	Taille normale	10% des patients développent des néoplasmes myéloïdes. Taux d'hémoglobine élevée et/ou leucocytose	173
Facteurs de transcription	Thrombocytopénie liée à <i>ETV6</i> (616216)	ETV6	AD	Taille normale	Prédisposition (30%) à des syndromes lympho- ou myeloprolifératif, macrocytose des globules rouges	174, 175
Facteurs de transcription	Syndromes liés à <i>GATA1</i> (300835, 300367, 314050)	GATA1	XLR	Macroplaquettes	Peut être associé à une anémie, β -thalassémie, neutropénie, splénomégalie ou une porphyrie erythropoïétique congénitale	176
Facteurs de transcription	Thrombocytopénie liée à <i>GF11B</i> (187900)	GF11B	AD/AR	Macroplaquettes	Globules rouges avec anisopoikilocytose	177, 178
Granules- α	Syndrome des plaquettes grises	NBEAL2	AR	Macroplaquettes	Splénomégalie, prédisposition à de l'auto-immunité	144, 179
Récepteur	Thrombocytopénie liée à G6b-B (617441)	MPIG6B	AR	Macroplaquettes	Anémie microcytique, leucocytose	180
Métabolisme	Thrombocytopénie associée à une sitosterolémie (618666, 210250)	ABCG5, ABCG6	AR	Macroplaquettes	Anémie hémolytique avec stomatocytose	181
Cytosquelette	Thrombocytopénie liée à <i>DIAPH1</i>	DIAPH1	AD	Macroplaquettes	Neutropénie avec un risque d'infections modéré	182
Cytosquelette	Macrothrombopénie avec un syndrome de Takenouchi-Kosaki (616737)	CDC42	AD	Macroplaquettes	Immunodéficiences, lymphœdème	183, 184
Cytosquelette	Thrombocytopénie liée à <i>ACTB</i>	ACTB	AD	Macroplaquettes	Leucocytose avec éosinophilie ou leucopénie	185
Cytosquelette	Syndrome de Wiskott-Aldrich (301000) ou thrombocytopénies liées à l'X (300299, 313900)	WAS	XLR	Microplaquettes	Immunodéficiences, syndrome lymphoprolifératif et auto-immun	186
Cytosquelette	Immunodéficiences 71 avec maladie inflammatoire et thrombocytopénie congénitale (617718)	ARPC1B	AR	Microplaquettes	Éosinophilie, maladie inflammatoire immune-médiée, lymphadénopathie, hépato-splénomégalie	187, 188
Syalilation	Thrombocytopénie liée à <i>GALE</i> (606953)	GALE	AR	Macroplaquettes	Anémie et neutropénie fébrile	189
Activité pro-coagulante	Syndrome de Stormorken (185070) ou immunodéficiences 9 ou 10 (612782, 612783)	STIM1, ORAI1	AD, AR	Normo ou macroplaquettes	Anémie modérée, infections récurrentes, fonctions des cellules T et NK défectueuses, AHAI	190

Tableau 3: Thrombopénies héréditaires avec des anomalies hématologiques et/ou des susceptibilités aux hémopathies malignes

Tableau 4: Défauts plaquettaires héréditaires sans thrombopénies mais avec des anomalies hématologiques et des susceptibilités aux hémopathies malignes

Fonctions plaquettaires	Syndrome associé (entrée OMIM)	Gènes	Transmission	Taille des plaquettes	Anomalies hématologiques et susceptibilités aux hémopathies malignes	Réf.
DEFAUTS PLAQUETTAIRES HEREDITAIRES						
Activité enzymatique et voie de signalisation	Syndrome Leucoocyte-Adhesion-Deficiency-III (Kindlin-3 deficiency) (612840)	FERMT3	AR	Taille normale	Susceptibilité aux infections, activation des neutrophiles défectueuse, leucocytose	¹⁹¹
Granules denses	Syndrome de Phermansky-Pudlak (617050, 614171, 614076, 614073, 608233)	HPS10, HPS9, HPS7, HPS4, HPS2	AR	Taille normale	Immunodéficiência, leucopénie, colite granulomateuse, infections récurrentes	^{192, 193}
Granules denses	Syndrome de Chediak-Higashi	LYST	AR	Taille normale	Immunodéficiência, infections récurrentes, lymphohistiocytose hémophagocytaire	⁸⁵
Granules denses	Syndromes de Griscelli	RAB27, MYO5A, MLPH	AR	Taille normale	Neutropénie variable, lymphohistiocytose, fonction cytotoxique réduite des NK et de certaines cellules T	^{194, 192}

Hypothèses et objectifs

Le rôle de NBEAL2 dans le système immunitaire n'est pas bien compris. Si son implication dans le trafic vésiculaire semble établie mais non détaillée, le mécanisme conduisant au développement de symptômes auto-immuns n'est pas décrit.

Les protéines de la famille BEACH sont impliquées dans le trafic vésiculaire⁷⁶. NBEAL2 étant un membre de cette famille, nous avons fait l'hypothèse que cette protéine avait un rôle dans le trafic vésiculaire des cellules du système immunitaire.

Dans les mégacaryocytes humains, en l'absence de NBEAL2, le contenu des granules- α est acheminé vers les endosomes de recyclage RAB11+¹³⁶.

Dans des modèles murins, WDFY4, membre de la famille BEACH, est très fortement exprimée dans les vésicules de recyclage RAB11+. WDFY4 s'ancre à la protéine HSP90AB1 sur les membranes des endosomes et facilite la translocation du contenu des vésicules en vue de leur dégradation¹⁰⁸. Enfin, chez l'humain, LRBA, une autre protéine BEACH, intervient dans le recyclage de CTLA-4 au niveau des endosomes RAB11+, en empêchant le checkpoint immunitaire d'être dégradé dans les lysosomes⁷⁵.

Ainsi, par analogie avec d'autres membres de la famille BEACH, nous avons également fait l'hypothèse que NBEAL2 pouvait être impliquée dans le trafic et le recyclage de checkpoints immunitaires. Cette hypothèse pourrait expliquer le développement de manifestations auto-immunes chez les patients souffrant du syndrome des plaquettes grises.

Les objectifs de cette thèse peuvent être résumés en trois axes :

- Mieux caractériser le phénotype immunitaire des patients GPS,
- Trouver les partenaires protéiques de NBEAL2 dans les cellules immunitaires, afin de mieux comprendre son rôle dans le trafic vésiculaire,
- Comprendre le mécanisme conduisant au développement de manifestations auto-immunes chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises.

Ainsi, cette thèse devrait contribuer à une meilleure compréhension du rôle de NBEAL2 dans l'immunité. Ces travaux pourraient alors permettre une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique des symptômes immunologiques développés chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises.

Matériels et Méthodes

1. Échantillons biologiques

1.1. Recrutement des patients

Les patients atteints du syndrome des plaquettes grises ont été recrutés grâce à une collaboration avec le service d'Hématologie Immunologie Oncologie Pédiatrique de l'Hôpital Trousseau à Paris. Les patients souffrant de symptômes auto-immuns, et notamment de purpura thrombopénique immunologique (PTI) sont envoyés au laboratoire pour une exploration par WES (whole exome sequencing).

1.2. Préparation et conservation des échantillons

Les prélèvements sanguins sont réalisés essentiellement sur héparinate de lithium (ou sur EDTA occasionnellement). Un échantillon de sang est conservé à -20°C en vue de l'extraction ultérieure d'ADN. Le plasma est collecté après une centrifugation de 5 min à 2300rpm, puis congelé à -20°C pour son utilisation ultérieure lors de dosages protéiques. Les PBMC (Peripheral Blood mononuclear cells) sont isolées des autres composants du sang grâce à un gradient de densité réalisé avec une solution appelée lymphoprep (Ficoll Hypaque). Les PBMC sont récupérées après centrifugation à 2200 rpm pendant 30 min. Après lavage dans du PBS (phosphate buffer saline), les PBMC sont congelées dans du sérum de veau fœtal avec 10% de DMSO (dimethyl sulfoxide) et conservées à l'azote liquide.

1.3. Préparation des cellules T

Pour l'isolation d'une grande quantité de cellules T, des anneaux de cytophèrese ont été reçus en provenance de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les PBMC ont été récupérées grâce au kit SepMate (Stemcell Technologies, # 85450), selon le protocole du fournisseur.

Les cellules T ont ensuite été isolées en utilisant le kit EasySep™ Human T Cell Isolation (Stemcell Technologies, # 17951) en suivant le protocole du fournisseur. Les cellules sont ensuite congelées et cryopréservées à -150°C .

2. Cultures cellulaires

2.1. Milieux de cultures

Panserin complet

Milieu Panserin 401 (PAN BIOTECH, # P04-710401), complété avec 5% de sérum AB humain, 1% de penicillin/streptomycin (Thermofisher, 15140122) et 1% de L-glutamine (Thermofisher, 25030081) et filtré avec une unité de filtration stérile à usage unique Nalgene Rapid-Flow avec membrane en PES (Thermofisher, # 568-0010).

RPMI complet

Milieu RPMI 1640 (Thermofisher, # 21875034), complété avec 10% de serum de veau fœtal préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min (FBS, Thermofisher, 10270106).

Immunocult complet (IC-C)

Milieu ImmunoCult - XF T Cell Expansion Medium (StemCell, #10981), complété avec du sérum de veau fœtal à 2% en volume (LifeTechnologies, #10500) et de la Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) à 1% (LifeTechnologies, #15140-122).

X-Vivo15 Complet

Milieu X-VIVO 15 sans Gentamycin ou Phenol Red (Lonza, #BE02-061Q), complété avec 1% de Penicillin/Streptomycin (LifeTechnologies, #15140-122).

2.2. Activation et culture des lymphocytes T primaires

L'activation des cellules T est réalisée à partir des PBMC de patients ou de donneurs sains provenant de l'EFS. Les cellules T sont activées par liaison des récepteurs CD3/CD28 avec des Dynabeads (Thermofisher, #11141D). Les cellules sont mises en culture à 1.10^6 /mL/10 μ L de Dynabeads dans du milieu Panserin complet. Après 3 jours de culture, les cellules sont centrifugées sur Ficoll pour éliminer les débris et les cellules mortes puis remises en culture dans du Panserin complet avec de l'interleukine-2 à 100 unités internationales/mL (U/mL) afin de stimuler la prolifération cellulaire. Tous les deux jours, l'expansion des cellules est poursuivie par un ajout de Panserin complet avec IL-2.

Pour les expériences nécessitant uniquement l'activation des cellules T, préalablement isolée avant congélation, le milieu de culture utilisé est de l'Immunocult.

2.3. Génération de lignées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Afin d'obtenir un modèle *in vitro* pour l'étude de la physiopathologie des manifestations auto-immunes chez les patients GPS, nous avons souhaité reprogrammer des PBMC de patients en cellules souches pluripotentes induites. Ces iPSC pourront à terme être différenciées en cellules des tissus ciblés par l'auto-immunité. On pourrait alors envisager des expériences de co-culture avec les PBMC des patients afin d'étudier la réponse immunitaire.

Ce protocole a été réalisé avec l'aide de la plateforme iPS de l'institut Imagine.

Avant la reprogrammation, les PBMC sont cultivées pendant quatre jours dans du milieu StemPro™-34 SLM (ThermoFisher Scientific) avec les cytokines SCF, FLT-3 (100 ng/mL), IL-3 et IL-6 (20 ng/mL) (PeproTech). Ensuite, $2,5 \cdot 10^5$ PBMC ont été transduites à l'aide du kit de reprogrammation CytoTune-iPS 2.0 Sendai (ThermoFisher Scientific) en suivant les instructions du fabricant. Après 3 jours, les cellules transduites ont été étalées sur des boîtes de culture recouvertes de vitronectine (technologies StemCell) dans du milieu StemPro™-34 SFM sans cytokines. Au jour 7, le milieu a été changé en remplaçant la moitié du milieu StemPro™-34 par du milieu ReproTeSR™ (technologies StemCell). Le lendemain, le milieu entier a été remplacé par du milieu ReproTeSR et changé quotidiennement jusqu'à l'apparition de colonies iPSC. Après trois semaines, quelques colonies ont été prélevées manuellement et ont été multipliées pendant 10 passages pour une caractérisation plus poussée. Les iPSC ont été cultivées sur des boîtes de culture recouvertes de vitronectine avec renouvellement quotidien du milieu mTeSR™1 (technologies StemCell) et repiquées manuellement tous les huit à dix jours.

Une lignée de cellules souches pluripotentes induites d'un patient porteur d'une mutation hétérozygote de NBEAL2 d'origine paternelle (p.R688C) et d'une mutation hétérozygote de LRBA d'origine maternelle (p.P37S) a été générée. Le détail de cette lignée et les résultats des contrôles de qualité sont donnés en annexe 14.

3. Biologie moléculaire et biochimie

3.1. Extraction de l'ADN

Afin de réaliser les exomes des patients, l'ADN a été extrait à partir de sang total à l'aide de la technique phénol/chloroforme^{195, 196}. Ce protocole permet de lyser les cellules, de digérer les protéines et de les éliminer, et de précipiter l'ADN.

Afin de vérifier les mutations par séquençage par la technique de Sanger, l'ADN a été extrait à partir de sang total ou de cellules de patients en utilisant les kits QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) ou Quick-DNA/RNA Miniprep (Zymo Research).

3.2. Extraction de l'ARN et retro-transcription

Les ARN ont été extraits à partir de cellules en utilisant les kits d'extraction RNeasy (Qiagen) ou Quick-DNA/RNA Miniprep (Zymo Research). Les ARN ont été conservés à -80°C ou rétrotranscrits. Les rétrotranscriptions des ARN en cDNA ont été faites grâce au kit QuantiTect Reverse Transcription de Qiagen, dont le protocole comporte une déplétion de l'ADN génomique. Les cDNA sont conservés à -20°C.

3.3. Séquençage

3.3.1. Whole exome sequencing (WES)

L'ensemble des exomes a été réalisé en collaboration avec la plateforme de génétique de l'institut Imagine. Le principe du WES peut être expliqué selon le mécanisme décrit dans la Figure 24¹⁹⁷. A partir de l'ADN génomique, une librairie est générée. Les fragments d'ADN

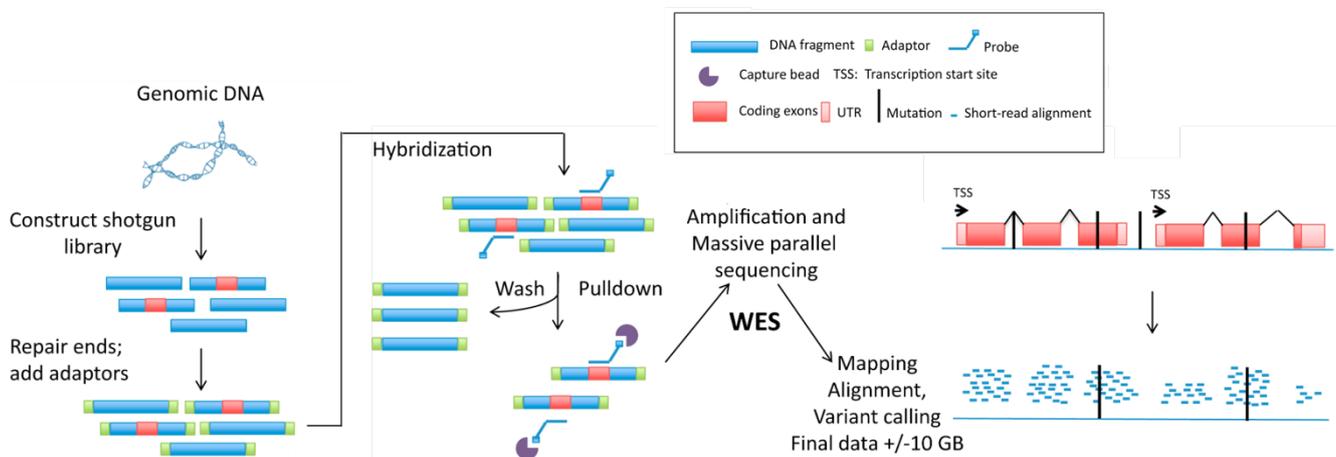


Figure 24: Principe expérimental du séquençage WES (Whole Exome sequencing)¹⁹⁷.

sont ensuite purifiés grâce à des sondes et des billes de capture pour retenir les fragments codant des exons (Human All Exon v5—50 Mb, Agilent Technologies). Ces fragments sélectionnés sont ensuite amplifiés et séquencés en parallèle sur le système HiSEQ 2000 (Illumina). L'alignement est ensuite fait sur le génome humain de référence hg19 à l'aide de l'algorithme de correspondances exacte maximales du logiciel Burrows-WheelerAligner. L'analyse du génome est réalisée avec le Genome Analysis Toolkit (GATK). Les doublons PCR sont supprimés avec les outils Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Le recalibrateur GATKbasequalityscore est appliqué pour corriger les artefacts de séquençage. Les variants ont été annotés en se basant sur la dernière version de la base de données Ensembl et analysés grâce au logiciel développé par la plateforme de bioinformatique de l'institut Imagine : Polyweb.

3.3.2. Séquençage Sanger après amplification par PCR

Afin de confirmer les mutations trouvées après analyse d'exomes et de réaliser les ségrégations familiales, l'ADN ou le cDNA des patients est amplifié autour de la mutation par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les primers sont générés à l'aide du site PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La taille des amplicons est vérifiée par migration sur un gel d'agarose à 1%. Les produits de PCR sont purifiés sur Sephadex G-50, séquencés grâce au kit BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher, # 4337455) et lus par électrophorèse capillaire avec le 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Les chromatogrammes obtenus sont ensuite analysés et alignés grâce au logiciel ApE (A plasmid Editor RRID : SCR_014266). La liste des primers utilisés est donnée en Annexe 6 (Tableau 19, Tableau 20 et Tableau 21).

3.4. Analyse par RT-qPCR

Les niveaux d'expression de différents gènes ont été réalisés par Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) avec le réactif SyberGreen et le thermocycleur LightCycler ViiA7 system (Roche).

Les primers utilisés sont générés à l'aide du site PrimerBlast

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et listés en Annexe 7 (Tableau 22)

La quantification a été normalisée avec 2 gènes de ménage endogènes (GAPDH, Actin). Les résultats ont été mis en forme sur le logiciel GraphPad Prism v.9.2.0.

3.5. Extraction et quantification des protéines

Les cellules sont lavées à froid et les protéines sont extraites dans un tampon de lyse RIPA (Thermo Fisher, # 89900) complété par des cocktails d'anti-phosphatases (Sigma-Aldrich, #P5726 et #200-664-3) et d'anti-protéases (Thermo Fisher, # 87786). Après 30 min d'incubation sur glace et une centrifugation de 5 min à 12000rpm, le surnageant contenant les protéines extraites est récupéré. Les protéines sont conservées à -20°C (pour une utilisation à court terme) ou à -80°C. Les concentrations des lysats protéiques sont mesurées juste avant utilisation grâce au kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher, #23225).

3.6. Western Blot NBEAL2

Entre 15 et 40 µg de protéines sont déposés par puits après une étape de dénaturation et de réduction avec du NuPAGE LDS Sample buffer 4X (Thermo Fisher, #NP0007) et du NuPAGE sample reducing agent 10X (Thermo Fisher, NP009). La migration est réalisée sur des gels pré-coulés NuPAGE 3-8% Tris Acetate (Thermo Fisher, #EA0378BOX) à 150V pendant 2h. Le transfert se fait sur des membranes PVDF (Thermo Fisher, #IB24002) avec le système de transfert sec iBlot 2 (Thermo Fisher, #IB21001) en utilisant un programme de 10min à 25V constant. Les membranes sont bloquées avec du lait à 5% dans du TBS (Tris Buffer saline) Tween 0,1% pendant 1h à TA (température ambiante) sous agitation, puis incubées avec l'anticorps primaire recombinant de lapin Anti-NBEAL2 [EPR14501(B)] - N-terminal (Abcam, #ab187162) dilué au 1000^{ème} sous agitation à 4°C sur la nuit. Après 3 lavages avec du TBS Tween 0,1%, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase) a été incubé 1h à TA sous agitation à la dilution de 1 :10000^e dans du lait à 5% TBS Tween 0,1%. Après 3 lavages avec du TBS Tween 0,1%, la membrane a été incubée 5 min, à TA, dans le noir, avec le substrat de la HRP, contenu dans la solution commerciale SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, #34580), puis révélée sur des hyperfilms Amersham (GE Healthcare, #28-9068-37) avec le développeur CuriX 60 (Agfa).

4. Immunophénotypages multiparamétriques

4.1. Cytométrie en flux

4.1.1. Marquage intracellulaire de CTLA-4

Le marquage intracellulaire de CTLA-4 sur les PBMC ou les cellules T activées a été réalisé avec le panel d'anticorps décrit dans le Tableau 5. Après lavage des cellules au PBS et compte, le marquage extracellulaire a été réalisé pendant 30 min sur glace et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et centrifugées à 350g, 5min à 4°C. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées avec le kit de eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (#00-5523-00), selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été lavées dans le tampon du kit (centrifugation 800g, 5min, 4°C). Puis les anticorps pour le marquage intracellulaire ont été ajoutés et incubés sur glace pendant 1h à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées avec le tampon du kit, resuspendues dans 250 µL de PBS et analysées sur le cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 SORP Cell Analyzer (TReg) ou sur le cytomètre spectral Sony Biotechnology SP6800 Spectral Analyzer (T activés).

Tableau 5: Panel d'anticorps utilisé pour le marquage intracellulaire de CTLA-4 sur les cellules T

	Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
Extracellulaire	CD3	PerCp5.5	OKT3	Biolegend	317336
	CD4	BV510	OKT4	Sony	2187220
	CD25	PE-Cy7	M-A251	BD Bioscience	561405
	CD45RA	PE-Cy5	HI100	Sony	2120550
	CD127	FITC	A019D5	Sony	2356560
Intra cellulaire	CTLA-4	PE	BNI3	BD Bioscience	555853
	FoxP3	APC	PCH101	Thermofisher	17-4776-42
	Helios	eF450	22F6	Thermofisher	48-9883-42

4.1.2. Marquages de checkpoints immunitaires

Trois panels permettant de détecter l'expression des checkpoints immunitaires sur les cellules T activées ont été mis au point sur des cytomètres analyseurs spectraux : deux panels sur le

SP6800 (Sony Biotechnology) et un panel sur l'Aurora CS (Cytek). Les anticorps utilisés sont listés en Annexe 8 (Tableau 23, Tableau 24). Le protocole de marquage est similaire à celui décrit au paragraphe précédent. Le seul anticorps marqué en intracellulaire est CTLA-4. Le kit de fixation utilisé est le kit Cytotfix/Cytoperm (#554714, BD). Des marqueurs de viabilité sont utilisés avant les marquages extracellulaire, ils ont été utilisés suivant les recommandations des fournisseurs et leurs références sont précisées en Annexe 8. Les récepteurs de fragments Fc ont été bloqués à l'aide du réactif FcR Block (Miltenyi Biotec, 130-059-901), selon les indications du fournisseur.

4.1.3. Marquages des PBMC utilisées pour les expériences de séquençage sur cellules uniques

En parallèle des expériences de séquençage sur cellules uniques (sc RNA Seq), des phénotypages des PBMC utilisées ont été réalisés par cytométrie en flux. Ces marquages étaient divisés en 3 panels dont les détails sont donnés en Annexe 9 (Tableau 25, Tableau 26 et Tableau 27). Ils permettent d'effectuer un contrôle qualité des résultats obtenus après analyse bio-informatique de l'expérience de sc RNA Seq. En effet, ils nous ont permis de confirmer l'existence de biais de clusters parmi les cellules immunitaires des patients. Progressivement, ces marquages de cytométrie ont été remplacés par des marquages de cytométrie de masse (cf prochain paragraphe).

Le protocole général de ces marquages en cytométrie de flux est le suivant : pour chaque panel, les cellules mortes ont été marquées à l'aide du kit Zombie NIR Fixable Viability (Biolegend, # 423105), selon les indications du fournisseur. Les récepteurs de fragments Fc ont été bloqués à l'aide du réactif FcR Block (Miltenyi Biotec, 130-059-901), suivant les recommandations du fournisseur. Enfin les marquages extracellulaires ont été faits avec les anticorps détaillés en Annexe 9, 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Les échantillons ont été analysés sur le cytomètre spectral SP6800 (Sony).

4.2. Cytométrie de masse

Un phénotypage immunitaire plus exhaustif a été réalisé grâce au kit Maxpar Direct Immune Profiling (Fluidigm) avec un panel d'anticorps de 30 marqueurs pour analyse CyTOF (Cytometry by Time Of Flight). A ces 30 marqueurs, 8 anticorps supplémentaires ont été ajoutés afin de détecter FAS et certains checkpoints immunitaires (liste en Annexe 10, Tableau 28). Trois millions de PBMC ou 300 µL de sang total sur héparine ont été utilisées par marquage.

Les cellules ont été incubées 20 min à température ambiante (TA) avec 3µL d'héparine à 10.000 U/mL et 5µL de Human TruStain FcX (Biolegend), puis incubées 30 min à TA avec le cocktail d'anticorps pour un marquage extracellulaire (sauf CTLA-4 pour lequel un marquage intracellulaire est nécessaire). Après lavages et perméabilisation à l'aide du kit Cytofix CytoPerm (#554714, BD) l'anticorps CTLA-4 a été incubé avec les cellules pendant 30 min à TA. Après lavages, les cellules ont une nouvelle fois été fixées pendant 15 min avec une solution de 1,6% de PFA (paraformaldéhyde, Thermo Fisher). Enfin les cellules ont été incubées dans le tampon Fix&Perm (Fluidigm) avec l'intercalateur d'Iridium (permettant de marquer le noyau) (Fluidigm, 1 :1000) pendant une nuit à 4°C. Les solutions cellulaires ont été congelées à -80°C. Pour l'acquisition, les cellules ont été lavées et remises en suspension à une concentration de 1.10^6 /mL dans la solution d'acquisition de cellules Maxpar, une solution à haute concentration ionique, et mélangées avec 10 % de billes EQ (permettant une calibration automatique de l'appareil) immédiatement avant l'acquisition. L'acquisition des événements a été réalisée sur le cytomètre de masse Helios (Fluidigm) couplé au logiciel CyTOF version 6.7.1014 (Fluidigm) à la Plateforme de Cytométrie de la Pitié-792 Salpêtrière (CyPS).

5. Dosages protéiques dans les plasmas

5.1. Dosage de FasL et de la vitamine B12

Le dosage de FasL dans le plasma des patients a été réalisé avec le kit ELISA (R&D, #DFL00), selon les recommandations du fournisseur.

Le dosage de la vitamine B12 a été réalisé en collaboration avec le Dr Nathalie Neveux, au laboratoire de nutrition biologique de l'hôpital Cochin, Paris. Ce dosage a été réalisé à l'aide d'un test immunologique par électrochimiluminescence « ECLIA » contenu dans le kit Elecsys® Active B12 (holoTC) (Roche, # 07 713 207 190), selon les recommandations du fournisseur.

5.2. Legendplex

Afin de mesurer les concentrations des récepteurs immunitaires présents dans les plasmas, le kit LEGENDplex Immune Checkpoints Panel 1 (Biolegend, # 740961) a été utilisé. Ce multiplex permet la détection simultanée des formes solubles de CD25 (IL-2Ra), 4-1BB, sCD27, B7.2 (CD86), le TGF-β1 actif libre, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, Tim-3, LAG-3, et

la Galectin-9. Les résultats obtenus ont été analysés sur <https://legendplex.qognit.com/> puis sur le logiciel GraphPad Prism v.9.2.0.

5.3. Dosage des autoanticorps plasmatiques

En collaboration avec le Biocentre Microarray Core de l'Université Southwestern Medical District au Texas aux États-Unis, le dosage de 128 autoantigènes a pu être réalisé dans les plasmas des patients. La liste des autoantigènes testés est donnée en Annexe 11, Tableau 29. La technique d'Autoantigen Microarray for high-throughput autoantibody profiling est détaillée dans l'article de référence de Zhu et al, 2015 ¹⁹⁸.

6. Edition génétique avec le système CRISPR/Cas9

Afin d'étudier le rôle de *NBEAL2* dans des lymphocytes T primaires, le système CRISPR/Cas9 a été utilisé afin de générer des cellules *NBEAL2* KO. En utilisant un guide ARN approprié, le système CRISPR/Cas9 est capable de créer une rupture dans le génome de la cellule au site complémentaire du guide ARN et à proximité d'un PAM (protospacer adjacent motif). Les systèmes endogènes de réparation de l'ADN s'activent alors pour réparer la cassure de l'ADN. La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) favorise la ligature directe de la molécule d'ADN brisée. En raison de l'imperfection du système NHEJ, cela peut entraîner l'introduction ou la délétion de paires de base, causant souvent une perte d'expression génétique et une absence de protéines dans la cellule.

Ici, des cellules T primaires, préalablement activées ont été utilisées. Les cellules analysées à la fin de l'expérience sont donc un pool de cellules, et non une lignée cellulaire avec des caractéristiques génétiques uniques. Ce choix permet de reproduire *in vitro* l'impact d'une absence de la protéine NBEAL2 dans un système endogène.

L'électroporation de cellules T activées avec des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) fabriqués directement à partir de la protéine Cas9 recombinante (IDT, référence #10000735) et de guides ARN synthétiques ont montré une efficacité élevée sur un certain nombre de cibles. C'est donc la technique qui a été adoptée.

6.1. Stratégie de design des guides ARN

Le choix de la localisation des guides a été fait en suivant les principes d'efficacité explicités dans le chapitre 9 du livre «*Target Discovery and Validation: Methods and Strategies for Drug*

Discovery » de A.T. Plowright ¹⁹⁹. Le premier objectif est de trouver un guide ayant la capacité de cibler le plus grand nombre de transcripts possibles pour le gène étudié.

Il faut ensuite cibler une séquence à au moins 50 nucléotides (nt) en aval d'une jonction d'exons. Il faut également éviter de cibler une séquence située dans les 200 premiers nucléotides du codon d'initiation de la protéine, afin d'éviter que la traduction ait quand même lieu grâce à un site d'initiation de la traduction secondaire. Il faut éviter de viser un exon long (<400 nt) ou un exon dit « symétrique », c'est-à-dire contenant un nombre de nt multiple de 3. En effet si un exon symétrique est ciblé, cela pourrait entraîner le saut d'un exon à l'étape de traduction et le cadre de lecture ne serait pas décalé, causant peut-être la formation d'une néo-protéine avec seulement un exon manquant.

Une fois la région d'intérêt identifiée, sa séquence peut être importée dans l'outil CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/> ²⁰⁰) qui permettra d'obtenir une liste des guides candidats. Des scores de spécificité sont attribués à chaque guide. On ne retiendra que les guides ayant un score MIT > 50 ²⁰¹. Les guides idéaux possèdent une teneur en GC comprise entre 40 et 60%. De plus, une guanine en -1 du PAM est favorable, alors qu'une adénine en -1 du PAM est à éviter.

Les guides se localisant sur des polymorphismes ou ceux pouvant reconnaître un grand nombre de séquences avec un faible nombre de mismatch, sont évités.

Six guides ARN ont ainsi été générés pour l'obtention de KO *NBEAL2* et 6 autres pour l'obtention de KO *LRBA*. Leurs séquences sont données dans le Tableau 6. Les guides ont été commandés chez IDT à 10 nmol sous le format « single guide RNA » (sgRNA).

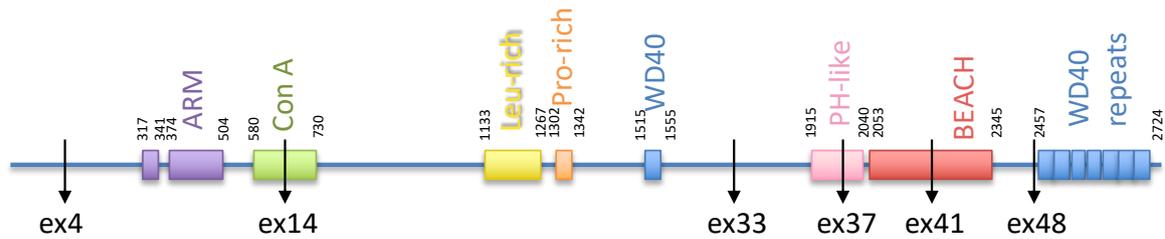
Tableau 6: Liste des guides RNA utilisés pour générer les KO par CRISPR-Cas9

Nom du guide	Séquence du guide (sans la PAM)	Pourcentage GC	Sens	Nombre de transcripts ciblés / transcripts codants
LRBA ex3	TTACGTGCCAAGCAGAAGTC	50%	Forward	5/11
LRBA ex22	CCCCTCATATTTGACTGCA	45%	Forward	6/11
LRBA ex27	AAAGGAATAAGGCTATGCAT	35%	Forward	8/11
LRBA ex44	GACAAATCTCTGAAGTTGGT	40%	Forward	8/11
LRBA ex50	CACTCCCCTGTTACTCACG	55%	Reverse	7/11
LRBA ex55	GTTATCATCTGTTCCATCG	40%	Forward	7/11
NBEAL2 ex4	GGCCTGCCTCTATGTTCTCC	60%	Reverse	2/6
NBEAL2 ex14	TCTTTACCAGCAGCGGCTCA	55%	Forward	3/6
NBEAL2 ex33	CCTGGAGGGGCTACGCTACA	65%	Forward	4/6

NBEAL2 ex37	TACGGAACCAGGTGTACTCG	55%	Forward	4/6
NBEAL2 ex 41	CACCGAGTGGAACTGCCGGT	65%	Reverse	5/6
NBEAL2 ex 48	GGAAAGCTGCTATTCAGCGG	55%	Forward	5/6

La localisation des guides par rapport aux domaines protéiques connus des protéines est représentée en Figure 25:

NBEAL2



LRBA

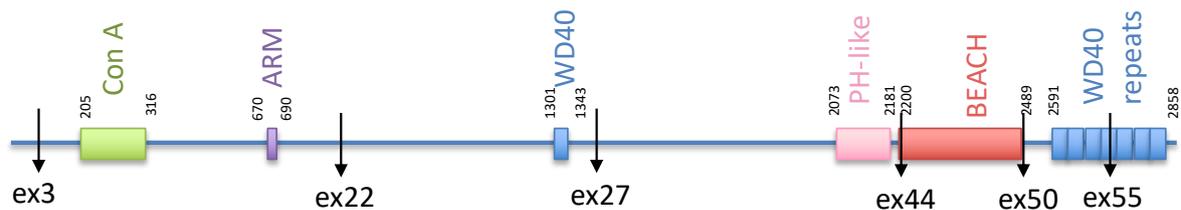


Figure 25: Positions, au niveau protéique, des guides RNA utilisés pour générer des KO de NBEAL2 ou de LRBA par le système CRISPR-Cas9

6.2. Protocole détaillé

Le protocole utilisé est schématisé à la Figure 26 :

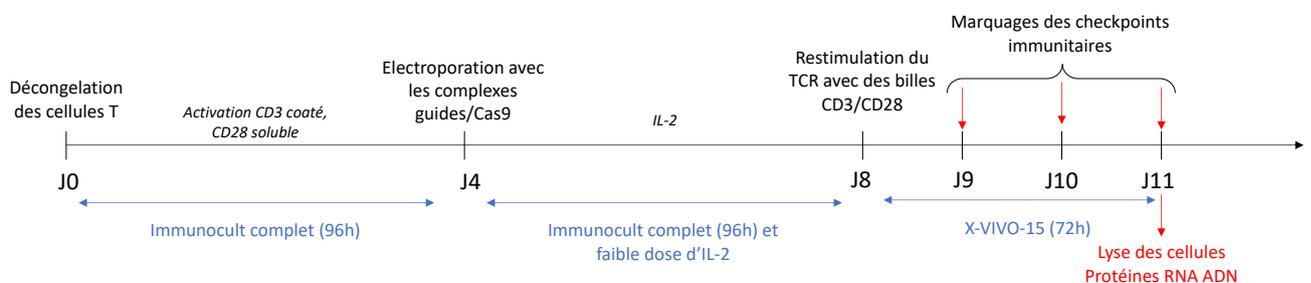


Figure 26: Schéma du protocole utilisant le système CRISPR-Cas9 pour générer des cellules T primaires activées KO NBEAL2 ou LRBA

6.2.1. Décongélation et mise en culture des cellules

Le premier jour (J0), les flasques de cultures sont recouvertes avec un anticorps anti-CD3 (clone UCHT1, Invitrogen #16-0038-85) à 0,3 µg/mL dans du PBS (20mL / flasque T150). L'incubation est faite pendant 4h à 37°C. La décongélation de cellules T préalablement purifiées à partir de sang de donneurs sains de l'EFS a été faite dans 10 mL de milieu Immunocult chaud. Les cellules ont été comptées à l'aide du compteur automatique Vi-Cell (Beckman Coulter), puis les cellules ont été centrifugées 6min, à température ambiante (TA), à 1250 rpm. Les cellules ont été resuspendues à 500 000 cellules/mL dans du milieu Immunocult Complete (IC-C) medium (ImmunoCult - XF T Cell Expansion Medium, StemCell #10981 ; 2% FBS from LifeTechnologies #10500 ; 1% penicilin/Streptomycin, LifeTechnologies #15140-122). L'anticorps anti-CD28 (clone 28.2, Ozyme #BLE302934) a été ajouté à la concentration finale de 0,06 µg/mL.

La solution d'anti-CD3 présente dans les flasques a été aspirée et les flasques ont été lavées 3 fois avec 10 mL de PBS. 40 mL de solution cellulaire ont été ajoutés par flasque et incubées à 37°C pendant 4 jours.

6.2.2. Préparation des réactifs en amont de l'électroporation

Au 4^{ème} jour, les cellules ont été électroporées. Préalablement à l'électroporation, les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) entre l'enzyme Cas9 (Alt-R Cas9 Nuclease V3, IDT, 10 mg/ml, Mw: 162 kDa, #10000735) et les guides RNA ont été formés 20 min à température ambiante, dans un tampon ne contenant pas de nucléases (IDT, #1072570, lot#313547) suivant les dilutions suivantes :

Tableau 7 : Formation des complexes ribonucléoprotéiques entre la Cas9 et les guides ARN

Composés	Volume (µl)/ électroporation pour 1 millions de cellules
Nuclease free duplex buffer	2,1
Alt-R guide RNA	1,2 (120pmol)
Alt-R cas9 enzyme (61µM stock)	1,7 (104pmol)
Volume total	5

L'électroporation et la remise en suspension des cellules après électroporation doivent se faire très rapidement, tous les réactifs sont donc préparés juste avant la nucléofaction.

Le système de nucléofaction Amaxa™ 4D-Nucleofector a été réglé sur les nucléocuvettes 16-puits et le programme P2-EH100.

Le tampon amplificateur d'électroporation (IDT, #1072570, lot#313547) a été re-suspendu dans le tampon sans nucléase à 100 nM. Le milieu Immunocult supplémenté avec de l'interleukine-2 (R&D Systems, #202-IL) ; FBS 2% ; Pen/Strep 1% a été préparé et préchauffé à 37°C.

Le supplément Nucleofector a été ajouté à la solution Nucleofector du kit P2 Primary Cell 4D X Kit S (LONZA #V4XP-2032). Une plaque de 96 puits à fond plat a été préparée avec 125 µL de milieu IC-C+IL-2 à 37°C par puits. De plus 50 µL de milieu IC-C+IL-2 / électroporation ont été mis à 37°C pour re-suspendre les cellules directement après l'électroporation.

6.2.3. Électroporation des cellules

Les cellules T pré-activées ont été rassemblées dans un tube Falcon et centrifugées à 320g, à TA pendant 10 min. Un lavage avec 30mL de PBS a été réalisé, puis les cellules ont été re-suspendues dans 10 mL de PBS et leur nombre a été déterminé à l'aide du compteur automatique Vi-Cell. Dans un nouveau tube Falcon, le volume nécessaire de suspension pour obtenir 1.10^6 cellules / électroporation a été ajouté et complété jusqu'à 30 mL de PBS, puis centrifugé 10 min, à 320g, à TA. Le surnageant a été aspiré au maximum sans perturber le culot. Les cellules ont ensuite été re-suspendues dans la solution P2-4D Nucleofactor™ X Solution : 20µL/ 1.10^6 cellules/électroporation. 1µL d'amplificateur d'électroporation pour chaque 20 µL / électroporation a été ajouté. Puis les cellules ont été divisées et 5 µL de solution RNP ont été ajoutés pour chaque électroporation en pipetant 2-3 fois. Chaque condition a été ajoutée à une cupule de la Nucleocuvette (25 µL au total). L'absence de bulles dans toutes les cupules a été vérifiée et la nucleocuvette a été placée sur l'Amaxa. Immédiatement après électroporation, 50 µL de milieu IC-C+IL-2 chaud ont été ajoutés à toutes les cupules. Les 75 µL de suspension cellulaire ont été transférés dans la plaque de 96 puits préalablement préparés.

Les cellules ont été incubées pendant quatre jours à 37°C.

6.2.4. Poursuite de la culture

A J7, les cellules sont entretenues en les diluant au 1/3 dans du milieu IC-C+IL-2.

A J8, les cellules sont comptées et restimulées par des Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 à 1 billes /16 cellules. Les cellules sont remises en culture dans des plaques à 100 000 cellules / 100 µL de milieu X-Vivo15 (Lonza, #BE02-061Q) + 1% pen/strep par puits en incubation à 37°C.

6.2.5. Marquage en cytométrie de flux

Chaque jour post re-stimulation (24, 48 et 72h post ré-activation), les surnageants ont été prélevés et conservés à -20°C et les cellules ont été marquées pour analyser l'expression des checkpoints immunitaires sur le cytomètre Cytex® Aurora CS selon le protocole décrit au paragraphe 4.1.2.

6.2.6. Extraction de protéines, d'ADN et d'ARN

72h post réactivation, une partie des cellules restantes a été mise en culots secs pour extraction ultérieure à l'aide du kit Quick-DNA/RNA Miniprep (Zymo Research). Le reste des cellules a été lysé afin d'extraire les protéines des différentes conditions expérimentales (un lysat par guide testé).

7. Analyses transcriptomiques

7.1. Séquençage ARN bulk

Les analyses Bulk-RNA-Seq ont été réalisées sur des lymphocytes T activés avec des billes CD3/CD28 à partir de PBMC congelées extraites d'échantillons sanguins sur héparinate de lithium. L'ARN a été extrait avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) en suivant le protocole du fournisseur avec l'étape de DNase.

La suite du protocole a été réalisé par la plateforme de génomique de l'institut Imagine.

La qualité des ARN a été évaluée par électrophorèse capillaire en utilisant des réactifs ARN à haute sensibilité avec le Fragment Analyzer (Agilent Technologies) et la concentration en ARN a été mesurée en utilisant à la fois la spectrométrie utilisant l'électrophorèse capillaire Xpose (Trinean) et le Fragment Analyzer. Les bibliothèques RNAseq ont été préparées à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit Universal Plus mRNA-Seq (Nugen) tel que recommandé par le fabricant. Les cDNA produits à partir de la fraction poly-A⁺ ont été séquencés sur un NovaSeq6000 d'Illumina (Paired-End lit 100 bases + 100 bases). Un total d'environ 50 millions de lectures a été produit, par bibliothèque.

7.2. Séquençage ARN sur cellules uniques

Les analyses de séquençage ARN sur cellules uniques (sc RNA Seq) ont été réalisées sur les PBMC congelées, préalablement isolées d'échantillons sanguins sur héparine. La décongélation

des PBMC a été réalisée suivant le protocole de 10x Genomics. Les bibliothèques sc-RNA-Seq ont été générées en utilisant les kits Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v.2 / v.3 ou v.3.1 de 10x Genomics selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules ont été comptées, diluées à 1000 cellules/ μ L dans du PBS + 0,04 % et 20 000 cellules ont été chargées dans le 10x Chromium Controller pour générer des gouttes encapsulant des cellules uniques. Après transcription inverse, les gouttes ont été rompues. Les cDNA bar-codés ont été isolés, amplifiés et indexés par PCR. Les banques purifiées ont été séquencées sur un Novaseq 6000 (Illumina).

8. Analyses protéomiques

8.1. Immunoprécipitation

8.1.1. Activation des cellules

Pour l'immunoprécipitation de CTLA-4, des cellules T isolées du sang de donneurs sains ont été utilisées. Une comparaison entre cellules T non activées et cellules T activées via le TCR a été réalisé chez 3 donneurs. Les cellules T non stimulées expriment peu CTLA-4 et ont constitué un contrôle négatif de l'immunoprécipitation. L'activation des cellules a été faite avec des Dynabeads CD3/CD28 (ThermoFisher, # 11141D) : 1 bille pour 30 cellules. Et les cultures ont été faites à 1.10^6 cellules/mL à 37°C dans du milieu Immunocult + 1% penicillin/streptomycin. Après quatre jours de culture, les cellules T activées ont été comptées et re-suspendues dans du milieu d'Immunocult +1% P/S+IL-2. Le 5^{ème} jour, les cellules ont été lysées. Le même jour, les cellules T non activées ont été décongelées et rééquilibrées 1h à 37°C puis lysées.

Pour l'immunoprécipitation de NBEAL2, des PBMC de deux patients GPS et de deux donneurs sains ont été stimulées par des Dynabeads CD3/CD28 (ThermoFisher, # 11141D) et cultivées dans un milieu Panserin Complet, comme décrit au paragraphe 2.2. Les cellules ont été comptées et lysées après 10 jours de culture.

8.1.2. Couplage des anticorps aux billes

La veille des expériences d'immunoprécipitation, les anticorps nécessaires ont été couplés à des billes de résine agarose fonctionnalisées avec des groupements aldéhydes permettant le couplage covalent aux amines libres des anticorps.

Les anticorps utilisés sont :

- anti-CTLA-4 rabbit (ref Ab251599, Abcam, lot GR3344009-7) à 0,998 mg/mL
- Ou anti-NBEAL2 rabbit (ref Ab ab250919, Abcam)

Pour 4 conditions d'IP, le couplage de 50µg d'anticorps aux billes a été fait grâce au kit Thermo Pierce Direct IP kit (ThermoFisher, ref 26148) selon les instructions du fournisseur. Après les deux derniers lavages, les billes ont été resuspendues dans 400 µL de tampon Conditioning Buffer 1x et conservées à 4°C pendant 24h.

8.1.3. Cross-link et lyse cellulaire

Un cross-linker réversible a été utilisé pour préserver les interactions protéines-protéines : le dithiobis[succinimidyl]propionate] (DSP, Thermofisher, #22586, lot WB309463). Le DSP n'est pas soluble dans l'eau et a été dilué juste avant son utilisation dans du DMSO à une concentration de 10mg/mL, soit environ 25mM. Il a ensuite été dilué dans du PBS au 1:25^e (100 mL de DSP à 1mM final).

Les cellules ont été comptées et centrifugées (5min, 300g, TA) puis lavées avec 30mL de PBS froid. 5mL de la solution de DSP à 1mM ont été ajoutés sur les culots secs, et ce volume a été complété à 30mL après dissolution du culot à la pipette. Les cellules ont été incubées avec le cross-linker 30 min, à TA, sous agitation. Puis 750 µL de TRIS 1M ont été ajoutés à chaque solution et agités 3 min à RT. Après une centrifugation (300g, 5min, 4°C) le culot a été lavé avec 30 mL de PBS froid puis les cellules ont été recentrifugées (600g, 5min, 4°C). Les culots ont été resuspendus dans le tampon de lyse Octyl dont la composition est décrite dans le Tableau 8. Les solutions ont été soniquées 3 fois pendant 10 secondes.

Tableau 8: Composition du tampon de lyse pour les immunoprécipitations

Quantité pour 100mL de tampon de lyse	Réactifs	Fournisseur	Réf.
2,5 mL (1M)	25mM Tris	Invitrogen	15567-027
3 mL (5M)	150mM NaCl	Sigma	S5150-1L
1,2g (1,2%)	n-Octyl-β-D-glucopyranoside	Merck	494460-5gm
64mg	NaF	Sigma	S7920-100g
440mg	Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate	Sigma	S6422-100g
2 pastilles	complete protease inhibitor cocktail	ChemCruz	sc-29130
1mL	Na3VO4 100mM	NEB	P0758L
92mL	H2O		

Pour chaque condition, 10 μL de benzonase (Sigma, #E1014-25KU, lot #SLCG1171) ont été ajoutés. La benzonase est une endonuclease permettant de "digérer" l'ADN issus des cellules après lyse. Les lysats ont été incubés pendant 2h sous agitation en chambre froide. Les lysats ont été centrifugés à 15000 rcf, à 4°C pendant 15 min, puis le surnageant a été transféré dans un nouveau Falcon et une partie du lysat (100 μL , fraction INPUT) a été congelée. Les lysats ont été conservés sur glace le temps de réaliser un dosage protéique à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermofisher, #23225).

8.1.4. Immunoprécipitation

Les concentrations des lysats ont été ajustées si nécessaire suivant les résultats des dosages protéiques. L'équivalent 15 μg de billes couplées à l'anticorps la veille a été ajouté à chaque condition. Les lysats ont été agités sur une roue en chambre froide, pendant toute une nuit.

Le lendemain, les tubes Falcons ont été centrifugés 5 min, 1200g, 4°C. 100 μL des surnageants obtenus (Flow-through) ont été conservés sur glace. Le reste des surnageants a été aspiré avec une pointe effilée et les culots ont été lavés avec 10 mL de tampon de lyse froid, puis centrifugés à 1200g, 5 min, à 4°C. Les culots de billes ont été re-suspendus dans 400 μL de tampon de lyse froid et déposés sur des colonnes Pierce Spin Cups (Thermofisher, # 69700). Trois lavages ont été effectués en changeant le tube eppendorf sous la colonne à chaque fois, et en déposant les 400 μL de tampon de lyse dans le tube Falcon puis sur les billes de la colonne. Entre chaque lavage, une centrifugation de 2 min à 4°C 1200g a été réalisée.

8.1.5. Elution des protéines accrochées aux billes/anticorps

Une solution de 1x Blue loading buffer (3x Blue loading buffer, Cell Signaling Technologies, #56036S dilué dans de l'eau) a été préparée. 50 μL ont été ajoutés sur chaque colonne retenant les billes et incubés 20 min à 60°C, à 1000 rpm afin de dénaturer les protéines. Après une centrifugation (5min, 5000g, TA), l'éluat est récupéré et 3 μL de β -mercaptoéthanol (Biorad, ref #1610710) y sont ajoutés. Les éluats sont ensuite réduits 5 min à 60°C sous agitation, puis déposés sur le gel.

Les fractions des lysats protéiques initiaux (input) ainsi que les fractions des éluats finaux (flow-through) ont été dénaturées et réduites avec du Blue loading buffer et du β -mercaptoéthanol pendant 20 min à 60°C, à 1000 rpm.

8.1.6. Immunoblotting

Des gels midi 4-15%, 12 puits (Biorad, #5671083) ont été utilisés et une migration des échantillons pendant 1h30 à 180V a été réalisée dans un tampon Tris Glycine SDS 10x (Biorad, #161-0732) dilué au 10^{ème} dans de l'eau. Les gels ont été trempés dans un bain d'éthanol 20% pendant 2 min avant le transfert. Les transferts ont été réalisés sur des membranes de nitrocellulose (Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm Nitrocellulose Transfer Packs, Biorad, #1704159) avec le programme 2.5A, 25V, 15 min (spécifique pour les hauts poids moléculaires) sur le dispositif Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad, #1704150). Une coloration au rouge Ponceau (Sigma, #P7170-1L) a été réalisée pour vérifier la présence de protéines sur la membrane, puis cette coloration a été lavée au TBS 1X. Les membranes ont été saturées avec une solution de lait (PanReac AppliChem, #A0830) à 10% dans du TBST 1X (Cell signaling, #9997). Les hybridations des anticorps primaires ont été réalisées sur la nuit à 4°C dans une solution de lait 10%, TBST 1X :

- NBEAL2 (Abcam, #Ab187162, lot GR32045803) : dilution au 1000^{ème}
- CTLA-4 (Abcam, #Ab237712, lot GR336078011) : dilution au 1000^{ème}
- CTLA-4 (SantaCruz Biotechnology, #sc-376016) : dilution au 200^{ème}
- LRBA (Sigma Prestige, #HPA-023597, lot 00002244) : dilution au 1000^{ème}

Le lendemain, deux lavages avec du TBST 1 (5 min, TA, sous agitation) et deux lavages avec du TBS 1X ont été réalisés. Les anticorps secondaires couplés à la HRP ont été dilués dans la solution de lait 10% et incubés 1h, à TA, sous agitation :

- Mouse monoclonal [SB62a] Anti-Rabbit IgG light chain (HRP), (Abcam, #ab99697, lot GR3330192-1) : dilution au 10000^{ème}
- Goat anti-mouse IgG1 (HRP) (Millipore, #AP192P, lot 2966512) : dilution au 10000^{ème}

Après incubation, deux lavages avec du TBST 1 (5 min, TA, sous agitation) et deux lavages avec du TBS 1X ont été réalisés. Les substrats ont été préparés : SuperSignal West Dura (Thermo #859024 + 859025) ou Femto (Thermo #1859022 + 1859023). Après 5 min d'incubation sous agitation à TA des substrats sur les membranes, elles ont été révélées sur des hyperfilms ECL (Amersham, #28906836) sur la développeuse de films radiologiques Optimax (Protec) ou à l'aide d'un système d'imagerie Chemidoc MP (Biorad).

Après révélation, les membranes ont été lavées puis conservées à 4°C dans du TBS 1X.

Lorsqu'une deuxième révélation de la membrane est nécessaire, il faut détacher les anticorps (primaire et secondaire) toujours accrochés à la membrane, afin de pouvoir de nouveau hybrider la membrane avec d'autres anticorps primaires.

Dans ce cas, les membranes ont été strippées avec un tampon de stripping (Millipore, #2060-1, lot #3202438) dilué dans de l'eau au 10^{ème}, incubation 15 min sous agitation, à TA. Quatre lavages ont été réalisés puis les membranes ont été bloquées de nouveau avec une solution de lait 10% pendant 1h sous agitation à TA permettant une nouvelle incubation avec un anticorps primaire peut alors être réalisée.

8.2. Interactome de NBEAL2 en spectrométrie de masse

Préparation des échantillons protéiques

Après l'immunoprécipitation de NBEAL2 et de ses partenaires à partir de cellules T activées avec des billes CD3/CD28 de deux contrôles sains et deux patients GPS, les lysats protéiques obtenus ont été déposés sur un gel Novex 4-20%. Migration à 180V pendant 1h30. Le gel a été coloré au PageBlue (ThermoFisher, #24620). Six bandes ont été découpées pour chaque puits (échantillons) et mis dans des tubes Axygen dans 500 µL d'une solution de bicarbonate 50mM/acétonitrile (50/50).

Digestion des bandes de gels

Les bandes de gels ont été lavées par une solution d'acétonitrile et de bicarbonate d'ammonium à 50 mM (CH₃CN/NH₄HCO₃ 50/50 (v/v)). La réduction des ponts disulfures est réalisée en ajoutant du DTT (5 mM) et le mélange est incubé 30 min à 56°C. Après un nouveau lavage, l'étape d'alkylation des cystéines est réalisée par l'addition d'iodoacétamide à 15 mM pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Deux nouveaux lavages avec la solution de CH₃CN/NH₄HCO₃ sont réalisés, puis les protéines sont digérées par ajout de 600 ng de trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) une nuit à 37°C et à l'obscurité. Le surnageant est conservé et les bandes de gel sont rincées avec une solution constituée de 75% CH₃CN, 25% H₂O et 0,2% HCOOH (v/v) pendant 10 min. Le surnageant est ajouté au précédent. La bande est une nouvelle fois rincée dans une solution constituée de 90% de CH₃CN, 10% d'H₂O et 0,2% d'HCOOH (v/v) pendant 10 min et le surnageant est ajouté aux autres surnageants. Le total est ensuite concentré pour obtenir un volume final de 60 µl pour injection en LC-MS/MS.

LC-MS/MS

Les analyses LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) sont réalisées sur un système NanoAcquity UPLC (Waters) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) équipé d'une source nanospray. Les peptides issus de la digestion protéique sont injectés en duplicate sur une pré-colonne de pré-concentration (Symmetry C18, 180 µm x 20 mm, Waters). Les peptides sont piégés sur la pré-colonne pendant 4 min à un débit de 15 µl/min de Tampon A (0,2% HCOOH). La pré-colonne est ensuite mise en ligne avec la colonne analytique (BEH C18, 75 µm x 250 mm, Waters). Un gradient ((5% à 30%) de Tampon B (H₂O/CH₃CN/HCOOH, 10:90:0,2 ; v/v) en 85 min suivi de 30% à 90% de Tampon B en 10 min et de 90% de Tampon B pendant 5 min) permet la séparation des peptides sur la colonne analytique à un débit de 300 nL/min.

L'acquisition par spectrométrie de masse est réalisée en mode data-dépendant avec le logiciel Xcalibur 4.3.73.11 (Thermo Scientific) et deux types de spectres de masse sont acquis. Le premier type de spectres correspond aux spectres MS en mode FTMS sur une gamme de masse de m/z de 325 à 1200 avec une résolution de 120000. Le second correspond à la MS/MS en mode ITMS en fonctionnement Top-Speed avec un temps de cycle de 2 s, une valeur cible (AGC Target) de 10000) et une durée maximale d'injection de 35 ms. La fragmentation est réalisée par HCD (Higher-energy collisional dissociation, dissociation par collision à haute énergie) avec une énergie de collision normalisée de 27%. L'exclusion dynamique a été utilisée avec un « repeat count » de 1 et une durée d'exclusion de 50 s.

8.3. Protéomes totaux en spectrométrie de masse

Afin d'analyser les inputs (fractions initiales) des immunoprécipitations précédentes, des protéomes totaux ont été réalisés sur les lysats des cellules T activés pour deux patients GPS et deux contrôles, ainsi que les lysats de cellules T, avant et après activation, de deux donneurs sains.

Les échantillons sont déposés sur un gel 10% de polyacrylamide (10% Criterion TGX Precast Midi Protein Gel, Bio-Rad) et la migration est stoppée une fois que la totalité de l'échantillon déposé dans le puits est rentrée dans le gel de concentration. Les bandes correspondantes sont découpées à l'aide d'un scalpel. Les mêmes protocoles de digestion, d'acquisition et d'analyse, précédemment utilisés pour l'interactome ont été appliqués.

9. Tests fonctionnels

9.1. Tests d'apoptose et d'AICD

La fonction d'apoptose peut être testée sur des lymphocytes activés par des billes CD3/CD28 *in vitro* en quantifiant la mort induite lors de stimuli apoptotiques impliquant soit la voie extrinsèque soit la voie intrinsèque de l'apoptose. Le laboratoire a développé un protocole permettant de suivre 3 voies d'apoptose : la voie induite par FAS, la voie induite post activation cellulaire (AICD) ou la mort autonome des cellules activées (ACAD) ²⁰². Dans ce projet, les tests d'apoptose et d'AICD sont effectués sur des lymphocytes T activés, entre 9 et 15 jours après stimulation des PBMC. Dans le test d'apoptose, les cellules T sont cultivées avec 20 ou 100 ng/mL de l'anticorps agoniste anti-Fas Apo1.3 pendant 24h. Apo1.3 a ensuite été réticulé avec un anticorps de lapin anti-souris (10 µg/mL), ce qui permet de tester la voie d'apoptose induite par FAS. En parallèle, les cellules T sont réactivées avec 0,05µg/mL de SEE ou 2µg/mL de PHA pendant 16-24h. La staurosporine est utilisée comme contrôle positif car elle induit l'apoptose par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des caspases conduisant à la mort de plus de 90 % des cellules T activées.

La mort cellulaire est détectée grâce à de la quantification des noyaux hypodiploïdes après une coloration à l'iodure de propidium (IP). L'apoptose est quantifiée et renormalisée par rapport à l'apoptose spontanée, selon la formule ²⁰² :

$$\frac{\% \text{ apoptose observée dans l'échantillon} - \% \text{ apoptose spontanée}}{100 - \% \text{ apoptose spontanée}} \times 100$$

9.2. Tests de dégranulation des cellules T CD8+

Les blastes lymphocytes T ont été stimulés pendant 4 h avec des concentrations d'anti-CD3 immobilisés variants de 0,3, 3 et 30 µg/mL, en présence d'anti-LAMP-1/2 (CD107a/b) conjugué à la PE (H4A3, H4B4; BD Biosciences) ²⁰³. CD107a/b sont des marqueurs de l'exocytose des granules lytiques. Les cellules ont ensuite été lavées et colorées pour l'expression de CD3, CD4 et CD8 et analysées par cytométrie en flux.

9.3. Tests de prolifération

Les lymphocytes T activés sont lavés et cultivés sans IL-2 pendant 72 h pour synchroniser les cellules. Les cellules sont marquées avec le colorant CellTrace Violet (Invitrogen, # C34571) selon les instructions du fabricant. Ce colorant, qui traverse passivement la membrane plasmique se lie de façon covalente à toutes les amines libres à la surface et à l'intérieur des cellules, et permet de visualiser environ une dizaine de génération cellulaire. Les cellules sont ensuite cultivées pendant quatre jours dans du milieu Panserin 401 complet seul ou en présence de 0,1, 1 ou 10 µg/mL d'anticorps anti-CD3 immobilisées (clone OKT3 ; eBioscience), dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen), 100 UI/mL d'IL-2, 2,5 µg mL⁻¹ de PHA (phytohemagglutinine) (Sigma). Après quatre jours, les cellules sont marquées en surface pour la détection des molécules CD3, CD4, CD8 et CD25 et analysées par cytométrie en flux (LSRFortessa X-20 SORP ; BD Biosciences). L'indice de prolifération (correspondant au rapport du nombre total de divisions par le nombre de cellules qui se sont divisées) a été calculé à l'aide du logiciel FlowJo v.10.7.1 (BD) ⁵³.

10. Stratégie d'analyses des exomes

Afin d'analyser les exomes des patients, la base de données Polyweb, développée par la plateforme bioinformatique de l'institut Imagine, a été utilisée.

Un variant est considéré comme candidat s'il répond aux critères ci-dessous :

- de rareté : évalué par rapport aux autres variants trouvés au sein de l'institut ainsi qu'aux fréquences des variants reportés dans la base de données internationales GnomAD ²⁰⁴.
- de pathogénicité : un score SIFT ²⁰⁵ (Sorting Intolerant From Tolerant) tendant vers 0 ; un score Polyphen ²⁰⁶ (Polymorphism Phenotyping) tendant vers 1, et pour les mutations ponctuelles un score CADD ²⁰⁷ (Combined Annotation-Dependent Depletion) >20.
- du type de variants trouvés : par exemple, une mutation conduisant à un stop précoce est considérée plus intéressante qu'une mutation synonyme.

Suivant le but de l'analyse, différentes stratégies ont été adoptées.

Si le but de l'analyse est de trouver l'ensemble des variants pathologiques pour un gène donné, l'outil PolyDéjàVu a été utilisé. Il permet de filtrer toutes les mutations d'un gène sur l'ensemble des exomes réalisés à l'institut Imagine. Les variants peuvent ensuite être sélectionnés suivant leur rareté ainsi que leur pathogénicité.

Si le but est de déterminer les variants pathogéniques pour un patient dont aucune cause génétique n'est connue, l'outil PolyWeb est utilisé. Il permet de chercher des variants candidats dans une liste de gènes préétablis ou dans l'ensemble des gènes codants.

L'adéquation entre les symptômes du patient et le gène, ou les gènes candidats trouvés, est ensuite évaluée par une revue de la littérature ainsi que l'utilisation de la base OMIM ²⁰⁸.

Une liste de gènes préétablie a été utilisée pour déterminer ou écarter des variants candidats dans des gènes associés à des déficits immunitaires déjà décrits (Annexe 12, Tableau 30). Une liste de gènes a également été utilisée pour étudier des variants dans des gènes responsables de thrombopénies constitutionnelles ou ayant un rôle clé dans le développement des plaquettes et de la lignée mégacaryocytaire (Annexe 13, Tableau 31).

11. Analyses bioinformatiques

11.1. Analyses transcriptomiques

RNA Seq bulk

Les fichiers FASTQ ont été alignés sur la référence ENSEMBL Human (GRCh39/hg39) à l'aide de HISAT2 et comptés par la fonction featureCounts du package R Subread. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Mickaël Ménager et la plateforme de bioinformatique de l'institut Imagine.

Analyse d'expression différentielle

La matrice brute a été analysée dans R (v 4.0.3) en utilisant DESeq2 (version 1.30.1). Aucun pré-filtrage n'a été appliqué aux données. L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée à l'aide de la fonction DESeq avec les paramètres par défaut. Pour la visualisation et le regroupement, les données ont été normalisées à l'aide de la méthode de transformation stabilisatrice de variante implémentée dans la fonction vst.

La corrélation de Pearson a été utilisée comme mesure de distance pour le regroupement, et toutes les cartes thermiques et figures ont été générées à l'aide de pheatmap (version 1.0.12) et de ggplot2 (version 3.3.5).

Correction de l'effet de batch

Les premières analyses exploratoires ont mis en évidence la présence d'un fort effet de batch provenant du sexe des échantillons. Cet effet a été corrigé en incluant le sexe des patients dans

la formule de régression pour DESeq (~Sexe + Groupe), puis supprimé après transformation vst, en utilisant removeBatchEffect du package limma (version 3.46.0).

Les analyses fonctionnelles ont été réalisées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen), du logiciel Gene Set Enrichment Analysis, du logiciel Cytoscape et du site EnrichR ^{209, 210} (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

Sc RNA Seq

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Mickaël Ménager et le labTech Single-cell de l'institut Imagine.

Principe de la UMAP

Les données de séquençage en cellules uniques sont complexes. En effet pour chaque cellule, qui sera identifiée par un barre-code, nous obtenons le nombre de transcrits détectés pour chaque gène. Une cellule peut donc être traitée comme un point dans un espace mathématique du même nombre de dimensions qu'il y a de gènes détectés.

L'humain n'étant pas capable de visualiser des objets en plus de trois dimensions, il faut donc réduire cet espace pour pouvoir visualiser les cellules. Ainsi, pour représenter des données de séquençage en cellules uniques, on projette chaque cellule dans un nouvel espace à deux dimensions, où ces deux dimensions résument les informations contenues dans toutes les dimensions initiales (ici, l'expression des gènes).

Plusieurs algorithmes permettent cette réduction de dimensions, et nous avons ici choisi d'effectuer une UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). Sur une UMAP, chaque point représente une cellule. Cette méthode permet de conserver les distances entre les cellules : deux cellules éloignées sur la UMAP auront des profils d'expression transcriptomique très différents, alors que des cellules proches l'une de l'autre seront des cellules assez similaires.

Un clustering est ensuite réalisé, qui vise à grouper les cellules ayant des profils transcriptomiques proches, et donc susceptibles d'appartenir à la même population cellulaire. Chaque cluster peut ensuite être identifié grâce à des marqueurs biologiques d'un sous-type cellulaire. Par exemple, les lymphocytes B formeront un cluster distinct des cellules myéloïdes. En utilisant une UMAP, les distances entre les clusters sont importantes. Ainsi, les clusters ayant des contenus transcriptomiques proches, par exemple plusieurs sous-types de lymphocytes T, seront proches les uns des autres ; et beaucoup plus éloignés des clusters de monocytes, qui ont un transcriptome différent.

La forme de la UMAP va dépendre des données initialement utilisées pour la générer.

Méthodes d'analyses du sc RNA Seq

Les lectures de séquençage ont été démultiplexées et alignées sur le génome humain de référence (GRCh38, version 98, construit à partir de Ensembl sources), en utilisant le CellRanger Pipeline v3.0.2.

Les décomptes des UMI (Unique Molecular Identifiers) d'ARN non filtrés ont été chargés dans Seurat v4.0.4 (Stuart et al., 2019) pour le contrôle qualité, l'intégration des données et les analyses en aval. Les cellules apoptotiques, les gouttes vides et les doublets, ont été exclus en filtrant les cellules avec moins de 500 gènes détectés ou un contenu mitochondrial supérieur à 20 %. Les données de chaque échantillon ont été normalisées et mises à l'échelle avec la méthode sctransform, avant la correction du batch effect à l'aide de la fonction FindIntegratedAnchors de Seurat.

Sur cet ensemble de données intégrées, l'analyse en composantes principales (ACP) a été calculée sur les 3000 gènes les plus variables. La UMAP a été réalisée à l'aide des 30 Composantes Principales (CP) les plus importantes et la détection des clusters a été réalisée à l'aide de l'algorithme de Louvain d'optimisation de la modularité basé sur des graphes de la fonction FindClusters de Seurat avec une résolution de 1,8.

Les clusters ont été identifiés sur la base d'une liste de gènes marqueurs établie manuellement ainsi que des signatures publiées des sous-types de PBMC ²¹¹.

Tous les clusters ont été annotés et 134 776 cellules ont été conservées pour une analyse plus approfondie. L'expression différentielle a été réalisée sur différents groupes (tous les PBMC, les cellules myéloïdes, les cellules T, les cellules B et leurs sous-populations), en utilisant la fonction FindMarkers de Seurat avec les paramètres par défaut (test de Wilcoxon avec correction de Bonferroni). Seuls les gènes avec des valeurs de p ajustées $< 0,05$ ont été sélectionnés comme significatifs. Les listes de gènes exprimés de manière différentielle ont ensuite été divisées en gènes régulés UP et DOWN sur la base de avg_log2FC ; $avg_log2FC > 0$ pour les gènes régulés UP et $avg_log2FC < 0$ pour ceux régulés DOWN. L'analyse d'enrichissement des voies de signalisation a été réalisée à l'aide d'EnrichR ^{209, 210} (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Une analyse supplémentaire a été réalisée à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen).

À partir de la liste des différents gènes exprimés, des scores de signature ont été calculés à l'aide de la fonction AddModuleScore de Seurat, et des dot plots ont été utilisés pour visualiser

le changement d'intensité de signature entre les conditions (par exemple, type de cellule, gène, traitement...).

11.2. Analyses des profils immunologiques

Cytométrie en flux

L'analyse des données de cytométrie en flux a été réalisée avec le logiciel FlowJo v.10.7.1 (BD).

CyTOF

Les fichiers standards de cytométrie de masse, produits par l'analyseur HELIOS, ont été normalisés à l'aide du logiciel CyTOF v. 6.7.1014. Pour le nettoyage des données, quatre paramètres (centre, décalage, résidu et largeur) sont utilisés pour résoudre les événements de fusion ionique (doublets) à partir d'événements uniques de la distribution gaussienne générée par chaque événement. Après le nettoyage des données, le programme produit de nouveaux fichiers FCS composés uniquement de cellules singulets vivantes intactes.

Les fichiers FCS ont été téléchargés dans le logiciel R (v.4.0.3) à l'aide du package *flowCore* et concaténés dans un *SingleCellExperiment* (SCE) avec le package *SingleCellExperiment*. Après le contrôle qualité (nombre de cellules par échantillon, modèle d'expression de tous les marqueurs dans tous les échantillons), toutes les cellules ont été soumises à une classification en utilisant les fonctions de cluster (*FlowSOM* et *ConsensusMetaClustering*) suivant la recommandation des packages CATALYST²¹². Pour la clusterisation, le paramètre *k* a été fixé à 60 pour détecter les petites populations immunitaires. Les clusters ont ensuite été identifiés en fonction de leur expression de marqueurs de type, en fonction des connaissances antérieures sur le phénotype des cellules immunitaires, et en suivant les instructions du fabricant du kit Fluidigm Maxpar Immune Profiling. Des clusters exprimant des mêmes marqueurs similaires ont été fusionnés en une seule population de cellules immunitaires. La proportion de clusters parmi toutes les cellules viables intactes a ensuite été définie à l'aide de la fonction appropriée de CATALYST et comparée entre les groupes à l'aide du test de somme de Wilcoxon dans R. Pour aller plus loin dans l'analyse, les cellules T CD4 mémoire, ont été soumises à un sous-clustering et les cellules de type Th1, Th2, Th17 et Tfh ont été identifiées à l'aide des marqueurs CXCR3, CXCR5, CCR6 et CCR4. L'intensité d'expression médiane des marqueurs d'intérêt a été évaluée en utilisant la fonction *plotPbExprs* du package CATALYST.

La réduction de la dimension des UMAP a été effectuée à l'aide de la fonction *runDR* de CATALYST avec des voisins définis sur 15 et une distance minimale à 0,4. La visualisation de l'intensité des marqueurs sur les UMAP a été effectuée avec une normalisation des données entre 0 et 1. Toutes les autres visualisations ont été effectuées à l'aide de la fonction *ggplot2*.

11.3. Analyses protéomiques

Quantification

Les analyses quantitatives sont réalisées à l'aide du logiciel MaxQuant (Version 1.6.17.0, Max-Planck Institute of Biochemistry, Department of Proteomics and Signal Transduction, Munich). La base de données interrogée est Uniprot avec la taxonomie *Homo Sapiens*. L'interrogation de cette banque de données se fait avec les critères suivants : une tolérance de masse des peptides parents de 7 ppm, une tolérance de masse des peptides fragments de 0,6 Da et un nombre maximal de sites de coupures manqués par la trypsine (Missed cleavages) de 2. La carbamidométhylation des cystéines est choisie (si le cross-linker DSP a été utilisé dans l'expérience en amont) comme modification fixe et les modifications variables sont les suivantes : N-acétylation (Protein), Pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M) et CAMthiopropionyl modification des lysines. Les autres paramètres utilisés sont les paramètres par défaut de MaxQuant.

Sélection des protéines de l'interactome

3527 protéines ont été trouvées dans les interactomes NBEAL2 après analyse en spectrométrie de masse. Afin de garder uniquement les protéines les plus probables d'interagir avec NBEAL2, un tri de cette liste a été faite. Ce tri sélectionne les protéines avec la plus forte intensité ainsi que le plus fort ratio d'intensité entre contrôles et patients, permettant d'éliminer les interactions non spécifiques. Un flow-chart permettant d'obtenir la liste finale de 86 protéines analysées par la suite est détaillé dans la figure supplémentaire de l'article.

De plus, les niveaux d'expression protéiques de chacun de ces 86 candidats ont été vérifiés dans les protéomes totaux des lysats initiaux (avant IP). Cette étape permet de vérifier que les protéines obtenues étaient bien présentes dans tous les lysats initiaux (patients et contrôles). Enfin le niveau d'expression transcriptomique de chacun des gènes codant les 86 protéines a été analysé.

Analyse du protéome

Les protéines trouvées dans les protéomes totaux de deux patients GPS et deux donneurs sains ont été analysées.

De plus les protéomes des cellules T de deux autres donneurs sains, avant puis après activation du TCR ont également été analysés à la recherche de protéines différentiellement exprimées après activation, et notamment pour confirmer le niveau d'expression de NBEAL2 et LRBA dans ces deux conditions.

Résultats

1. NBEAL2 joue un rôle dans le trafic de CTLA-4

Dans cet article, nous nous attachons à étudier le rôle de NBEAL2 dans les cellules T et plus spécifiquement dans le trafic de CTLA-4. Notre cohorte de patients est constituée de 11 patients répartis dans 9 familles non apparentées. Ils sont tous porteurs de mutations récessives de *NBEAL2* impliquant une forte diminution ou une absence de la protéine.

Un immunophénotypage extensif par cytométrie de masse a été réalisé sur les PBMC et les granulocytes des patients. Comparativement aux donneurs sains utilisés comme contrôles, les patients présentent une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes B naïfs par rapport au nombre de cellules totales. On observe également une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ centraux et effecteurs mémoires, ainsi qu'un excès de cellules T $\gamma\delta$ et de TReg. Leurs neutrophiles et éosinophiles présentent des marqueurs d'activation et de dégranulation (CD66b) surexprimés, suggérant leur activation précoce. Leurs cellules B ainsi que leurs cellules NK ont également des marqueurs anormaux. Enfin si les cellules TReg des patients ne présentent pas de défauts d'expression de CTLA-4, les cellules T activées via leur TCR présentent une diminution significative de l'expression de ce checkpoint inhibiteur.

Afin de confirmer que la diminution d'expression de CTLA-4 était liée à une perte d'expression de NBEAL2, l'expression du gène *NBEAL2* a été inactivée dans des lymphocytes T primaires de donneurs sains en utilisant le système CRISPR-Cas9. Les mêmes observations ont pu être faites dans ce système *in vitro* : diminution de l'expression de CTLA-4 après la perte d'expression protéique de NBEAL2.

Des expériences d'immunoprécipitation ont mis en évidence que NBEAL2 interagissait physiquement avec CTLA4.

De plus, un interactome NBEAL2 a été réalisé et a permis de comparer des donneurs sains à des patients atteints du syndrome des plaquettes grises. En sélectionnant les protéines ayant le meilleur différentiel, une liste de partenaires potentiels de NBEAL2 a été dressée. Parmi eux, LRBA a été retrouvée, ainsi que des protéines impliquées dans l'endocytose ou le recyclage de CTLA-4. Ainsi nous sommes en mesure de proposer un modèle expliquant le rôle de NBEAL2 dans le trafic vésiculaire, ainsi qu'une liste de nouveaux partenaires protéiques pour cette BEACH protéine.

La version de l'article ci-après ne contient pas la partie « matériels et méthodes » qui est détaillée en français, plus haut dans ce manuscrit. Cet article correspond à une ébauche très avancée de l'article que nous souhaiterions soumettre pour publication.

Dans la version définitive nous souhaitons notamment ajouter les données issues de séquençages ARN sur cellules uniques, qui sont en cours d'analyse. Ces données sont pour l'instant présentées séparément dans la suite du manuscrit de thèse.

NBEAL2 recessive mutations lead to CTLA-4 deficiency in conventional T cells and could explain autoimmunity in GPS

Authors:

Laure Delage ^{a,b}, Francesco Carbone ^{c,d}, Jean-Luc Zachary ^e, Quentin Riller ^a, Erwan Kerbellec ^b, Marie-Claude Stolzenberg ^a, Armelle Buzy ^e, Marine Luka ^{c,d}, Alizée Michel ^a, Aude Magérus ^a, Sonia Meynier ^a, Aurélien Corneau ^m, Sajedeh Sadat Mirshahvalad ^a, Nathalie Neveux ^{k,l}, Georges Kalouche ^e, Sébastien Roudières ^e, Camille de Cevins ^{c,e}, Briec Pérot ^c, Caroline Besnard ^a, Nicolas Cagnard ⁿ, Rémi Favier ^{f,g}, Guy Leverger ^h, Bénédicte Collet ^j, Bénédicte Neven ^{a,i}, Jean-Claude Guillemot ^e, Alain Fischer ^{a,p,q}, Mickaël Ménager ^{c,d}, Benoit Pasquier ^{b,*}, Frédéric Rieux-Laucat ^{a,*}

* The authors contributed equally to this work

Correspondence: frederic.riex-laucat@inserm.fr

Affiliations:

^a Université de Paris, Institut Imagine, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, F-75015 Paris, France.

^b Checkpoint Immunology, Immunology and Inflammation Therapeutic Area, Sanofi, Vitry, France

^c Université de Paris, Institut Imagine, Laboratory of Inflammatory Responses and Transcriptomic Networks in Diseases, Atip-Avenir Team, INSERM UMR 1163, F-75015 Paris, France

^d Labtech Single-Cell@Imagine, Imagine Institute, INSERM UMR 1163, F-75015 Paris, France

^e Molecular Biology and Genomics, Translational Sciences, Sanofi, Chilly-Mazarin, France

^f Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Hôpitaux Armand Trousseau, Bicêtre, Robert Debré, Paris, France.

^g INSERM Unité Mixte de Recherche 1170, Gustave Roussy Cancer Campus, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

^h Pediatric Oncology Hematology Unit, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris-Hôpital Trousseau, Unité INSERM UMRS_938, Paris, France

ⁱ Pediatric Immunohematology and Rheumatology Department, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), 149 rue de Sèvres, Paris, F-75015, France

^j Pediatric Unit, Centre Hospitalier de Roubaix, Roubaix, France

^k Laboratory of Biological Nutrition, EA 4466, Faculty of Pharmacy, Paris University, Paris, France

^l Clinical Chemistry Department, Hôpital Cochin, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), 4 Avenue de l'Observatoire, Paris, F-75014, France

^m Sorbonne Université, UMS037, PASS, Plateforme de cytométrie de la Pitié-Salpêtrière CyPS, F-75013 Paris, France

ⁿ Bioinformatics Platform, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM UMR1163, Université de Paris, Imagine Institute, Paris, France

^o Genomics Core Facility, Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 et INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris Descartes Sorbonne Paris Cite University, Paris, France

^p Department of Paediatric Immuno-Haematology and Rheumatology, AP-HP, APHP.CUP, Hôpital Necker, F-75015 Paris, France.

^q Collège de France, Paris, France.

Highlights

- **NBEAL2 deficiency leads to abnormal innate and adaptive immune phenotype in humans.**
- **NBEAL2 interactome in primary activated T cells reveals new partners for this BEACH-domain containing protein.**
- **NBEAL2 interacts with LRBA in activated T cells and is involved in CTLA-4 trafficking.**

Summary

Recessive *NBEAL2* mutations lead to Gray Platelet Syndrome (GPS), a bleeding disorder characterized by macro-thrombocytopenia and platelets lacking α -granules. Some GPS patients develop autoimmunity through an unknown mechanism. *NBEAL2* belongs to a BEACH domain protein family involved in vesicular trafficking. Among a list of 76 *NBEAL2* putative strong partners we found *LRBA*, a member of the BEACH family. Recessive *LRBA* mutations lead to autoimmunity and lymphocytic infiltrations as a consequence of defective CTLA-4 trafficking. Accordingly, we found that *NBEAL2* deficiency leads to a reduced CTLA-4 expression in the patients' effector T cells. *NBEAL2* knock-down in control T cells using CRISPR-Cas9 system reproduced this observation. Finally, we confirmed the *NBEAL2*-*LRBA*-CTLA-4 interactions by co-immunoprecipitation. These results show for the first time that *NBEAL2* is involved in CTLA-4 expression and provide a molecular rationale to contemplate a CTLA-4-Ig therapy in GPS patients with autoimmunity.

Keywords : Gray platelet syndrome; GPS; CTLA-4; NBEAL2; LRBA; BEACH domain; BEACH-domain containing protein; vesicular traffic; recycling; lysosomal degradation; lytic granule; interactome; immune checkpoint; autoimmunity

Introduction

NBEAL2 recessive mutations cause gray platelet syndrome (GPS) (Albers et al., 2011) (Gunay-Aygun et al., 2011) (Kahr et al., 2013). This syndrome is characterized by a macrothrombocytopenia, with platelets lacking α -granules, leading to bleeding disorders, often associated with splenomegaly, and sometimes evolving in myelofibrosis. Extensive emperipolesis of leukocytes in the cytoplasm of megakaryocytes was also observed in the bone marrow of GPS patients (Larocca et al., 2015).

In murine models, *NBEAL2* knock-out mice present a clinical phenotype recapitulating the human grey platelet syndrome (Deppermann et al., 2013) (Kahr et al., 2013). Moreover, several immune cell types anomalies were reported in *NBEAL2*^{-/-} mice. Granules numbers in neutrophils and NK degranulation were abnormal in knock-out mice, leading to an increased susceptibility to infections (Sowerby et al., 2017). The numbers of circulating monocytes and neutrophils were decreased in *NBEAL2*^{-/-} mice after lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation (Tariket et al., 2019). These mouse models raised the question of a potential role for *NBEAL2* in the function of immune cell subsets.

Initially, the gray platelet syndrome was described as a constitutive platelet disorders without immune manifestations. However, *NBEAL2* deficient patients presenting clinical features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) have been described (Rensing-Ehl et al., 2015), suggesting a role of *NBEAL2* in immune homeostasis and tolerance. More recently, a broader international cohort of GPS patients has been characterized, revealing immune system abnormalities (autoimmune diseases, autoantibodies, lymphopenia) (Sims et al., 2020). The impact of recessive *NBEAL2* mutations on neutrophils biological functions have also been reported (Sowerby et al., 2017) (Aarts et al., 2021). Neutrophils of GPS patients have a defective NETosis and a reduced number of specific granules due to premature release of these granules (Aarts et al., 2021). This early-release phenomenon is also observed in platelets, where alpha-granules are not retained in the cytoplasm due to the absence of *NBEAL2* (Lo et al., 2018). If the role of *NBEAL2* in granules retentions is well described, the exact mechanism leading to the development of auto-immune manifestations in GPS patients remains unknown.

NBEAL2 protein is composed of several domains, and in particular a *Beige and Chediak* (BEACH) domain, a pleckstrin homology (PH) domain, a concavalin A-like lectin (ConA), an armadillo-like (ARM) domain and WD40 repeats. (Kahr et al., 2011)

NBEAL2 belongs to a protein family called *Beige and Chediak* (BEACH) domain containing proteins (BDCPs). This family contains 9 members, all presenting with a conserved BEACH domain and are described as scaffold proteins involved in vesicular trafficking. (Cullinane et al., 2013). In this family, one of the closest members to NBEAL2 is LRBA, the lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (Cullinane et al., 2013).

In humans, recessive mutations of *LRBA* lead to reduced CTLA-4 expression and therefore to immune dysregulation and autoimmune manifestations similar to those observed in patients with *CTLA-4* deficiencies (Schubert et al., 2014) (Lo et al., 2015) (Serwas et al., 2019).

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4) is an inhibitory immune checkpoint. It plays a crucial role in regulating immune responses mediated by T cells (Lo and Abdel-Motal, 2017). CTLA-4 is constitutively expressed at the surface of regulatory T cells (Tregs) and on conventional T cells after activation (Rowshanravan et al., 2018). It competes with CD28, a co-stimulatory immune checkpoint, for their ligands CD80/CD86. CTLA-4 trafficking is essential to maintain immune homeostasis and tolerance (Mitsuiki et al., 2019).

In humans, heterozygous mutations of *CTLA-4* and recessive mutations of *LRBA* are associated with autoimmunity (diabetes, enteropathies, cytopenia), lymphocytic infiltrations, and progressive B lymphopenia resulting in pulmonary infections (Schubert et al., 2014) (Kuehn et al., 2014) (Burns et al., 2012) (Lo et al., 2015).

In the case of *LRBA* deficiencies, the CTLA-4 defect is due to the intracellular function of this BEACH protein. Indeed, *LRBA* interacts physically with CTLA-4 in the RAB11+ endosomes (Lo et al., 2015). This intracellular interaction is key to the recycling of CTLA-4 to the membrane, as *LRBA* prevents the lysosomal degradation of CTLA-4 (Lo et al., 2015). Therefore, *LRBA* deficiency leads to a secondary CTLA-4 defect associated with clinical symptoms similar to patients' carrier of heterozygous mutations of *CTLA-4*.

Since autoimmunity and immune abnormalities are observed in GPS patients, we investigated the role of NBEAL2 in CTLA-4 trafficking.

Results

Clinical and genetic phenotype of the cohort (Figure 1)

Eleven patients, from nine unrelated families, with grey platelet syndrome and carrying recessive *NBEAL2* mutations were studied. Their family trees are described in Supplemental figure 1. The patients' mutations affect several domains and no hot spot mutations were identified (Figure 1.b). At the protein level, we observed a drastic reduction (P3, P4.1) or an absence of NBEAL2 protein in the lysates from the patients' activated T cells, confirming the damaging impact of the mutations (Figure 1.c).

Patients have a bleeding susceptibility (epistaxis, bruising), and sometimes splenomegaly (Figure 1.a). One patient (P4.2) developed bone marrow fibrosis and needed allogenic hematopoietic stem cells transplantation (Favier et al., 2019). This patient was no longer analyzed in this study.

As previously described (Rensing-Ehl et al., 2015), some GPS patients can show biological markers similar to patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome, such as elevated level of Vitamin B12 and Fas ligand (FasL) in their plasma (Supplemental figure 2).

Five patients had autoimmune manifestations: Evans syndrome, chill blain lupus, thyroiditis, or auto-antibodies against platelets (Figure 1.a).

A screening for autoantibodies against 124 autoantigens was performed in patients' plasma (Supplemental Figure 5). Most of the patients clustered together (7 patients out of 9) due to the level of autoantibodies found in their plasma. The represented values are normalized intensities, which reflects the plasmatic concentration. However, a positive signal does not necessarily indicate an abnormal concentration in the plasma.

These last data indicate that the NBEAL2 deficiency is frequently associated with autoimmune features, suggesting a key role of *NBEAL2* in the immune system.

Comprehensive immunophenotyping of GPS patients (Figure 2)

Four patients had an impaired number of at least one immune cell subset: neutropenia (P1), T (P6, P8), B (P6) or NK (P7, P8) lymphopenia (Figure 1.a). To further analyze these immune phenotypes, a broad standardized immune staining was performed by mass cytometry (CyTOF) on fresh blood samples. The 37 markers used for the staining allowed to cluster 34 different immune cell subsets (Figure 2.a). 11 controls and 7 patients with recessive NBEAL2 (P1, P2, P5.2, P6, P7, P9.1, P9.2) were compared. A visual comparison of the UMAPs already suggests a difference in the neutrophils of the patients, as well as an excess of the $\gamma\delta$ T cells (Figure 2.a, red arrows). A cluster bias analysis revealed significant increases of the proportions of naïve B cells, Tregs, central memory and effector memory CD8 T cells in the patients' group (Figure 2.b). Moreover, a reclustering on CD4 T cells allows to show a significant increased proportion of the patients' T follicular helper cells (Figure 1.d), supported by an increase of CXCR5 expression in central memory CD4+ T cells (Supplemental figure 2)

This comprehensive immunophenotyping also allowed the comparison of activation markers and immune checkpoints on the different cell subsets. The results of these comparisons between patients and controls are summarized in Figure 2.c. Monocytes, neutrophils, classical dendritic cells (cDC), double negative (DN) T cells and CD8 had a reduced CD45RA expression. These down regulation of CD45RA suggest that GPS patient cells exhibit a less naïve phenotype. In addition, FAS was overexpressed in eosinophils, B cells and cDC. The HLA-DR and CD66b markers were upregulated on eosinophils and neutrophils, suggesting activation and a premature degranulation. Of note, the increased expression of CD66b in neutrophils was already observed in GPS patients (Aarts et al., 2021). TIM3, HLA-DR and CD11c expression were increased in NK cells, whereas a reduction of CXCR3 was measured, suggesting activation of these cell subsets. Overexpression of PD1 by MAIT and CD4 T cells suggest the exhaustion of these subsets in GPS patients.

Proteomic analysis (Figure 3)

To dissect NBEAL2 functionality, an interactome after immunoprecipitation of NBEAL2 was performed on activated T cells. Two healthy donors were compared to two GPS patients (P6 and P7). The immunoblotting of NBEAL2 was performed on the inputs and flow-through fractions (Figure 3.a). NBEAL2 protein expression is profoundly reduced in P7 and not detectable in P6. The comparison between the inputs and the flow-through of the healthy donors allows to compute a yield of the NBEAL2 immunoprecipitation of 44%. The immunoprecipitation fractions were analyzed by mass spectrometry. A list of 3527 proteins was found for this interactome (available in supplemental data). Based on the intensities detected for each sample and the ratios between controls and patients, the protein list was curated to select the best candidates as potential partners of NBEAL2. The strategy of selection is described in Supplementary Figure 7. A list of 76 proteins, detected with high intensities and presenting high controls/patient ratios, were selected for further analysis.

The proteins expressions were measured in the input fractions by mass spectrometry. Moreover, transcriptomic expressions were assessed in the bulk RNA Sequencing data from activated T cells of NBEAL2 and healthy donors. Both transcriptomic and proteomic expressions did not differ between controls and patients' groups. Therefore, the ratio observed for these proteins in the interactome is due to the immunoprecipitation of NBEAL2, further supporting the idea that the 76 proteins found are highly probable partners of the NBEAL2 protein.

Heatmaps of the normalized intensities, the mean intensity for the two controls and the ratios of these 76 NBEAL2 interactors are shown in Figure. 3.b.

In figure 3.c., a network analysis was performed using STRING database (Szklarczyk et al., 2019). Among these 76 partners of NBEAL2, proteins involved in the immune response, in protein transport, GTPase binding, and cytoskeleton binding proteins were found (Figure 3. c. and Supplemental Figure 8 and 9).

To evaluate if these proteins were expressed in other cell subsets, an enrichment analysis was performed using the Jensen Tissues library in EnrichR website (Kuleshov et al., 2016). A link to the entire analysis is provided in the methods section. This analysis revealed that almost all 76 proteins were expressed in lymphocytes, lymph nodes, bone marrow, platelets, and monocytes (Figure 3.d).

CCDC88B was one of the proteins with the highest intensity and ratio of this list. In mice, CCDC88B is known to bind DOCK8 and microtubules, and to play a role in the transport of lytic granules along microtubules with the help of a dynactin/dynein complex (Ham et al., 2015). Moreover, DYNC1H1 and GZMM (part of the dynein complex 1) were also present in the interactome, suggesting that NBEAL2 may be a scaffold protein in lytic granules transport.

Finally, among the partners of NBEAL2, proteins that can be involved in CTLA-4 trafficking were found: LRBA and AP1G2 ($\gamma 2$ subunit of AP-1 complex). As CTLA-4 haplo-insufficiency and LRBA deficiencies are responsible for auto-immune symptoms, we further investigated the role of NBEAL2 in CTLA-4 expression.

NBEAL2 is involved in CTLA-4 expression (Figure 4)

Due to the autoimmune symptoms of this GPS cohort and the proteins found in the NBEAL2 interactome (LRBA, AP1G2), we investigated the CTLA-4 expression level in GPS patients. We observed that CTLA-4 expression on Treg was similar to controls (Figure 4.a), whereas the percentage of cells expressing CTLA-4 after TCR-activation were significantly reduced in the T cells of GPS patients (Figure 4.b).

To confirm these observations, we performed knockdowns of NBEAL2 or LRBA in primary activated T cells using a CRISPR-Cas9 system. Six mRNA guides were designed. The positions of the guides are illustrated in Figure 4.c and 4.d. Immunoblotting of NBEAL2 or LRBA were performed to observe the impact of the knock-down at the protein level (Figures 4.e and 4.f). The controls of these experiments were activated T cells that did not undergo electroporation (WT) or cells electroporated with the CRISPR-Cas9 system targeting an intergenic region (AAVS1) or using a scramble mRNA guide (Ctrl). The immunoblotting revealed that all designed NBEAL2 guides and three LRBA guides were efficient to knock-down NBEAL2 expression (Figures 4.e). As a fraction of the cells were lysed for immunoblotting, the remaining cells were stained for CTLA-4 and other immune checkpoints expressions. Interestingly, the percentage of CTLA-4 positive cells markedly mirrored the

knock-down of NBEAL2 (Figure 4.g). As controls, similar experiments were conducted for LRBA knockdowns. We showed with three mRNA guide that LRBA protein expression was decreased (Figure 4.f) with a decreased of CTLA-4 positive T cells (Figure 4.g). These results confirm the observations made in NBEAL2 patients' activated T cells (Figure 4.b).

The extracellular expressions of other checkpoints were not affected by neither NBEAL2 nor LRBA knock-down. A slight increase (10%) of the TIM3⁺ T cells was observed in all the knock-down cells (Supplemental Figure 6). We also measured plasmatic concentrations of soluble immune checkpoints for NBEAL2, LRBA and CTLA-4 mutated patients (Supplemental Figure 4). The concentrations of the following molecules were calculated: sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- β 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, TIM-3, LAG-3, Galectin 9. None of these markers were significantly detected in NBEAL2 patients' plasma. For both CTLA-4 and LRBA patients, higher sCD25 plasmatic concentrations were measured (Supplemental figure 4.a). CTLA-4 haplo-insufficient patients also showed an increase level of Galectin 9 (supplemental figure 4.b). The LRBA patients presented elevated level of soluble TIM3 (Supplemental figure 4.c), this observation correlates with the slight increase of TIM3 expression observed in LRBA knock-down T cells (supplemental figure 6).

To assess a possible interaction between NBEAL2 and CTLA-4, a CTLA-4 pull-down was performed on healthy donors' cells. CTLA-4 is upregulated following T cell activation, hence unstimulated T cells, with a low CTLA-4 expression, were compared to activated T cells, with a high CTLA-4 expression. In activated T cells, CTLA-4 co-immunoprecipitated with NBEAL2 and LRBA (Figure 4.h, on the left). The specificities of these interactions were confirmed with non-activated T cells, as neither NBEAL2 nor LRBA were pulled down when CTLA-4 was poorly expressed. The strength of the interaction between CTLA-4 and NBEAL2 seems less important than the one between CTLA-4 and LRBA. This experiment was reproduced in 3 different healthy donors.

Moreover, in the input fractions, the level of LRBA expression seems to decrease after activation, contrary to NBEAL2 expression that increased after activation (Figure 4.h, on the right). To confirm these observations, we performed a proteome analysis of unstimulated or activated T cells from two healthy controls. The intensities detected by mass spectrometry for NBEAL2 and LRBA proteins are shown in Figure 4.i. For NBEAL2, the increase of expression after activation is small and not significant. On the contrary, LRBA is globally more expressed than NBEAL2 in both conditions. And a significant decrease in LRBA expression is observed after activation, confirming the results shown in Figure 4.h.

(Single cell data will be integrated here: goal compared NBEAL2 patient to other CTLA-4 deficiencies, confirmed cluster bias seen in the immune phenotype, and eventually explain this

cluster bias. To plot the transcriptomic signature of the 76 partners of NBEAL2. To analyze more precisely the interactome and maybe show affected degranulation or recycling pathways for example).

Discussion

We performed an extensive immune phenotyping of GPS patients' whole blood in order to assess the global consequences of NBEAL2 deficiency in the immune subsets. We globally showed that patients' cells exhibited a more activated phenotype, with an increased expression of activation markers (HLA-DR, FAS) or exhaustion (PD-1) and a decreased CD45RA expression. The excess of naïve B cells, regulatory T cells, memory CD8+ T cells and TFH cells was not described so far for the GPS patients.

Neutrophils and eosinophils presented overexpression of activation markers and degranulation markers (HLA-DR, FAS, CD66B) without stimulation and in the absence of documented infections. The overexpression of CD66b in GPS patients' neutrophils was previously reported and was associated with an abnormal activation and an early degranulation of those cells (Aarts et al., 2021). This observation is also supported by the higher level of protein from neutrophil specific granules in GPS patients' plasma (Sims et al., 2020). Our results corroborate these findings in neutrophils and extended them to the eosinophils. Combined with the observation that deficient NBEAL2 eosinophils have a significant reduction of size and granularity (Sims et al., 2020), it suggests that eosinophils functions in GPS patients might be impaired.

Finally, NK cells had also a particularly activated profile with the overexpression of CD11c, TIM3 and HLA-DR.

To understand the role of NBEAL2 in immune cells, we decided to generate its interactome and analyzed its putative partners. 76 proteins were selected thanks to the differential between controls and GPS patients interactomes in activated T cells. These proteins are involved in transport, as well as proteins able to bind GTPase or cytoskeleton. Thus, NBEAL2 could be described as a scaffold protein in vesicular trafficking. These proteins are presented in several immune cells and in platelets, emphasizing the role that NBEAL2 have in the immune system.

In this list, CCDC88B and DOCK8 were found to interact with NBEAL2. In mice, these two proteins are known to play a role in the transport of lytic granules along microtubules with the help of a dynactin/dynein complex (Ham et al., 2015). These findings might explain the particularly activated profile of NK cells from patients. As NBEAL2^{-/-} mice present abnormal

NK functions (Sowerby et al., 2017), it could be interesting to investigate NK functions in NBEAL2 deficient patients. Finally, because NBEAL2 is required for the retention of specific granules in neutrophils (Aarts et al., 2021) and for the retention of α -granules in megakaryocytes (Lo et al., 2018), it could be interesting to investigate the retention of lytic granules in NK patients cells.

NBEAL2 seems important for the retention of granules in the cytoplasm. This might explain the elevated FASL plasmatic level in GPS patients. Indeed, FASL is stored in secretory lysosomes in cytotoxic cells (Lettau et al., 2011), and degranulation triggers the expression of FASL at the plasma membrane (Bossi and Griffiths, 1999). NCKIP5D, a partner of FASL, was found in the NBEAL2 interactome. We could hypothesize that the elevated FASL plasmatic level could be due to early degranulation of cytotoxic cells or the absence of secretory lysosomes retention due to NBEAL2 deficiency. Increased FASL expression at the plasma membrane could be associated with elevated FASL concentration in the patients' plasma as a consequence of FASL cleavage (REF?).

Finally, NBEAL2 interactome revealed its interaction with LRBA and AP1G2, coding for the γ 2 subunit of the adaptin protein complex AP-1 (Shin et al., 2021). Both LRBA and AP-1 are involved in CTLA-4 trafficking. After CTLA-4 endocytosis, LRBA allows the recycling of the inhibitory immune checkpoint to the membrane (Lo et al., 2015), whereas AP1G2 mediates its transport to the lysosome where it will be degraded (Valk et al., 2008). Since NBEAL2 interacts with LRBA and AP1G2, we decided to investigate its role in CTLA-4 expression.

We observed that GPS patients had a reduced number of T cells expressing CTLA-4 after TCR activation. However, NBEAL2 deficiency did not affect CTLA-4 expression on Treg, suggesting that NBEAL2 is involved in CTLA-4 trafficking mostly in T effector cells.

We confirmed that NBEAL2 interacts with CTLA-4 in activated T cells by co-immunoprecipitation. Moreover, we reproduced *in vitro* the CTLA-4 defect on primary activated T cells after a knock-down of NBEAL2 using a CRISPR/Cas9 system.

Interestingly, LRBA expression was reduced after TCR activation, whereas NBEAL2 expression seemed increased. Thus, we could hypothesize that NBEAL2 reinforce or take over LRBA capacity to recycle CTLA-4 after TCR activation, maybe by preventing CTLA-4 to be send to lysosome by avoiding its binding to AP-1 complex.

In addition, CTLA-4 expression defect is not observed in TReg of NBEAL2 deficient patients, suggesting that Treg functions in self-tolerance might not be impacted by NBEAL2 deficiency. This observation could explain why only 25% of GPS patients develop auto-immune manifestations (Sims et al., 2020), whereas in the case of LRBA deficiency and CTLA-4 haplo-insufficiency most patients develop severe autoimmune manifestations. This result also shows

that the expression of CTLA-4 on activated effector cells is also involved in the control of autoimmunity.

Our results on CTLA-4 trafficking in NBEAL2 deficient patients could suggest new therapeutic options. First for GPS patients presenting auto-immune manifestations, their symptoms might improve with the use of CTLA-4Ig (abatacept), that could mimic CTLA-4 function, counteracting the CTLA-4 defect observed on patients' effector T cells.

Finally, immunotherapy targeting CTLA-4 in cancer often leads to adverse immune effects and autoimmune manifestations (Boutros et al., 2016). Targeting NBEAL2 instead of CTLA-4 could be interesting since the role of NBEAL2 in Treg seems less important than in activated T cells. Therefore, NBEAL2 could be a target specific to cancer cells overexpressing CTLA-4, sparing Tregs CTLA-4 expression, and reducing autoimmune adverse events.

To conclude, NBEAL2 deficiency leads to abnormal immune phenotype in humans. We presented the first NBEAL2 interactome in primary activated T cells revealing new partners for this BEACH-domain containing protein. Thus, NBEAL2 interacts with LRBA in activated T cells and is involved in CTLA-4 trafficking. Grey platelet syndrome patients developing autoimmunity might be treated by abatacept, as the expression of CTLA-4 is downregulated in their conventional T cells.

Limitation of the study

This study has been performed on a small cohort of GPS patients and these findings ought to be confirmed on a larger cohort. Further analysis of GPS patients' eosinophils might bring a deeper insight of the role of NBEAL2 in granulocytes. NBEAL2 seems to have a crucial role in granule retention. Hence the study of cells containing granules might be considered, beyond the hematopoietic lineage. For example, some GPS patients developed vitiligo. Is this an autoimmune manifestation or a partial abnormal melanin production? Finally, the role of NBEAL2 as an immune regulator, beyond vesicle trafficking could be further investigated.

STAR Methods

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

- Patients
- **METHOD DETAILS**
 - Cell isolation and cultures
 - Flow cytometry
 - Mass cytometry
 - FasL dosage
 - Vitamin B12 dosage
 - Autoantibodies array
 - Bulk RNA Sequencing
 - Bulk RNA Seq analysis
 - CRISPR Cas9 experiments
 - Immunoblotting
 - Immunoprecipitation
 - Mass spectrometry analysis
 - Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)
 - Statistical analysis

Acknowledgments

We would like to acknowledge the patients and their families for their cooperation in this study. The study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by government grants from the Agence National de la Recherche as part of the “Investment for the Future” program (ANR-10-IAHU-01 and ANR-18-RHUS-0010), the Ligue Contre le Cancer-Comité de Paris, Fondation ARC pour la recherche sur le CANCER, the Centre de Référence Déficiences Immunitaires Héritaires (CEREDIH), the Agence National de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 “Lumugene”, ANR-18-CE17-0001 “Action”), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQU202103012670).

We thank Imagine genomic, bioinformatic and single-cell core facilities, Biomarkers UTechS platform and the Pitié-Salpêtrière Cytometry platform CyPS. We thank Dr Quan-Zhen Li team for their help with the autoantigen array (Microarray Core, BioCenter, UT Southwestern Medical District, Dallas, Texas, Etats-Unis).

Author contributions

L.D. designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.
F.C. analyzed the single-cell and bulk RNA Sequencing (sc RNA Seq) data.
J-L.Z. designed and performed the co-immunoprecipitation and mass spectrometry experiments.
Q.R. analyzed the CyTOF data and performed bioinformatics analyses
E.K. optimized and performed the CRISPR experiments

M-C.S. performed the CTLA-4 Treg staining, the proliferation assays, and critically revised the manuscript.

A.B. performed the mass spectrometry experiment and analyses.

M.L. performed the sc RNA Seq experiment and generated the RNA libraries.

A.Mi. contributed to the sc RNA Seq experiment, cytometry staining and clinical data collection.

A.M. performed the FAS ligand ELISA

S.M. contributed to the sc RNA Seq experiment, cytometry staining and bioplex.

A.C. performed the acquisition and first analysis of CyTOF data

S.S.M. extracted the DNA for whole exome sequencing analyses.

N.V. performed the vitamin B12 dosage

G.K. provided insight to CRISPR-Cas9 guide design and optimized nucleofection protocols.

S.R. performed western blotting.

C.dC. performed bioinformatics analysis and designed graph layouts.

B.Pé. contributed to the sc RNA Seq experiment and cytometry staining.

C.B. contributed to the sc RNA Seq experiment and cytometry staining.

N.C. analyzed the bulk RNA Sequencing data

R.F., G.L., B.N., B.C. participated in clinical care and critically revised the manuscript.

J-C. G. analyzed the mass spectrometry data and reviewed the article.

A.F. provided insights in experimental design and critically revised the manuscript

M.M. designed and analyzed the sc RNA Seq data.

B.P. and F.R.L designed and supervised the project and reviewed the manuscript.

All authors reviewed the manuscript.

References

- Aarts, C.E.M., Downes, K., Hoogendijk, A.J., Sprenkeler, E.G.G., Gazendam, R.P., Favier, R., Favier, M., Tool, A.T.J., van Hamme, J.L., Kostadima, M.A., et al. (2021). Neutrophil specific granule and NETosis defects in gray platelet syndrome. *Blood Advances* 5, 549–564.
- Bossi, G., and Griffiths, G.M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5, 90–96.
- Boutros, C., Tarhini, A., Routier, E., Lambotte, O., Ladurie, F.L., Carbonnel, F., Izzeddine, H., Marabelle, A., Champiat, S., Berdelou, A., et al. (2016). Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 473–486.
- Burns, S.O., Zenner, H.L., Plagnol, V., Curtis, J., Mok, K., Eisenhut, M., Kumararatne, D., Doffinger, R., Thrasher, A.J., and Nejentsev, S. (2012). LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 1428–1432.
- Cullinane, A.R., Schäffer, A.A., and Huizinga, M. (2013). The BEACH is hot: A LYST of emerging roles for BEACH-domain containing proteins in human disease. *Traffic* 14.
- Deppermann, C., Nurden, P., Nurden, A.T., Nieswandt, B., and Stegner, D. (2013). The *Nbeal2*^{-/-} mouse as a model for the gray platelet syndrome. *Rare Diseases* 1, e26561.
- Favier, R., Roussel, X., Audia, S., Bordet, J.C., De Maistre, E., Hirsch, P., Neuhart, A., Bedgedjian, I., Gkalea, V., Favier, M., et al. (2019). Correction of Severe Myelofibrosis, Impaired Platelet Functions and Abnormalities in a Patient with Gray Platelet Syndrome Successfully Treated by Stem Cell Transplantation. *Platelets* 1–5.

Gunay-Aygun, M., Falik-Zaccari, T.C., Vilboux, T., Zivony-Elboun, Y., Gumruk, F., Cetin, M., Khayat, M., Boerkoel, C.F., Kfir, N., Huang, Y., et al. (2011). NBEAL2 is mutated in Gray Platelet Syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet* 43, 732–734.

Ham, H., Huynh, W., Schoon, R.A., Vale, R.D., and Billadeau, D.D. (2015). HkRP3 Is a Microtubule-Binding Protein Regulating Lytic Granule Clustering and NK Cell Killing. *J.I.* 194, 3984–3996.

Kahr, W.H., Hinckley, J., Li, L., Schwertz, H., Christensen, H., Rowley, J.W., Pluthero, F.G., Urban, D., Fabbro, S., Nixon, B., et al. (2011). Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* 43, 738–740.

Kahr, W.H.A., Lo, R.W., Li, L., Pluthero, F.G., Christensen, H., Ni, R., Vaezzadeh, N., Hawkins, C.E., Weyrich, A.S., Paola, J.D., et al. (2013). Abnormal megakaryocyte development and platelet function in *Nbeal2*^{-/-} mice. *Blood* 122, 3349–3358.

Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E.K., Niemela, J.E., Avery, D.T., Schickel, J.-N., Tran, D.Q., Stoddard, J., Zhang, Y., et al. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. 6.

Kuleshov, M.V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., et al. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* 44, W90–W97.

Larocca, L.M., Heller, P.G., Podda, G., Pujol-Moix, N., Glembotsky, A.C., Pecci, A., Alberelli, M.A., Balduini, C.L., Landolfi, R., Cattaneo, M., et al. (2015). Megakaryocytic emperipolesis and platelet function abnormalities in five patients with gray platelet syndrome. *Platelets* 26, 751–757.

Lettau, M., Paulsen, M., Schmidt, H., and Janssen, O. (2011). Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *European Journal of Cell Biology* 90, 456–466.

Lo, B., and Abdel-Motal, U.M. (2017). Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition. *Current Opinion in Immunology* 49, 14–19.

Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J.M., Marsh, R., et al. (2015). Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 349, 436–440.

Lo, R.W., Li, L., Leung, R., Pluthero, F.G., and Kahr, W.H.A. (2018). NBEAL2 (Neurobeachin-Like 2) Is Required for Retention of Cargo Proteins by α -Granules During Their Production by Megakaryocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38, 2435–2447.

Mitsuiki, N., Schwab, C., and Grimbacher, B. (2019). What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? *Immunological Reviews* 287, 33–49.

Rensing-Ehl, A., Pannicke, U., Zimmermann, S.-Y., Lorenz, M.R., Neven, B., Fuchs, I., Salzer, U., Speckmann, C., Strauss, A., Maaß, E., et al. (2015). Gray platelet syndrome can mimic autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 126, 1967–1969.

Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 131, 58–67.

Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T.Z., Wing, J.B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B.-S., Schäffer, A.A., Grüning, B.A., et al. (2014). Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* 20, 1410–1416.

Serwas, N.K., Hoeger, B., Ardy, R.C., Stulz, S.V., Sui, Z., Memaran, N., Meeths, M., Krolo, A., Yüce Petronczki, Ö., Pfajfer, L., et al. (2019). Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis. *Nat Commun* 10, 3106.

Shin, J., Nile, A., and Oh, J.-W. (2021). Role of adaptin protein complexes in intracellular trafficking and their impact on diseases. *Bioengineered* 0, null.

Sims, M.C., Mayer, L., Collins, J.H., Bariana, T.K., Megy, K., Lavenu-Bombled, C., Seyres, D., Kollipara, L., Burden, F.S., Greene, D., et al. (2020). Novel manifestations of immune dysregulation and granule defects in gray platelet syndrome. *Blood* 136, 1956–1967.

Sowerby, J.M., Thomas, D.C., Clare, S., Espéli, M., Guerrero, J.A., Hoenderdos, K., Harcourt, K., Marsden, M., Abdul-Karim, J., Clement, M., et al. (2017). NBEAL2 is required for neutrophil and NK cell function and pathogen defense. *J Clin Invest* 127, 3521–3526.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607–D613.

Tariket, S., Guerrero, J.A., Garraud, O., Ghevaert, C., and Cognasse, F. (2019). Platelet α -granules modulate the inflammatory response under systemic lipopolysaccharide injection in mice. *Transfusion* 59, 32–38.

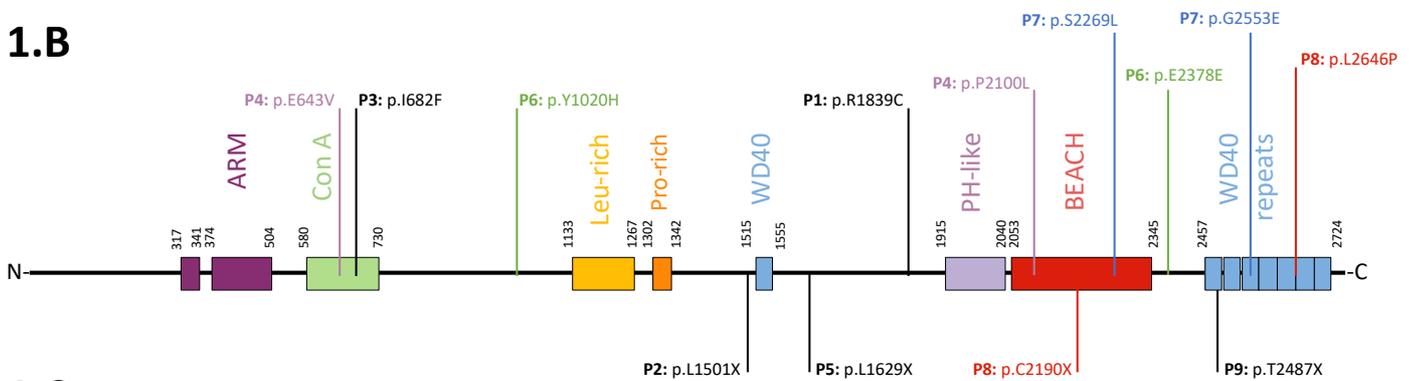
Valk, E., Rudd, C.E., and Schneider, H. (2008). CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends in Immunology* 29, 272–279.

Figure1: Gray platelet syndrome cohort: clinical and genetic characteristics

1.A

Patient ID	Gender	Affected Allele	Mutation 1	Mutation 2	Affected protein domains	GPS	Main symptoms	AI symptoms
P1	M	homozygous	p.R1839C	p.R1839C	-	unknown	Evans syndrome, neutropenia, adenopathy	Evans syndrome
P2	M	homozygous	p.L1501X	p.L1501X	-	yes	GPS, epistaxis, chill blain lupus	chill blain lupus
P3	F	homozygous	p.I682F	p.I682F	Con A	unknown	Splenomegaly, peripheral thrombocytopenia, repetitive infections	-
P4.II-1	F	compound	p.E643V	p.P2100L	Con A & BEACH	yes	GPS, hematomas	-
P4.II-2	M	compound	p.E643V	p.P2100L	Con A & BEACH	yes	GPS, myelofibrosis leading to BMT	-
P4.II-3	F	compound	p.E643V	p.P2100L	Con A & BEACH	yes	GPS	thyroiditis, joint problems
P5.II-1	F	homozygous	p.L1629X	p.L1629X	-	yes	GPS, splenomegaly, hematomas	Autoimmune thyroiditis
P5.II-2	M	homozygous	p.L1629X	p.L1629X	-	yes	GPS, moderate CD4+ T and B lymphopenia	platelets auto-antibodies
P6	M	compound	p.Y1020H	p.E2378E	-	yes	GPS	-
P7	M	compound	p.S2269L	p.G2553E	BEACH & WD40	yes	GPS, NK lymphopenia	-
P8	F	compound	p.C2190X	p.L2646P	BEACH & WD40	yes	GPS, hematomas, splenomegaly, T and NK lymphopenia, type 2 diabetes	-
P9.II-1	M	homozygous	p.T2487X	p.T2487X	WD40 repeats	yes	GPS	-
P9.II-2	F	homozygous	p.T2487X	p.T2487X	WD40 repeats	yes	GPS	-

1.B



1.C

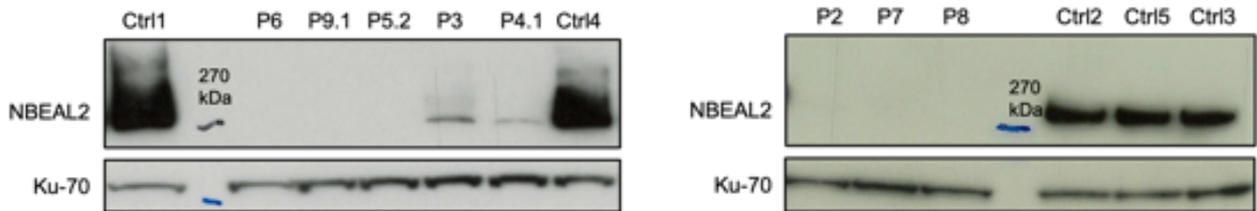
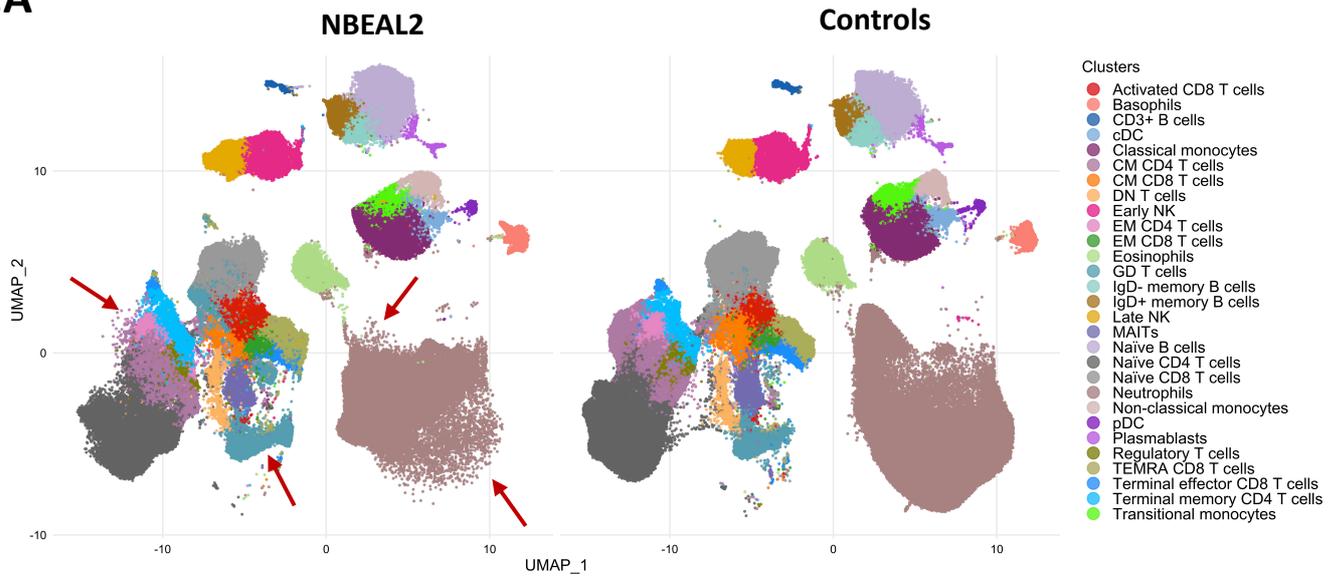
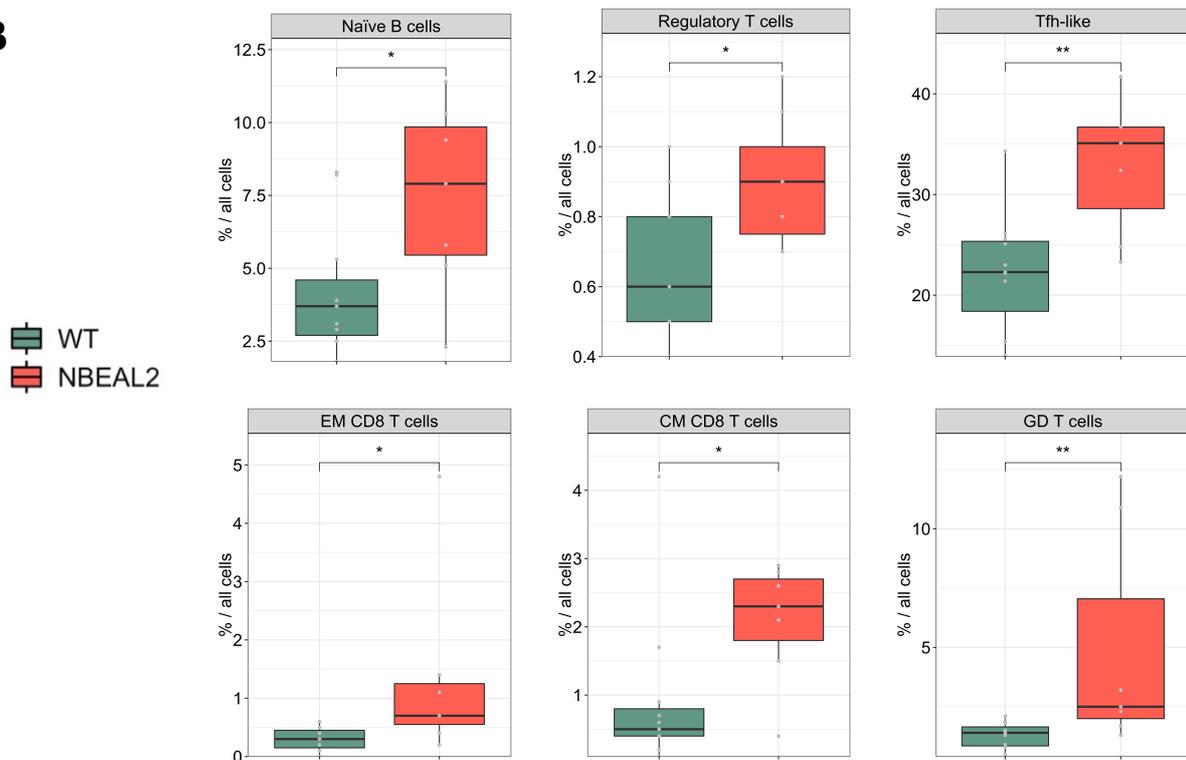


Figure 2: Gray platelet syndrome - immunological phenotype

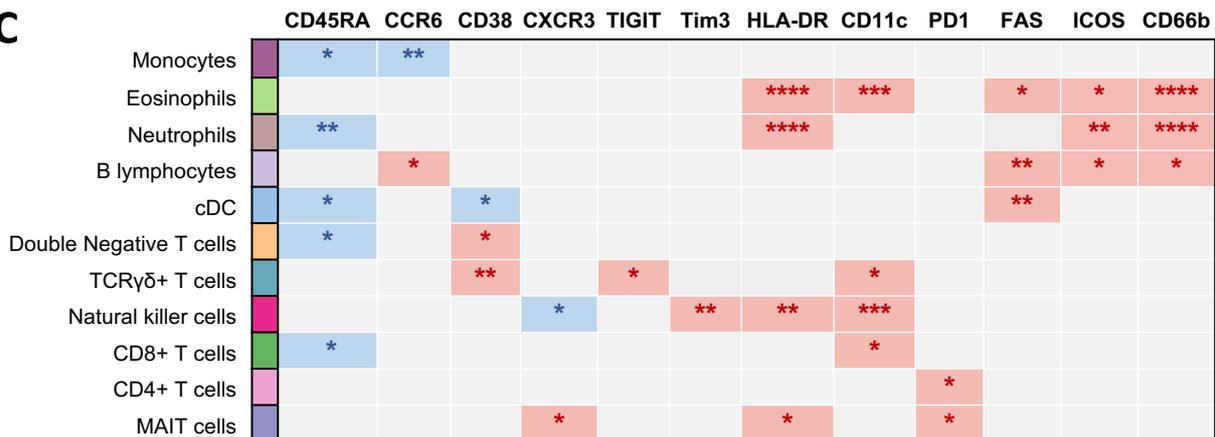
2.A



2.B



2.C



Mann-whitney test. (*) p-value < 0,05 ; (**) p-value < 0,01 ; (***) p-value < 0,005 ; (****) p-value < 0,0001

Figure 3: Proteomics analysis: NBEAL2 interactome in activated T cells

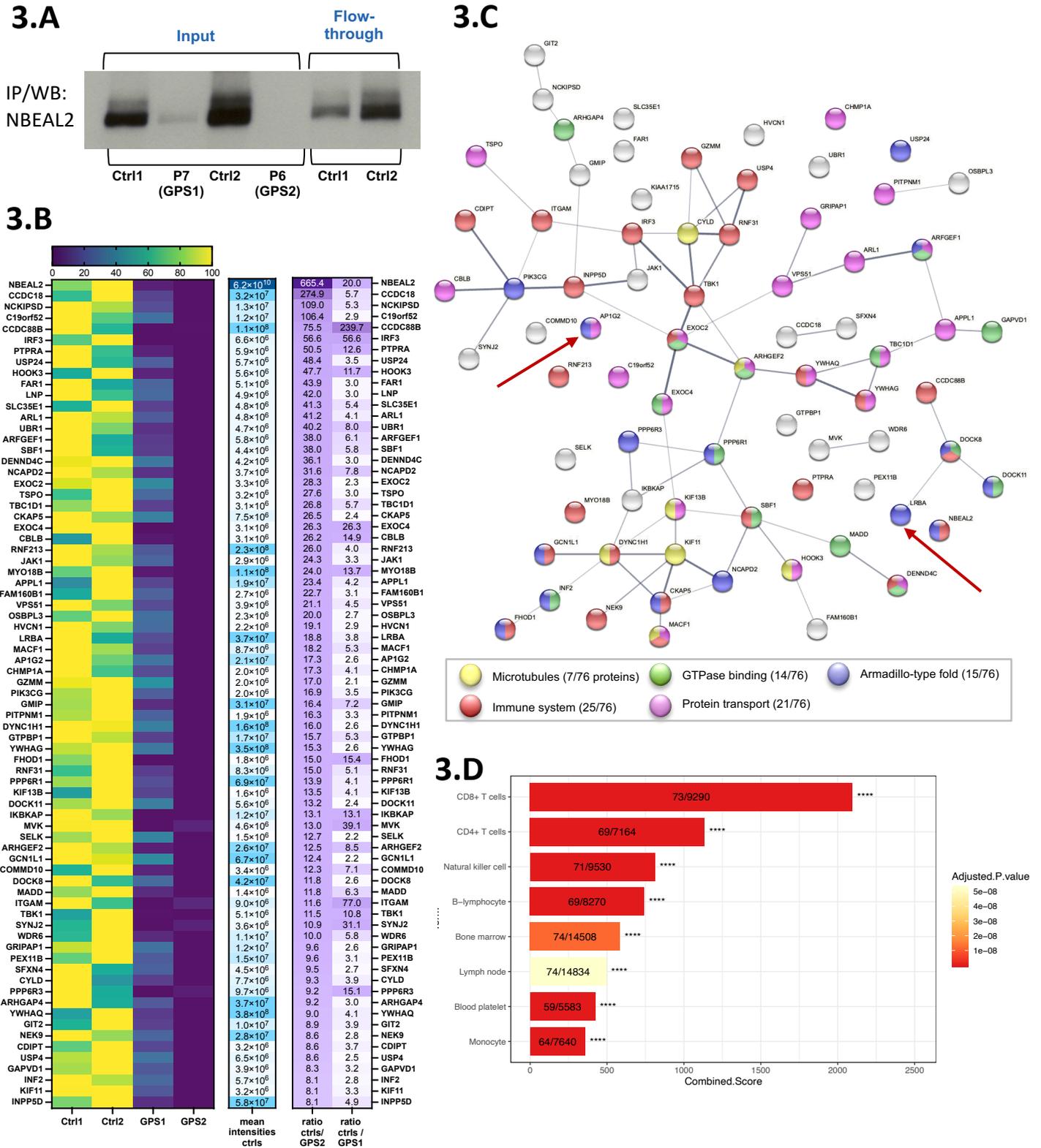
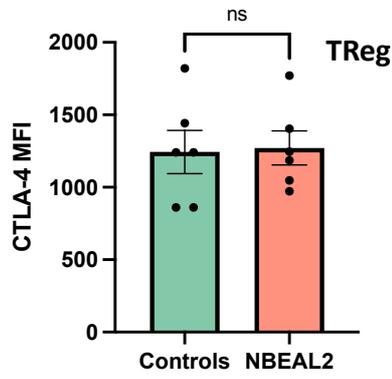
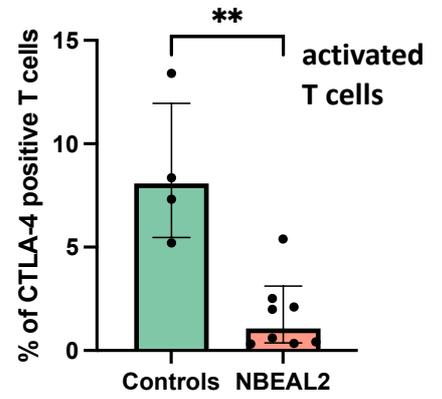


Figure 4: NBEAL2 is involved in CTLA-4 trafficking

4.A

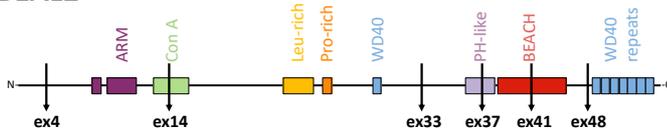


4.B



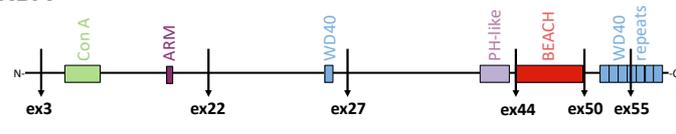
4.C

NBEAL2

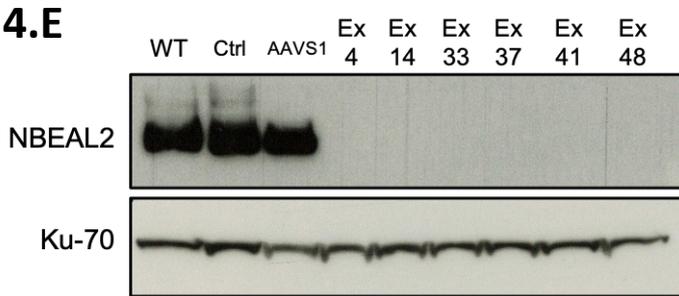


4.D

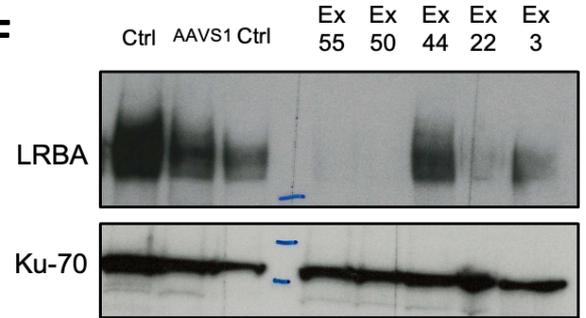
LRBA



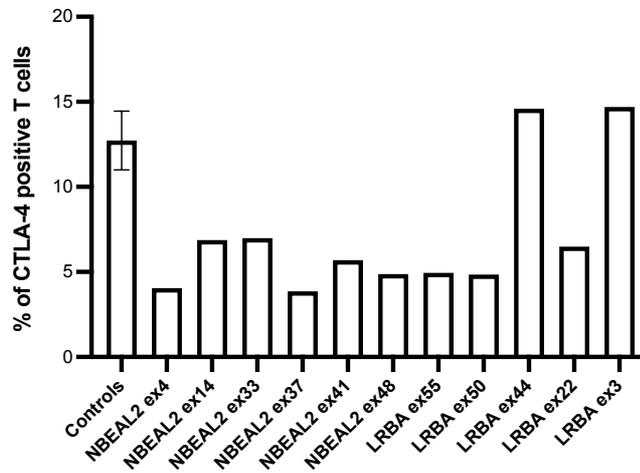
4.E



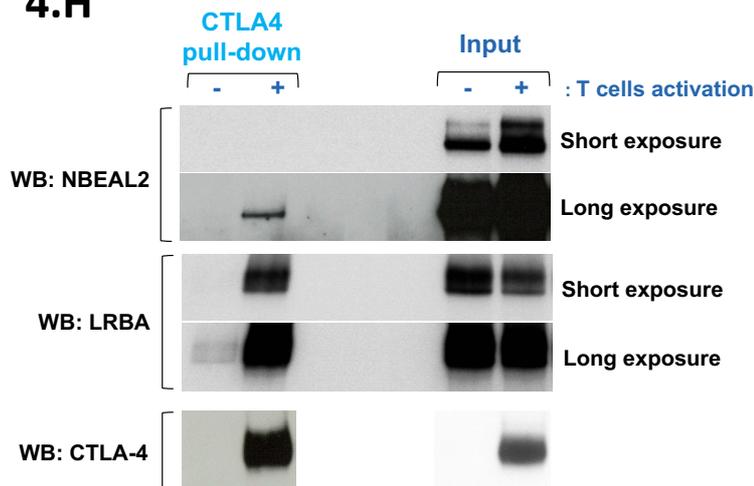
4.F



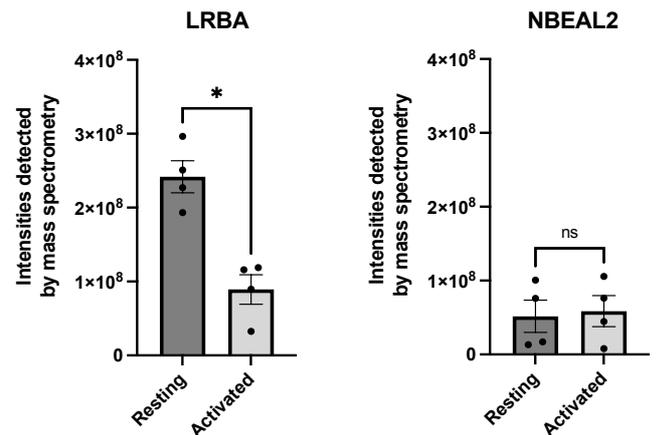
4.G



4.H

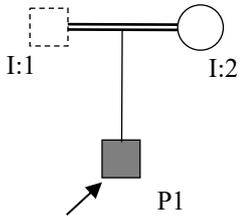


4.I

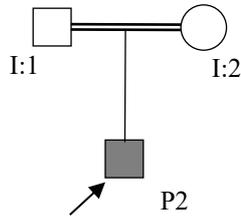


Supplemental figure 1: Patients cohort – family trees

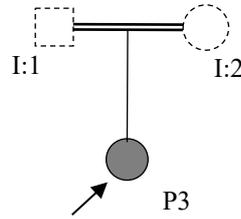
Family 1
(hmz, p.R1839C)



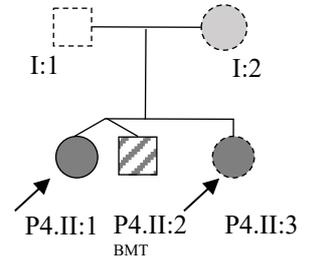
Family 2
(hmz, p.L1501del)



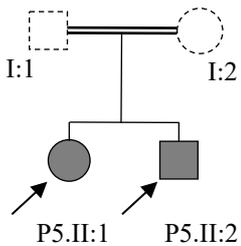
Family 3
(hmz, p.I682F)



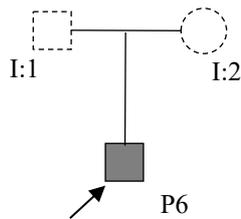
Family 4
(p.E643V and p.P2100L)



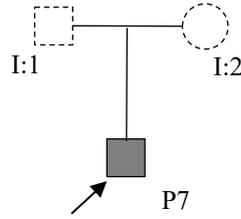
Family 5
(hmz, p.L1629X)



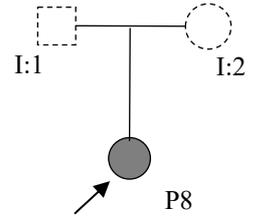
Family 6
(compound htz, p.Y1020H, p.E2378E, intronic mutation-1 ex19)



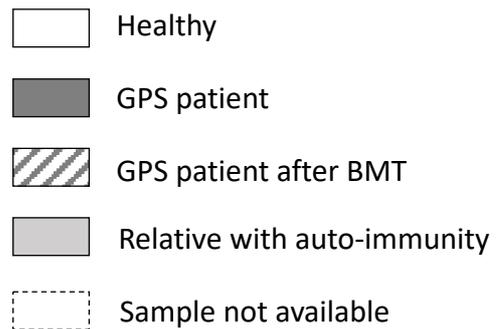
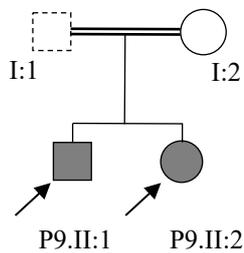
Family 7
(compound htz, p.S2269L, p.G2553E, p.I86V, intronic mutation ex44)



Family 8
(compound htz, p.C2190X and p.L2646P)

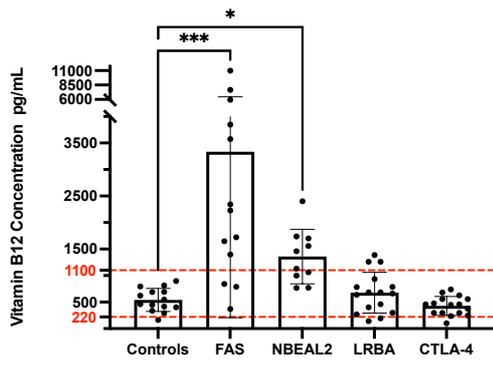


Family 9
(hmz, p.T2487X)

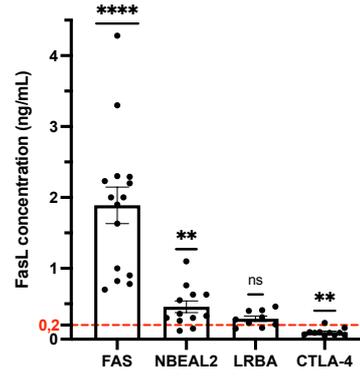


Supplemental figure 2: FasL and Vitamine B12 dosage

2.A Vitamin B12 in plasma

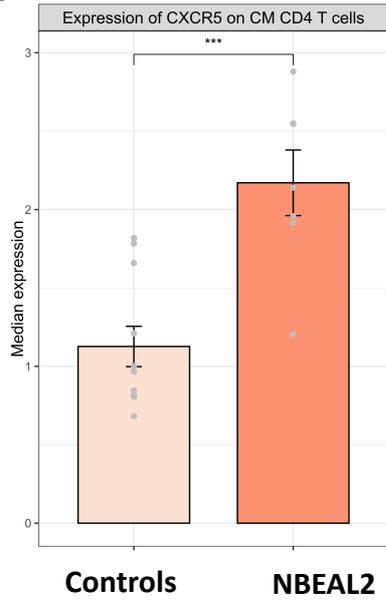


2.B FasL in plasma

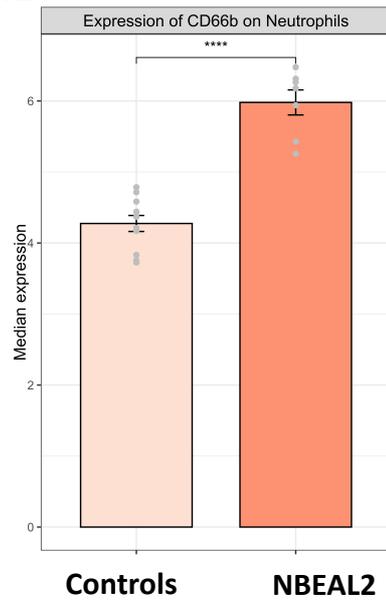


Supplemental figure 3: CXCR5 and CD66b expressions on specific cell subsets

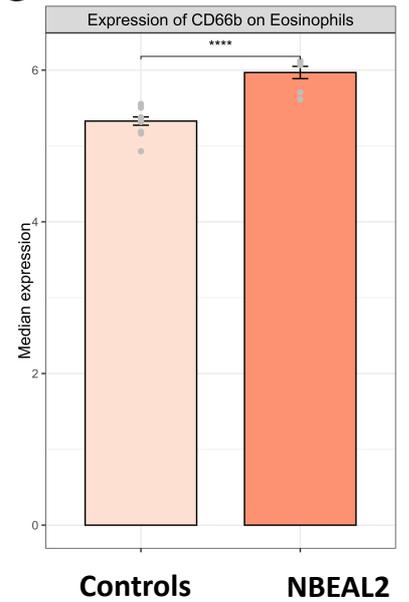
3.A



3.B

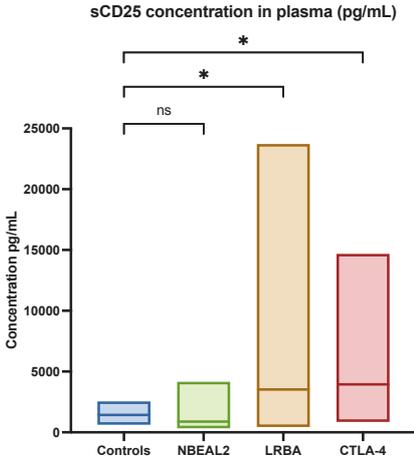


3.C

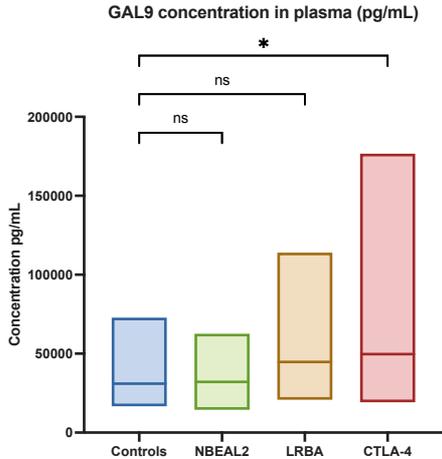


Supplemental Figure 4: immune checkpoints concentrations in the plasma of patients

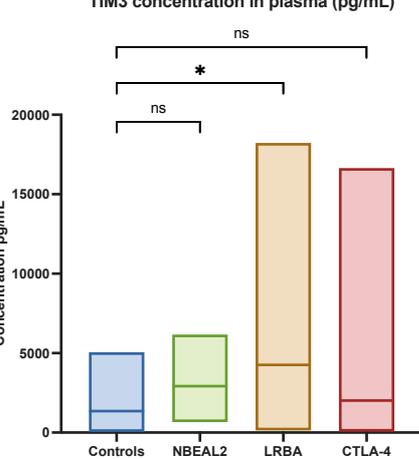
4.A



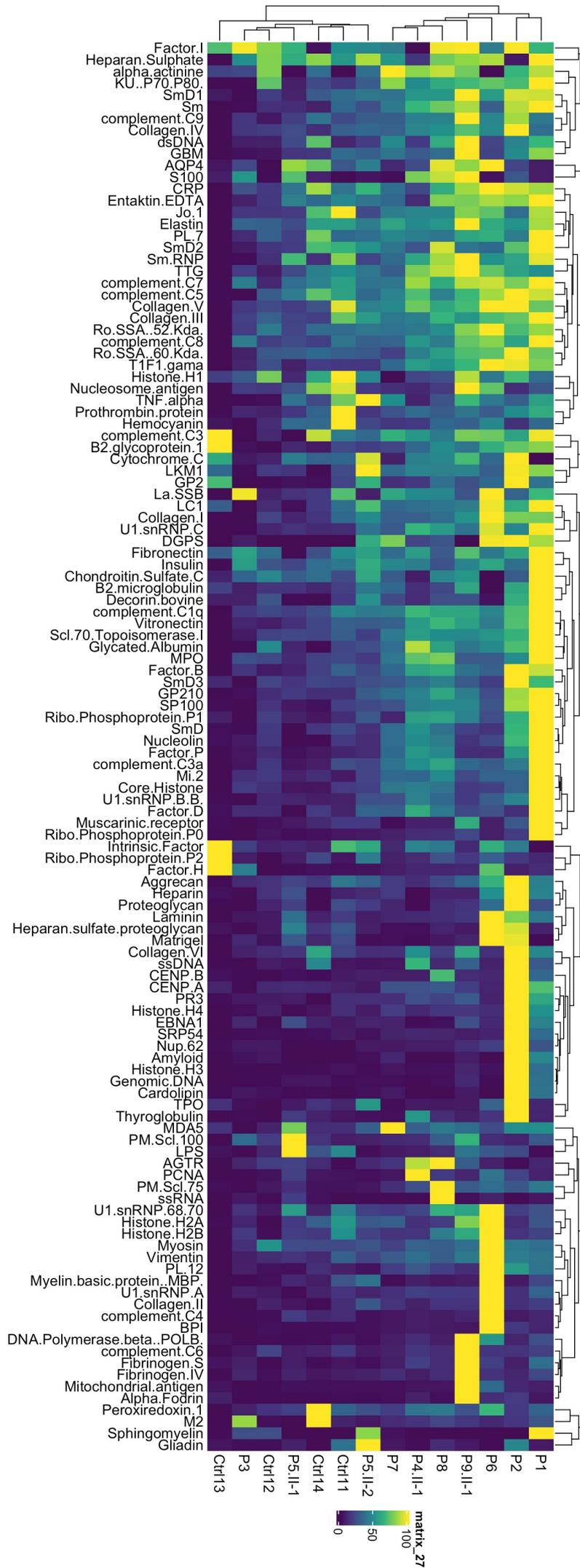
4.B



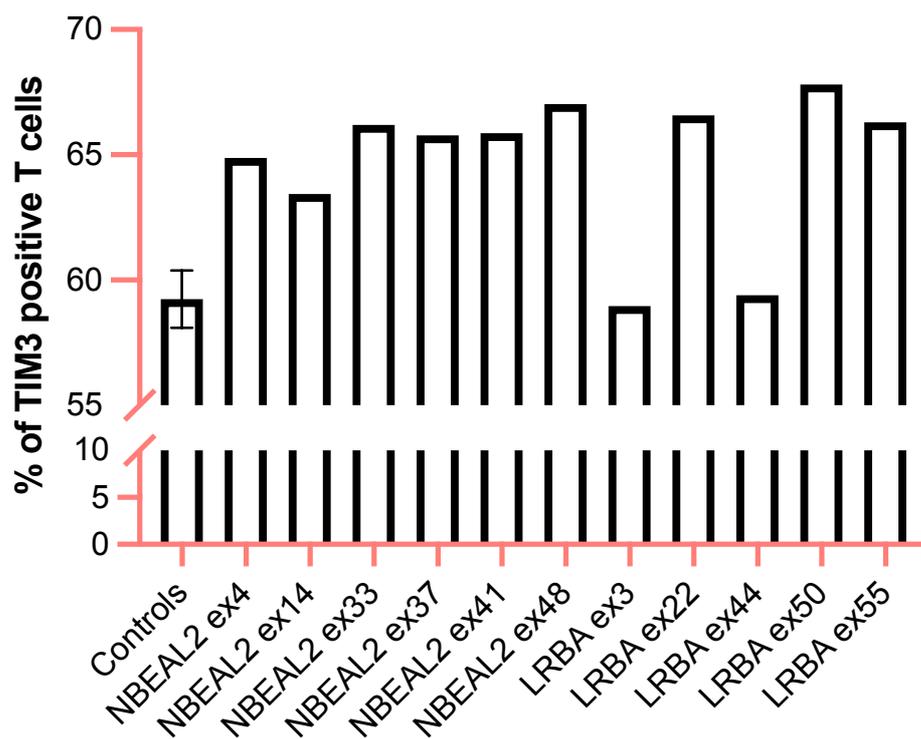
4.C



Supplemental Figure 5: Autoantigen microarray



Supplemental Figure 6: TIM3 expression after CRISPR-Cas9 knock-outs



Supplemental Figure 7: Mass spectrometry analyses – strategy of proteins selection

Samples from the interactome

Ctrl1
Ctrl2
GPS1 = Patient P6
GPS2 : KO NBEAL2 = Patient P7

Proteins after mass spectrometry
N = 3527

Protein is detected in both controls
N = 3170

Ratio Ctrl/patient calculable
N = 2818 proteins

Ratio Ctrl/patient not calculable because
only one patient have an intensity = 0
N = 183
*Ratio have been corrected using the the
lowest intensity value detected in this
experiment = $1,17 \cdot 10^5$*

Ratio Ctrl/patient not calculable because
both patients have an intensity = 0
N = 96 proteins
*Ratio have been corrected using the the
lowest intensity value detected in this
experiment = $1,17 \cdot 10^5$*

Intensities of each ctrl > 1.10^6
N = 2687 proteins

Intensities of each ctrl > 1.10^6
N = 183 proteins

Intensities of each ctrl > 3.10^6
N = 12 proteins

Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS2} > 8$
Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS1} > 2$
N = 77 proteins

Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS2} > 8$
Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS1} > 2$
N = 59 proteins

Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS2} > 8$
Proteins with ratio $\frac{I_{mean\ Ctrl1}}{GPS1} > 2$
N = 12 proteins

Manual curation of the MS/MS
spectra and detected peptide
N = 31

Manual curation of the MS/MS
spectra and detected peptide
N = 2

**Normalization of intensities amongst samples
per protein**

Curation of the list with the following criteria :

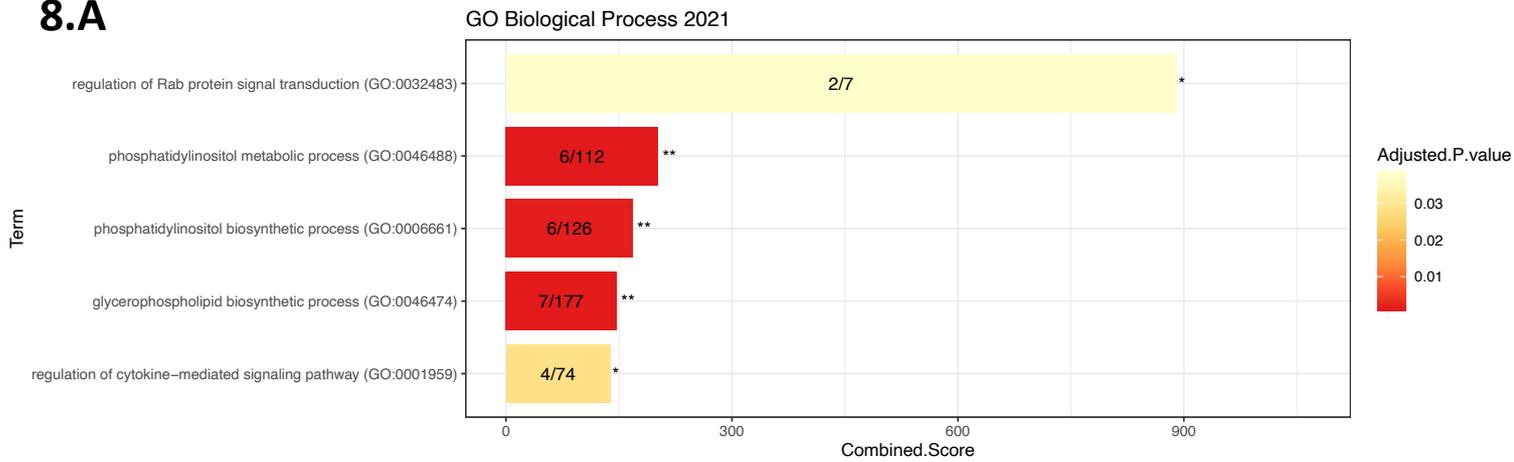
- 1) Both ctrls with Intensity >20%
AND all Ctrl/patient ratio >2
- 2) Both ctrls with intensity > 40%

N = 76 proteins
2,2% of the initial proteins list

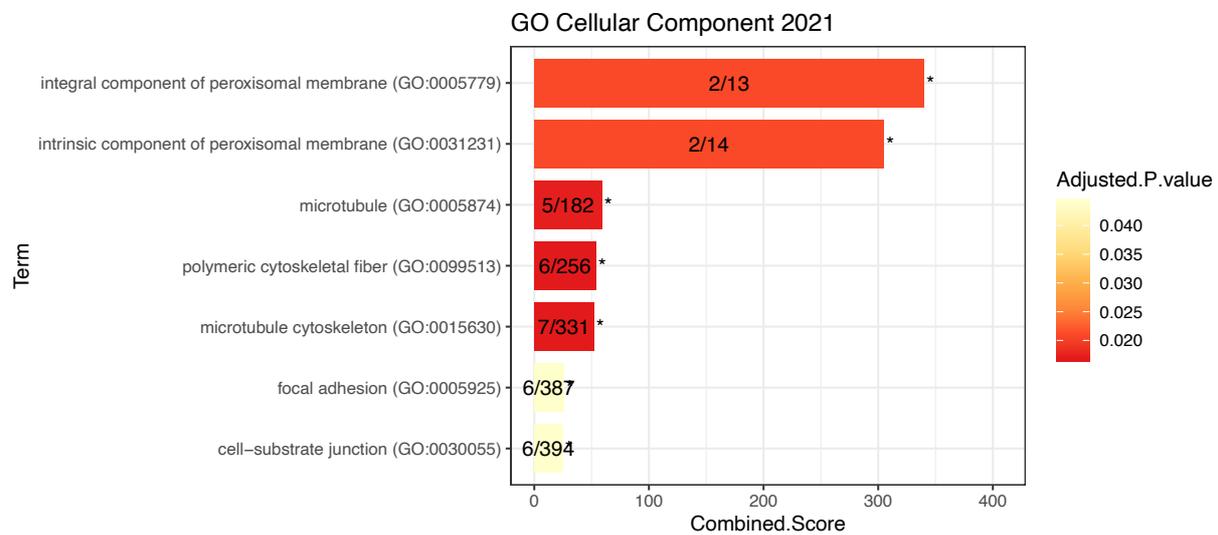
Supplemental Figure 8:

Mass spectrometry analyses – Gene set enrichment analyses - enriched pathways

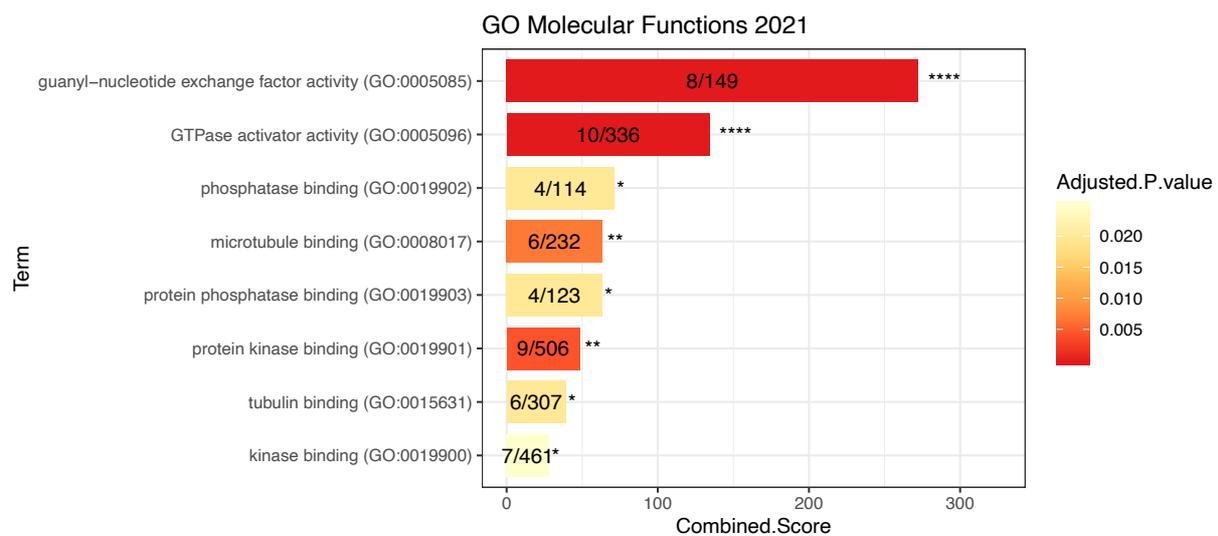
8.A



8.B



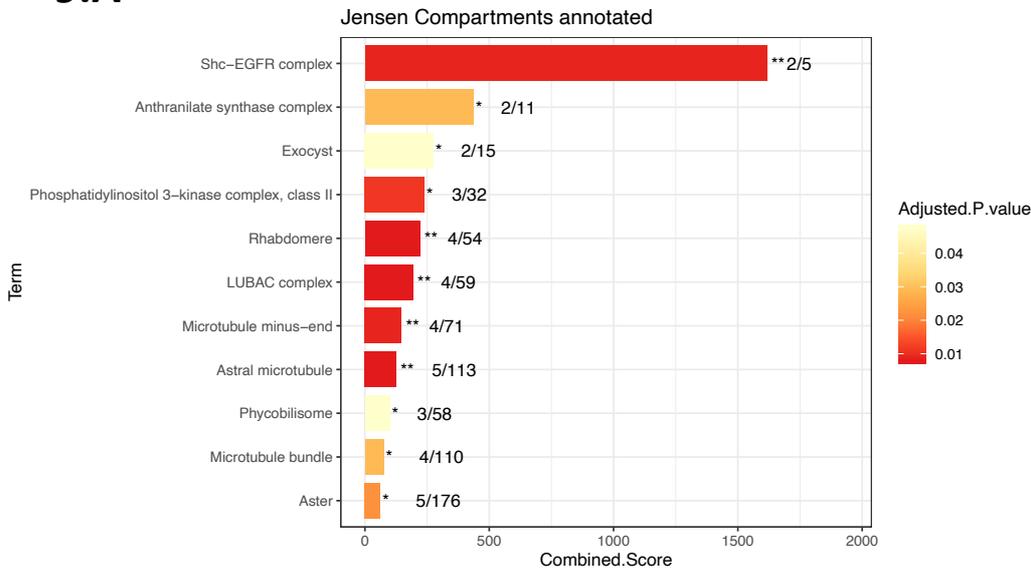
8.C



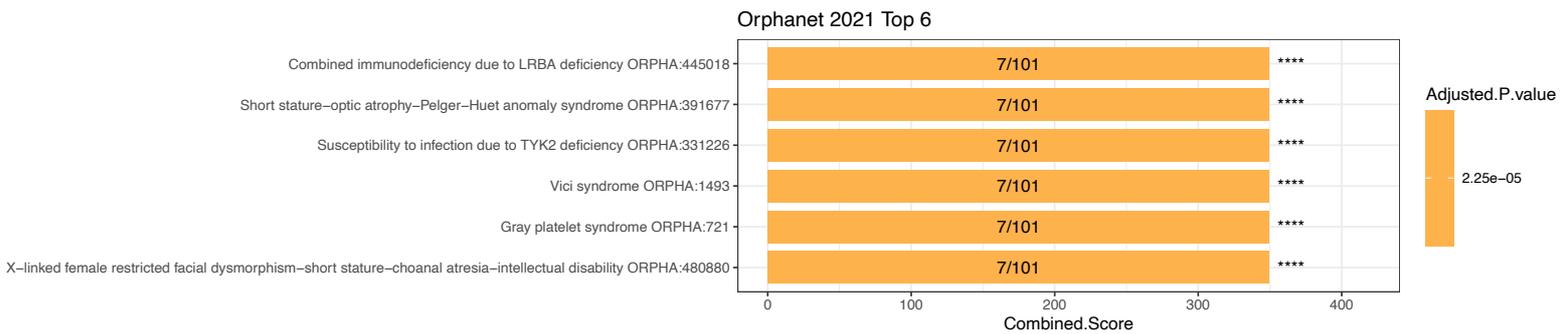
Supplemental Figure 9

Mass spectrometry analyses – enriched pathways

9.A



9.B



Captions of the figures

Figure 1: Gray platelet syndrome cohort: clinical and genetic characteristics

1.A) Main clinical symptoms and genetic information of the grey platelet syndrome patients. GPS: Gray Platelet Syndrome. B) Positions of the NBEAL2 mutations at the protein level. Compound heterozygous mutations are annotated with the same color. Homozygous mutations are annotated in black. C) NBEAL2 immunoblotting on activated T cells lysates from patients and healthy donors. The ku-70 protein is revealed as a loading control.

Figure 2: Gray platelet syndrome cohort: immunological phenotype

A) UMAP of immune cell subsets analyzed by CyTOF on whole blood samples from NBEAL2 patients and controls. Each cluster is color coded. The red arrows indicate changes in the cluster's shapes of the patients group B) Cluster biases observed in the cyTOF immune phenotype. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-whitney test. (*) p-value < 0,05 ; (**) p-value < 0,01 ; (***) p-value < 0,005 ; (****) p-value < 0,0001.

EM: Effector memory ; CM: Central Memory ; GD T cells: $\gamma\delta$ T cells. C) Table summarizing the significant upregulation (red) or downregulation (blue) of surface markers in the different immune cell subsets detected by CyTOF. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-whitney test. (*) p-value < 0,05 ; (**) p-value < 0,01 ; (***) p-value < 0,005 ; (****) p-value < 0,0001

Figure 3: Proteomics analysis: NBEAL2 interactome in activated T cells

A) Immunoblotting of NBEAL2 in input and flow-through fractions after NBEAL2 immunoprecipitation in T cells lysate (controls and GPS patients). B) The left heatmap shows normalized intensities of the 76 proteins selected after mass spectrometry analysis of the NBEAL2 interactome. The middle heatmap represents the mean intensities detected for the two controls. The last heatmap on the right shows the intensities ratio of the mean control intensity over each GPS patient. The proteins are ranked by their ratio over the patient GPS2 (no NBEAL2 protein expression detected). C) STRING network analysis of the 76 proteins and node coloring per function. The network edges indicate both functional and physical protein associations: proteins jointly contribute to a shared function. The line thickness indicates the strength of data support. D) Analysis of the 76 proteins partners of NBEAL2 in enrichR using the Jensen Tissue library. Top 8 of the most represented cells where these proteins are expressed. In the barplot the number of proteins versus the number of proteins defining the cell type is indicated. The adjusted p-value is also shown. The combined score is a combination of the p-value and z-score calculated by multiplying the two scores.

Figure 4: NBEAL2 is involved in CTLA-4 expression

A) CTLA-4 mean of intensity measured on Treg from unstimulated PBMC. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-whitney test B) Percentage of activated T cells expressing CTLA-4 following TCR activation. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-whitney test. C and D) Scheme of the proteins (NBEAL2 and LRBA) representing at the protein level the positions targeted by the CRISPR guides RNA used. E and F) NBEAL2 and LRBA immunoblotting after CRISPR-Cas9 experiment on activated T cells. Lysates from the different cell pools were used: one pool correspond to one RNA guide. WT: refers to cells that underwent nucleofection without CRISPR/Cas9 in the solution. Ctrl: refers to cells nucleofected with a scramble guide and the Cas9. AAVS1: refers to cells transfected with a the Cas9 and a guide targeting an intronic position of the genome. G) Percentage of cells expressing CTLA-4 after CRISPR-Cas9 knockout experiment for each mRNA guide used. H) Immunoprecipitation (IP) of CTLA-4 in activated or unstimulated T cells from healthy donors: comparison of the input fractions and the IP fractions. NBEAL2, LRBA and CTLA-4 were immunoblotted. I) Intensities detected by mass spectrometry in the input fractions of resting and activated T cells from two healthy donors (in duplicate). The intensities of LRBA and NBEAL2 were plotted.

Captions of the supplemental figures

Supplemental Figure 1: Patients cohort – family trees

Genetic family trees of the patients included in this cohort. Dashed squares and circles indicate the unavailability of biological samples.

Supplemental figure 2: FasL and Vitamine B12 dosage

A) Vitamin B12 concentration in plasma, the normal concentration range is annotated in red (220-1100 pg/mL). The p-values were determined with a nonparametric Kruskal-Wallis test for multiple comparison, corrected with a Dunn test B) Concentration of soluble FASL in patients' plasma compared to the normal maximum value set at 0,2 ng/mL. The p-values were calculated using a Wilcoxon signed-rank test with a hypothetical value of 0,2.

Supplemental Figure 3: CXCR5 and CD66b expressions on specific cell subsets

A) Expression of CXCR5 in central memory (CM) CD4+ T cells from controls and GPS patients (NBEAL2 group). B) Expression of CD66b on neutrophils from controls and GPS patients (NBEAL2) C) Expression of CD66b on eosinophils from controls and GPS patients. These data were obtained after cyTOF experiment. Two-tailed p-values were determined with a

nonparametric Mann-whitney test. (*) p-value < 0,05 ; (**) p-value < 0,01 ; (***) p-value < 0,005 ; (****) p-value < 0,0001

Supplemental Figure 4: Immune checkpoints concentrations in the plasma of patients

Concentrations of soluble immune checkpoints were measured in the plasma of patients carrying recessive mutations of LRBA or NBEAL2, or heterozygous mutations of CTLA-4. The following molecules have been tested with the Legendplex kit Immune Checkpoints Panel 1 (Biolegend, #740962) : sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- β 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, TIM-3, LAG-3, Galectin 9. A nonparametric Kruskal-Wallis test, corrected with a Dunn test was performed for multiple comparisons. (*) p-value < 0,05 ; (**) p-value < 0,01.

A, soluble CD25

B, soluble Galectin 9

C, soluble TIM3

Supplemental Figure 5: Autoantigens microarray

Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling including 128 autoantigens performed in collaboration with Dr Quan-Zhen Li team (Microarray Core, BioCenter, UT Southwestern Medical District, Dallas, Texas, Etats-Unis). The concentration of each autoantibody is normalized and the heatmap is clustered according to the relative intensity of these autoantibodies using a Euclidean clustering.

Supplemental figure 6: TIM3 expression after CRISPR-Cas9 knockdowns

Percentage of cells expressing TIM3 after CRISPR-Cas9 knockout experiment for each mRNA guide used.

Supplemental Figure 7: Mass spectrometry strategy for proteins selections in the interactome

Strategy of selection of the 76 highest putative partners of NBEAL2 obtained from the interactome by mass spectrometry analysis.

Supplemental Figure 8: Gene set enrichment analyses of the 76 partners of NBEAL2

with the GO_Biological_Process_2021 (A) ; GO_Cellular_Component_2021 (B) and GO_Molecular_Functions_2021 (C) libraries using EnrichR web tool

(<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)

Supplemental Figure 9: Gene set enrichment analyses of the 76 partners of NBEAL2

with the Jensen_compartment (A) and Orphanet_2021 (B) libraries using EnrichR web tool (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). Only the top 6 entries are shown for figure 9.B.

2. Analyses transcriptomiques sur cellules uniques des déficiences en CTLA-4

2.1. Objectifs de l'étude

NBEAL2 est impliqué dans le trafic de CTLA-4. Afin d'approfondir l'analyse des différences et ressemblances entre les patients atteints du syndrome des plaquettes grises, et ceux présentant une déficience en CTLA-4, nous avons réalisé plusieurs expériences de séquençage ARN sur cellules uniques. Toutes les données ont été acquises, et sont en cours de traitement bio-informatique grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Mickaël Ménager et le labTech SingleCell à l'institut Imagine.

Lors d'une première série d'expériences, nous avons pu comparer 4 groupes d'échantillons : des donneurs sains, des patients porteurs de mutations récessives de *LRBA* ou *NBEAL2* et des patients porteurs de mutations hétérozygotes de *CTLA-4*. Ces premières analyses devraient nous permettre de distinguer les voies de signalisation dérégulées pour chaque groupe de patients et de les comparer. Nous espérons que ces résultats nous permettront d'expliquer plus finement la pathophysiologie de cette maladie, et notamment pourquoi les patients déficients en NBEAL2 développent des symptômes auto-immuns moins graves que les patients déficients LRBA ou CTLA-4.

Lors d'une deuxième série d'expériences, nous avons souhaité étudier l'effet des traitements chez les patients atteints d'une haplo-insuffisance en *CTLA-4*. Par ailleurs, la pénétrance des mutations hétérozygotes de *CTLA-4* est décrite comme incomplète^{60, 213, 214}. Le mécanisme expliquant cette pénétrance incomplète n'est pas connu. Plusieurs hypothèses sont avancées : une cause digénique avec des variants « protecteurs », des causes épigénétiques ou environnementales, mais aucune n'a été démontrée. Grâce à cette étude, nous serons également en mesure d'étudier deux patients, porteurs sains de mutations de *CTLA-4* et de les comparer avec un de leur proche ayant développé la maladie. Cette étude nous permettra peut-être de comprendre si une dérégulation au niveau transcriptomique explique le développement des symptômes.

2.2. Échantillons analysés

Pour ces analyses, quatre expériences de séquençage sur cellules uniques ont été réalisées. Les échantillons analysés sont des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Elles ne sont pas pré-activées et sont encapsulées peu de temps après la décongélation. La viabilité des cellules est vérifiée avant l'encapsulation. Tous les échantillons retenus présentaient une viabilité supérieure à 90%. La répartition des échantillons, suivant le type de gènes mutés et le traitement, est décrite par le diagramme de la Figure 27. Nous disposons de 7 donneurs sains, 6 patients porteurs de mutations récessives de *LRBA*, 5 patients porteurs de mutations récessives de *NBEAL2*, 3 patients porteurs de mutations hétérozygotes de *CTLA-4*. A notre connaissance, pour ces quatre groupes, les patients ne suivaient pas de traitements immuno-modulateurs. Puis nous avons deux groupes de patients *CTLA-4* traités : sous abatacept (4) ou sous corticoïdes (1), qui pourraient être regroupés sous une seule appellation « *CTLA-4* traités ». Enfin nous avons un groupe comportant deux donneurs porteurs sains d'une mutation de *CTLA-4* (*CTLA-4* hc pour healthy carriers).

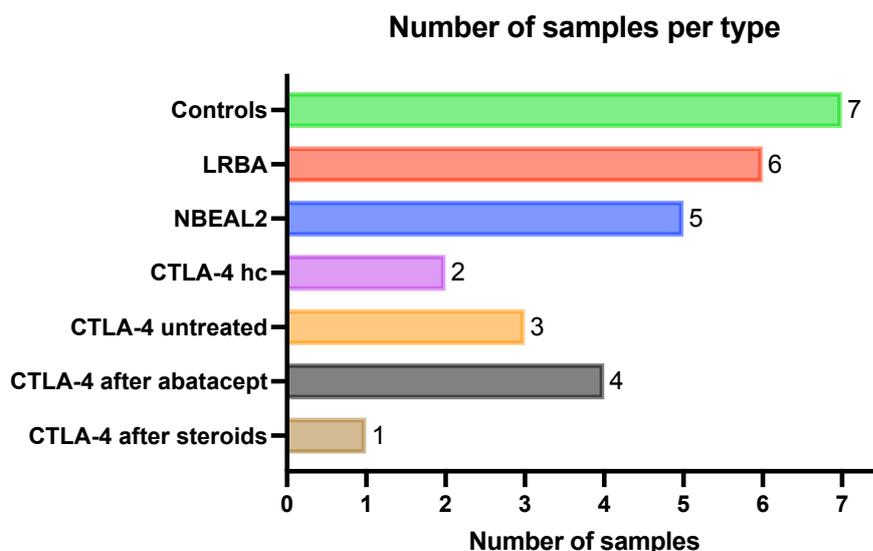


Figure 27: Présentation des groupes de patients analysés par séquençage en cellules uniques sur PBMC

La répartition des échantillons en fonction de l'âge est décrite à la Figure 28. Nous avons essayé de conserver une répartition homogène et d'éviter des différences d'âges trop importantes entre les patients et les contrôles et au sein des groupes.

samples grouped age and type

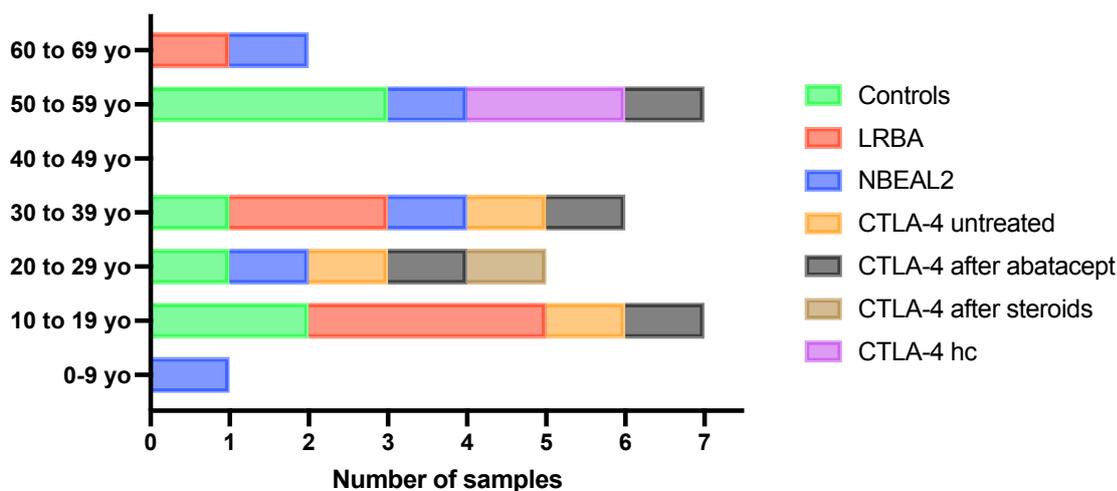


Figure 28: Répartition par âge des échantillons étudiés en séquençage sur cellules uniques

Tableau 9: Principales caractéristiques des donneurs et patients étudiés en séquençage en cellules uniques

Group	Sample ID	Gender	Age	Mutated gene	Allele	Inheritance	Protein change	Treatment	Main symptoms
Controls	C6	F	13	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C1_Cousin_P1	F	16	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C4_bis	M	20	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C26	F	30	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C3_Mother_P6_CTLA4	F	50	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C27	M	53	NA	NA	NA	NA	None	None
Controls	C2_Brother_P4	M	58	NA	NA	NA	NA	None	None
NBEAL2	P3_NBEAL2_hmz	M	9	NBEAL2	homozygote	Both parents	p.L1501*	None	Chil bla in lupus, hypogammaglobulemia, GPS
NBEAL2	P5_NBEAL2_compound	M	29	NBEAL2	compound_htz	Both parents	p.S2269L and p.G2553E and -1ex44	None	GPS, NK lymphopenia, reare hematomas
NBEAL2	P4_NBEAL2_compound	F	35	NBEAL2	compound_htz	Both parents	p.E643V and p.P2100L	None	GPS, hematomas
NBEAL2	P6_NBEAL2_compound	F	52	NBEAL2	compound_htz	Both parents	p.C2190* and p.L2646P	None	GPS, hematomas, splenomegaly, T and NK lymphopenia, haemolitic anemia, type 2 diabetes
NBEAL2	P7_NBEAL2_hmz	F	61	NBEAL2	homozygote	Both parents	p.L1629*	None	GPS, hematomas, thyroiditis, splenomegaly
LRBA	P1_LRBA_hmz	F	14	LRBA	homozygote	Both parents	p.R722_L1723del	None	Splenomegaly, adenopathies
LRBA	P6_LRBA_hmz	F	17	LRBA	homozygote	Both parents	p.Q1508*	None	ITP, AIHA
LRBA	P8_LRBA_hmz	M	19	LRBA	homozygote	Both parents	large deletion From exon 3 to 40	None	Vitiligo, lymphopenia B/NK, pulmonary infiltration, parenteral nutrition
LRBA	P2_LRBA_hmz	M	30	LRBA	homozygote	Both parents	p.R722_L1723del	None	autoimmune thyroiditis and shirt stature
LRBA	P5_LRBA_compound	F	30	LRBA	compound_htz	Both parents	p.R633* and p.V723_K753del	None	ITP, AIHA, diabetes type I
LRBA	P7_LRBA_hmz	F	62	LRBA	homozygote	Both parents	p.T2459*	None	DICV, granulome, hepatic and intestinal damages
CTLA-4 untreated	P9_CTLA4_ht	M	15	CTLA-4	heterozygous	unknown	p.R70W	None	diabetes type I, total alopecia, AIHA, eczema
CTLA-4 untreated	P6_CTLA4_ht	M	22	CTLA-4	heterozygous	father	deletion of exon 2 and 3 in CTLA-4	None	assumed asymptomatic
CTLA-4 untreated	P5_CTLA4_ht	M	31	CTLA-4	heterozygous	father	p.P137L	None	AIHA, hepatosplenomegaly, hypogammaglobulemia
CTLA-4_hc	P2_CTLA4_ht_hc_Mother_P1	F	53	CTLA-4	heterozygous	unknown	deletion of exon 2 and 3 in CTLA-4	None	None
CTLA-4_hc	P3_CTLA4_ht_hc_Father_P6	M	53	CTLA-4	heterozygous	unknown	deletion of exon 2 and 3 in CTLA-4	None	None
CTLA-4_treated	P9_CTLA4_ht_T	M	19	CTLA-4	heterozygous	unknown	p.R70W	Abatacept	diabetes type I, total alopecia, AIHA, eczema
CTLA-4_treated	P5_CTLA4_ht_T	M	31	CTLA-4	heterozygous	father	p.P137L	Abatacept	
CTLA-4_treated	P4_CTLA4_ht_T	M	55	CTLA-4	heterozygous	unknown	p.P137L	Abatacept	AIHA, hepatosplenomegaly, hypogammaglobulemia
CTLA-4_treated	P1_CTLA4_ht_T	M	28	CTLA-4	heterozygous	father	deletion of exon 2 and 3 in CTLA-4	Abatacept	polyadenopathies and hepatosplenomegaly
CTLA-4_treated	P6_CTLA4_ht_T	M	25	CTLA-4	heterozygous	father	deletion of exon 2 and 3 in CTLA-4	Steroids	ITP

Les principales caractéristiques, cliniques et biologiques, des donneurs étudiés, sont reportées dans le Tableau 9.

A partir de ces données, nous avons pu réaliser plusieurs intégrations des échantillons pour répondre à différentes questions :

- les signatures transcriptomiques des patients NBEAL2 ressemblent-elles à celles des patients LRBA et CTLA-4 ?
- les patients CTLA-4 traités par CTLA-4-Ig (abatacept) retrouvent-ils des profils transcriptomiques similaires aux donneurs sains ?
- peut-on prédire si un patient porteur d'une mutation hétérozygote de CTLA-4 développera des symptômes ? Les signatures transcriptomiques des porteurs sains ressemblent-elles à celles des contrôles ?

2.3. Comparaison des patients avec un déficit en CTLA-4

Dans un premier temps nous avons cherché à comparer les patients avec des mutations récessives de *NBEAL2* ou *LRBA* avec des patients ayant une haplo-insuffisance en CTLA-4. En effet, ces données nous permettraient de compléter l'article présenté dans la première partie des résultats. Nous espérons que l'analyse de ces résultats pourra nous permettre de mieux caractériser la pathophysiologie de l'auto-immunité chez les patients souffrant du syndrome des plaquettes grises, grâce à une comparaison avec les patients LRBA et CTLA-4.

Les groupes « controls » ; « NBEAL2 » ; « LRBA » et « CTLA-4 untreated » ont donc été comparés et les données ont été intégrées ensemble.

2.3.1. Traitement des données et génération de la UMAP

Pour ce projet, une UMAP a été générée à la suite de l'intégration des 21 échantillons mentionnés au début de ce paragraphe. Une explication de l'obtention de cette UMAP est décrite au paragraphe 11.1.

A la suite de cette intégration, un échantillon ne semblait pas former de clusters similaires aux autres. Les contrôles qualifiés dans leur globalité ont été revu point par point et il a été décidé d'éliminer cet échantillon de l'analyse. (P8_LRBA_hmz).

Une nouvelle UMAP contenant les 20 échantillons a été générée et les différents clusters, correspondants à des sous-types cellulaires, ont été identifiés et annotés (Figure 29).

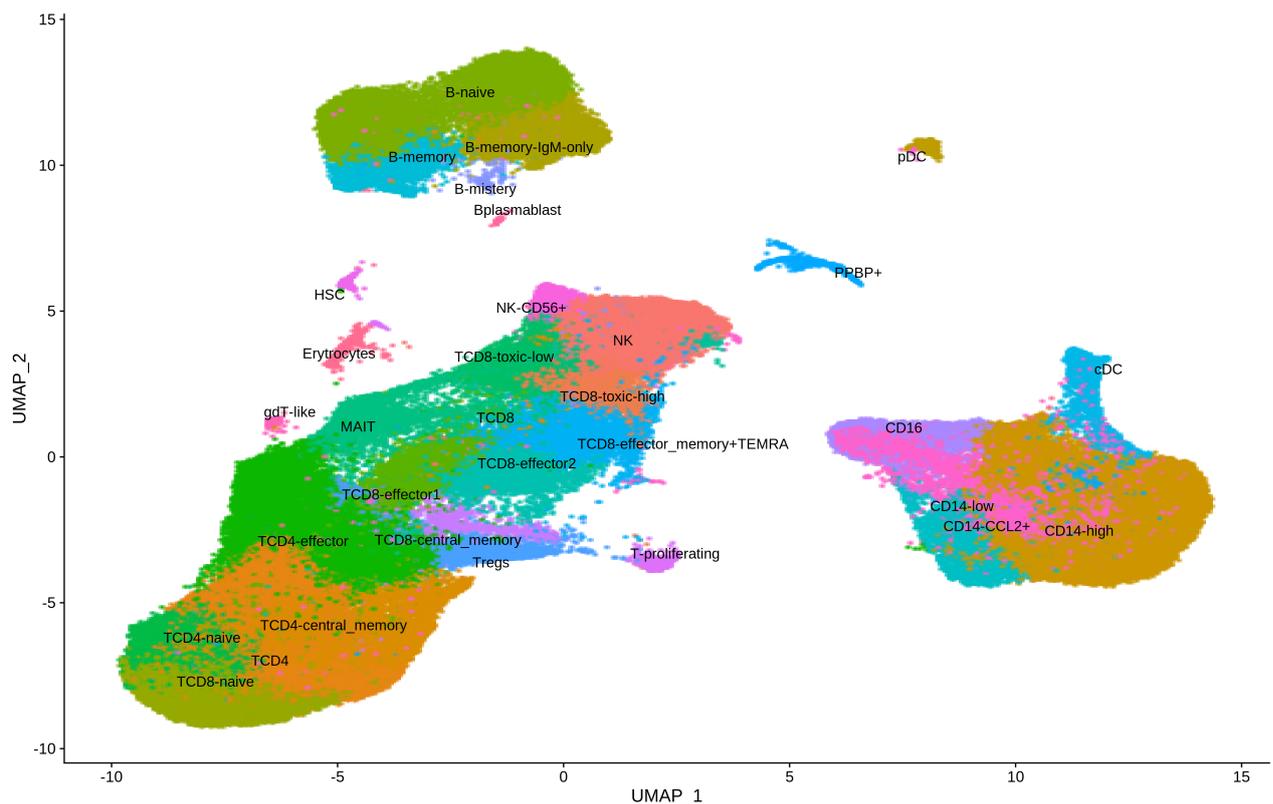


Figure 29: UMAP permettant de visualiser les données et les clusters de cellules obtenus

Trois macro-clusters sont identifiés délimitant les cellules myéloïdes (à droite), les lymphocytes T (en bas à gauche) et les lymphocytes B (en haut à gauche). En rentrant dans le détail des clusters, on peut distinguer les cellules dendritiques classiques (cDC, cluster accroché à celui des monocytes à droite) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les clusters de monocytes sont annotés avec le nom des marqueurs qui les caractérisent le plus : « CD16 » pour les monocytes non-classiques, « CD14-high » pour les monocytes classiques et ainsi de suite. Un cluster de cellules T en prolifération ainsi qu'un cluster possédant des marqueurs de cellules T $\gamma\delta$ se détachent du macro-cluster des lymphocytes T. Nous pouvons distinguer un petit cluster de cellules souches hématopoïétiques (HSC). Parmi les cellules B, le cluster des plasmablastes se détache également du macro-cluster. A noter qu'un sous-cluster, appelé pour l'instant « B-mystery » n'a pas été totalement identifié. Nous sommes certains qu'il s'agit de cellules B, mais nous avons du mal à les catégoriser. De plus deux autres petits clusters sont difficiles à identifier : il s'agit du cluster appelé « érythrocytes », qui est composé de cellules exprimant fortement des gènes de l'hémoglobine ; et du cluster « PPBP+ » qui expriment fortement des gènes classiquement associés aux plaquettes. Nous pensons que ces deux clusters sont probablement des contaminants et nous ne les considérerons pas dans la suite de l'analyse.

Enfin, il faut noter que l'identification des différents sous-types de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est assez complexe. En effet, contrairement à des techniques classiques de cytométrie en flux, les marqueurs permettant de distinguer les cellules mémoires et naïves sont très peu exprimés au niveau transcriptomique (CCR7, CD45RA...).

Il reste donc deux clusters de lymphocytes T appelés « CD4 » et « CD8 », avec des transcriptomes indiquant plutôt un phénotype mémoire que naïf, que nous n'arrivons pas à catégoriser de façon explicite.

2.3.2. Analyses des biais de clusters

Une fois les clusters identifiés, la première étape d'analyse consiste à regarder si certains sous-types cellulaires ressortent comme pathologiques : par exemple un cluster de cellules qui n'est trouvé que chez les patients. Ce n'était pas notre cas pour cette expérience.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la proportion de chaque cluster par rapport à l'ensemble des cellules. En Figure 30, les proportions des clusters par groupe de patients sont représentées.

On remarque que les deux clusters de monocytes « CD14_low » et « CD14_high » sont plus représentés chez les patients *CTLA-4*. A l'inverse on observe une lymphopénie globale des lymphocytes T CD4⁺ pour ce groupe de patients, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules NK mature (CD56⁺). Pour le groupe de patients *LRBA*, on observe également une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ centraux mémoires et naïfs, et T CD8⁺ naïfs. En revanche, le pourcentage de CD8⁺ centraux mémoires ainsi que des TReg est augmenté à la fois pour le groupe *LRBA* et pour le groupe *NBEAL2*. Enfin, chez les patients *NBEAL2*, le nombre de cellules NK CD56⁺, ainsi que le nombre de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques semblent diminués.

Si nous comparons ces résultats à ceux du cyTOF sur sang total (PBMC et granulocytes) réalisé sur les patients *NBEAL2*, nous observons la même tendance pour les TReg et les cellules CD8⁺ centrales mémoires. De la même manière, une tendance à l'augmentation du nombre de cellules B naïves semble être confirmée chez les patients *NBEAL2*.

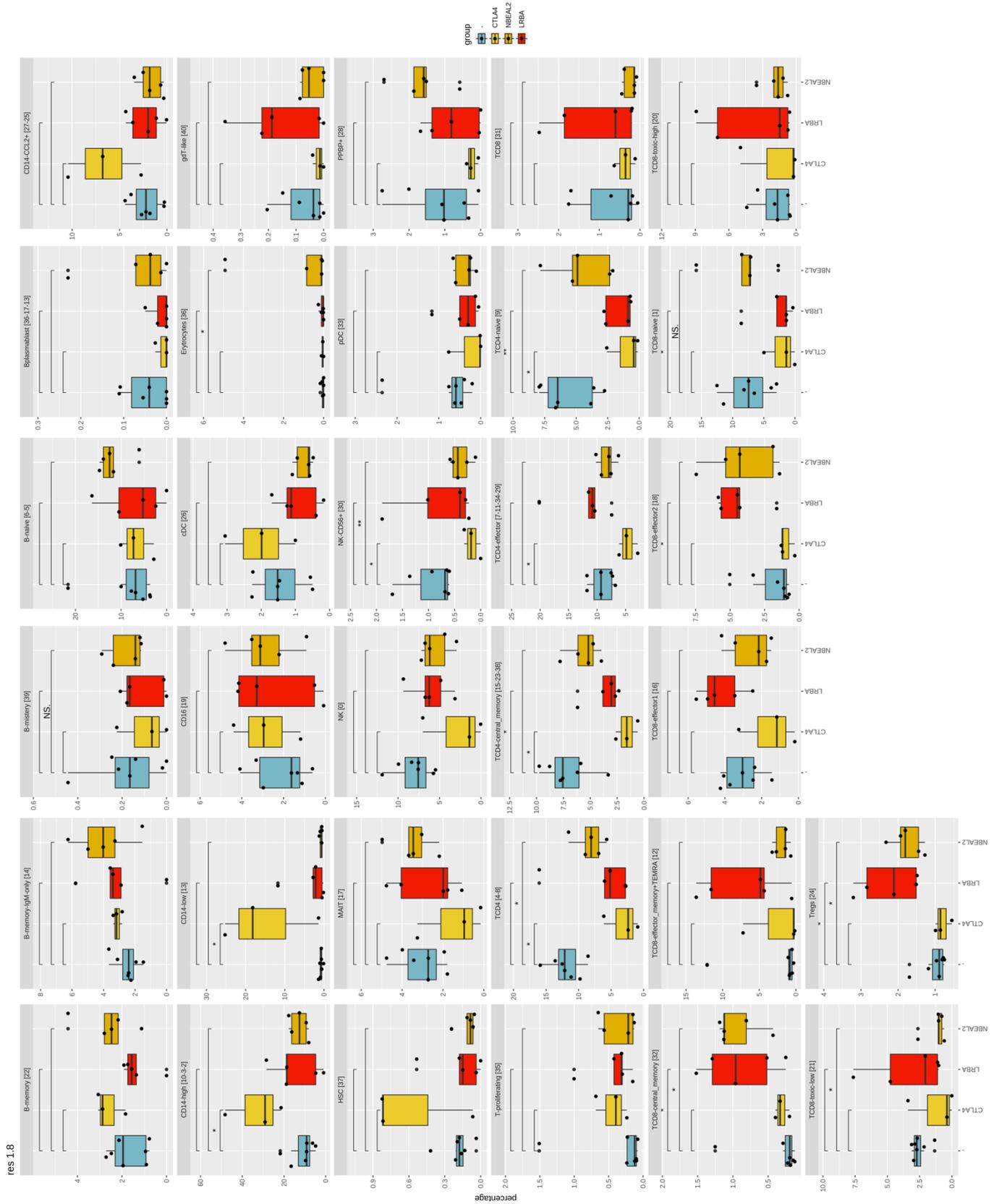


Figure 30: Représentation des proportions de cellules pour chaque cluster identifié sur la UMAP

2.3.3. Analyses des voies de signalisation dérégulées

Afin d'explorer les voies de signalisation dérégulées pour chaque groupe de patients, nous avons réalisé des analyses de gènes différentiellement exprimés (DEG) sur les clusters cellulaires. Ces analyses permettent de comparer, pour un cluster cellulaire, un groupe de patients au groupe contrôle et de faire ressortir les gènes sur-exprimés ou sous exprimés chez les patients. Une fois ces listes de gènes obtenues, nous réalisons une analyse d'enrichissement, qui nous permet d'avoir une idée des grandes voies de signalisation dans lesquelles la plupart de ces gènes ont un rôle. Ces analyses d'enrichissement ont été réalisées en utilisant la base de données EnrichR ²¹⁰ (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) ainsi qu'à l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis (IPA) de Qiagen. Lors des analyses EnrichR, nous nous sommes notamment concentrés sur les bibliothèques : GO_Biological_Process_2021 ; GO_Cellular_Component_2021 ; et GO_Molecular_Function_2021.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux macros-clusters : cellules myéloïdes, T et B, ainsi que des grands sous clusters : T CD4+, T CD8+ et les deux clusters de cellules NK (précoces et matures). Dans ce paragraphe, les premiers résultats seront présentés. Ils seront amenés à être affinés lors d'un deuxième temps d'analyses sur des clusters cellulaires plus petits et en comparaison avec la littérature disponible pour ces 3 groupes de patients.

Nous avons notamment remarqué que les voies de signalisation de l'apoptose semblent sous-exprimées dans les lymphocytes T CD8+ des patients GPS (Figure 31). Ceci pourrait expliquer leur pourcentage de cellules CD8+ mémoires augmenté.

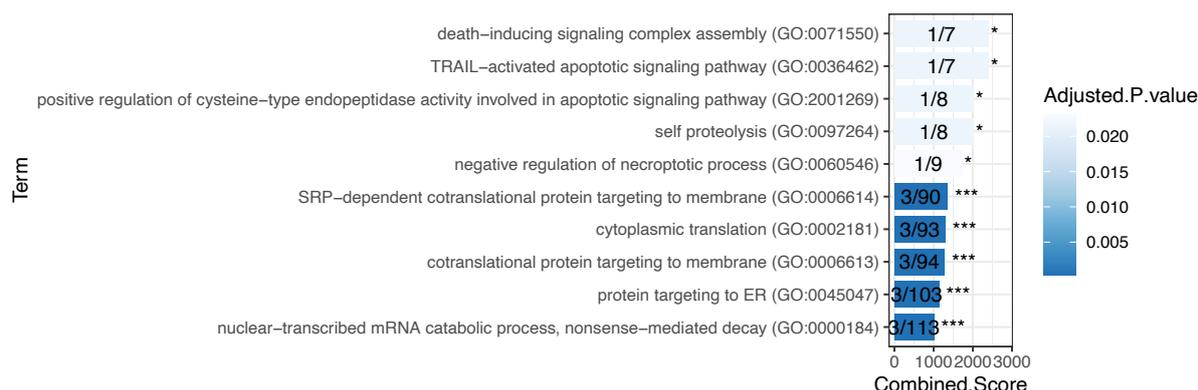


Figure 31: Voies de signalisation de l'apoptose sous-exprimées chez les patients NBEAL2, pouvant expliquer leur excès de lymphocytes CD8+ mémoires

L'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules B naïves des patients GPS montre une sur-expression des voies d'activation des cellules B (Figure 32). Ce profil transcriptomique pourrait expliquer l'excès de lymphocytes B naïfs observés chez les patients.

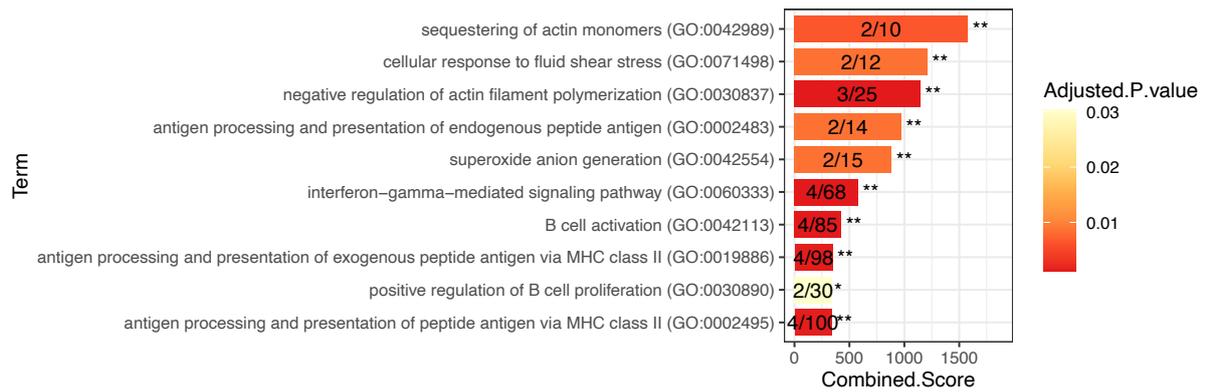


Figure 32: Sur-expression des voies d'activation des cellules B dans le cluster des B naïves chez les patients NBEAL2, expliquant leur léger excès de cellules B

Enfin, nous avons commencé à comparer les groupes de patients entre eux. Ainsi la listes de gènes différentiellement exprimés pour chaque macro-cluster et chaque groupe ont pu être comparés sur le logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen). Les voies de signalisations dérégulées sont décrites dans la Figure 33. Nous remarquons que les groupes de patients LRBA et NBEAL2 ont des signatures très similaires. De plus, les voies de signalisation liées au TCR, à la régulation du cytosquelette d'actine ou à l'extravasation des leucocytes sont toutes régulées à la hausse chez les patients. Ces voies de signalisation dérégulées pourraient contribuer, ou être le résultat, des manifestations auto-immunes développées par ces patients.

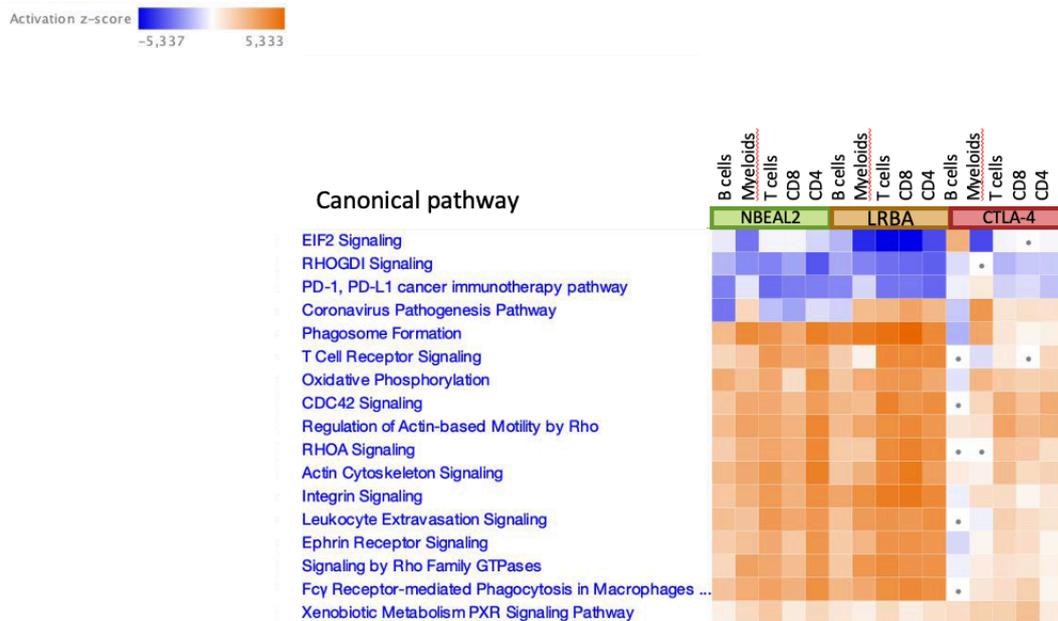


Figure 33: Analyses des voies de signalisation dérégulées dans les macro-clusters pour chaque groupe de patients (grâce au logiciel IPA).

Seuls les voies de signalisation les plus dérégulées sont montrées ici. Les groupes LRBA et NBEAL2 sont proches. Les z-scores permettent de visualiser si les voies de signalisation sont régulées à la hausse (orange) ou à la baisse (bleu). Les points gris indiquent que les p-values ne sont pas significatives pour le cluster et la voie de signalisation correspondants.

2.3.4. Perspectives

Nous souhaiterions nous concentrer sur les cellules dont la dérégulation est maximale pour les patients GPS et peaufiner la comparaison entre les groupes de patients. Nous espérons pouvoir ressortir des sous-types cellulaires ou des voies de signalisation préférentiellement dérégulées pour chaque groupe de patients, afin de potentiellement les corrélérer aux symptômes de ces différentes déficiences en CTLA-4.

2.4. Deuxième objectif : Effet du traitement par abatacept et analyse des porteurs sains de mutations de CTLA-4

Grâce à ces expériences de séquençage en cellules uniques, nous serons également en mesure de mener une autre étude et de comparer des patients présentant une haplo-insuffisance en *CTLA-4*, avant et après leur traitement par abatacept ou corticoïdes (pour 3 patients, soit 6 échantillons). De plus, nous pourrions analyser les différences entre les porteurs sains et les patients développant des symptômes. Cette analyse est juste initiée. Nous avons dû exclure le patient P4_CTLA4_ht_T car l'encapsulation de ses cellules lors de l'expérience était incomplète. En outre, les données collectées montraient un comportement qui divergeait de tous les autres échantillons. L'intégration des échantillons a été réalisée ainsi que la UMAP. Les biais de clusters sont en cours d'analyse ainsi que les listes de gènes différentiellement exprimés.

2.5. Troisième objectif : Analyse d'une patiente présentant une mutation homozygote de CTLA-4

Enfin, une dernière patiente CTLA-4, ainsi que sa mère, ont été analysées par séquençage sur cellules uniques. Il s'agit d'une patiente, issue d'une famille consanguine et présentant une mutation homozygote de CTLA-4. Cette mutation est particulière car elle se situe dans l'intron 3, à la position -3 de l'exon 4 (c.568-3C>A). La mère de cette patiente est porteuse de la mutation à l'état hétérozygote et ne présente aucun symptôme, ainsi qu'un niveau d'expression de CTLA-4 normal sur ses TReg. Notre hypothèse est que cette mutation produit un épissage aberrant, mais cette mutation est probablement hypomorphe et permet un épissage normal sur une proportion des ARNm ; ce qui expliquerait que les porteurs hétérozygotes ne présentent aucun signe d'une haplo-insuffisance en *CTLA-4*.

Pour conclure sur ce défaut en CTLA-4 chez la patiente, nous espérons que la comparaison de ses données de single-cell avec celles d'autres patients CTLA-4 et d'autres porteurs sains, nous permettra de montrer les mêmes voies de signalisation dérégulées.

3. DOCK11

Lors de l'analyse de l'interactome de NBEAL2, DOCK11 (Dedicator of cytokinesis 11) a été identifié comme un partenaire potentiel de NBEAL2. DOCK11 est le 11^{ème} membre de la famille des protéines DOCK, qui sont des facteurs d'échange de guanine nucléotidique (GEF) non conventionnels. DOCK11 est exprimé de manière prédominante dans les leucocytes ²¹⁵. Les protéines de la famille DOCK interviennent principalement dans l'activation des GTPases Rac et Cdc42 en régulant l'échange entre GDP et GTP. Ces échanges sont déterminants pour diverses fonctions des cellules B et T, telles que la chimiotaxie, l'adhésion et la différenciation.

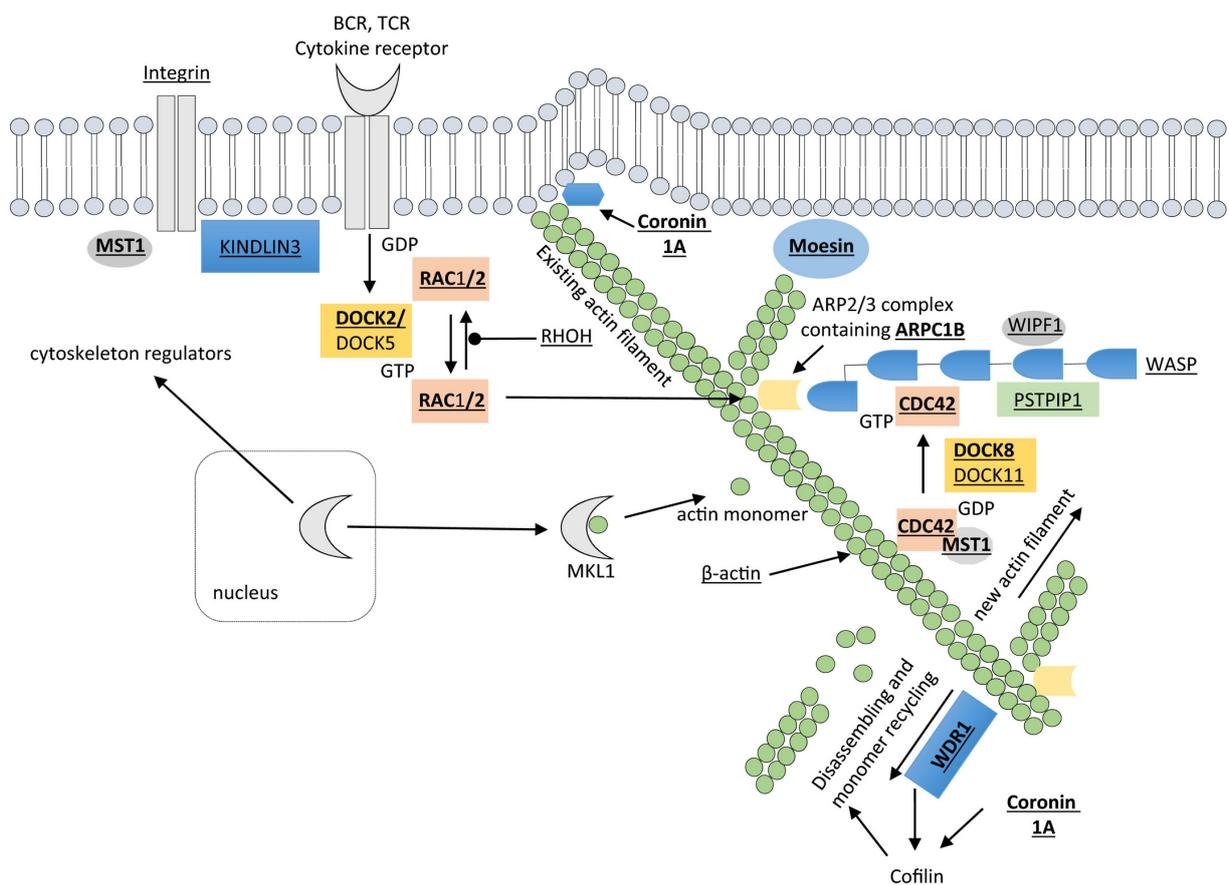


Figure 34: Modèle spéculatif du rôle de DOCK11 dans la polymérisation de l'actine ²¹⁶

Schéma simplifié de la dynamique du cytosquelette d'actine permettant de visualiser le rôle potentiel de DOCK11. Les protéines DOCK activées convertissent les protéines inactives de la famille Rho liées au GDP en formes actives liées au GTP. Les protéines de la famille Rho (RAC, CDC42), à leur tour, activent le complexe nucléoteur d'actine Arp2/3 via WASP. WDR1 favorise le renouvellement du filament d'actine dépendant de la cofiline.

DOCK11 active principalement Cdc42, qui promeut la formation de filopodes et influence la morphologie cellulaire ²¹⁷. Un modèle du rôle de DOCK11, ainsi que d'autres protéines de la famille des DOCK est schématisé à la Figure 34 ²¹⁶.

Les souris *DOCK11*^{-/-} présentent une augmentation du pourcentage de cellules pro-B dans la moelle osseuse mais une diminution du pourcentage de cellules B de la zone marginale et des cellules T CD4⁺ du thymus ²¹⁸.

A ce jour, aucun déficit en DOCK11 n'a été rapporté chez l'Humain.

3.1. Cohorte et symptômes cliniques

Suite à l'analyse des exomes réalisée à l'institut Imagine, nous avons mis en évidence des mutations hémizygotiques de *DOCK11* chez 5 patients, de 4 familles non-apparentées (Figure 35). Les mutations sont détaillées dans le Tableau 10, elles ne sont pas décrites dans la base de données internationales GnomAD.

Les positions des mutations au niveau protéique sont représentées à l'échelle à la Figure 36. La protéine DOCK11 possède deux domaines DHR comme l'ensemble des protéines DOCK. Le domaine DHR-1 peut se lier à PIP3, ce qui peut permettre la localisation du DOCK sur la membrane. Le domaine DHR-2 peut activer des GTPases comme Cdc42. De plus, DOCK11 possède un domaine PH, interagissant principalement avec le phosphoinositide et qui pourrait être lié à la translocation membranaire ²¹⁵.

Les mutations des patients ne sont pas positionnées dans un domaine particulier de la protéine.

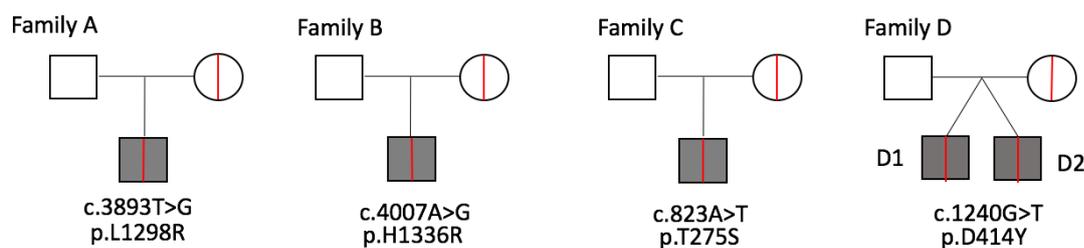


Figure 35: Arbres génétiques des familles *DOCK11*

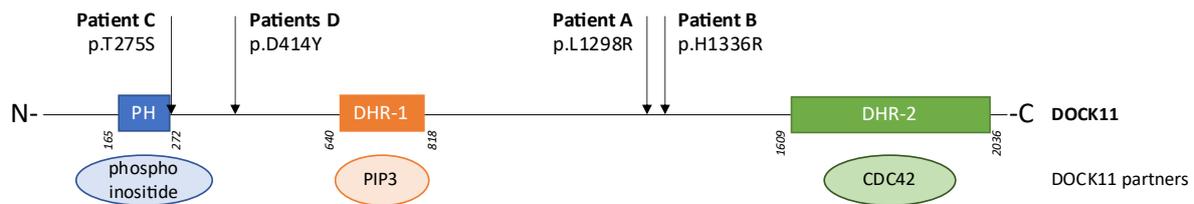


Figure 36: Position des mutations DOCK11 au niveau protéique

Tableau 10: Détails des mutations DOCK11 et des scores de prédiction

Gene	Family	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
DOCK11	Family A	hemizygous	mother	36	p.L1298R	c.3893T>G	Never described	Deleterious (score: 1)	NA	28
DOCK11	Family B	hemizygous	mother	38	p.H1336R	c.4007A>G	Never described	Benign (score: 0.003)	Benign (score: 0.57)	20
DOCK11	Family C	hemizygous	mother	8	p.T275S	c.823A>T	Never described	Benign (score: 0.003)	Benign (score: 0.58)	15
DOCK11	Family D	hemizygous	mother	12	p.D414Y	c.1240G>T	Never described	Probably Damaging (score: 0.998)	Deleterious (score: 0)	30

Tableau 11: Principaux symptômes des patients de la cohorte DOCK11

Patient	Genotype	Age at onset	Autoimmune manifestations	Skin manifestation	Digestive manifestation	Others	Therapy
A	p.L1298R	2 yrs	ITP	Dermatosis	Severe enteropathy	Failure to thrive	Steroids, IVIG, Rituximab, Imurel, everolimus, modigraf, remicade
B	p.H1336R	5 yrs	AIHA	Atopic dermatitis	Enteropathy	Rheumatoid Factor & Polyarticular juvenile idiopathic arthritis	Steroids, methotrexate, adalimumab
C	p.T275S	5 yrs	ITP AIHA	no	no	no	Steroids
D1	p.D414Y	14 yrs	Lupus	Bullous dermatosis	Ileitis	Pulmonary infection Failure to thrive	Steroids, plaquenil, cellcept
D2		9 yrs	MCTD	Bullous dermatosis	No	Failure to thrive	Steroids, plaquenil

Les principaux symptômes cliniques des patients sont rapportés dans le Tableau 11. Tous les patients présentent des manifestations auto-immunes. Quatre patients ont des affections de la peau et trois d'entre eux montrent des manifestations digestives. Trois patients ont un retard de croissance et un des patients a une arthrite juvénile idiopathique polyarticulaire avec des facteurs rhumatoïdes positifs.

3.2. Impact des mutations

Les mutations ont été confirmées par séquençage Sanger. Le niveau d'expression transcriptomique a été évalué par qPCR mais n'a pas montré de différence entre les patients et les contrôles testés. Une analyse de l'expression transcriptomique d'autres partenaires de DOCK11 est prévue.

Un western blot a été réalisé sur les lysats protéiques des cellules T activées des patients et de donneurs sains. Une légère diminution de l'expression protéique peut être notée chez les patients, cependant la protéine DOCK11 est exprimée chez tous les patients. Les impacts structuraux sur la conformation 3D de la protéine sont en cours d'analyse.

Un marquage de DOCK11 en immunofluorescence a été réalisé, cependant l'anticorps testé est non spécifique, car un signal est aussi émis dans une lignée cellulaire n'exprimant pas la protéine DOCK11. Nous cherchons actuellement d'autres alternatives pour réaliser ces images.

3.3. Marqueurs biologiques

Les expressions de plusieurs marqueurs d'activation ont été étudiées sur les cellules T activées des patients. Chez trois patients (A, D1, D2), une expression réduite du MHC de classe II a été trouvée dans les cellules T activées, en comparaison à celles de donneurs sains.

3.4. Analyses fonctionnelles

Des tests fonctionnels ont été réalisés afin de déterminer l'impact des mutations sur certains processus biologiques. Comme DOCK11 semble avoir un rôle dans la formation du cytosquelette des tests de migration et de « spreading » ont été réalisés. Enfin, des tests de prolifération et d'apoptose ont été faits.

3.4.1. Étude du cytosquelette

Les tests de migration spontanée dans des canaux en deux dimensions permettent d'évaluer la vitesse de progression des cellules, la façon dont elles se déplacent dans ces canaux (mouvements unidirectionnels ou changement de sens) ainsi que la localisation de l'actine polymérisée. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Fernando Sepulveda à l'institut Imagine. Enfin, des tests de « spreading » permettant de mesurer la capacité de la cellule à s'étaler sur une surface, ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Claire Hivroz à l'institut Curie.

Migration 2D

Nous avons pu observer que la vitesse de migration des cellules T activées étaient différentes chez 3 patients comparés aux contrôles. Les patients présentent en effet une vitesse de migration réduite ou augmentée. Nous nous attendions initialement à ce que le changement de vitesse soit homogène parmi les patients, cependant il est possible que les mutations aient des impacts

différents selon leur position dans la protéine. De plus, nous avons pu observer que la proportion de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ différait après activation selon les patients. Ces expériences doivent donc être refaites en séparant ces deux sous-population. Il est possible que DOCK11 ait un rôle prépondérant dans l'un des deux sous-types cellulaires.

Polymérisation de l'actine sous contrainte 2D

Afin d'estimer la répartition de l'actine polymérisée au cours de la migration 2D des cellules dans les canaux, des images ont été acquises en microscopie confocale. L'ensemble des patients n'a pas été testé à ce jour, mais les résultats préliminaires sur deux d'entre eux semblent prometteurs (B, C). En effet, on observe que la polymérisation de l'actine est anormale dans les cellules des patients et ne se localise pas à l'arrière de la cellule comme c'est le cas pour les contrôles. Cette répartition anormale de l'actine dans le cytoplasme des cellules pourrait être à l'origine des anomalies de migration observées.

Tests de spreading

La capacité des cellules à s'étaler a été évaluée par microscopie pour les patients A, D2 et B. Cette capacité d'étalement est liée à une re-modélisation de l'actine après stimulation. Nous avons pu observer que les patients présentant des vitesses de migration différentes des contrôles, présentent également des surfaces de d'étalement (spreading) anormales.

De la même manière, le spreading anormal n'est pas homogène parmi les patients. Certaines cellules s'étalent plus et d'autres moins. Ces tests seront à refaire pour confirmer les résultats et notamment explorer plus spécifiquement le spreading des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺.

3.4.2. Tests de prolifération *in vitro*

Un test de prolifération a pu être réalisé sur les cellules T activées des patients A et D2. Le patient D2 ne semble pas présenter de défaut de prolifération *in vitro*. Le patient A présente un défaut de prolifération accentué aux doses fortes d'anti-CD3. Ces résultats doivent être confirmés avec une répétition de l'expérience et l'étude des autres patients.

3.4.3. Tests d'apoptose

Des tests d'apoptose ont été faits sur des cellules T activées par le TCR (Dynabeads CD3/CD28) pour tous les patients. De manière globale, il n'y a pas de défaut flagrant de cette fonction et les cellules des patients ne semblent pas présenter une mort cellulaire plus élevée.

Si les patients sont analysés de façon individuelle, on note un léger défaut d'apoptose par Apo20 et CHX+TRAILkiller pour le patient A. On note également un défaut d'apoptose pour les

patients A, D1 et D2 par réactivation avec la PHA. Il s'agit des patients qui présentent une expression du MHC de classe II diminuée.

Ces résultats doivent être répétés et confirmés. De plus, il serait intéressant de tester l'apoptose sur les cellules B, à la vue de l'importance de la protéine DOCK11 pour cette population dans des modèles murins.

3.5. Perspectives sur DOCK11

Nous souhaitons poursuivre l'exploration de ces variants DOCK11. Nous estimons qu'ils représentent de bons candidats pour expliquer les symptômes des patients. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les familles ne sont ni apparentées ni consanguines, que les mutations ne sont pas décrites dans les bases de données publiques et que nous trouvons des défauts au niveau du cytosquelette lors d'expériences préliminaires.

Nous souhaitons étudier plus en détails le rôle de DOCK11 dans les plaquettes car deux patients présentent des purpuras thrombopéniques immunologiques (PTI). Des résultats préliminaires pour le patient C semble indiquer un défaut d'agrégation liée à l'activation du récepteur PAR1 de la thrombine. L'activation de ce récepteur induit des réarrangements du cytosquelette. Ainsi, un défaut chez les patients pourrait montrer de manière indirecte le rôle de DOCK11 dans la fonction plaquettaire.

Grâce à une collaboration avec les Dr Frédéric Adam et Alexandre Kauskot de l'unité INSERM U1176, Hémostase Inflammation Thrombose, nous allons poursuivre cette exploration et notamment estimer l'agrégation plaquettaire, l'étalement sur fibrinogène par immunofluorescence, l'expression des principaux récepteurs et de la taille des plaquettes par cytométrie, l'activation plaquettaire, l'ultrastructure des plaquettes par microscopie électronique à transmission (MET), l'expression de DOCK11 et de l'activité de CDC42 dans les plaquettes.

La migration 2D ayant donné des résultats encourageants, nous envisageons également d'étudier la migration 3D des cellules dans des gels de collagène (collaboration avec le Dr Pablo Vargas).

Enfin nous souhaiterions étudier la formation des filopodes dans des modèles de cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC) et de cellules B, immortalisées à l'EBV. Cette analyse nous semble pertinente car DOCK11 promeut la formation des filopodes et des dendrites²¹⁷. Nous avons déjà optimisé le protocole pour les cellules B et nous collaborerons avec l'équipe du Dr Mickaël Ménager pour l'étude des dendrites des moDC.

Si ces travaux d'exploration démontrent un rôle de DOCK11 dans les symptômes développés par ces patients, il s'agirait de la première description de mutation hémizygote de *DOCK11* chez l'Humain.

4. CCDC88B

Lors de l'analyse de l'interactome de NBEAL2, un autre partenaire mis en évidence est CCDC88B. L'intensité de cette protéine chez les contrôles et le différentiel d'expression entre donneurs sains et patients GPS la classe parmi les meilleurs partenaires de NBEAL2.

Le laboratoire avait précédemment identifié un patient porteur de mutations hétérozygotes composite de CCDC88B.

4.1. Fonctions biologiques connues de CCDC88B

Dans un modèle murin, *CCDC88B* code pour une protéine importante dans la fonction des lymphocytes T. L'absence d'expression de la protéine CCDC88B entraîne une maturation *in vivo* aberrante, une activation et une division cellulaire réduites, ainsi qu'une production altérée de cytokines (IFN- γ et TNF) en réponse à l'engagement des récepteurs des cellules T, ou à des stimuli non spécifiques *in vitro*, et au cours de l'infection à *P. Berghei in vivo*. CCDC88B est un régulateur important de la fonction des cellules T ²¹⁹.

Chez l'humain, le gène *CCDC88B* est cartographié dans un locus du chromosome 11 (11q13) associé à la susceptibilité à plusieurs affections inflammatoires et auto-immunes, notamment le psoriasis, la cirrhose biliaire primitive, la sclérodermie en plaques et les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) ^{220, 221, 222}.

Le rôle de CCDC88B a été étudié dans des lignées cellulaires humaines, mettant en évidence son implication dans le transport des granules lytiques et la cytotoxicité des cellules. CCDC88B se lie notamment à DOCK8 et à des protéines liées aux microtubules ; participant ainsi à la polarité du centre organisateur des microtubules et à la synapse immunologique ²²³. Enfin le rôle de CCDC88B a été partiellement élucidé dans les cellules dendritiques, montrant une mobilité réduite chez les DC n'exprimant pas la protéine. Ce défaut de mobilité se traduit par un défaut de migration dans les tissus. A noter que l'absence de CCDC88B ne semble pas perturber la capture ou la présentation d'antigènes aux cellules T *in vitro* ²²⁴.

4.2. Symptômes cliniques et phénotypes

Le patient, porteur de mutations hétérozygotes composites de *CCDC88B*, souffre d'une macrothrombopénie et d'hypogammaglobulinémie. La thrombopénie est en rémission complète après une cure d'immunoglobuline en intraveineuse.

Un immunophénotypage a permis la mise en évidence d'une lymphopénie T CD4 discrète et une numération normale des lymphocytes T CD8 avec un excès modéré des lymphocytes T CD8 activés. Les numérations des lymphocytes B et des cellules NK étaient normales. L'expression de la perforine dans les lymphocytes T CD8 et les cellules NK était légèrement diminuée chez le patient (Tableau 12). Ce résultat nécessitera d'être confirmé, mais il est encourageant, vu l'importance de la perforine dans les granules lytiques et le rôle de *CCDC88B* dans leur transport.

Tableau 12: Nombre de cellules T CD8+ et NK exprimant la perforine et moyenne d'intensité de fluorescence de la perforine sur ces populations

Name	Events	% Total	% Parent	% Grandparent	Perforine T FITC-A Mean	Perforine FITC-A Mean
Temoin perforine:Perforine/NK T	8,649	2.92	90.77	15.68	15,035	
Temoin perforine:Perforine/CD8+TCRab+ T	6,255	2.11	41.12	11.34	7,178	
Patient perforine:Perforine/NK+	1,513	0.73	65.19	8.97		11,811
Patient perforine:Perforine/CD8+TCRab	234	0.11	4.57	1.39		5,634

Un phénotypage par CyTOF est en cours d'analyse afin d'avoir plus d'informations sur les différentes sous-populations cellulaires et leurs marqueurs immunologiques. Ce marquage pourra être comparé à ceux obtenus pour NBEAL2.

Enfin, des analyses plaquettaires ont révélé une macrocytose plaquettaire avec des réponses à la thrombine de faible amplitude de l'ensemble des glycoprotéines plaquettaires testées. D'autres tests plaquettaires sont en cours.

4.3. Analyse d'exomes en trio

L'analyse des exomes du patient ainsi que de ses parents a été faite afin de rechercher des variants pathologiques *de novo*, récessifs ou dominants.

Deux mutations hétérozygotes composites délétères de *CCDC88B* ont été trouvées, dont une non décrite dans la base de données GnomAD (Tableau 13).

Tableau 13: Caractéristiques des mutations *CCDC88B*

Gene	Main transcript (selected)	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
CCDC88B	ENST00000356786.10	heterozygous	mother	14	P.R792W	c.2374C>T	rs774090996	Benign (score: 0.005)	Deleterious (score: 0.05)	23
CCDC88B	ENST00000356786.10	heterozygous	father	24	p.G1334E	c.4001G>A	Never described	Probably Damaging (score: 0.999)	Deleterious (score: 0.01)	25

D'autres variants délétères ont également été trouvés : des mutations hétérozygotes composites de *LYST* ainsi qu'une mutation hémizygote de *G6PD*, décrite comme pathogénique dans la littérature (Tableau 14).

Tableau 14: Caractéristiques des mutations de *LYST* et *G6PD* trouvés chez le patient

Gene	Main transcript (selected)	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
LYST	ENST00000389793.7	heterozygous	mother	-4 ex15	Splice?	Splice?	rs201382097	NA	NA	6
LYST	ENST00000389793.7	heterozygous	father	6	p.S1040C	c.3119C>G	rs541176869	Benign (score: 0.394)	Deleterious (score: 0.04)	18
G6PD	ENST00000393562_X	hemizygous	mother	3	p.I48T	c.143T>C	rs76645461	Probably Damaging (score: 0.954)	Benign (score: 1)	22

4.4. Séquençage Sanger et qPCR

Les mutations de *CCDC88B* ont été confirmées par séquençage Sanger. L'impact de ces mutations au niveau transcriptomique a également été caractérisé après une amplification PCR sur l'ADN complémentaire du patient et de ses parents.

Enfin le niveau d'expression transcriptomique a été évalué par RT-qPCR.

4.5. Analyses fonctionnelles

Les formes dérivées de l'oxygène sont produites de façon normale par les granulocytes (96.6% n; N>70%) en réponse à la PMA. Des tests d'apoptose et d'AICD ont été réalisés sur les cellules T activées du patient et n'ont pas révélés d'anomalies.

Un test de dégranulation sur les cellules T activées est en cours.

Analyse de cheveux et dosage de l'enzyme *G6PD*

Mise à part la macro-thrombocytopenie, les symptômes du patient ne sont pas en accord avec des mutations récessives de *LYST* et un syndrome de Chediak-Higashi. Afin de confirmer l'hypothèse que les variants de *LYST* ne sont pas causaux, une analyse des cheveux du patient est en cours.

De plus, en raison du variant hémizygote sur *G6PD*, un dosage enzymatique est en cours afin d'établir l'impact du variant.

4.6. Conclusion et perspectives

D'autres tests sont nécessaires pour établir la causalité de ces mutations chez ce patient. Une analyse du niveau d'expression protéique par Western Blot nous donnera une idée de l'impact des mutations de *CCDC88B*. En outre, une expérience d'immuno-précipitation pourrait être réalisée pour regarder si l'interaction entre *CCDC88B* et *DOCK8* pourrait être altérée par ces mutations.

De plus, une analyse des plaquettes par microscopie électronique permettra d'évaluer leur morphologie et les organelles plaquettaires en détails et de les comparer à des patients atteints du syndrome des plaquettes grises. En effet, comme *CCDC88B* est probablement un partenaire de *NBEAL2*, la thrombopathie observée résulte peut-être d'un déficit granulaire. Nous souhaitons également mesurer l'exposition de la p-sélectine (*CD62P*) à l'état de base et après activation, ainsi que les principales glycoprotéines telles que *GPIIb*, *GPIbalpha*, ce qui nous permettra d'affiner nos conclusions sur l'impact granulaire. De plus, nous souhaitons réaliser un test d'agrégation plaquettaire pour ce déficit, une numération et un frottis sanguin, complété par une recherche des auto-anticorps plaquettaires.

Ce patient possède quelques similitudes les patients atteints du syndrome des plaquettes grises : macro-plaquettes, phénotype activé des cellules T *CD8+* ainsi qu'une discrète lymphopénie *CD4+*.

Si la causalité de ces mutations est confirmée, il s'agirait de la première description de mutations récessives de *CCDC88B* chez l'humain.

5. Autres analyses d'exomes

5.1. Patients LRBA/NBEAL2

Nous avons identifié par analyse d'exome, deux patients porteurs d'une mutation hétérozygote de *NBEAL2* et d'une mutation hétérozygote de *LRBA* (Tableau 15). Ces deux patients ne sont pas apparentés et il n'y a pas de consanguinité familiale. Les autres causes génétiques, classiquement associées à de l'auto-immunité ont été écartées. Les mutations ont été confirmées

par séquençage Sanger et la ségrégation familiale a été réalisée (sauf pour le père du patient 2 dont le prélèvement sanguin vient d'être reçu au laboratoire).

Tableau 15: Mutations hétérozygotes délétères de NBEAL2 et LRBA chez deux patients atteints d'auto-immunité

Gene	Patient	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
LRBA	Patient 1	Heterozygous	mother	2	p. P37S	c.109C>T	rs374519451 (MAF: 0.000031)	Deleterious (score: 0.999)	Deleterious (score: 0)	27
NBEAL2	Patient 1	Heterozygous	father	15	p. R688C ConA domain	c.2062C>T	rs201210287 (MAF: 0.0001112)	Deleterious (score: 0.999)	Deleterious (score: 0)	33
LRBA	Patient 2	Heterozygous	mother	21	p. L843F	c.2527C>T	Never described	Deleterious (score: 0.998)	Deleterious (score: 0)	32
NBEAL2	Patient 2	Heterozygous	father or de novo ?	25	p. R1195Q (described in GPS)	c.3584G>A	rs369806643 (MAF: 0.0000290)	Benign (score: 0.208)	Deleterious (score: 0.07)	19

Nous avons prouvé l'interaction entre NBEAL2 et LRBA grâce à un interactome différentiel entre patients GPS et donneurs sains. Le fait que ces deux patients développent des symptômes auto-immuns, nous invite à suspecter une cause di-génique, en l'absence d'autres gènes candidats. L'expression de CTLA-4 sur les TReg du patient 1 est normale, mais diminuée chez le patient 2. L'expression de CTLA-4 sur les cellules T après activation n'a pas encore été réalisée. L'étude de ces patients pourrait peut-être nous aider à comprendre le rôle exact de l'interaction LRBA/NBEAL2. Nous avons pu réaliser une lignée de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) pour l'un des patients (cf Annexe 14). Ce matériel précieux pourra être utilisé afin d'étudier l'impact de ces mutations dans le développement de la lignée mégacaryocytaire par exemple.

Données cliniques :

Patient 1 : Cet homme de 30 ans présente une pancytopenie auto-immune, un déficit cellulaire et humoral progressif (hypogammaglobulinémie) ainsi qu'une hépatite auto-immune. Il a subi une splénectomie à l'âge de 21 ans. Aucun de ses parents n'est atteint. Les tests d'apoptose se sont révélés normaux.

Patient 2 : Ce garçon de 14 ans est suivi pour une hypogammaglobulinémie familiale (mère aussi atteinte), diagnostiquée à la suite de plusieurs épisodes infectieux ORL. Sa mère est également atteinte d'une thyroïdite et de rhumatisme articulaire aigu. Il y a des antécédents d'auto-immunité dans la famille maternelle (Syndrome de Goujerot, maladie de Wegener et lupus érythémateux aigu disséminé). Le patient ne présente pas d'hépatosplénomégalie, et il a connu des épisodes d'épistaxis. Il supporte bien le traitement par intraveineuse d'immunoglobuline.

5.2. TIGIT

Comme montré en introduction au Tableau 2, chez l'humain, un certain nombre de mutations délétères ont été rapportées dans quelques checkpoints immunitaires. Mais leur nombre reste faible et contraste avec le nombre toujours plus important des checkpoints immunitaires décrits dans la littérature. Les exemples des mutations de PD-1 ³⁶ et de CD28 ³⁷ décrites pour la première fois en 2021 en attestent, et il est tout à fait probable que de nouvelles mutations de checkpoints immunitaires seront trouvées prochainement. C'est pourquoi nous avons ré-analysé les exomes de l'institut Imagine à la recherche de variants pathogéniques pour les gènes codants des checkpoints immunitaires. Nous avons notamment trouvé deux variants prédits délétères dans le gène *TIGIT*.

5.2.1. Fonctions biologiques de TIGIT

TIGIT (T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and itim domains) est un checkpoint immunitaire co-inhibiteur appartenant à la famille PVR. TIGIT est exprimé dans les TReg, les cellules T mémoires et effectrices et les cellules NK. TIGIT possède deux ligands : CD155 (PVR) et CD112 (NECTIN2) ²²⁵. Ces ligands sont également des ligands pour CD226 (DNAM-1) et CD96. TIGIT est en compétition avec CD226 pour la liaison des ligands. TIGIT interagit avec CD226 en *cis* et perturbe l'homodimérisation de CD226. Lorsque TIGIT se lie à son ligand, il déclenche un signal inhibiteur, réprimant l'activation des lymphocytes T. Lorsque TIGIT se lie aux cellules dendritiques tolérogènes induites par CD155, il est capable d'inhiber la prolifération des cellules T ²²⁶.

TIGIT est fortement exprimé par un sous-type de TReg qui possède un phénotype activé et une capacité de suppression supérieure aux TReg TIGIT- ²²⁷. De plus, les TReg TIGIT+ régulent positivement l'expression du récepteur co-inhibiteur TIM-3 dans le tissu tumoral, et TIM-3 et TIGIT sont en synergie pour supprimer les réponses immunitaires anti-tumorales ²²⁸.

TIGIT se compose d'un domaine extracellulaire d'immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire de type I et d'un domaine intracellulaire court avec un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et un motif ITT (immunoglobulin tyrosine tail-like) ²²⁹.

Il n'y a pas de variants génétiques connus de TIGIT associées à une maladie chez l'humain.

Des mutations dans CD226 sont liées au diabète de type 1, à la thyroïdite auto-immune, à la sclérodémie systémique, au lupus et au psoriasis ²³⁰.

5.2.2. Description clinique et génétique des patients

Les mutations trouvées sont détaillées dans le Tableau 16 et leurs positions au niveau protéique sont schématisées en Figure 37. La mutation du patient P1 touche le domaine extracellulaire d'homodimérisation de TIGIT, proche d'une position très conservée, ce qui pourrait en perturber la fonction. Le variant du patient P2 touche la partie cytoplasmique de la protéine. Les arbres génétiques des patients sont décrits dans la Figure 38. L'analyse des exomes a permis également d'identifier d'autres variants potentiellement pathogéniques (Tableau 17).

Tableau 16: Détails des mutations de TIGIT trouvées pour ces patients

Gene	Patient	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
TIGIT	Patient 1	heterozygous	unknown	2	p.G39C	c.115G>T	Never described	Probably Damaging (score: 0.947)	Deleterious (score: 0)	24
TIGIT	Patient 2	heterozygous	unknown	4	p.H223Y	c.667C>T	Never described	Possibly Damaging (score: 0.723)	Deleterious (score: 0.01)	21

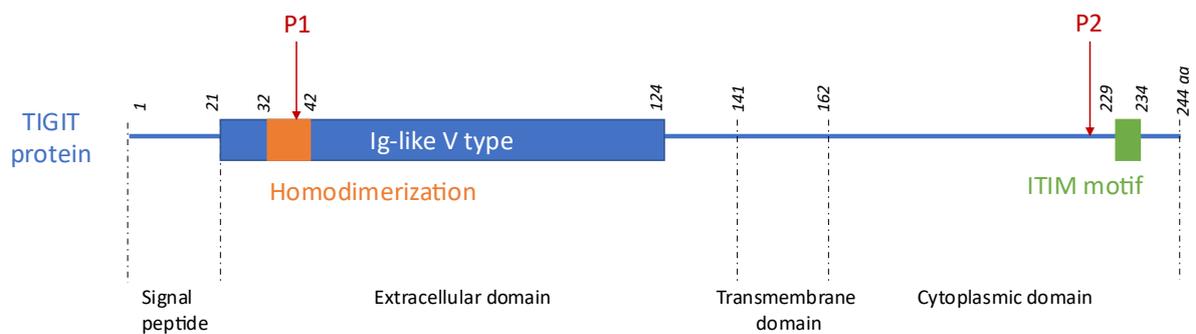


Figure 37: Position des mutations de TIGIT au niveau protéique

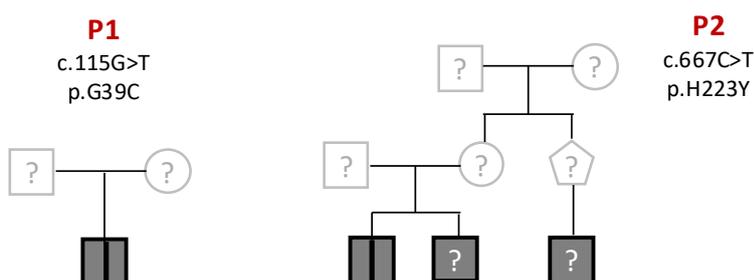


Figure 38: Arbres génétiques des patients présentant un variant pathogénique de TIGIT

Tableau 17: Autres mutations délétères associées à de l'auto-immunité trouvées dans les exomes des patients TIGIT

Gene	Patient	Allele	Inheritance	Exon	Protein	Nomenclature	rs	Polyphen	Sift	CADD
PVR	Patient 1	Heterozygous	unknown	3	p.E226K	c.676G>A	rs139528439 (MAF : 0.002677)	Possibly Damaging (score: 0.842)	Deleterious (score: 0)	24
CARD8	Patient 1	Heterozygous	unknown	9	p.G198S	c.592G>A	rs150036211 (MAF : 0.001786)	Probably Damaging (score: -1)	Benign (score: -1)	14
RNF31 (HOIP)	Patient 1	Heterozygous	unknown	9	p.G540V	c.1619G>T	Not described but seen 6 times in the Institute	Benign (score: 0.102)	Deleterious (score: 0.02)	23
NFAT5	Patient 2	Heterozygous	unknown	4	p.S92T	c.274T>A	Never described	Benign (score: 0.28)	Deleterious (score: 0.05)	25
RNF31 (HOIP)	Patient 2	Heterozygous	unknown	1	p.N60S	c.179A>G	rs746401660 (MAF : 0.0000723)	Possibly Damaging (score: 0.824)	Deleterious (score: 0.04)	27

Données cliniques

Patient 1 : Un homme de 24 ans avec un diabète insulino-dépendant de type I, une pancytopenie auto-immune probable et un syndrome lymphoprolifératif sans atteinte lymphomateuse. Le patient présente également des adénopathies inguinales mais pas d'hépatosplénomégalie. Le diagnostic a d'abord été orienté vers un syndrome ALPS-like, cependant aucune mutation de Fas n'a été trouvée et les taux plasmatiques de FasL et d'IL-10 étaient normaux.

Patient 2 : Le patient caucasien de 39 ans est issu d'une famille non consanguine. Il présente un syndrome d'Evans complet réfractaire (AIHA, ITP, AI neutropénie) à début tardif (33 ans). Après plusieurs tests (immunophénotypage, myélogramme, biopsie ostéomédullaire et anatomopathologie de la rate), il n'y a pas de signe de lymphoprolifération.

Historique : A 25 ans, il développe une uvéite postérieure et une iridocyclite hétérochrome de Fuchs. A 33 ans, la neutropénie auto-immune est détectée et le patient présentait alors une splénomégalie, 6% de lymphocytes T double-négatif et des manifestations auto-immunes (FAN 1/1280, anti-SRP positif, anti PMSC1 légèrement positif). L'hypothèse d'un syndrome ALPS-like est écartée, suite à l'absence de mutation de *FAS* et à des concentrations plasmatiques normales de FasL et d'IL-10. Il est traité par des corticoïdes et ne fait pas de rechute pendant 4 ans. A 37 ans, il rechute avec une thrombopénie, puis une neutropénie et enfin une anémie hémolytique auto-immune (AHAI) sévère. Son syndrome d'Evans est réfractaire aux corticoïdes, aux IgIV, au Rituximab, au G-CSF et aux agonistes des récepteurs TPO. Trois mois plus tard, il sera splénectomisé en urgence ce qui corrigera ses cytopénies. Depuis il est cliniquement stable sous neoral, bactrim, zecitrex, neucasta et nplate.

A noter, son cousin maternel a développé un syndrome de Crohn et son frère est atteint de spondylarthropathie sans comorbidité.

5.2.3. Premier phénotypage et test fonctionnel TReg

TIGIT possède un rôle important dans la biologie des TReg. Ainsi la fonction des TReg pourrait être testée. Un test préliminaire a notamment été réalisé sur les lymphocytes T du Patient 2.

Les lymphocytes T régulateurs, T effecteurs et les cellules dendritiques du patient et d'un donneur sain ont été triés. Dès ce premier tri, le phénotype des TReg du patient différait de celui du contrôle (et des contrôles sains déjà passés dans de précédentes expériences. En effet, le patient avait un pourcentage faible de lymphocytes T (34% des PBMC totaux), de TReg et de cellules dendritiques classiques (Figure 39)

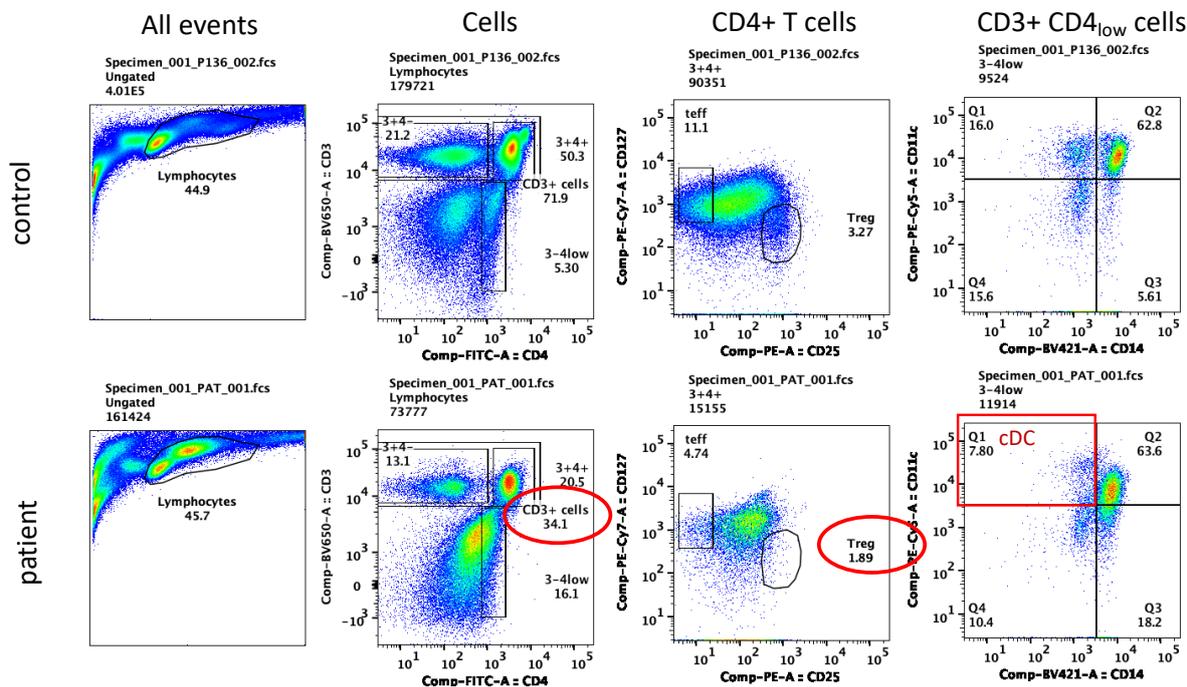


Figure 39: Phénotypage du patient 2 porteur d'une mutation hétérozygote de TIGIT

Le faible nombre de cellules TReg du patient récupéré après ce tri ne nous a pas permis de conclure sur la fonction des TReg chez ce patient.

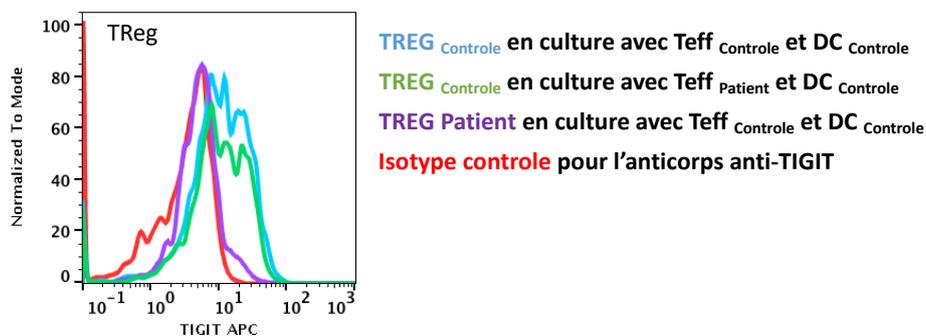


Figure 40: Expression de TIGIT sur les TReg du controle et du patient après culture

Cependant après culture avec les T effecteurs et les cDC du contrôle, le marquage extracellulaire de TIGIT semblait diminué pour les TReg du patient, comparé à l'expression de TIGIT par les TReg du contrôle (Figure 40).

Ce résultat préliminaire montrant une diminution de l'expression de TIGIT sur les TReg du patient sera à confirmer par d'autres immunophénotypages.

5.2.4. Perspective

La poursuite de l'exploration de ces patients par des marquages et des westerns pour mesurer l'expression protéique de TIGIT pourra être faite, en plus d'un immunophénotypage complet par cytométrie de masse. TIGIT possédant un rôle important dans la biologie des TReg, l'étude de la fonction des TReg sera poursuivie chez ses patients. Le fait que le patient 2 possède un pourcentage faible de cellules T régulatrices pourrait être un obstacle technique pour ce test fonctionnel.

Enfin, tous les patients TIGIT possèdent d'autres variants pathologiques (Tableau 17), qui sont de moins bons candidats mais qui représentent tout de même des pistes. Pour le patient 1, le variant délétère (mais fréquent) dans le gène *PVR* a été retenu car il s'agit d'un ligand de TIGIT. Des variants hétérozygotes de *CARD8* ont été décrits comme augmentant le risque de susceptibilité à la maladie de Crohn. Cependant, ce variant est décrit bénin dans Clinvar. Les variants de *RNF31*(HOIP) ont été mentionnés, même si seules des transmissions récessives ont été décrites dans la littérature. Enfin le variant *NFAT5*, jamais décrit et prédit délétère pourrait être responsable de l'auto-immunité chez le patient 2. *NFAT5* semble associé à des pathologies inflammatoires et auto-immunes, notamment via sa fonction dans les macrophages^{231, 232}.

Il faudra donc étudier ces autres variants, pour vérifier qu'ils ne sont pas causaux.

Idéalement, il serait très informatif d'obtenir des échantillons ADN des proches et des parents de ces patients afin de réaliser une ségrégation complète, voire des exomes complémentaires pour le frère et le cousin du patient 2 qui présentent également des symptômes auto-immuns. Un arbre génétique plus approfondi devra être réalisé pour le patient 2 et les variants délétères portés par le chromosome X devront être évalués avec une attention particulière pour éliminer une possible transmission liée à l'X dans cette famille.

6. Les thrombopénies mixtes existent-elles ?

La description tardive des manifestations auto-immunes chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises, nous a incité à repenser notre façon d'analyser les exomes des patients au laboratoire.

En effet, combien de gènes initialement décrits comme responsables de thrombopénies constitutionnelles, ont en réalité un rôle plus large ? Des gènes codant des protéines, classiquement décrites comme plaquettaires, auraient-ils un rôle dans le système immunitaire ?

Ainsi, une liste de 356 gènes associés aux plaquettes ou à des maladies plaquettaires a été établie [165, 166, 208, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240]. Pour faciliter l'analyse, cette liste a ensuite été réduite à 122 gènes connus pour être impliqués dans des pathologies plaquettaires ou pour avoir un rôle fonctionnel dans les plaquettes (avec au moins une preuve expérimentale au niveau murin). Cette liste de gènes est donnée en Annexe 13, Tableau 31.

Les exomes ont ensuite été ré-analysés avec cette nouvelle liste. Une deuxième série d'analyses a permis d'éliminer les patients pour lesquels des variants pathogéniques et classiquement associés à leurs symptômes avaient déjà été trouvés. Un intérêt particulier a été apporté aux patients présentant un PTI sans cause génétique identifiée.

Au total, 463 exomes ont ainsi été ré-analysés et 21 variants ont été retenus (Tableau 18).

L'ensemble de ces variants nécessitera une étude plus approfondie pour valider leur causalité, et une ségrégation familiale sera nécessaire pour conclure sur la pénétrance des variants. De plus, les informations cliniques, et notamment les critères permettant de conclure au PTI, devront être vérifiées extensivement afin d'éviter toutes fausses pistes.

A noter qu'un grand nombre de gènes impliqués dans le cytosquelette sont ressortis de cette étude. Il faudra surement distinguer les gènes ayant un rôle restreint aux plaquettes, des gènes ayant des fonctions plus ubiquitaires.

Tableau 18: Variants et principales caractéristiques cliniques des patients retenus après analyse des exomes en utilisant la liste de gènes associées aux plaquettes

Function	Gene	Patient	Allele	Inheritance	Protein	rs	MAF	CADD	Main symptoms
Cytoskeleton	TUBB1	Patient 1	Heterozygous	Mother	p.R297H	Never described	-	28	thrombopenia, Neutropenia, Splenomegaly, Adenopathies axillaires, Hypergammaglobulinemia, ALPS suspicion, DN T cells slight increase, FasL 0,4, IL10 normal
Cytoskeleton	TUBB1	Patient 2	Heterozygous	Mother	p.E45X	Never described	-	NA	Recurrent left cervical lymphadenopathy, hypergamma, necrotizing granulomatosis
Cytoskeleton	ACTN1	Patient 3	Heterozygous	unknown	p.N426H	Never described	-	28	Chronic ITP
Cytoskeleton	TPM4	Patient 4	Heterozygous	unknown	p.E75Q	Never described	-	24	Evans syndrome with thrombopenia and auto-immune neutropenia. FasL and IL-10 increased in plasma
Cytoskeleton	TPM4	Patient 16	Heterozygous	Mother	p.R146L	rs538902086	3,2 10 ⁻⁵	33	Chronic ITP
Cytoskeleton	TRPM7		Heterozygous	Father	p.R819W	rs200662631	1,6 10 ⁻⁴	24	
Cytoskeleton	TRPM7	Patient 5	Heterozygous	unknown	p.A1254V	rs56288221	5,0 10 ⁻⁴	23	ITP, lymphoproliferatio, increased DN T cells, ALPS suspicion
Cytoskeleton	MYH9	Patient 6	Heterozygous	unknown	p.D1424N	Never described	-	28	Chronic auto-immune cytopenia
Cytoskeleton	MYH9	Patient 7	Heterozygous	Mother	p.S1294N	Never described	-	23	Severe autoimmune hemolytic anemia at 6 months of age, positive Coombs, B lymphopenia
Cytoskeleton	MYH9	Patient 8	Heterozygous	Mother	p.D1627N	rs756236810	6,6 10 ⁻⁶	24	Alps-like suspicion, Splenomegaly
Cytoskeleton	MYH9	Patient 9	Heterozygous	Mother	p.D1119V	Never described	-	27	Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity, DN T cells increased, FasL concentration within normal range
Transcription factor	ANKRD26	Patient 10	Heterozygous	unknown	p.R858X	Never described	-	38	Evans syndrome (including AHAI), increased DN T cells
Transcription factor	ETV6	Patient 11	Heterozygous	unknown	p.R369W	Never described	-	34	ITP with early onset, Crohn at 18 years old, lymphopenia
Transcription factor	RUNX1	Patient 12	Heterozygous	unknown	p.M267I	rs757570529	3,9 10 ⁻⁵	16	Isolated ITP
Transcription factor	JAK2	Patient 13	Heterozygous	Father	p.F240V	Never described	-	23	AHAI, ITP, autoimmune neutropenia, brain hematoma
Enzymatic activity	PLCG2	Patient 14	Heterozygous	unknown	p.V43I	rs370352962	2,6 10 ⁻⁵	22	Refractory ITP
Enzymatic activity	PLCG2	Patient 15	Heterozygous	unknown	p.D520G	rs201391996	3,2 10 ⁻⁵	21	Refractory ITP associated with aregenerative anemia, Evans syndrome, Coombs +, no ALPS, father epistaxis in childhood, mother psoriasis

Discussion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle de NBEAL2 dans les lymphocytes T activés. De nouveaux partenaires protéiques de cette protéine d'échafaudage ont été mis en évidence, précisant son rôle dans le trafic vésiculaire. Les résultats trouvés autour de NBEAL2 ont été discutés dans l'article de la section 1 des résultats. Dans ce chapitre, les résultats de ma thèse seront mis en perspective et discutés selon des angles plus généraux sur les thrombopénies et le rôle des protéines BEACH.

1. NBEAL2

1.1. NBEAL2 et granules

D'après les modèles murins et les résultats chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises, le rôle de NBEAL2 dans le système immunitaire est large. Les neutrophiles, les mastocytes, les lymphocytes T cytotoxiques ou encore les cellules NK semblent impactés par l'absence de cette protéine. Toutes ces cellules possèdent des granules et leur fonction biologique en dépend largement. Comme NBEAL2 est également exprimé dans la peau, nous pouvons nous demander si le cas de vitiligo décrit par Sims et al ¹⁴⁴, pourrait être en partie dû à un rôle de NBEAL2 dans les mélanocytes et le trafic des mélanosomes, de manière semblable à *LYST*, une autre protéine BEACH. Le problème pourrait également venir des cellules de Langerhans, cellules sentinelles immunocompétentes présentes dans la peau et qui contiennent de nombreux granules de Birbeck.

Nous pourrions extrapoler ces hypothèses à d'autres types de cellules exprimant NBEAL2. Nous savons notamment que cette protéine a une expression dans des tissus ayant une fonction endocrine comme le pancréas, la thyroïde ou les glandes surrénales (source : *The Human Protein Atlas*, disponible sur <https://www.proteinatlas.org/> ²⁴¹). Ainsi, les thyroïdites auto-immunes, développées par les patients GPS, pourraient-elles être amplifiées par le rôle de NBEAL2 dans cette glande ?

De façon plus générale, nous pouvons poser l'hypothèse que les tissus cibles de l'auto-immunité pourraient initier et/ou diriger la réaction auto-immune vers ces tissus qui seraient à la fois « coupables et victimes » de l'auto-immunité. Nous verrons que cette hypothèse pourrait s'appliquer à de nombreuses manifestations auto-immunes.

1.2. NBEAL2 : système immunitaire et plaquettes, un vase communicant ?

Nos résultats d'immunophénotypage suggèrent une dérégulation des neutrophiles et des éosinophiles chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises. Une dérégulation des neutrophiles chez les patients GPS a récemment été mise en évidence ¹⁴⁵. Les auteurs montrent notamment que NBEAL2 a un rôle important dans la rétention des granules spécifiques des neutrophiles. A notre connaissance, une activation des éosinophiles n'a pas été décrite pour ces patients.

Cette dérégulation des granulocytes est possiblement liée au rôle intrinsèque de NBEAL2 dans ces sous-types cellulaires. Cependant, on peut également se demander si les plaquettes peuvent amplifier cette hyper-activation et cette dégranulation précoce. En effet, dans plusieurs phénomènes, et notamment l'allergie, il existe un lien entre l'activation des neutrophiles et les plaquettes. Les granules- α y jouent d'ailleurs un rôle clé car neutrophiles et plaquettes interagissent via la P-sélectine (contenue dans les granules- α) et ses récepteurs à la membrane des polynucléaires.

NBEAL2 et la P-sélectine interagissent physiquement dans les plaquettes ¹³⁶.

Dans le syndrome des plaquettes grises, l'absence de NBEAL2 empêche la rétention des granules- α à l'intérieur des plaquettes, et leur contenu est ainsi libéré, notamment dans le plasma ¹⁴⁴. Nous faisons l'hypothèse que les granulocytes sont activés par cette dégranulation précoce et dégranulent à leur tour, sur-exprimant ainsi CD66b (marqueur de la dégranulation). Une façon de tester cette hypothèse pourrait être de générer un modèle animal dans lequel le gène *NBEAL2* serait invalidé uniquement dans les plaquettes ou dans la lignée myéloïde.

1.3. NBEAL2 et cancer

D'après Guerrero et al, les souris *NBEAL2*^{-/-} développent 80% moins de métastases que les souris sauvages dans un modèle de métastases pulmonaires de mélanome ¹⁶². Les auteurs étayaient uniquement le rôle des plaquettes dans ce phénomène qui empêcherait la formation de métastases : les plaquettes anormales des souris KO NBEAL2 empêcheraient la tumeur de métastaser. Si le rôle anti-tumoral des plaquettes était le seul en jeu dans cette protection métastatique, nous pourrions imaginer observer un phénomène anti-métastatique pour d'autres thrombopénies constitutionnelles.

Bien que le rôle direct des plaquettes dans l'évasion tumorale soit bien étayé dans la littérature ²⁴², nous nous proposons de nuancer ce propos avec un modèle intermédiaire où l'immunité anti-tumorale des souris *NBEAL2* ^{-/-} joueraient un rôle.

En effet, les plaquettes peuvent stocker une quantité importante de TGF- β dans leurs granules- α (50 à 100 fois plus que les autres cellules sanguines) et le libérer dans le système circulatoire et le microenvironnement tumoral. Il a été démontré que le TGF- β dérivé des plaquettes provoque la régulation négative de NKG2D sur les cellules NK lors de l'interaction avec les cellules cancéreuses, inhibant l'immunité anti-tumorale. Conformément à cela, la régulation négative de NKG2D a été associée à des niveaux élevés de TGF- β chez les patients atteints de cancers colorectaux et pulmonaires ²⁴².

Dans le cas du syndrome des plaquettes grises, le nombre de plaquettes est diminué et les granules- α sont absents. Les plaquettes, moins nombreuses, peuvent donc difficilement former des hétéroagrégats avec les cellules tumorales circulantes ¹⁶¹. De plus les granules- α n'étant pas présents, la sécrétion du TGF- β n'a probablement pas lieu, ce qui peut préserver l'immunité anti-tumorale des cellules NK. De plus, nous avons mis en évidence que les cellules immunitaires des patients GPS étaient globalement plus activées ce qui peut laisser présager une immunité anti-tumorale accrue ou pour le moins conservée.

1.4. NBEAL2 et la régulation du transcriptome

D'après les premières analyses des expériences de séquençage en cellules uniques, un déficit en *NBEAL2* semble entraîner une dérégulation transcriptomique. L'origine de cette dérégulation pourrait être uniquement liée à l'absence de la protéine *NBEAL2* au sein de la cellule, entraînant une dérégulation globale par des mécanismes indirects. Cependant, nous pouvons nous demander si *NBEAL2* n'a pas un rôle plus direct dans la dérégulation transcriptomique, suite notamment aux travaux réalisés sur des modèles murins.

En effet, dans les mastocytes des souris KO *NBEAL2*, il a été montré que *NBEAL2* régulait l'activation de la voie de signalisation Shp1-STAT5 et la composition du signalosome c-Kit/STAT. De plus, *NBEAL2* semble restreindre l'expression des facteurs de transcription IRF8, GATA2 et MITF ainsi que de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, qui sont essentiels à la différenciation, à la prolifération et à la production de cytokines des mastocytes ¹³⁴. Chez l'humain, une susceptibilité à l'allergie n'a pas été décrite chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises.

Si NBEAL2 restreint réellement l'expression de certains facteurs de transcription, il pourrait avoir un rôle au-delà du trafic vésiculaire et son absence pourrait avoir des répercussions sur le transcriptome par ce biais.

Wijngaerts et al ²⁴³ ont montré le rôle du facteur de transcription *GATA1* dans l'expression de NBEAL2 chez deux patients porteurs de mutations hémizygotiques de *GATA1*. En effet, les plaquettes de ces deux patients, ainsi que celles de souris déficientes en *GATA1*, expriment faiblement la protéine NBEAL2. Par conséquent, les plaquettes des patients sont plus larges et possèdent moins de granules- α . Les auteurs ont mis en évidence un site de liaison GATA dans une région régulatrice à 31 kb en amont de NBEAL2, qui agit comme un puissant amplificateur de l'expression de NBEAL2. De plus, les auteurs ont confirmé que *GATA1* et *GATA2* pouvaient se lier à ce locus. De tels sites de liaison GATA peuvent être occupés par *GATA1* ou *GATA2*. *GATA2* est essentiel au maintien des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices, tandis que *GATA1* entraîne la mégacaryopoïèse. *GATA1* réprime la transcription de *GATA2*, et favorise le détachement de *GATA2* de la chromatine (médié par *GATA1* par compétition), ce processus est appelé « GATA-switch » ²⁴⁴.

Comme NBEAL2 semble restreindre l'expression de *GATA2* dans les mastocytes, on peut supposer l'existence éventuelle d'une boucle de rétrocontrôle. Si tel était le cas, NBEAL2 aurait bien une influence sur le transcriptome cellulaire, par exemple par séquestration de facteurs de transcription dans certaines vésicules.

1.5. NBEAL2 et le trafic de CTLA-4 : vers de nouvelles voies thérapeutiques

Nous avons mis en évidence que NBEAL2 régule le trafic de CTLA-4 dans les lymphocytes T activées, mais ne semble pas être indispensable pour l'expression de CTLA-4 par les TReg. De plus, chez des donneurs sains, nous avons noté que l'expression protéique de LRBA diminue légèrement après l'activation des lymphocytes T *in vitro*, alors que l'expression de NBEAL2 augmente. NBEAL2 prendrait-il le relais de LRBA dans les cellules T activées ? Ou viendrait-il amplifier l'expression de CTLA-4 en favorisant le recyclage médié par LRBA ? Afin de répondre à ces hypothèses, nous souhaitons étudier, grâce au système CRISPR-Cas9, des cellules T primaires doubles-KO pour les gènes *LRBA* et *NBEAL2* dans des cellules T primaires. En les comparant avec des cellules simples KO, nous espérons voir une différence dans l'expression de CTLA-4, la cinétique d'apparition de CTLA-4 ou dans la prolifération

cellulaire. Enfin, l'étude des deux patients porteurs de mutations hétérozygotes de *NBEAL2* et *LRBA* pourrait apporter des réponses supplémentaires à ces questions.

Les patients GPS présentent un défaut d'expression de CTLA-4 sur leurs lymphocytes T activées. Cette observation pourrait être un rationnel moléculaire pour traiter les patients GPS développant de l'auto-immunité par CTLA4-Ig (abatacept). L'abatacept est en effet une protéine fusion entre une immunoglobuline humaine et le domaine extracellulaire de CTLA-4. Elle permet donc de mimer l'action de CTLA-4, s'avère souvent très efficace, et la plupart du temps bien toléré, dans le traitement des symptômes auto-immuns causés par des déficits en CTLA-4 ^{75, 245, 246, 247, 248, 249}.

De plus, l'abatacept est également approuvé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, pathologie dans laquelle il est également bien toléré ²⁵⁰. Cette apparente bonne tolérance est à mettre en contraste avec la légère augmentation du risque de cancer associée à son utilisation et qui nécessite une étude plus approfondie ²⁵⁰. Comme les patients atteints du syndrome des plaquettes grises peuvent développer des myélofibroses ²⁵¹, et que la cause de ce symptôme n'est pas totalement élucidée ¹⁶², il faudra porter une attention particulière à son éventuel développement sous abatacept.

Il est remarquable de noter que, chez les patients GPS, l'expression de CTLA-4 sur les TReg est comparable à celle de donneurs sains. De plus, le développement de symptômes auto-immuns chez les patients GPS est moins fréquent que chez des patients souffrant d'autres déficiences génétiques en CTLA-4 (défauts génétiques en *LRBA*, *CTLA-4*, *DEF6*). Le rôle et l'impact de *NBEAL2* dans le trafic de CTLA-4 semble restreint aux cellules T activées. Cette observation pourrait avoir une application pour le traitement de certains cancers.

En effet, les cellules cancéreuses peuvent sur-exprimer des checkpoints immunitaires inhibiteurs, ce qui leur permet de ne pas stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale : c'est un des mécanismes d'évasion immunitaire.

Le traitement des cancers par inhibiteurs de checkpoints sous la forme d'anticorps monoclonaux anti-CTLA4 ou anti-PD1 a complètement modifié le paradigme du traitement des cancers depuis leur mise sur le marché en 2011, et 2014 dans le mélanome métastatique. En ciblant les checkpoints inhibiteurs à la surface des lymphocytes T, ces traitements permettent de restaurer

l'immunité anti-tumorale dont le rôle essentiel dans le pronostic des cancers n'est plus à démontrer²⁵².

Les effets indésirables de ces thérapies sont les effets indésirables auto-immuns. En effet, ces checkpoints inhibiteurs sont essentiels au maintien de la tolérance périphérique et le blocage de leur signalisation entraîne régulièrement une auto-immunité (appelée irAEs, pour « immune-related adverse events »)²⁵³.

On peut alors supposer qu'une thérapie ciblant NBEAL2 permettrait de perturber le trafic de CTLA-4 dans les lymphocytes T effecteurs activés, facilitant leur réponse anti-tumorale, sans pour autant provoquer des effets indésirables auto-immuns car les TReg seraient moins impactés que lors d'un traitement ciblant directement CTLA-4. Il reste à montrer dans un modèle animal pré-clinique que la réponse anti-tumorale est efficace si la fonction régulatrice des TReg est préservée.

De manière plus générale, cibler le trafic intracellulaire des checkpoints immunitaires pourrait être une voie thérapeutique intéressante, permettant une régulation plus subtile des effets indésirables auto-immuns. Ainsi, des études précliniques s'intéressent aux différentes étapes du trafic et du recyclage des checkpoints immunitaires avec des résultats prometteurs. En exploitant les capacités de dégradation du lysosome, du protéasome et des autophagosomes, différentes molécules et peptides ont fortement induit la dégradation des checkpoints immunitaires et amélioré l'immunité anti-tumorale. Les expériences *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'efficacité thérapeutique de ces molécules. Ainsi, la dégradation ciblée par des voies liées au réticulum endo-lysosomal, autophagique, protéasomal ou endoplasmique peut fournir des stratégies prometteuses pour relever les défis de l'immunothérapie anticancéreuse²⁵⁴. Cependant, la tolérance *in vivo* de ce genre de thérapies reste encore à valider.

Pour conclure, une étude a tout récemment mis en évidence le rôle de TRAPPC4, un facteur d'attache vésiculaire canonique, dans le recyclage de PD-L1. TRAPPC4 interagit avec PD-L1 dans le recyclage des endosomes, agissant comme un échafaudage entre PD-L1 et RAB11, et favorisant le recyclage médié par RAB11 de PD-L1, permettant sa ré-expression à la surface des cellules tumorales. L'épuisement de TRAPPC4 conduit à une réduction significative de l'expression de PD-L1 *in vivo* et *in vitro*. Cette réduction de PD-L1 facilite la cytotoxicité médiée par les cellules T. La surexpression de TRAPPC4 sensibilise les cellules tumorales à la thérapie de point de contrôle dans les modèles de tumeurs murines, suggérant TRAPPC4 comme cible thérapeutique pour renforcer l'immunité anti-tumorale²⁵⁵.

Cette similitude entre les fonctions de LRBA et TRAPPC4 dans le trafic de CTLA-4 ou PD-L1, suggère que d'autres protéines d'échafaudage pourraient jouer des rôles similaires dans le trafic d'autres checkpoints immunitaires.

Enfin, NBEAL2, comme DEF6 ou LRBA, participe au trafic de CTLA-4, et son absence entraîne une diminution de l'expression de ce checkpoint. Nous pouvons donc nous demander : combien de partenaires ayant un rôle dans le trafic de CTLA-4 reste-t-il encore à découvrir ; et si tous ces partenaires sont responsables d'une perturbation de l'expression du checkpoint sur les cellules T.

2. Les partenaires protéiques de NBEAL2

Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence 76 nouveaux partenaires protéiques de NBEAL2 dans les lymphocytes T activés. A notre connaissance, il s'agit du premier interactome de NBEAL2 réalisé dans des cellules T activées humaines et dans un système où l'expression de la protéine est endogène.

2.1. Perspectives générales

Nous n'avons pas identifié CTLA-4 dans la liste des partenaires de NBEAL2. Cependant, nous soupçonnons que cette protéine soit difficilement détectable en spectrométrie de masse, car nous ne la trouvons pas non plus dans les protéomes totaux de cellules T activées issus de donneurs sains. Pour s'assurer de la présence de CTLA-4 dans ces interactomes, il faudrait réaliser une analyse ciblée en spectrométrie de masse. Cette analyse consisterait à co-injecter un peptide isotopiquement alourdi de CTLA-4 de quantité connue, ce qui permettrait d'augmenter grandement la sensibilité de l'analyse et sûrement la détection de CTLA-4.

Parmi les autres partenaires, on retrouve également d'autres protéines associées à des vésicules, au transport vésiculaire (moteurs kinésines, myosines) ou au cytosquelette.

Le fait que NBEAL2 semble interagir avec CCDC88B et DOCK8 suggère un rôle dans le transport des granules lytiques. Parmi les autres partenaires de NBEAL2 nous avons également trouvé une autre protéine de la famille DOCK : DOCK11.

Sur 76 protéines identifiées comme ayant une très forte probabilité d'interagir avec NBEAL2 dans les lymphocytes T activés, nous trouvons que le tiers d'entre elles sont impliquées dans le système immunitaire. Si le rôle de NBEAL2 dans le trafic de CTLA-4 pourrait à lui seul expliquer le développement de manifestations auto-immunes chez les patients atteints du syndrome des plaquettes grises, nous pouvons nous demander si ces autres partenaires possèdent également une part de responsabilité dans ces symptômes.

Nous pouvons également nous demander si, comme pour *DOCK11* ou *CCDC88B*, des mutations dans les gènes de ces partenaires de NBEAL2 pourraient être retrouvées chez des patients présentant des anomalies immunologiques ou plaquettaires. Il sera donc intéressant de ré-analyser nos exomes avec cette liste de 76 gènes.

2.2. Comparaison aux autres partenaires décrits de NBEAL2

Dans la littérature, des protéines interagissant directement avec NBEAL2 ont été mises en évidence. Ainsi dans des modèles de cellules HEK transfectées, Mayer et al ont montré l'interaction entre NBEAL2 et VAC14, SEC16A et DOCK7 ²⁵⁶.

Une liste de partenaires potentiels est également donnée par Mayer et al, mais la spécificité de ces interactions potentielles n'a pas été démontrée. De plus, ce modèle n'est pas biologiquement le plus intéressant car il ne s'agit pas d'un système endogène.

Nous avons pu comparer l'ensemble des protéines obtenues dans notre interactome dans des cellules T primaires après activation du TCR, aux protéines listées par Mayer et al (Annexe 15, Tableau 32). Sur les 134 protéines de leur article, nous retrouvons 80 protéines, indiquées en bleu dans le tableau (soit presque 60%). Nous retrouvons notamment VAC14 et SEC16A, mais nous ne détectons pas DOCK7. Nous avons ensuite classé ces 80 protéines en fonction des ratios intensité moyenne des contrôles / patient que nous avons enregistré. Nos données permettent alors de stratifier les données de Mayer et al. Nous pouvons prédire que VAC14 et SEC16A, dont les interactions avec NBEAL2 ont été confirmées, étaient de meilleurs candidats (ratio non calculable car l'expression de ces protéines n'est pas détectée dans l'interactome du patient GPS) que les protéines HSPA1B, TUBB, TUBB4B et UBC (dont le ratio est inférieur à 2).

Enfin nous ne détectons pas DOCK7 dans nos interactomes, cependant nous détectons DOCK11 et DOCK8 dont l'expression transcriptomique est très faible (pour DOCK11) voire inexistante (pour DOCK8) dans les cellules HEK 293. Il faut également noter que l'expression

transcriptomique de DOCK7 est inférieure aux expressions de DOCK8 et DOCK11 dans les lymphocytes T (*source*: The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>)

2.3. La famille des protéines DOCK

Les interactions entre NBEAL2 et différents membres de la famille des DOCK protéines semblent importante. Ainsi les plaquettes des patients atteints de GPS ont une expression drastiquement réduite de DOCK7 ²⁵⁶. De plus, DOCK8 et DOCK11 ressortent comme des partenaires de NBEAL2 de nos interactomes sur lymphocytes T activés.

La famille DOCK (Dedicator of cytokinesis) est constituée de 11 membres. Grâce à l’outil DICE (<https://tools.dice-database.org/celltypescore/>) les nombres de transcrits par million pour chaque sous-type cellulaire des PBMC sont présentés à la Figure 41.

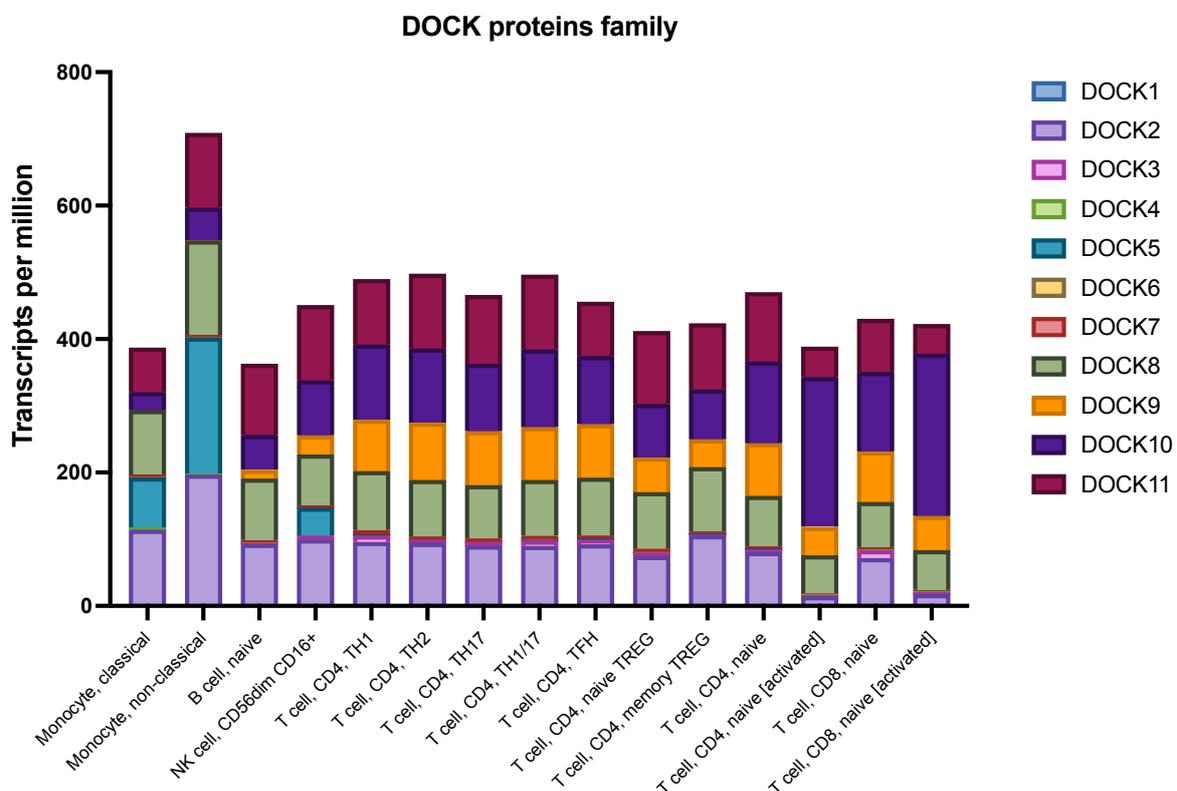


Figure 41: Transcripts par million dans les sous types cellulaires de PBMC, des différents gènes codant les protéines de la famille DOCK

La famille DOCK se divise en quatre sous-groupes sur la base de leur structure et de leur substrat. DOCK1, DOCK2 et DOCK5 appartiennent au sous-groupe DOCK-A. Le sous-groupe DOCK-B contient DOCK3 et DOCK4. Le sous-groupe DOCK-C comprend DOCK6, DOCK7

et DOCK8, et les protéines DOCK9, DOCK10 et DOCK11 appartiennent au sous-groupe DOCK-D ²¹⁵.

On note notamment dans la Figure 41 que DOCK2 et DOCK8, ainsi que l'ensemble des protéines du sous-groupe DOCK-D représentent les transcripts les plus abondants dans les cellules immunitaires. A noter que l'expression transcriptomique de DOCK5 semble spécifique des monocytes et des cellules NK. Il faut également remarquer que nous n'avons pas de données sur les granulocytes avec ce graphique.

Chez l'humain, des mutations récessives de *DOCK2* ²⁵⁷ et *DOCK8* ²⁵⁸ entraînent des déficits immunitaires. Alors que pour les trois autres déficits décrits dans des protéines de la famille DOCK, une anomalie majeure du système immunitaire ne semble pas le principal symptôme. En effet, des mutations récessives de *DOCK3* causent une déficience intellectuelle avec une hypotonie importante et une ataxie de la marche, probablement due en partie à un développement axonal anormal ^{259, 260, 261}. Les patients porteurs de mutations récessives de *DOCK7* présentent des traits dysmorphiques, une épilepsie réfractaire précoce, une déficience intellectuelle et une cécité corticale ²⁶². Quant aux mutations récessives de *DOCK6* elles sont responsables du syndrome d'Adams-Oliver (AOS), défini par l'association d'une aplasie cutanée congénitale et d'anomalies terminales des membres transversaux ^{263, 264}.

Pour les autres membres de la famille DOCK, aucune déficience chez l'humain n'a été décrite à ce jour. La prépondérance des transcripts du sous-groupe DOCK-D dans les cellules immunitaires nous laisse envisager l'hypothèse que des mutations de ces gènes entraîneraient des anomalies du système immunitaire, à l'instar de *DOCK2* et *DOCK8*.

Le fait que NBEAL2 semble interagir avec DOCK8 et DOCK11 dans les lymphocytes T activés, pose la question des autres interactions possible entre les membres de la famille des BEACH protéines et ceux de la famille des DOCK.

Se pourrait-il que ces deux familles fonctionnent de concert suivant le type cellulaire ? Par exemple *WDFY3* ou *WDR81*, dont les mutations causent des troubles neurologiques, sont-ils les partenaires de *DOCK3* et *DOCK7* ?

2.4. Modèle/mécanismes régulés par les BEACH protéines

Parmi les partenaires de NBEAL2, on retrouve notamment LRBA, qui joue un rôle très important dans le trafic vésiculaire de CTLA-4. Cette interaction confirme en partie le modèle

spéculatif décrit par Cullinane et al ⁷⁶, dans lequel deux protéines BEACH peuvent interagir. D'autres expériences seraient nécessaires pour vérifier que cette interaction entre les protéines BEACH se fait via leurs domaines WD40 répétés. Ce résultat nous invite également à repenser le rôle des protéines BEACH et les interactions au sein de cette famille, ou avec d'autres protéines ayant des domaines WD40 répétés.

Si NBEAL2 et LRBA interagissent ensemble dans les cellules T, Cullinane et al prédisaient quant à eux l'interaction *in silico* de WDFY3 avec LYST, NBEAL1, NBEAL2, LRBA et WDFY4 ⁷⁶. Existe-t-il plusieurs combinaisons de BEACH protéines possible ?

Ces combinaisons varient-elles suivant le type cellulaire ou la fonction nécessaire à accomplir ? Par exemple, *WDFY3* possède un rôle dans l'autophagie sélective. Son association avec d'autres protéines BEACH pourrait permettre de sélectionner les cargos vésiculaires endommagés ⁷⁶.

Le domaine BEACH est très conservé au cours de l'évolution et la famille des protéines contenant des domaines BEACH est présente chez tous les eucaryotes ²⁶⁵. Par analogie à d'autres modèles (drosophile, zebrafish, souris, arabidopsis...), il existe un rôle clair de cette famille de protéine dans le trafic vésiculaire.

Nous pouvons nous demander s'il y a eu une spécialisation des BEACH protéines suivant le type cellulaire. Et nous devons considérer les redondances éventuelles en fonction du type cellulaire.

3. Rôle des plaquettes dans l'auto-immunité

Les plaquettes ont un rôle d'immuno-modulation important ¹⁵⁷, . Le contenu de leurs granules ainsi que leur activation peuvent influencer la réponse immunitaire.

Nous pouvons là encore faire l'hypothèse que les plaquettes sont « victimes et coupables » de l'auto-immunité. En effet, des plaquettes de morphologies anormales pourraient être à l'origine de la génération d'auto-anticorps dirigés contre les plaquettes. On peut supposer que les « néo-antigènes » présents à la surface des plaquettes, pourraient contourner le système de tolérance plus facilement que des plaquettes physiologiquement normales.

Cette hypothèse s'appuie sur l'observation d'auto-anticorps contre les plaquettes dans un modèle de KO *WAS* uniquement dans ce type cellulaire ²⁶⁶. Il a été montré dans ce modèle que les plaquettes surexpriment CD40L entraînant une activation importante des lymphocytes B qui contribue à la rupture de tolérance et à l'apparition des auto-anticorps ²⁶⁶. Ce modèle suggère

que des anomalies constitutionnelles des plaquettes pourraient conduire à une rupture de tolérance et à la production d'auto-anticorps anti-plaquettes, et finalement à des « thrombopénies mixtes » à la fois constitutionnelles et auto-immunes. Cette hypothèse a des conséquences directes sur la prise en charge des patients pour lesquels il est alors nécessaire de contrôler l'auto-immunité en même temps (ou avant ?) d'utiliser des analogues de la thrombopoïétine afin de compenser le défaut constitutionnel.

L'apparition de manifestations auto-immunes chez certains patients NBEAL2, nous rappelle l'importance d'étudier les gènes classiquement connus pour leur fonction plaquettaire et de s'intéresser à leur rôle potentiel dans le système immunitaire.

On pourrait suggérer une surveillance accrue du développement de symptômes auto-immuns chez des patients présentant des thrombopénies constitutionnelles.

4. Perspectives sur les déficits en checkpoints immunitaires

4.1. Existe-t-il une redondance des checkpoints immunitaires ?

Peu de déficits monogéniques en checkpoints immunitaires sont décrits chez l'humain, comparé au nombre croissant de checkpoints décrits dans la littérature. Il est probable que de nouvelles descriptions soient publiées dans les prochaines années, comme pour les récentes descriptions des premiers déficits en PD1³⁶ et CD28²⁶⁷ chez l'humain.

Cette observation nous invite à nous demander s'il existe une redondance de fonctions et d'emplois des checkpoints immunitaires.

Il suffit d'une mutation hétérozygote de CTLA-4 pour observer un phénotype clinique sévère. Pour tous les autres checkpoints dont les déficiences ont été décrites chez l'Homme, la transmission est autosomale récessive (ICOS, ICOSL, PD1, CD28, 4-1BB, OX40, CD27, CD70, CD40, CD40L, TOD2) suggérant qu'un déficit partiel, associé à une mutation hétérozygote est compensable.

De plus, les effets indésirables après une thérapie anti-CTLA-4 sont plus sévères qu'avec un traitement ciblant PD1³⁵. Pourquoi CTLA-4 semble-t-il « irremplaçable » ?

Lors de ces travaux nous avons mis en évidence que l'expression de TIM3 était légèrement augmentée sur les cellules T activées n'exprimant plus LRBA ou NBEAL2 (KO CRISPR). De plus, la concentration plasmatique de TIM3 chez les patients atteints d'un déficit en LRBA était significativement plus élevée que chez des contrôles sains. On peut supposer qu'il s'agit d'un mécanisme de compensation en avec le déficit en CTLA-4.

De manière générale, nous pouvons nous demander s'il existe une redondance parmi les checkpoints immunitaires.

Il serait intéressant de regarder l'expression de différents checkpoints chez des patients porteurs de mutations hétérozygotes d'ICOS, 4-1BB, CD27... : découvrira-t-on une surexpression au niveau transcriptomique ou protéique d'un autre checkpoint, pour compenser celui muté ?

4.2. Pénétrance incomplète des mutations de CTLA-4

La pénétrance incomplète pour les mutations hétérozygotes de *CTLA-4* est une autre caractéristique de ce déficit génétique. Le fait qu'il existe dans la même famille, des individus sains et des patients gravement malades, pose la question de facteurs secondaires au développement des symptômes.

Il peut notamment exister des facteurs environnementaux, des événements épigénétiques, un second événement génétique somatique qui serait déclencheur par l'atteinte d'une sous-population cellulaire particulière comme cela a été décrit dans l'ALPS-sFAS²⁶⁸.

Dans le locus de *CTLA-4*, nous remarquons qu'il est encadré par deux gènes codant des molécules de co-stimulation : *CD28* et *ICOS*. Nous pouvons alors envisager qu'une régulation épigénétique permette un niveau de transcription réduit de *CD28*, qui compenserait l'haplo-insuffisance en *CTLA-4* chez les porteurs sains.

Un deuxième événement génétique protecteur pourrait également être envisagé, comme une mutation hypomorphe de *CD28* affectant son expression ou sa fonction à la surface des cellules immunitaires par exemple.

Nous avons notamment l'exemple d'une famille, pour laquelle les porteurs sains de mutations hétérozygotes de *CTLA-4*, sont aussi porteurs d'une mutation hétérozygote, prédite bénigne, et affectant le peptide signal de *CD28*. L'arbre de la famille est donné en Figure 42. Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en démontrer que cette mutation de *CD28* affectait l'expression de ce checkpoint immunitaire. Cette famille fait partie des échantillons que nous sommes en

train d'analyser en séquençage ARN sur cellules uniques. Cette approche pourrait peut-être nous permettre de conclure.

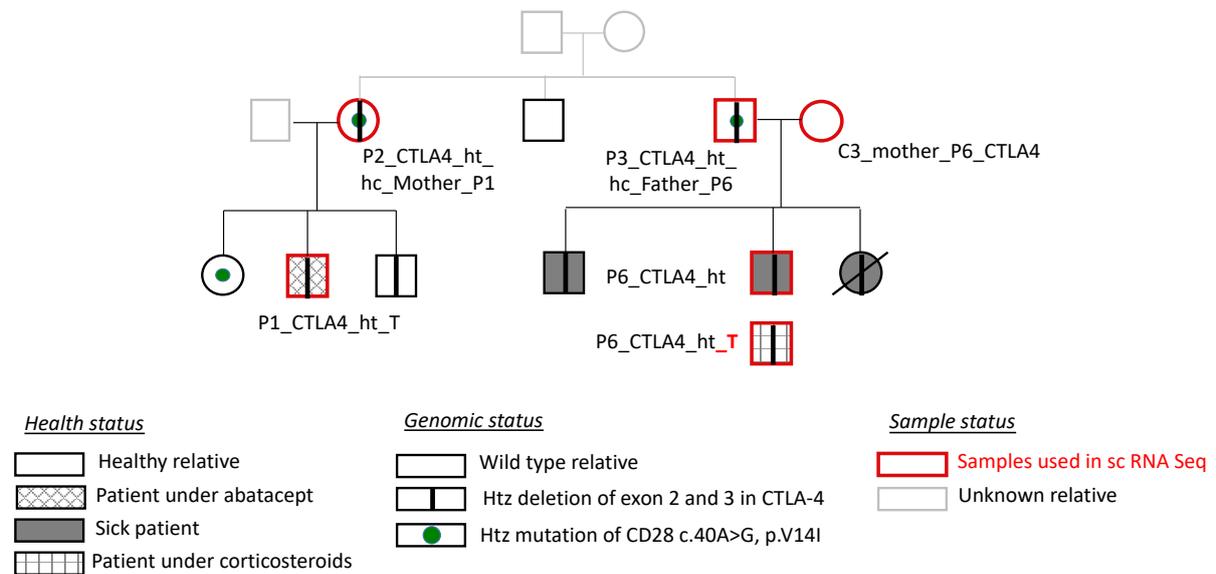


Figure 42: Arbre génétique de la famille présentant une mutation hétérozygote de CTLA-4, dont certains membres sont des porteurs sains, illustrant la pénétrance incomplète de cette mutation

4.3. Le rôle de CTLA-4 au-delà des lymphocytes T

Enfin nous pouvons nous demander si le rôle de CTLA-4 est réduit aux cellules T. En effet, plusieurs articles suggèrent que l'expression et le rôle de CTLA-4 ne sont pas circonscrits aux seuls lymphocytes T^{269, 270}, alors même qu'une littérature bien plus abondante décrit la fonction de ce récepteur inhibiteur quasi exclusivement dans les cellules T et les TReg.

L'expression de CTLA-4 semble notamment être importante pour les cellules B^{271, 272, 273, 274, 275}, les cellules dendritiques^{276, 277, 278, 279}, les cellules NK²⁸⁰, les monocytes²⁸¹ et les granulocytes²⁶⁹.

CTLA-4 semble notamment pouvoir être exprimé par les cellules B murines. Une étude récente démontre que l'expression de CTLA-4 joue un rôle crucial dans les cellules B-1a murine et permet le maintien de la tolérance en régulant cette sous-population de cellules B²⁸². D'après les auteurs, les cellules B-1a murine produisent une large gamme d'anticorps naturellement auto-réactifs et fonctionnellement importants, ce qui soulève la question de savoir comment la production d'auto-anticorps par les B-1a est régulée. Les auteurs montrent notamment que ces cellules B expriment de façon constitutive CTLA-4. La suppression sélective de l'expression de CTLA-4 dans ces cellules B-1a génère des souris qui développent spontanément des auto-

anticorps, des cellules folliculaires auxiliaires T (Tfh) et des centres germinatifs (GC) dans la rate ²⁸². A ce jour, l'expression et la fonction de CTLA-4 n'a pas été étudiée dans des cellules B humaines non malignes. Vu que les patients LRBA, qui ont une expression réduite de CTLA-4, peuvent présenter un nombre de cellules B diminué ainsi que des auto-anticorps malgré une hypogammaglobulinémie, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression de CTLA-4 sur leurs cellules B.

Enfin, Halpert et al ont observé que CTLA-4 est exprimé par les cellules dendritiques (humaines et murines) dérivées des monocytes (moDc) ²⁷⁹. Ils ont notamment montré que ces moDC étaient capables de sécréter des vésicules extracellulaires (EV) contenant CTLA-4. Cette sécrétion influence d'autres cellules dendritiques voisines, et contribue à la diminution de l'expression des récepteurs CD80/CD86, comme représenté à la Figure 43 ²⁷⁰.

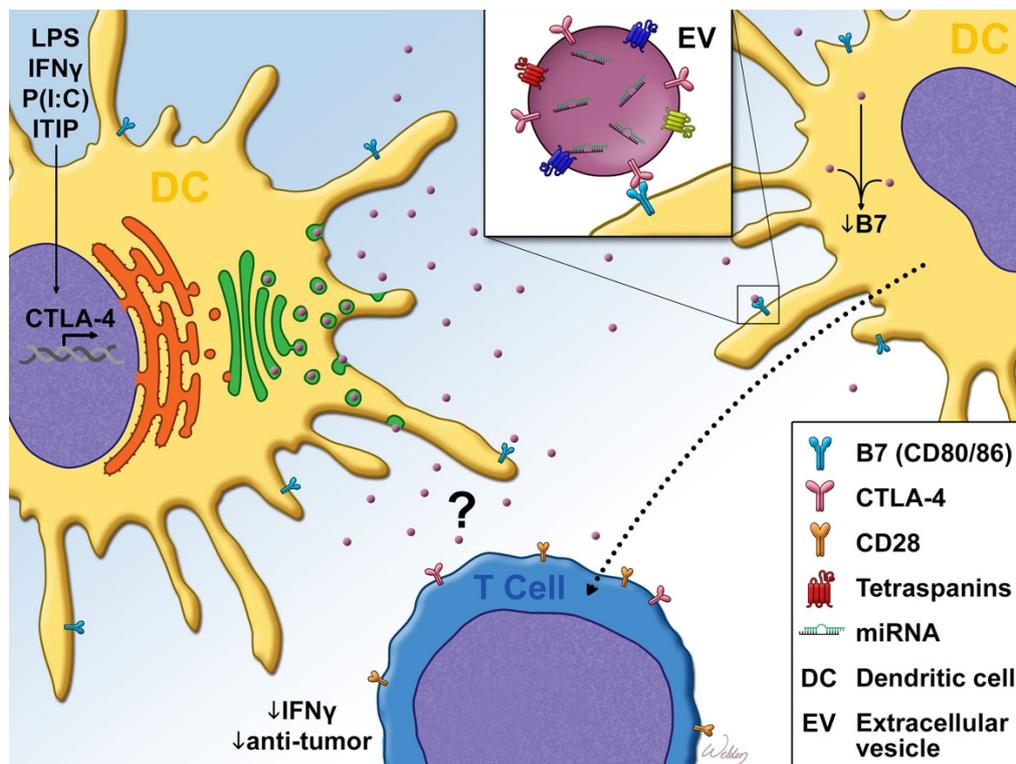


Figure 43: Expression de CTLA-4 par les cellules dendritiques ²⁷⁰

La stimulation par les cytokines ou les agonistes du TLR favorise la maturation des cellules dendritiques (DC) ainsi que l'expression de CTLA-4. Contrairement aux cellules T, pour lesquelles CTLA-4 est principalement localisée à la membrane plasmique, l'expression de CTLA-4 dans les DC est diffuse, avec une certaine localisation au niveau du réseau trans-golgien. Après avoir quitté le golgi, CTLA-4 se localise à la membrane des vésicules extracellulaires (EV) CD63+ Rab5+, avant d'être relarguées par la cellule. Une fois dans l'espace extracellulaire, les récepteurs CD80/CD86 des cellules dendritiques voisines peuvent se lier à ces vésicules extracellulaires CTLA-4+. L'absorption de ces vésicules entraîne une régulation négative de l'expression de CD80/CD86 à la surface des cellules dendritiques, ce qui participe à une inhibition de la réponse cellulaire T.

En l'absence de NBEAL2, les granules- α des plaquettes ou les granules des neutrophiles ne sont pas retenus dans leurs cytoplasmes chez les patients atteints du GPS^{136, 145}. De plus, NBEAL2 est impliqué dans le trafic de CTLA-4. Nous pouvons donc nous demander si les cellules dendritiques des patients NBEAL2 sont en mesure de sécréter ou de retenir ces vésicules extracellulaires, et si ces vésicules contiennent CTLA-4.

Devrions nous étendre l'étude de CTLA-4 à d'autres types cellulaires ? Un biais bibliographique sur le rôle de ce checkpoint inhibiteur dans les cellules T existe-t-il ?

L'étude de l'expression et du trafic de CTLA-4 dans d'autres types cellulaires pourraient permettre la découverte de nouveaux mécanismes expliquant de façon plus précise la pathophysiologie et les symptômes observés dans les déficiences en *CTLA-4*.

Conclusions

En conclusion, nous avons décrit un nouveau rôle de NBEAL2 dans les lymphocytes T activés humain. Nous avons mis en évidence que cette protéine BEACH se lie à LRBA, et qu'elle est impliquée dans le trafic de CTLA-4. En conséquence, les patients atteints du syndrome des plaquettes grises présentent une réduction de l'expression de CTLA-4 sur leurs lymphocytes T après activation. Ce défaut d'expression en CTLA-4 a été confirmé *in vitro* sur des cellules T primaires activées, en utilisant le système CRISPR-Cas9. Cette expression diminuée de CTLA-4 sur les lymphocytes T pourrait donc être responsable des symptômes auto-immuns chez certains de ces patients. De plus, le fait que ce défaut n'est pas observé sur les TReg des patients GPS pourrait expliquer que la survenue des manifestations auto-immunes est moins fréquente que lors de déficit en LRBA ou d'haplo-insuffisance en *CTLA-4*, dans lesquels le défaut d'expression de CTLA-4 est observé sur les TReg.

L'interactome de NBEAL2 a également révélé de nouveaux partenaires de cette protéine dans les lymphocytes T activés. Ces partenaires sont notamment impliqués dans le système immunitaire, le trafic vésiculaire et l'activité GTPase. Cette nouvelle liste de partenaires, obtenue dans un système endogène, ouvre la voie à de nouvelles découvertes sur les mécanismes impliquant NBEAL2 dans le lymphocyte T. Le fait que ces protéines soient en grande majorité exprimée par d'autres cellules du système immunitaire suggèrent que ces mécanismes seront sûrement transposables à l'ensemble du système immunitaire. De plus, l'étude de patients porteurs de mutations de certains partenaires, comme DOCK11 ou CCDC88B, pourraient amener à la description de nouveaux défauts génétiques responsables de pathologies plaquettaires à la fois constitutionnelles et auto-immunes.

L'ensemble de ces résultats illustre le rôle central de NBEAL2 dans le système immunitaire. Ils ouvrent la perspective à de nouvelles options thérapeutiques. Ainsi les patients atteints du syndrome des plaquettes grises et développant des manifestations auto-immunes pourraient être traités par CTLA4-Ig (abatacept). Enfin, cibler le trafic vésiculaire de CTLA-4 via NBEAL2, pourrait être intéressant dans le développement de traitements anti-cancéreux avec des effets auto-immuns indésirables possiblement plus limités qu'en ciblant directement CTLA-4.

Contributions à d'autres publications

Article 1 (voir Annexe 2)

Terrier, B., Humbert, S., Preta, L. H., Delage, L., Razanamahery, J., Laurent-Roussel, S., ... & Chouchana, L. (2020). Risk of scleroderma according to the type of immune checkpoint inhibitors. *Autoimmunity Reviews*, 19(8), 102596.

Article 2 (voir Annexe 3)

Gaillet, A., Delage, L., Legendre, P., Henriquez, S., Heshmati, F., Wislez, M., ... & Terrier, B. (2021). Extracorporeal photopheresis and cyclophosphamide for systemic sclerosis induced by immune checkpoint inhibitors. *Soumis*

Article 3 (voir Annexe 4)

Hadjadj*, J., Planas*, D., Ouedrani*, A., Delage[§], L., Buffier[§], S., Nguyen[§], Y., Bruel[§], T., ..., Terrier, B. (2021). Immunogenicity of BNT162b2 Vaccine Against the Alpha and Delta Variants in Immunocompromised Patients. *Soumis*

* These authors contributed equally to this work

§ These authors contributed equally to this work

Article 4 (voir Annexe 5)

Meynier, S., O'Donoghue[†], A., Abdessalem[†], G., Caye, A., Strullu, M., Arfeuille, C., Luka, M., Delage, L., ..., Rieux-Laucat, R. (2021). From Ras-associated Autoimmune Leukoproliferative Disorder to leukemia. *Article en cours de rédaction*

† These authors contributed equally to this work

Annexes

Annexe 1 : Participation à d'autres projets de séquençage sur cellules uniques

Au cours de mon doctorat, j'ai participé à d'autres projets de séquençage sur cellules uniques, apportant un soutien expérimental ainsi que l'analyse en cytométrie en flux des PBMC utilisées. En effet, en parallèle de l'expérience de séquençage, une partie des PBMC est marquée pour vérifier les proportions des différents sous-types cellulaires. Ces marquages sont divisés en 3 panels (cf Annexe 9) et les acquisitions étaient réalisées sur un cytomètre spectral (Sony SP6800). Ces marquages de cytométrie en flux permettent de confirmer les tendances et les biais de clusters observés à la suite des analyses bioinformatiques du single-cell.

Projet STING

Le gène *TMEM173* code pour la protéine STING, une protéine adaptatrice qui médie la production d'interféron- β . Des mutations dominantes du gène *TMEM173* entraînent le développement précoce d'un SAVI (STING-associated vasculopathy, infantile onset). Ce syndrome est une vasculopathie auto-inflammatoire provoquant des lésions cutanées sévères, affectant particulièrement le visage, les oreilles, le nez et les doigts, et entraînant une ulcération, la formation d'escarres, une nécrose et, dans certains cas, une amputation. De nombreux patients ont une maladie pulmonaire interstitielle. La biopsie tissulaire et les résultats de laboratoire montrent un état hyper-inflammatoire, avec des preuves d'une augmentation de la signalisation de l'interféron- β ^{283, 284}. Dans ce projet, j'ai contribué aux trois expériences réalisées et j'ai analysé l'intégralité des résultats de cytométrie en flux. Les échantillons analysés sont ceux de 6 patients « STING » non traités, 5 échantillons de 4 de ces patients après traitements, et 8 échantillons de donneurs sains. Les résultats des expériences de séquençage sont en cours d'analyse bio-informatique

Projet RALD

En collaboration avec le Dr Sonia Meynier, une analyse sur des patients avec des mutations dans des gènes sur la voie RAS (NRAS, KRAS) a été réalisée.

La maladie lymphoproliférative associée à Ras (RALD) est une maladie auto-immune bénigne associée à l'activation de mutations somatiques des gènes *KRAS* ou *NRAS*. La RALD partage des caractéristiques cliniques avec une tumeur maligne pédiatrique rare liée à la voie RAS, la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ). Certains patients atteints de RALD évoluent vers une leucémie manifeste. Les lymphocytes T des patients RALD présentent une résistance à l'apoptose autonome (induite par BIM) des cellules activées (ACAD), mais une mort cellulaire induite par activation de FAS/FASL (AICD) normale. Pour comprendre et caractériser le lien physiopathologique entre ces deux maladies, nous avons évalué ces voies d'apoptose chez des patients RALD, LMMJ et chez une patiente RALD ayant développé une leucémie. Nous avons constaté que les cellules T des patients JMML présentent une ACAD normale mais une fonction AICD altérée liée à une expression de FASL réduite. Par séquençage ARN sur cellules uniques, nous montrons une réduction de la signature liée à l'AICD, définie par FASL, Perforine, Granzyme B et TNF- α , dans les cellules NK et CD8⁺ cytotoxiques, entre le stade RALD et le stade JMML. Ce processus serait orchestré par les monocytes des patients provoquant des modifications épigénétiques des gènes régulant l'apoptose, inhibant leur expression d'ARNm dans les cellules cytotoxiques et réduisant ainsi leur capacité à surveiller les cellules cancéreuses.

Un article, auquel je suis associée, est en cours de rédaction pour ce projet (cf Article 4, Annexe 5).

Pathologies liées à une dérégulation de l'interféron

J'ai aussi participé à une expérience et à l'analyse des résultats de cytométrie en flux pour des patients atteints d'une interféronopathie, d'un lupus sévère ou d'un syndrome auto-inflammatoire. Ce projet vise à comparer ces patients qui présentent tous des signatures élevées des gènes stimulés par l'interféron. Ces patients sont porteurs de mutations *TREX1*, *RELA* ou *A20*. D'autres expériences ont été réalisées depuis et les analyses sont en cours.

DICS (Déficit immunitaire combiné sévère)

J'ai participé à la première expérience d'analyse de PBMC de patients ayant un DICS T-B⁺ (déficit immunitaire combiné sévère) par mutation du gène codant la chaîne gamma du récepteur à l'IL2 (DICS lié à l'X). Ces patients ont développé une hépatite cytolitique incompressible en moyenne 6 ans après leur greffe sans conditionnement, associée à une cassure staturo-pondérale majeure. Ces expériences ont permis de montrer un défaut CD8 majeur

(activation dérégulée, réponse à l'interféron exacerbée) suggérant un environnement viral chez ces patients en comparaison à des patients greffés dans les mêmes conditions n'ayant pas développé d'hépatite. D'autres expériences ont suivi et l'analyse des résultats est en cours.

Annexe 2 : Article 1

Terrier, B., Humbert, S., Preta, L. H., **Delage, L.**, Razanamahery, J., Laurent-Roussel, S., ... & Chouchana, L. (2020). Risk of scleroderma according to the type of immune checkpoint inhibitors. *Autoimmunity Reviews*, 19(8), 102596.

Introduction: Immune checkpoint inhibitors (ICIs) are associated with immune-related adverse events (irAEs). Among them, ICIs-induced systemic sclerosis (SSc) is poorly known.

Methods: To better characterize this irAE, our comprehensive approach combined the description of ICIs-induced scleroderma cases, the systematic review of the literature and the analysis of Vigibase, the WHO pharmacovigilance database.

Results: We identified two cases with underlying limited cutaneous SSc who presented a dramatic increase in the skin thickening following pembrolizumab, associated with scleroderma renal crisis in one case. In the literature, four cases of scleroderma and four cases of morphea have been reported with pembrolizumab or nivolumab. None following ipilimumab, atezolizumab or durvalumab were retrieved. Skin changes appeared or worsened more quickly with pembrolizumab than nivolumab and had different patterns between both drugs. Patients with generalized skin changes required high-dose prednisone to improve skin thickening. Among the 2527 scleroderma cases identified in Vigibase, 35 were associated with ICIs. Nivolumab and pembrolizumab showed a disproportionality in scleroderma reporting. No disproportionality was found for ipilimumab, atezolizumab or durvalumab.

Conclusion: The risk of scleroderma or fibrosis extension in SSc patients should be considered when initiating anti-PD-1 agents. It suggests the role of PD-1/PD-L1 interaction in the pathophysiology of SSc.



Risk of scleroderma according to the type of immune checkpoint inhibitors

Benjamin Terrier^{a,b,c,*}, Sébastien Humbert^d, Laure-Hélène Preta^e, Laure Delage^{f,g}, Jérôme Razanamahery^d, Sara Laurent-Roussel^h, Raphaële Mestiri^{a,b,c}, Lauren Beauudeau^a, Paul Legendre^{a,b,c}, François Goupilⁱ, Jérôme Hadjadj^{a,f,g}, Marie-Claude Stolzenberg^{f,g}, Jean-Marc Treluyer^{c,e}, Virginie Westeel^j, Marie-Blanche Valnet-Rabier^k, Marie Wislez^{c,l}, Luc Mouthon^{a,b,c}, Laurent Chouchana^e

^a Department of Internal Medicine, Cochin Hospital, Paris, France

^b National Referral Centre for Systemic and Autoimmune Diseases, Hôpital Cochin, Paris, France

^c Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^d Department of Internal Medicine, CHU, Besançon, France

^e Regional Center of Pharmacovigilance, Department of Pharmacology, Cochin Hospital, Paris, France

^f Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, Imagine Institute, Paris, France

^g Checkpoint Immunology, Immunology and Inflammation Therapeutic Area, Sanofi, Vitry, France

^h Department of Pathology, Cochin Hospital, Paris, France

ⁱ Department of Pulmonology, General Hospital, Le Mans, France

^j Department of Pulmonology, University Hospital Jean Minjot, INSERM UMR 1098, Université de Bourgogne Franche Comté, Besançon, France

^k Regional Center of Pharmacovigilance, Department of Pharmacology, CHU, Besançon, France

^l Department of Pulmonology, Thoracic Oncology Unit, Cochin Hospital, Paris, France.

ARTICLE INFO

Keywords:

Scleroderma
Pembrolizumab
Nivolumab
Immune checkpoint inhibitors
PD-1

ABSTRACT

Introduction: Immune checkpoint inhibitors (ICIs) are associated with immune-related adverse events (irAEs). Among them, ICIs-induced systemic sclerosis (SSc) is poorly known.

Methods: To better characterize this irAE, our comprehensive approach combined the description of ICIs-induced scleroderma cases, the systematic review of the literature and the analysis of VigiBase, the WHO pharmacovigilance database.

Results: We identified two cases with underlying limited cutaneous SSc who presented a dramatic increase in the skin thickening following pembrolizumab, associated with scleroderma renal crisis in one case. In the literature, four cases of scleroderma and four cases of morphea have been reported with pembrolizumab or nivolumab. None following ipilimumab, atezolizumab or durvalumab were retrieved. Skin changes appeared or worsened more quickly with pembrolizumab than nivolumab, and had different patterns between both drugs. Patients with generalized skin changes required high-dose prednisone to improve skin thickening. Among the 2527 scleroderma cases identified in VigiBase, 35 were associated with ICIs. Nivolumab and pembrolizumab showed a disproportionality in scleroderma reporting. No disproportionality was found for ipilimumab, atezolizumab or durvalumab.

Conclusion: The risk of scleroderma or fibrosis extension in SSc patients should be considered when initiating anti-PD-1 agents. It suggests the role of PD-1/PD-L1 interaction in the pathophysiology of SSc.

1. Introduction

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have revolutionized the treatment of cancers, especially metastatic melanoma, non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and renal cell carcinoma. These agents, including anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), anti-programmed cell death-1 (PD-1) and anti-programmed cell death ligand-1 (PD-L1), have

the ability to reactivate the immune system against the tumor [1]. However, the use of ICIs is associated with the occurrence of immune-related adverse events (irAEs), resulting from an excessive immune system activation against normal tissues [2]. irAEs mainly include musculoskeletal manifestations, myositis, colitis, thyroiditis, Auto-immune hypothalamic-pituitary-adrenal axis, nephritis, hepatitis, diabetes or myocarditis [3–6], but their spectrum is still being

* Corresponding author at: Department of Internal Medicine, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris, Cedex 14, France.

E-mail address: benjamin.terrier@aphp.fr (B. Terrier).

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102596>

Received 3 February 2020; Accepted 7 February 2020

Available online 12 June 2020

1568-9972/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

dismembered. The outcome of patients with a pre-existing or newly diagnosed autoimmune diseases (AID) following the initiation of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy tends to be worsened or revealed by immunotherapy [7,8]. Flares of AID or moderate irAEs were shown to be frequently manageable without ICI discontinuation [7]. However, some AID, especially systemic sclerosis (SSc) induced by ICIs, are poorly known and their management is still challenging. We describe here two cases of pembrolizumab-induced scleroderma flare, review the literature of ICIs-induced scleroderma and analyze the WHO pharmacovigilance database to better characterize this irAE.

2. Results

2.1. Case 1

A 49-year-old woman was referred for diffuse skin thickening. She had been diagnosed with metastatic NSCLC 3 months earlier. At that time, no diagnosis of SSc was made but she had Raynaud phenomenon, puffy fingers and *gastroesophageal reflux disease (GERD)*. She received pembrolizumab 2 mg/kg every 3 weeks as first-line therapy. After the first cycle, she noted a dramatic increase in the skin thickening with an involvement of the trunk, the abdomen and the limbs. After the second infusion, treatment was discontinued because of extension of the skin involvement. Chest CT-scan showed a partial remission of the cancer. At admission in the Internal medicine department, the diagnosis of diffuse cutaneous SSc (dcSSc) was made with a modified Rodnan skin score (mRSS) of 34 [9]. Nailfold capillaroscopy did not show any scleroderma pattern but mild to moderate microvascular abnormalities. Antinuclear antibodies (ANA) were positive with a titer of 1/640, but were negative for Scl70, centromeres, fibrillar in or RNA polymerase III. Skin biopsy showed swollen collagen bundles in the reticular dermis, with an edema fluid in the papillary dermis, a straight edge of the dermal-subcutaneous interface and a minimal inflammatory infiltrate (Fig. 1A). Prednisone was started at 10 mg/day, but 6 weeks later, an extension of skin thickening to the breasts and loins was noted, alongside with decrease in tumor size. Intravenous cyclophosphamide was then initiated in combination with prednisone at a dose of 10 mg/day. FACS analysis on PBMCs revealed an increased expression of activation markers (CD25, CD27, CD28) on effector memory T cells compared to an age- and sex-matched healthy control, and the absence of PD-1 expression as expected. Compared to an age- and sex-matched SSc, the patient had more activated T cells, especially double positive CD38+ HLADR+ CD4+ and CD8+ T cells, and more Th1 cells (Fig. 1B).

2.2. Case 2

A 57-year-old woman was referred for Raynaud phenomenon, abnormal nailfold capillaroscopy, puffy fingers and GERD. Positive ANA with anti-RNA polymerase III were found, and lcSSc was diagnosed. Chest CT-scan did not reveal any interstitial lung disease but pulmonary nodules leading to the diagnosis of metastatic NSCLC. Bevacizumab-pemetrexed/cisplatin combined chemotherapy was started in association with prednisone 10 mg/day to treat arthralgias. She was relayed to docetaxel because of cancer progression after 3 cycles. Unfortunately, cancer further progressed with new pulmonary and hepatic lesions. Pembrolizumab 2 mg/kg every 3 weeks was initiated as third-line therapy. After 6 cycles, she noted a diffuse extension of the skin thickening to proximal limbs and the trunk, with a mRSS of 28, associated with scleroderma renal crisis. Pembrolizumab and prednisone were then discontinued, hypertension was controlled, and intravenous cyclophosphamide was initiated. After 6 cycles of cyclophosphamide, patient improved skin thickening (mRSS 20), and normalized renal function and blood pressure with ACE inhibitors. Chest CT scan showed no worsening of lung lesions.

2.3. Review of the literature

We performed a systematic literature search of PubMed, Medline and EMBASE for articles, and EULAR and ACR scientific meeting abstracts from the last 5 years (from 2015 to 2019). We used the following key words: 'scleroderma', 'systemic sclerosis' or 'morphea' AND 'immune checkpoint inhibitor', 'pembrolizumab', 'nivolumab', 'ipilimumab' or 'atezolizumab'. In addition, we hand-searched reference lists of papers initially detected to identify additional relevant reports. Duplicate references were removed.

Four cases of scleroderma (lcSSc in 2 and dcSSc in 2) and four cases of morphea (localized in 2 and generalized in 2) have been reported in the literature following treatment with pembrolizumab or nivolumab, both anti-PD-1 agents [10–13]. In contrast, no case following ipilimumab (anti-CTLA-4) or atezolizumab (anti-PD-L1) were retrieved. Case details are summarized in Table 1. ICIs were started mainly for metastatic melanoma or NSCLC. Skin changes appeared or worsened more quickly with pembrolizumab [median number of infusions before skin changes of 5 (IQR 4–8)] than with nivolumab [median 14 (IQR 7–16)]. Skin changes had different patterns between pembrolizumab and nivolumab. Nivolumab seemed to induce more frequently localized skin thickening, whereas pembrolizumab more frequently induced generalized skin thickening. Presentation and evolution of scleroderma changes were quite unusual, with frequent axial involvement then secondary extension to the proximal limbs. Initial management was based on ICI discontinuation, sometimes associated with topical steroids or low-dose prednisone because of the underlying SSc. Initial improvement was noted only in the two patients with localized morphea. For all patients with generalized skin changes, high-dose prednisone (0.8–1 mg/kg/day) was required to improve skin thickening, more often within weeks to months. No adverse drug reaction (ADR) related to glucocorticoids were reported, especially scleroderma renal crisis. Finally, ICI-induced scleroderma were frequently associated with cancer remission or stable disease despite ICI discontinuation.

2.4. Analysis of the WHO pharmacovigilance database

We reviewed Vigibase, the World Health Organization (WHO) global Individual Case Safety Report (ICSR) database, which contains anonymized reports of suspected ADRs from more than 130 countries. This pharmacovigilance statistical approach, based on a case/non-case study, estimates whether an adverse event is differentially reported for a drug compared to other drugs, using the Odds-Ratio of Reporting (ROR) for each drug-adverse event combination. To assess an association between scleroderma reporting and ICIs, we extracted scleroderma ICSRs recorded in Vigibase from 2008, date of the first ICSR for an ICI agent, until November 30th, 2019. Of the 17,027,150 ICSRs, 2527 scleroderma cases have been identified, including 35 associated with ICIs, 836 with other antineoplastic drugs and 1656 with other drugs. Of the five ICIs, only nivolumab and pembrolizumab, both targeting PD-1, showed a disproportionality of scleroderma reporting, suggesting a probable pharmacovigilance signal (Table 2). Of note, no disproportionality was found for ipilimumab, the anti-CTLA-4 agent.

3. Discussion

PD-1 and its ligands, PD-L1 and PD-L2, have been shown to exhibit important inhibitory function in the regulation of immune homeostasis and the maintenance of peripheral tolerance [14]. The role of PD-1/PD-L1 interaction in the development of skin sclerosis in SSc has been suggested in human and mice. Since PD-1 is antagonized by its soluble form [15], serum levels of soluble PD-1 (sPD-1) were measured. Serum sPD-1 levels were correlated with greater extent of skin sclerosis, suggesting that inhibiting PD-1 was associated with increased disease severity [16]. These data were confirmed in another study showing the same correlation between levels of sPD-1 and extent of fibrosis [17].

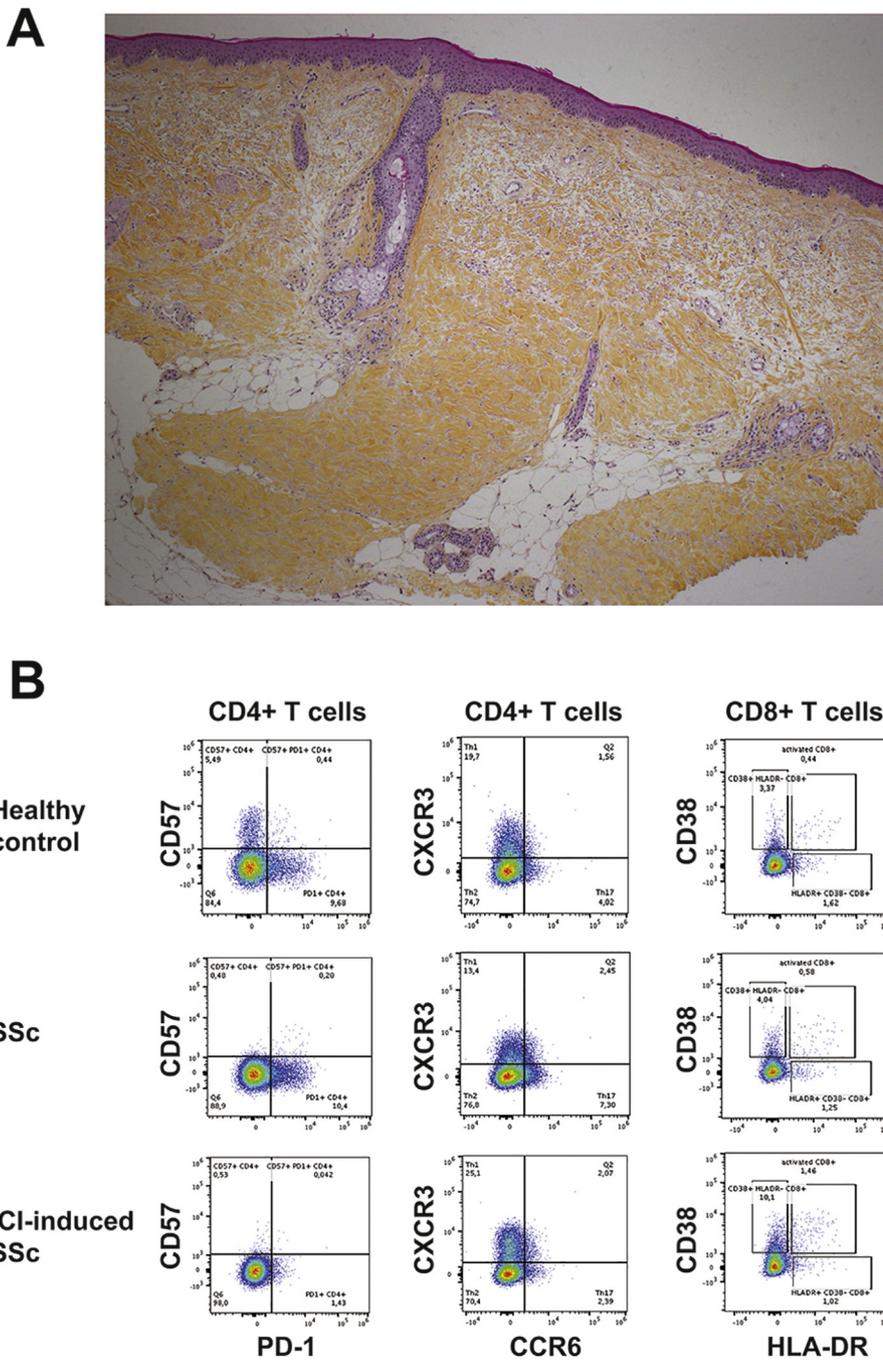


Fig. 1. Characteristics of peripheral blood mononuclear cells and the skin from patient 1. Panel A: Skin biopsy shows swollen collagen bundles in the reticular dermis, with an edema fluid in the papillary dermis, a straight edge of the dermal-subcutaneous interface and a minimal inflammatory infiltrate. (HES x4). Panel B: FACS analysis on PBMCs from the ICI-induced SSc revealed the lack of PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells, an increase of activated T cells, especially double positive CD38+ HLA-DR+ CD4+ and CD8+ T cells, and more Th1 cells (CXCR3+ CCR6- CD4+ T cells) compared to an age- and sex-matched SSc and healthy control.

Also, in mice with topoisomerase I-induced SSc, treatment antagonizing PD-1, similarly to pembrolizumab and nivolumab, induced a significant increase in dermal thickness and lung fibrosis scores. A role of costimulatory pathways in the pathogenesis of SSc was thus proposed [18]. Following the activation of naïve CD4+ T cells, either the engagement of positive costimulatory pathways or the inhibition of negative costimulatory pathways, such as PD-1/PD-L1, promote the development of Th1, Th2 and Th17 cells, inducing a profibrotic type 2 macrophages polarization. The latter finally promote fibroblast activation and excessive extracellular matrix production [18].

Regarding VigiBase, we showed a disproportionality for scleroderma reporting for pembrolizumab and nivolumab. ICI-induced scleroderma was restricted to anti-PD1, and no association was noted with ipilimumab. Of note, CTLA-4 was shown to be involved in the early phase of the immune response in the lymph nodes, while PD-1

plays a major role in the effector phase within the tissues. Clinical cases presented with unusual features, especially the frequent axial involvement that secondary extended to proximal limbs, and skin changes were different between pembrolizumab and nivolumab. These findings illustrate how ICIs may induced disease with atypical presentation. ICI discontinuation was not enough to stop the extension of skin thickening, and generalized skin changes always required the use of high-dose prednisone, without any ADR especially scleroderma renal crisis.

Taken together, our data strongly support the role of PD-1/PD-L1 interaction in the pathophysiology of SSc. It suggests considering the risk of scleroderma, as well as the risk of fibrosis extension in patients with underlying scleroderma, in patients receiving anti-PD-1 agents.

Table 1
Detailed characteristics of ICIs-induced scleroderma and our cases.

Authors	Gender	Age	Tumor	Treatment before ICIs	Symptoms before ICIs	ICI	No. of cycle before symptoms	Skin changes	mRSS	Other manifestations	AAN	1st-line therapy	Evolution of scleroderma	2nd-line therapy	Evolution of scleroderma	Oncological outcome
Tjarks et al.	Male	61	Metastatic RCC	Radiation therapy	None	Nivo	16	dcSSc	28	Arthralgias	Negative	Stop ICI	Worsening	GC 1 mg/kg/d	Improvement, MMF for GC-dependency	Stable
Cho et al.	Male	70	Metastatic melanoma	Interferon	None	Nivo	16	lcSSc	2	None	Negative	No stop ICI, GC 20 mg/d	Improvement then remission	None	Remission	NA
Dal Bello et al.	Female	70	Metastatic melanoma	None	None	Nivo	12	Localized morphea	-	Fever, oral mucositis	Negative	Stop ICI, GC 12,5 mg/d	Improvement then remission	None	Remission	NA
Alegre-Sanchez et al.	Female	65	Metastatic NSCLC	NA	None	Nivo	5	Localized morphea	-	None	NA	Stop ICI	Improvement then remission	None	Remission	Failure
Shenoy et al.	Male	79	Metastatic melanoma	None	None	Pembro	5	lcSSc	12	Raynaud, arthralgias, ILD	Negative	Stop ICI, topical steroids, HCQ	Worsening	GC 1 mg/kg/d	Improvement, GC-dependency	PR
Barbosa et al.	Male	66	Metastatic melanoma	None	None	Pembro	13	dcSSc	36	Arthralgias	Negative	Stop ICI, GC 1 mg/kg/d	Worsening	GC 1 mg/kg/d, IVIg, MMF	Improvement	CR
Cheng et al.	Male	64	Metastatic melanoma	Ipilimumab	Thyroiditis, vitiligo, colitis	Pembro	5	Generalized morphea	-	None	Negative	Stop ICI, GC 0.8 mg/kg/d	Improvement	None	Stable	Stable
Herrscher et al.	Female	74	Metastatic melanoma	Radiation therapy	None	Pembro	5	Generalized morphea	-	Sicca syndrome, arthralgias	Negative	Stop ICI, topical steroids, colchicine	Worsening	GC 15 mg/d + IV CYC	Worsening, then improvement after IFX	CR
Case 1	Female	49	Metastatic NSCLC	None	lcSSc	Pembro	1	dcSSc	34	Raynaud, GERD, ILD	AAN 1/640, no specificity	Stop ICI, GC 10 mg/d	Worsening	GC 10 mg/d + IV CYC	Stable	PR
Case 2	Female	57	Metastatic NSCLC	Bevacizumab, pemetrexed, cisplatin, docetaxel	lcSSc	Pembro	6	dcSSc	28	Raynaud, arthralgias, GERD, SRC	AAN 1/640, RNApol3 + IV CYC	Stop ICI, IV CYC	Stable	None	Stable	Stable

Table 2
Scleroderma reporting and Odds Ratios of Reporting (ROR) for immune checkpoint inhibitors within the WHO pharmacovigilance database.

	Target	SSc case	Other ADR	ROR (95%CI) vs. antineoplastic drugs	ROR (95%CI) vs. all drugs
Immune checkpoint inhibitors	–	35	79,891	2.4 (1.7–3.4)	3.1 (2.2–4.3)
Nivolumab	PD-1	14	39,310	1.9 (1.1–3.2)	2.4 (1.4–4.1)
Pembrolizumab	PD-1	16	20,597	4.1 (2.5–6.8)	5.3 (3.2–8.6)
Atezolizumab	PD-L1	1	4414	1.2 (0.2–8.4)	1.5 (0.2–10.8)
Durvalumab	PD-L1	1	2471	2.1 (0.3–15.1)	2.7 (0.4–19.4)
Ipilimumab	CTLA-4	3	17,887	0.9 (0.3–2.7)	1.1 (0.4–3.5)

Bold values indicate statistically significant results.

SSc: scleroderma or systemic sclerosis; ADR: adverse drug reactions; ROR: Odds-Ratio of Reporting, 95% CI: 95% confidence interval.

Scleroderma cases are defined as any individual case safety report (ICSR) with the reported terms scleroderma, scleroderma renal crisis, scleroderma-like reaction, systemic sclerosis, scleroderma associated digital ulcer, systemic sclerosis pulmonary, CREST syndrome or morphea as preferred term (PT) according to the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA). Antineoplastic drugs are defined as any drugs belonging to the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) L

level, i.e. antineoplastic and immunomodulating agents. ROR [95% CI] are calculated as $ROR = \frac{ad}{bc} \left[e^{\pm 1.96 \sqrt{\left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}\right)}} \right]$, where a is the number of SSc cases exposed to an ICI, b is the number of other ADR cases exposed to an ICI, c is the number of SSc cases exposed to the comparator drugs and d is the number of other ADR cases exposed to the comparator drugs.

Ethical approval information and data sharing statement

The French pharmacovigilance database and VigiBase are fully anonymized databases of spontaneous reports; access are granted for national or regional or pharmacovigilance centers, as our team.

Acknowledgements

The information from VigiBase comes from a variety of sources, and the probability that the suspected adverse effect is drug-related is not the same in all cases. The information does not represent the opinion of the UMC or the World Health Organization, and only reflects the authors' opinion.

References

- [1] Baraibar I, Melero I, Ponz-Sarvisé M, Castanon E. Safety and tolerability of immune checkpoint inhibitors (PD-1 and PD-L1) in cancer. *Drug Saf* 2019;42:281–94. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0774-8>.
- [2] Champiat S, Michot J-M, Lambotte O. Management of adverse events associated with cancer immunotherapy. *Rev Prat* 2019;69:39–48.
- [3] Kostine M, Truchetet M-E, Schaevebeke T. Clinical characteristics of rheumatic syndromes associated with checkpoint inhibitors therapy. *Rheumatol Oxf Engl* 2019;58:vii68–74. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez295>.
- [4] Percik R, Shlomai G, Tirosh A, Tirosh A, Leibowitz-Amit R, Eshet Y, et al. Isolated autoimmune adrenocorticotropic hormone deficiency: from a rare disease to the dominant cause of adrenal insufficiency related to check point inhibitors. *Autoimmun Rev* 2020;19:102454. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102454>.
- [5] Matas-García A, Milisenda JC, Selva-O'Callaghan A, Prieto-González S, Padrosa J, Cabrera C, et al. Emerging PD-1 and PD-L1 inhibitors-associated myopathy with a characteristic histopathological pattern. *Autoimmun Rev* 2020;19:102455. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102455>.
- [6] McGonagle D, Bragazzi NL, Amital H, Watad A. Mechanistic classification of immune checkpoint inhibitor toxicity as a pointer to minimal treatment strategies to further improve survival. *Autoimmun Rev* 2020;19:102456. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102456>.
- [7] Tison A, Quéré G, Misery L, Funck-Brentano E, Danlos F-X, Routier E, et al. Safety and efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with Cancer and Preexisting autoimmune disease: a Nationwide, Multicenter cohort study. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2019;71:2100–11. <https://doi.org/10.1002/art.41068>.
- [8] Manson G, Maria ATJ, Poizeau F, Danlos F-X, Kostine M, Brosseau S, et al. Worsening and newly diagnosed paraneoplastic syndromes following anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapies, a descriptive study. *J Immunother Cancer* 2019;7:337. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0821-8>.
- [9] van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:2737–47. <https://doi.org/10.1002/art.38098>.
- [10] Shenoy N, Esplin B, Barbosa N, Wieland C, Thanarajasingam U, Markovic S. Pembrolizumab induced severe scleroderma-like reaction. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28:432–3. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw543>.
- [11] Barbosa NS, Wetter DA, Wieland CN, Shenoy NK, Markovic SN, Thanarajasingam U. Scleroderma induced by Pembrolizumab: a case series. *Mayo Clin Proc* 2017;92:1158–63. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.03.016>.
- [12] Tjarks BJ, Kerkvliet AM, Jassim AD, Bleeker JS. Scleroderma-like skin changes induced by checkpoint inhibitor therapy. *J Cutan Pathol* 2018;45:615–8. <https://doi.org/10.1111/cup.13273>.
- [13] Cho M, Nonomura Y, Kaku Y, Nakabo S, Endo Y, Otsuka A, et al. Scleroderma-like syndrome associated with nivolumab treatment in malignant melanoma. *J Dermatol* 2019;46:e43–4. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14492>.
- [14] Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2010;9:583–7. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.04.003>.
- [15] Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-L1 pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol* 2014;290:72–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.006>.
- [16] Yanaba K, Hayashi M, Yoshihara Y, Nakagawa H. Serum levels of soluble programmed death-1 and programmed death ligand-1 in systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis. *J Dermatol* 2016;43:954–7. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13339>.
- [17] Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, et al. Contribution of soluble forms of programmed death 1 and programmed death ligand 2 to disease severity and progression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2017;69:1879–90. <https://doi.org/10.1002/art.40164>.
- [18] Boleto G, Allanon Y, Avouac J. Targeting costimulatory pathways in systemic sclerosis. *Front Immunol* 2018;9:2998. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02998>.

Annexe 3 : Article 2

Gaillet, A., Delage, L., Legendre, P., Henriquez, S., Heshmati, F., Wislez, M., ... & Terrier, B. (2021). Extracorporeal photopheresis and cyclophosphamide for systemic sclerosis induced by immune checkpoint inhibitors. *Soumis*

This letter is the follow-up case report of the patient described in Article 1 (Annexe 2).

We describe here the case of a patient with ICI-induced SSc who significantly improved after combination of cyclophosphamide and extracorporeal photopheresis (ECP).

Data regarding safety and efficacy of ECP for the treatment of irAE are lacking. This case report suggests that ECP, in combination with immunosuppressive agents, could be an interesting approach for refractory ICI-induced SSc without being detrimental for the control of the solid cancer.

Extracorporeal photopheresis and cyclophosphamide for systemic sclerosis induced by immune checkpoint inhibitors

Antoine Gaillet ^a, Laure Delage ^{b, c}, Paul Legendre ^a, Soledad Henriquez ^a, Farhad Heshmati ^d, Marie Wislez ^e, Loic Guillevin ^a, François Goupil ^f, Frédéric Rieux-Laucat ^b, Luc Mouthon ^a, Benjamin Terrier ^a

^a Department of Internal Medicine, National Referral Center for Rare Systemic Autoimmune Diseases, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris Descartes, Paris, France.

^b Université de Paris, Imagine Institute, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, F-75015 Paris, France.

^c Checkpoint Immunology, Immunology and Inflammation Therapeutic Area, Sanofi, Vitry, France.

^d Cochin Hospital, Paris, France.

^e Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Department of Pulmonology, Thoracic Oncology Unit, Cochin Hospital, Paris, France.

^f Service de Pneumologie, Centre Hospitalier, Le Mans, France.

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) targeting both CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein) and PD-1 (programmed cell death 1) have a central role in the management of solid cancers, especially metastatic melanoma, non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and renal cell carcinoma [1]. Resulting from an excessive activation of the immune system against the tumors, normal tissues may also be the target of the immune response and about half the patients develop serious immune-related adverse events (irAE), including musculoskeletal manifestations, colitis, thyroiditis, autoimmune hypothalamic-pituitary-adrenal axis, nephritis, hepatitis, diabetes or myocarditis [2].

Systemic sclerosis (SSc) induced by ICIs is an uncommon complication. Based on the analysis of the WHO pharmacovigilance database, we previously reported that nivolumab and pembrolizumab showed a disproportionality in scleroderma reporting, whereas no disproportionality was found for ipilimumab, atezolizumab or durvalumab [3]. However, the therapeutic management, from ICI discontinuation to glucocorticoids and/or immunosuppressive agents, remains to be defined.

We describe here the case of a patient with ICI-induced SSc who significantly improved after combination of cyclophosphamide and extracorporeal photopheresis (ECP).

A 49-year-old woman was admitted for diffuse skin thickening. She had been diagnosed with metastatic NSCLC three months earlier. Although SSc was not initially diagnosed, Raynaud phenomenon, puffy fingers and gastroesophageal reflux disease were already noted at this time. Pembrolizumab (2 mg/kg every 3 weeks) was initiated but discontinued after two injections because of the dramatic extension of skin thickening within one month with a modified Rodnan skin score (mRSS) of 34. No SSc specific antibody (Scl70, centromeres, fibrillarin or RNA polymerase III) was found and screening for visceral involvement revealed only mild infiltrative lung disease. Skin biopsy showed swollen collagen bundles in the reticular dermis with an edema fluid in the papillary dermis and a minimal inflammatory infiltrate.

Prednisone was started at 10 mg/day without any improvement and even an extension of skin thickening to the breasts and loins (not included in the mRSS). Pulses of cyclophosphamide (0.7 g/m²/month) were then initiated and rapidly combined after one month with weekly ECP owing to the extension of the cutaneous involvement (**Figure 1A**).

Over the next 12 months, skin thickening has decreased (mRSS 19) (**Figure 1A**), especially in areas not included in the mRSS, and persisted in the distal extremity of the forearms (**Figure 1B**), while the tumor mass has almost disappeared (**Figure 1C**). Cyclophosphamide was

stopped after 12 months, prednisone was progressively tapered, and ECP was spaced out every two weeks but maintained until last follow-up.

FACS analysis on PBMCs at SSc flare-up revealed an increased expression of activation markers (CD38 and HLA-DR) on effector memory T cells compared to an age- and gender-matched healthy control and the absence of PD-1 expression. FACS analysis during follow-up showed that PD-1 expression on T cells returned to normal level at 12 months (**Figure 1D**). Otherwise, while the percentages of activated T cells (CD38⁺ HLA-DR⁺) remained higher in the patient, CD38 mean expression decreases for CD8 T cells and normalizes for CD4 T cells. (**Figure 1E**).

Although spontaneous improvement is possible in irAE after ICI discontinuation, the improvement of skin thickening and general health status, concomitant with a normalization of the lymphocyte activation profile, suggests a specific effect of the combination therapy (cyclophosphamide and ECP). ECP is an established therapy for the treatment of graft-versus-host disease (GVHD) [4] but not in systemic sclerosis [5]. Data regarding safety and efficacy of ECP for the treatment of irAE are lacking [6]. This case report suggests that ECP, in combination with immunosuppressive agents, could be an interesting approach for refractory ICI-induced SSc without being detrimental for the control of the solid cancer.

1. Herbst R, Baas P, Kim D, Felip E, Pérez-Gracia J, Han J et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016 Apr 9;387(10027):1540-1550.

2. McGonagle D, Bragazzi NL, Amital H, Watad A. Mechanistic classification of immune checkpoint inhibitor toxicity as a pointer to minimal treatment strategies to further improve survival. *Autoimmun Rev* 2020;19:102456.

3. Terrier B, Humbert S, Preta L, Delage L, Razanamahery J, Laurent-Roussel S et al. Risk of scleroderma according to the type of immune checkpoint inhibitors. *Autoimmun Rev.* 2020 Aug;19(8):102596.
4. Zeiser R, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease — biologic process, prevention, and therapy. *N Engl J Med* 2017;377:2167-79
5. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Aug;76(8):1327-1339.
6. Petya Apostolova, Susanne Unger, Dagmar von Bubnoff, Frank Meiss, Burkhard Becher 2, Robert Zeiser. Extracorporeal Photopheresis for Colitis Induced by Checkpoint-Inhibitor Therapy. *N Engl J Med.* 2020 Jan 16;382(3):294-296.

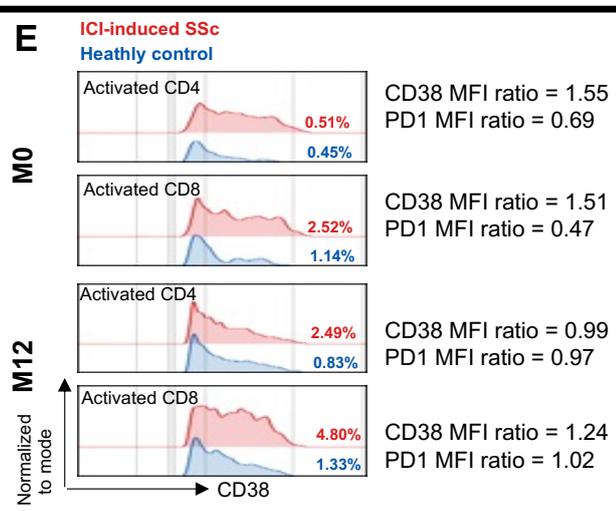
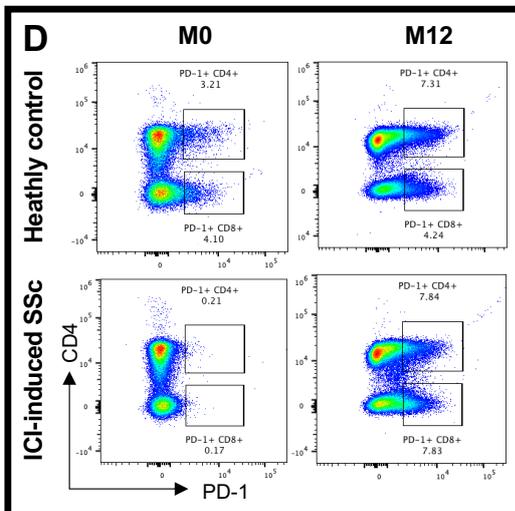
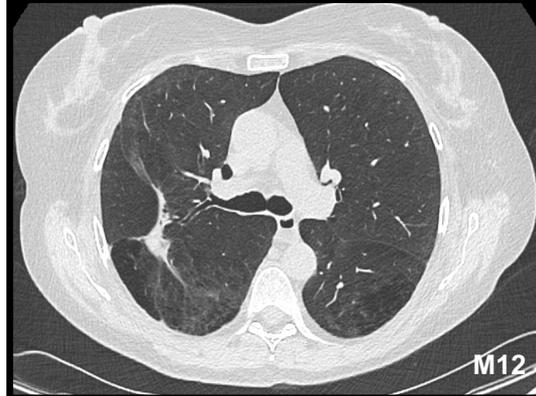
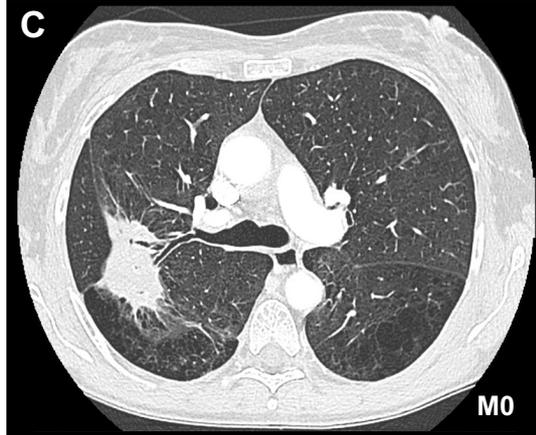
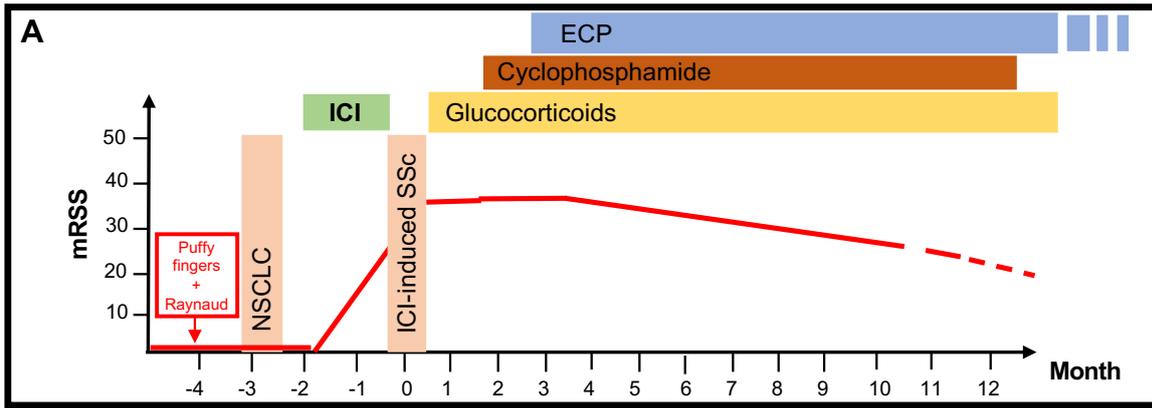


Figure 1. Cyclophosphamide plus Extracorporeal Photopheresis (ECP) for systemic sclerosis-induced by immune checkpoint inhibitors (ICIs).

Panel A shows the clinical evolution (according to modified Rodnan skin score) with different treatment over time.

Panel B shows skin thickening evolution over time (M0 = SSc diagnosis; M12 = 12 months).

Panel C shows evolution of tumor mass on CT scan over time.

Panel D shows FACS analysis on PBMCs over time compared to an age- and gender-matched healthy control. At M0, PD-1 expression is reduced and returned to normal level at M12.

Panel E shows CD38 histogram on the activated T cells (CD38+ HLA-DR+), with percentages of activated CD38+ HLA-DR+ CD4+ (or CD8+) T cells in the entire CD4+ T cells subset (or CD8+). Ratios of the Mean Fluorescence Intensity (MFI, patient / control) illustrates the diminution of CD38 overexpression at M12, concomitant with a level of PD-1 expression back to normal (ratio close to 1).

Annexe 4 : Article 3

Hadjadj*, J., Planas*, D., Ouedrani*, A., Delage[§], L., Buffier[§], S., Nguyen[§], Y., Bruel[§], T., ..., Terrier, B. (2021). Immunogenicity of BNT162b2 Vaccine Against the Alpha and Delta Variants in Immunocompromised Patients. *Soumis*

* These authors contributed equally to this work [§] These authors contributed equally to this work

Background. Immunosuppressants and immunomodulators impair immune response to SARS-CoV-2, increasing odds of severe coronavirus disease 2019 (Covid-19) and reducing vaccine efficacy. Emergence of strains of SARS-CoV-2 exhibiting increase viral fitness and immune escape potential, such as the Delta variant (B.1.617.2), further lower vaccine efficacy. To what extent Delta evades vaccine-induced immunity in immunocompromised individuals in patients with systemic inflammatory diseases remains unclear.

Methods. We conducted a prospective study in patients with systemic inflammatory diseases (cases) and healthy controls receiving two doses of BNT162b2 28 days apart. The primary end points were the levels of anti-spike antibodies and cross-neutralization of Alpha and Delta variants 3 months after BNT162b2 vaccine. Secondary end points were T cell responses, breakthrough infections and safety.

Results. Sixty-four cases and 21 controls not previously infected with SARS-CoV-2 were included and analyzed. Kinetics of anti-spike IgG and IgA after BNT162b2 vaccine showed a lower and delayed induction in cases compared to controls, much more pronounced in patients treated with rituximab. Administration of two doses of BNT162b2 generated a neutralizing response against the alpha and delta variants in 100% of controls, while sera from only one individual in the rituximab group neutralized alpha (5%) and none neutralized delta. In individuals under other therapeutic regimens, BNT162b2 induced an intermediate neutralizing activity against alpha, an effect further amplified when evaluating the efficacy of sera to neutralize the delta variant. All controls and cases except those treated with methotrexate showed the ability to mount a SARS-CoV-2 specific T-cell response. Methotrexate completely abrogated T-cell responses after one dose and dramatically impaired T-cell responses after 2 doses of BNT162b2 compared to controls and cases with other treatments.

Conclusions. Rituximab and methotrexate differentially modulate the immunogenicity of BNT162b2, by impairing B-cell and T cell responses, respectively. Delta fully escape the sub-optimal humoral response of individuals treated with rituximab. These findings support efforts to improve BNT162b2 immunogenicity in immunocompromised individuals

Immunogenicity of BNT162b2 vaccine Against the Alpha and Delta Variants in Immunocompromised Patients

J rome Hadjadj^{1*}, Delphine Planas^{2,3*}, Amani Ouedrani^{4*}, Solene Buffier^{1\$}, Laure Delage^{5,6\$}, Yann Nguyen^{7\$}, Timoth e Bruel^{2,3\$}, Marie-Claude Stolzenberg⁵, Isabelle Staropoli², Natalia Ermak⁸, Laure Macraigne⁴, Caroline Morbieu¹, Soledad Henriquez¹, David Veyer^{9,10}, Hélène P r ⁹, Marion Casadevall¹, Luc Mouthon¹, Frédéric Rieux-Laucat^{5#}, Lucienne Chatenoud^{4#}, Olivier Schwartz^{2,3#}, Benjamin Terrier¹

¹Department of Internal Medicine, National Reference Center for Rare Systemic Autoimmune Diseases, AP-HP, APHP.CUP, Hôpital Cochin, 75014, Paris, France.

²Virus & Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur; CNRS UMR 3569, Paris, France

³Vaccine Research Institute, Creteil, France

⁴Universit  de Paris, Paris, Institut Necker-Enfants Malades-CNRS UMR8253, Inserm UMR1151, Laboratoire d'Immunologie Biologique AP-HP, APHP.CUP, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75014, Paris, France

⁵Universit  de Paris, Institut Imagine, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, F-75015 Paris, France.

⁶Checkpoint Immunology, Immunology and Inflammation Therapeutic Area, Sanofi, Vitry-sur-Seine, France.

⁷Department of Internal Medicine, APHP.Nord, Hôpital Beaujon, Université de Paris, F-92110 Clichy, France

⁸Department of General Biochemistry, Hôpital Cochin, 75014, Paris, France.

⁹INSERM, Functional Genomics of Solid Tumors (FunGeST), Centre de Recherche des Cordeliers, Université de Paris and Sorbonne Université, Paris, France.

¹⁰Laboratoire de Virologie, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France.

* These authors contributed equally to this work.

\$ These authors contributed equally to this work.

These authors are co-senior authors.

Collaborators (indexed in PubMed) : Philippe Blanche, Benjamin Chaigne, Pascal Cohen, Nathalie Costedoat-Chalumeau, Bertrand Dunogu , Laure Frumholtz, Gaelle Guettrot-Imbert, Véronique Le Guern, Loic Guillevin, Claire Le Jeunne, Xavier Puechal, Tali-Anne Szwebel

Article type: Original article

Keywords: SARS-CoV-2, Covid-19, vaccination, Delta variant, rituximab, methotrexate

Word count : Abstract 247 words, Manuscript 2637 words , 27 References, 1 Table, 4 Figures, 1 Supplementary Appendix, 4 Supplementary Tables, 9 Supplementary Figures.

Correspondence: Prof. Benjamin Terrier, Département de M decine Interne, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris Cedex 14, France. Phone: +33 (0)1 58 41 14 61; Fax: +33 (0)1 58 41 14 50; E-mail: benjamin.terrier@aphp.fr

Funding :

- This study was supported by the Fonds IMMUNOV, for Innovation in Immunopathology.
- Work in OS lab is funded by Institut Pasteur, Urgence COVID-19 Fundraising Campaign of Institut Pasteur, Fondation pour la Recherche Médicale, ANRS, the Vaccine Research Institute (ANR-10-LABX-77), Labex IBEID (ANR-10-LABX-62-IBEID), ANR/FRM Flash Covid PROTEO-SARS-CoV-2 and IDISCOVER. DP is supported by the Vaccine Research Institute

Declaration of interests : T.B., I.S. and O.S. are coinventors on provisional patent no. US 63/020,063 entitled ‘S-Flow: a FACS-based assay for serological analysis of SARS-CoV-2 infection’ submitted by Institut Pasteur.

Abstract

Background. The emergence of strains of SARS-CoV-2 exhibiting increase viral fitness and immune escape potential, such as the Delta variant (B.1.617.2), raises concerns in immunocompromised patients. To what extent Delta evades vaccine-induced immunity in immunocompromised individuals with systemic inflammatory diseases remains unclear.

Methods. We conducted a prospective study in patients with systemic inflammatory diseases (cases) and controls receiving two doses of BNT162b2. Primary end points were anti-spike antibodies levels and cross-neutralization of Alpha and Delta variants after BNT162b2 vaccine. Secondary end points were T-cell responses, breakthrough infections and safety.

Results. Sixty-four cases and 21 controls not previously infected with SARS-CoV-2 were analyzed. Kinetics of anti-spike IgG and IgA after BNT162b2 vaccine showed lower and delayed induction in cases, more pronounced with rituximab. Administration of two doses of BNT162b2 generated a neutralizing response against Alpha and Delta in 100% of controls, while sera from only one of rituximab-treated patients neutralized Alpha (5%) and none Delta. Other therapeutic regimens induced a partial neutralizing activity against Alpha, even lower against Delta. All controls and cases except those treated with methotrexate mounted a SARS-CoV-2 specific T-cell response. Methotrexate abrogated T-cell responses after one dose and dramatically impaired T-cell responses after 2 doses of BNT162b2.

Conclusions. Rituximab and methotrexate differentially impact the immunogenicity of BNT162b2, by impairing B-cell and T-cell responses, respectively. Delta fully escapes the humoral response of individuals treated with rituximab. These findings support efforts to improve BNT162b2 immunogenicity in immunocompromised individuals (Funded by the Fonds IMMUNOV; ClinicalTrials.gov number, NCT04870411).

Introduction

The course of Coronavirus-induced disease 2019 (Covid-19) is less favorable in patients with systemic inflammatory diseases. Older age, male gender, cardiovascular disease and obesity are risk factors of severe forms and Covid-19-related death in this immunocompromised population¹⁻⁴, as it is in the general population^{5,6}. Disease-specific factors including disease activity and treatments, especially glucocorticoids, mycophenolate mofetil and rituximab, are additional risks factors¹⁻³.

BNT162b2 and mRNA-1273 Covid-19 vaccines have been developed using a novel liposomal mRNA-based delivery platform. These vaccines have a good safety profile, induce strong and persistent B-cell and T-cell responses^{7,8} and are highly effective to prevent SARS-CoV-2 infection, hospitalization and death with the ancestral strain and the Alpha (B.1.1.7) variant⁹.

The efficacy of vaccine has been recently mitigated by variants of SARS-CoV-2 exhibiting increase viral fitness and immune escape potential. Among them, the Delta variant (B.1.617.2) was first identified in India in October 2020 and rapidly became the predominant strain across the globe¹⁰. While *in vitro* data indicate reduced sensitivity of Delta variant to antibody neutralization¹¹, only modest differences in vaccine effectiveness are noted with Delta as compared to Alpha¹². In patients with systemic inflammatory diseases, the use of rituximab and methotrexate, commonly used to induce and maintain remission, decreases seroprotection rate following vaccination against influenza, pneumococcus and ancestral and Alpha variants of SARS-CoV-2¹³⁻¹⁶. Yet, how the different immunosuppressive or immunomodulatory drugs tune humoral and cellular responses, and how the Delta variant impacts vaccine effectiveness in this population remains unclear.

In this study, we measured seroconversion, cross-neutralization of Alpha and Delta variants and T-cell responses induced by BNT162b2 in immunocompromised patients with systemic inflammatory diseases according to the treatments received.

Methods

Study design

The prospective COVADIS study (NCT04870411) included patients with systemic inflammatory diseases managed in Cochin Hospital, University of Paris (Paris, France). Healthcare immunocompetent workers from the same hospital were included as controls. Patients with a positive Covid-19 serology at baseline were excluded from the main analysis. Cases and controls received two doses of BNT162b2 28 days apart. Four groups of patients receiving different immunosuppressive or immunomodulatory drugs were defined: patients receiving rituximab (“rituximab” treatment group), methotrexate (“methotrexate” group), conventional Disease-Modifying Anti-Rheumatic drugs (cDMARDs) except for methotrexate (“cDMARDs” group), and those receiving other strategies described to have limited impact on vaccine immunogenicity (“other” treatment group).

Clinical and laboratory data

Clinical data were collected at baseline and during follow-up until month 3. To evaluate vaccine immunogenicity, blood samples were collected before the first dose of vaccine (M0), one month later just before the second dose (M1), and at 3 months (M3).

Outcomes

Primary end points were BNT162b2 immunogenicity and cross-neutralization of Alpha and Delta variants at 3 months, i.e. after two vaccine doses, defined by neutralization titer (median of the half maximal effective dilution, ED50) for both virus with ED50 above 30. Secondary end points were the proportion of patients with positive anti-SARS-CoV-2 antibodies (define as an antibody binding unit (BU) above 1.1 for IgG and 0.2 for IgA) at M1 and M3, T-cell response defined by the number of circulating SARS-CoV-2-spike-specific IFN γ -producing T cells at M1 and M3, breakthrough infections and safety.

T and B cell immunophenotyping

Extended B cell and T cell immunoprofiling were performed on whole blood as described in the **Supplementary Appendix** and **Supplementary Figures 1-2**.

S-Flow assay

The S-Flow assay was used to detect antibodies bound to 293T cells stably expressing the spike protein (S) at their surface using flow cytometry. This assay is highly sensitive and allows quantification of antibodies through a standardized MFI (referred as Binding Unit ; BU), which is calculated using an anti-spike monoclonal antibody as reference. The method is described in the **Supplementary Appendix**.

Virus strains

The Alpha (B.1.1.7) variant originated from an individual returning from the United Kingdom. The Delta (B.1.617.2) variant originated from a hospitalized patient returning from India. The variant strains were isolated from nasal swabs using Vero E6 cells and amplified by two passages. Additional information is described in the **Supplementary Appendix**.

S-Fuse neutralization assay

The S-Fuse neutralization assay was used to assess the neutralizing activity of sera against emerging variants. The method is described in the **Supplementary Appendix**.

T-cell response using enzyme-linked immunoSpot (EliSpot)

SARS-CoV-2-specific IFN γ -producing T cells were identified by using commercially available pools derived from a peptide scan through SARS-CoV-2 N-terminal (pool S1) and C-terminal (pool S2) fragments of spike glycoprotein (JPT Peptide Technologies GmbH, BioNTech AG, Berlin, Germany). Results are expressed as Spot Forming Unit (SFU)/10⁶ CD3⁺ T cells after subtracting background values from wells with non-stimulated cells. The method is described in the **Supplementary Appendix**.

Statistical analysis

No statistical methods were used to predetermine sample size. The experiments were performed in blind regarding to the allocation groups. Flow cytometry data were analyzed with FlowJo v.10 software (TriStar). Calculations were performed using Excel 365 (Microsoft). Figures were drawn using GraphPad Prism 9. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 9. Statistical significance between different groups was calculated using the tests indicated in each figure legend. Detailed statistical analysis is described in the **Supplementary Appendix**.

Results

Patients characteristics

Between January and April 2021, 77 cases and 28 controls were included in the study. Twenty participants (13 cases and 7 controls) with positive SARS-CoV-2 serological tests at baseline were excluded from the main analysis (**Figure 1**). Finally, 64 cases and 21 controls were analyzed. Baseline characteristics of patients are shown in **Table 1**. Median age in controls and cases was 56 [39.5-59.5] and 52 [37.8-66.3] years, respectively. The immunological characteristics are shown in **Supplementary Table 1 and Supplementary Figures 3-4**. Compared to controls, cases showed lower total lymphocytes count. As expected, in the “rituximab” treatment group, circulating B cells were not detected (except in one patient) and levels of IgG, IgA and IgM were lower.

Induction of anti-spike antibodies after BNT162b2 vaccine

First, we analyzed the kinetics of induction of anti-spike IgG and IgA in patients' sera after the first and second dose of BNT162b2 vaccine. We observed a delayed response in cases compared to controls. Anti-spike IgG and IgA inductions were detectable mainly after the

second dose in cases, whereas it was noted from the first dose in controls (**Supplementary Figure 5**). On samples collected after the 2 doses, at 3 months, all treatment groups except the “other” group showed significantly lower anti-spike IgG levels than controls (**Figure 2A**). The “rituximab” group showed the lowest response. Then, we categorized individuals who seroconvert in IgG or IgA at M3 as “responders”. All controls and cases from the “other” treatment group seroconverted in IgG (**Figure 2B**). “Rituximab” showed again the lowest response, with only 50% of individuals who seroconverted at M3 (**Figure 2B**). “Methotrexate” and “cDMARDs” treatment groups showed intermediate levels of anti-spike IgG levels at 3 months, with 93% and 68% of individuals who seroconverted, respectively (**Figure 2A-B**). A large inter-individuals variability was observed in these two groups. The use of azathioprine or mycophenolate mofetil did not discriminate between responders and non-responders in the cDMARDs group. Anti-spike IgA levels after two doses of BNT162b2 were lower than for IgG in all cases and controls (**Figure 2A-B**). Anti-spike IgA levels after the first and second doses of BNT162b2 vaccine were significantly lower in patients treated with rituximab and methotrexate compared to controls and cases from the “cDMARDS” and “other” treatment groups (**Figure 2A and 2B and Supplementary Figure 5**). Analysis of the circulating follicular helper CD4⁺ T cells after the first and second dose showed a delayed increase in cases compared to controls, occurring mainly after the second dose in patients treated by methotrexate and cDMARDS and detected after the first dose in controls. No difference was observed in the proportion of memory B cells (**Supplementary Figure 6**).

Neutralization of Alpha and Delta variants by sera after BNT162b2 vaccine

We next examined whether BNT162b2 vaccine-elicited antibodies at month 3 neutralized the Alpha and Delta variants in cases and controls (**Figure 2C-D**). Median ED50 for Alpha in controls and in cases from the “rituximab”, “methotrexate”, “cDMARDS” and “other” treatment

groups were 1942, <7.5, 199, 65 and 2173, respectively; and 539, <7.5, 31, <7.5 and 270 for Delta (**Figure 2C**). Delta was 4-fold less sensitive to neutralization than Alpha in the controls, confirming previous observation¹¹. Among cases, titers were reduced by 6-fold between Delta and Alpha in the "methotrexate" group, 9-fold in the "cDMARDs" group, 8-fold in the "other" group. The lack of neutralization in the "rituximab" group impaired the calculation of a fold decrease.

Then, we arbitrarily classified individuals as neutralizers according to the detection of neutralizing antibodies at a serum dilution of 1:30 and non-neutralizers. Administration of two doses of BNT162b2 generated a neutralizing response against the Alpha and Delta variants in 100% of controls. Only one individual in the "rituximab" group neutralized Alpha (5%) and none neutralized Delta (**Figure 2C-D**). Sera of 87% of patients in the "methotrexate" group neutralized Alpha, dropping to 57% against Delta (**Figure 2D**). Sera from patients in the "cDMARDs" group neutralized Alpha and Delta in 53% and 42%, respectively. Nine (14%) cases neutralized Alpha but not Delta, including 5 patients treated with methotrexate, 2 with cDMARDs, 1 with rituximab and 1 with anti-TNF- α therapy. Correlation between Alpha and Delta neutralization titers, and between IgG production and ED50 of Alpha variant was strong in all participants except for those receiving rituximab and cDMARDs (**Supplementary Figure 7**).

The lack of neutralization of Delta was associated with active disease ($P<0.001$), the use of rituximab ($P<0.001$), glucocorticoids ($P=0.007$) and low IgM ($P=0.047$) and IgG2 ($P=0.05$) levels (**Supplementary Table 3**). In multivariate analysis, ED50 of Delta remained negatively associated with rituximab ($P<0.001$), methotrexate ($P<0.001$) and cDMARDs ($P<0.001$) (**Supplementary Table 4**).

Overall, B-cell response to BNT162b2 vaccine was impaired in immunocompromised patients at different levels depending on the treatments received. The effect was further amplified when evaluating the efficacy of sera to neutralize the Delta variant.

Seroconversion and neutralization of Alpha and Delta variants in Convalescent Vaccinated Individuals

We then quantified anti-spike IgG and IgA and neutralization activity 3 months after vaccination in the 7 controls and 13 cases who had been previously infected with SARS-CoV-2 and excluded from the main analysis (**Supplementary Figure 8**). In convalescent controls, vaccination boosted levels of anti-spike IgG and IgA as well as neutralizing antibody titres against both variants, as compared to the uninfected vaccinated control group. In previously infected cases under immunosuppressive or immunomodulatory drugs, a low response remained after vaccination.

T-cell Response to BNT162b2 Vaccine

We next investigated whether controls and cases mounted a SARS-CoV-2 specific T-cell response following the first and second doses of BNT162b2 vaccine (**Figure 3** and **Supplementary Figure 9**). All controls (except one) and cases except those from the “methotrexate” treatment group had similar levels of specific T-cells in response to S1 pool (**Figure 3A**). Methotrexate completely abrogated T-cell responses after one dose and dramatically impaired T-cell responses after 2 doses of BNT162b2 compared to controls and cases from other treatment groups (**Figure 3A and 3B**). Similar results, but less pronounced, were observed for S2 peptide pool (**Figure 3A and Supplementary Figure 9**). Importantly, despite the absence of neutralizing activity in response to BNT162b2, patients receiving rituximab showed increased levels of specific T-cell responses that reached after a delay the same levels as controls (**Figure 3A and 3B**). The relationship between humoral and cellular

immune responses against SARS-CoV-2 is shown in **Figure 4**, highlighting the impact of the different treatment groups on both humoral and cellular responses. The lack of T-cell response was associated with the use of methotrexate ($P=0.045$) and glucocorticoids ($P=0.012$). In multivariate analysis, no variable correlated with SARS-CoV-2-specific IFN γ -producing T cells. Also, no significant differences in the proportion of circulating CD4 $^{+}$ memory T cells and Th1 T cells after the first and second dose of BNT162b2 were found in all groups (**Supplementary Figure 6**).

Overall, T-cell responses to S1 and S2 peptide pools were similar in cases compared to the controls except methotrexate treated patients showing significantly decreased T-cell responses.

Clinical Outcomes After BNT162b2 Vaccine

At 3 months of follow-up, 2 patients from the cohort developed Covid-19, as confirmed by a positive SARS-CoV-2 RT-qPCR test in nasopharyngeal swab for Alpha and Beta variants. Both individuals belonged to the “rituximab” treatment group. Symptoms started 4 and 7 days after the second dose of vaccine. They were treated with anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies with a good outcome. Four patients (6.3%) experienced a disease flare within the 3 months following the first dose of vaccine, two patients with systemic lupus erythematosus and two with systemic vasculitis, leading to modification of immunosuppressive regimen.

Discussion

As the Delta variant spreads across the globe, aggregating data on the effectiveness of Covid-19 vaccines in specific immunocompromised populations is a critical issue. Data from solid organ transplant recipients, patients with malignant hemopathy or with chronic inflammatory arthritis suggested that risk factors for reduced SARS-CoV-2 vaccine immunogenicity included older age and treatments with glucocorticoids, rituximab, mycophenolate mofetil and abatacept^{15,17-19}. However, levels of anti-spike antibodies were mainly measured and few studies used neutralization assay or assessed T-cell response.

Additional studies specifically reported that B cell depletion by rituximab blocked humoral but not T cell response to vaccination, using anti-RBD IgG measurement and IFN γ ELISPOT T-cell response. SARS-CoV-2 antibody response was reported in 0 to 39% of the vaccinated B-cell-depleted patients, whereas T cell responses were noted in 58 to 100%^{20,21}. This early assessment showed that humoral immunity to one or two doses of BNT162b2 was also impaired by methotrexate treatment²²⁻²⁴. However, conflicting results were found for cellular responses showing either preserved²² or impaired T-cell activation²⁴. Most of these studies assessed very early timepoints that may not allow an appropriate assessment of immune response after complete vaccination.

Sera from convalescent and vaccinated individuals neutralize less efficiently the Delta variant than the Alpha¹¹. However, this was studied in the general population and assessing the sensitivity of the Delta variant to antibody neutralization in immunocompromised populations is thus necessary.

In this study, we focused on patients with systemic inflammatory diseases that were receiving rituximab, methotrexate and/or other cDMARDs, and provided important data regarding sensitivity to Delta variant according to the treatments used. We analyzed patients after the first and the second doses of the BNT162b2 vaccine. We report a delayed and lower induction of

anti-spike IgG and IgA compared to controls, much more pronounced with rituximab. While two doses of BNT162b2 generated a neutralizing response against Alpha and Delta variants in 100% of controls, 95% of sera from patients treated with rituximab did not neutralize these two variants. In contrast, SARS-CoV-2 specific T-cell response were similarly measured in controls and cases with the exception of methotrexate-treated patients. This differential impairment of immunogenicity after BNT162b2 vaccine according to the treatments received, mainly for rituximab and methotrexate, is critical to identify patients in which optimization of vaccine strategies should be evaluated.

To counteract this impaired immunogenicity, the administration of a third dose of mRNA-based vaccine has been proposed. Recent data in solid-organ transplant recipients showed that a third dose of BNT162b2 vaccine increased the prevalence of seroconversion and antibody titers, without serious adverse events²⁵⁻²⁷. A third dose also increased specific cellular response even in patients who remained seronegative²⁷.

Our study has several limitations. The findings are observational and based on small numbers and should be interpreted with caution. Differences in treatment groups were highly associated with the type of underlying inflammatory disease, and there may be differences among the populations. However, except for more frequent renal involvement at diagnosis in the “rituximab” group and younger age in the “cDMARDs” group, patients’ characteristics were comparable between treatment groups.

Overall, we found that rituximab and methotrexate differentially impact the immunogenicity of BNT162b2 vaccine, by impairing B-cell and T-cell responses, respectively. The Delta variant fully escapes the sub-optimal humoral response of individuals treated with rituximab. Our findings support efforts to improve effectiveness of mRNA vaccines in this immunocompromised population.

References

1. Avouac J, Drumez E, Hachulla E, et al. COVID-19 outcomes in patients with inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases treated with rituximab: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2021;3(6):e419–26.
2. FAI2R /SFR/SNFMI/SOFREMIP/CRI/IMIDIATE consortium and contributors. Severity of COVID-19 and survival in patients with rheumatic and inflammatory diseases: data from the French RMD COVID-19 cohort of 694 patients. *Ann Rheum Dis* 2020;annrheumdis-2020-218310.
3. Gianfrancesco M, Hyrich KL, Al-Adely S, et al. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann Rheum Dis* 2020;79(7):859–66.
4. Strangfeld A, Schäfer M, Gianfrancesco MA, et al. Factors associated with COVID-19-related death in people with rheumatic diseases: results from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann Rheum Dis* 2021;80(7):930–42.
5. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223):497–506.
6. Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020;
7. Sahin U, Muik A, Vogler I, et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* 2021;595(7868):572–7.
8. Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* [Internet] 2021 [cited 2021 Aug 3];Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03738-2>
9. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA

Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 2020;383(27):2603–15.

10. Reardon S. How the Delta variant achieves its ultrafast spread. *Nature* [Internet] 2021 [cited 2021 Aug 1]; Available from: <http://www.nature.com/articles/d41586-021-01986-w>
11. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* 2021;
12. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med* 2021;
13. Hua C, Barnetche T, Combe B, Morel J. Effect of methotrexate, anti-tumor necrosis factor α , and rituximab on the immune response to influenza and pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014;66(7):1016–26.
14. Oren S, Mandelboim M, Braun-Moscovici Y, et al. Vaccination against influenza in patients with rheumatoid arthritis: the effect of rituximab on the humoral response. *Ann Rheum Dis* 2008;67(7):937–41.
15. Braun-Moscovici Y, Kaplan M, Braun M, et al. Disease activity and humoral response in patients with inflammatory rheumatic diseases after two doses of the Pfizer mRNA vaccine against SARS-CoV-2. *Ann Rheum Dis* 2021;annrheumdis-2021-220503.
16. Park JK, Lee YJ, Shin K, et al. Impact of temporary methotrexate discontinuation for 2 weeks on immunogenicity of seasonal influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2018;77(6):898–904.
17. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA* 2021;325(21):2204–6.
18. Furer V, Eviatar T, Zisman D, et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study. *Ann Rheum Dis* 2021;annrheumdis-2021-

220647.

19. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell* 2021;S1535-6108(21)00389-5.
20. Simon D, Tascilar K, Schmidt K, et al. Brief Report: Humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination in B cell depleted autoimmune patients. *Arthritis Rheumatol* 2021;
21. Mrak D, Tobudic S, Koblichke M, et al. SARS-CoV-2 vaccination in rituximab-treated patients: B cells promote humoral immune responses in the presence of T-cell-mediated immunity. *Ann Rheum Dis* 2021;annrheumdis-2021-220781.
22. Mahil SK, Bechman K, Raharja A, et al. The effect of methotrexate and targeted immunosuppression on humoral and cellular immune responses to the COVID-19 vaccine BNT162b2: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2021;
23. Bugatti S, De Stefano L, Balduzzi S, et al. Methotrexate and glucocorticoids, but not anticytokine therapy, impair the immunogenicity of a single dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2021;annrheumdis-2021-220862.
24. Haberman RH, Herati R, Simon D, et al. Methotrexate hampers immunogenicity to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in immune-mediated inflammatory disease. *Ann Rheum Dis* 2021;annrheumdis-2021-220597.
25. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2021;
26. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal Serologic Response to 2 Doses. *JAMA* 2021;

27. Safety and Cross-Variant Immunogenicity of a Three-Dose COVID-19 mRNA Vaccine Regimen in Kidney Transplant Recipients by Filippo Massa, Marion Cremoni, Alexandre Gerard, Hanen Grabsi, Lory Rogier, Mathilde Blois, Nadia Ben Hassen, Matthieu Rouleau, Susana Barbosa, Emanuela Martinuzzi, Julien Fayada, Ghislaine Bernard, Guillaume Favre, Paul Hofman, Vincent LM Esnault, Cecil Czerkinsky, Barbara Seitz-Polski, Nicolas Glaichenhaus, Antoine Sicard :: SSRN [Internet]. [cited 2021 Aug 7]; Available from: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3890865

Tables

Table 1. Patients' characteristics at vaccination.

	All n = 64	Rituximab n = 22	Methotrexate n = 16	cDMARDs n = 19	Others n = 7
Age, years					
Median [IQR]	52 [37.8-66.3]	58.5 [48.3-67.8]	50 [38.5-72.3]	34 [30-53.5]	51 [44-58.5]
>50 yr, n (%)	35 (54.7)	16 (72.7)	8 (50)	7 (36.8)	4 (57)
Female, n (%)	48 (75)	15 (68.2)	11 (68.8)	15 (79)	7 (100)
Diagnosis					
Vasculitis					
AAV	18 (28.1)	18 (81.8)	0	0	0
Behçet's	2 (1.6)	0	0	2 (10.5)	0
Cryoglobulinemia vasculitis	2 (1.6)	2 (9.1)	0	0	0
Large vessel vasculitis	4 (6.3)	0	4 (25)	0	0
Connective Tissue Disease					
SLE	15 (23.4)	0	4 (25)	9 (47.4)	2 (28.6)
Systemic sclerosis	7 (10.9)	1 (4.5)	0	4 (21.1)	2 (28.6)
Sjogren Syndrome	2 (1.6)	1 (4.5)	1 (6.3)	0	0
Myositis	5 (7.8)	0	3 (18.8)	2 (10.5)	0
Inflammatory Rheumatic Diseases*	3 (4.7)	0	2 (12.5)	0	1 (14.3)
Sarcoidosis	3 (4.7)	0	1 (6.3)	1 (5.3)	1 (14.3)
Others	3 (4.7)	0	1 (6.3)	1 (5.3)	1 (14.3)
Disease duration (years), mean (SD)	9.5 (9)	9.2 (9.1)	10.1 (8)	8.4 (8.9)	12 (11.9)
Disease activity status					
Active disease n (%)	17 (26.5)	4 (18.2)	6 (37.5)	7 (36.8)	0 (0)
Renal involvement n (%)	19 (29.7)	9 (41)	3 (18.8)	6 (31.6)	1 (14.3)
Ongoing treatments n (%)					
Prednisone	45 (70.3)	13 (59.1)	12 (75)	17 (89.5)	3 (42.9)
Median mg/day (IQR)	7.5 (5-15)	5 (5-13.8)	7.5 (5-13.8)	10 (5-25)	5 (5-12.5)
cDMARDs					
Methotrexate	19 (29.7)	3 (13.6)	16 (100)	0	0
Azathioprine	5 (7.8)	0	0	5 (26.3)	0
Mycophenolate Mofetil	12 (18.8)	0	0	12 (63.2)	0
Cyclophosphamide	3 (4.7)	1 (4.5)	0	2 (10.5)	0
Biological therapies					
Anti-TNF- α	6 (9.4)	0	1 (6.3)	3 (15.8)	2 (28.6)
Rituximab	22 (34.4)	22 (100)	0	0	0
Tocilizumab	3 (4.7)	0	3 (18.8)	0	0
Belimumab	1 (1.6)	0	1 (6.3)	0	0

Hydroxychloroquine	15 (23.4)	2 (9.1)	4 (25)	7 (36.8)	2 (28.6)
No DMARDs, biologics or prednisone	1 (1.6)	-	-	-	1 (14.3)
Number of lines of previous treatments. n. median (IQR)	2 (1-3.8)	2 (1-4.3)	2 (1-4)	2 (1-3)	2 (1-2)

* Inflammatory Rheumatic Diseases : rheumatoid arthritis (n=2), spondyloarthritis (n=1).

Figure legends

Figure 1. Flow-chart of the study.

Figure 2. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 3 Months After BNT162b2 Vaccine.

A. Levels of anti-S IgG and IgA antibodies in the indicated groups after full vaccination at 3 months (M3) as determined by the SFlow assay. The Binding Unit (BU), in a log scale, is calculated using a serially diluted anti-S monoclonal antibody as standard. Dotted lines indicate threshold of positivity (BU=1.1 for IgG and 0.2 for IgA). Two-sided Kruskal-Wallis test with Dunn's test for multiple comparisons were performed. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

B. In each group, individuals were defined as a 'responders' (blue) if antibodies were detected above the threshold or non-responders' (gray) otherwise. Numbers of individuals in each group and percentages of responders are indicated.

C. Neutralizing titers of sera against Alpha and Delta variants are expressed as ED50 values, in a log scale. Dotted line indicates the limit of detection (ED50=30). Data are mean of two independent experiments. In each group, Wilcoxon paired t-test was performed to compared ED50 of Alpha *versus* Delta variants. Two-sided Kruskal-Wallis test with Dunn's test for multiple comparisons between group of treatment was performed. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

D. In each group, individuals were defined as a 'neutralizers' (blue for Alpha; orange for Delta) if neutralization was detected at the dilution 1:30 or 'non-neutralizers' (gray) otherwise. Numbers of individuals in each group and percentages of neutralizers are indicated.

Figure 3. Cellular Immune Response to SARS-CoV-2 After BNT162b2 Vaccine.

A. Quantification of SARS-CoV-2 specific T-cells responses using EliSpot at M3 in the indicated groups. Results were expressed as spot forming unit (SFU)/10⁶ CD3+ T-cells after subtraction of background values from wells with non-stimulated cells, in a log scale. Negative controls were PBMC in culture medium. Positive controls were PHA-P and CEFX Ultra SuperStim Pool. SARS-Cov-2 peptide pools tested were derived from a peptide scan through SARS-CoV-2 Spike glycoprotein (Left S1, N-terminal fragment, right: S2, C-terminal fragment). P values were determined with two-sided Kruskal-Wallis test with Dunn's test for multiple comparisons were performed. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

B. Kinetic of specific T-cells responses against the SARS-CoV-2 S1 peptide before the first dose (M0), before the second dose (M1) and after full vaccination at 3 months (M3) according to the treatments received. Data indicate median. Each dot represents a single patient.

Figure 4. Relationship Between Humoral and Cellular Immune Responses Against SARS-CoV-2.

Each dots represent the mean of all patients in the indicated groups. Bars are the standard deviation. X axis is the neutralization titer (ED50) for Alpha (left panel) or the levels of IgG (right panel). Y axis is the levels of S1-specific T-cell responses measured by ELISPOT. Dotted lines indicate the limit of detection.

Figure 1. Flow-chart of the study.

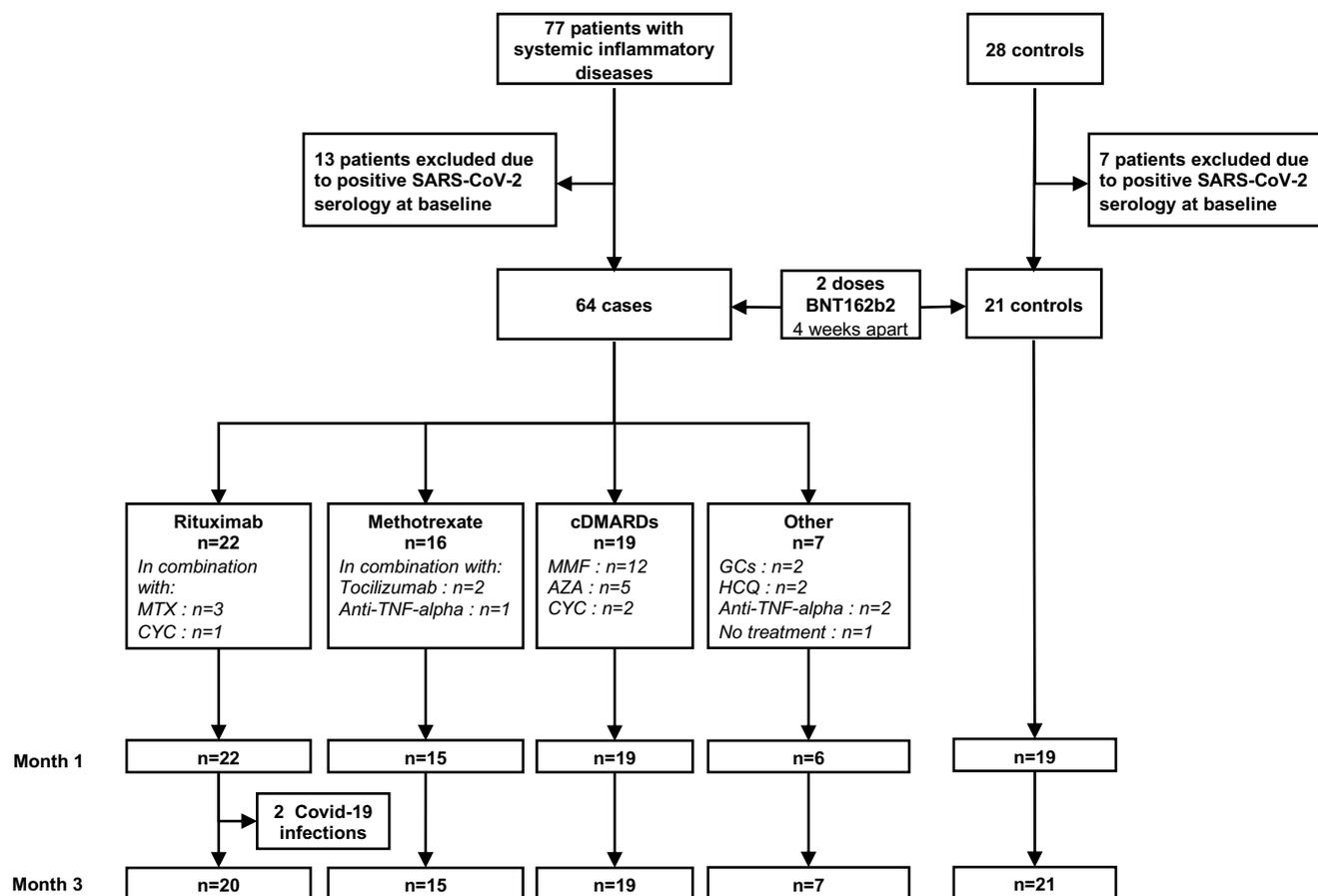


Figure 2. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 3 Months After BNT162b2 Vaccine.

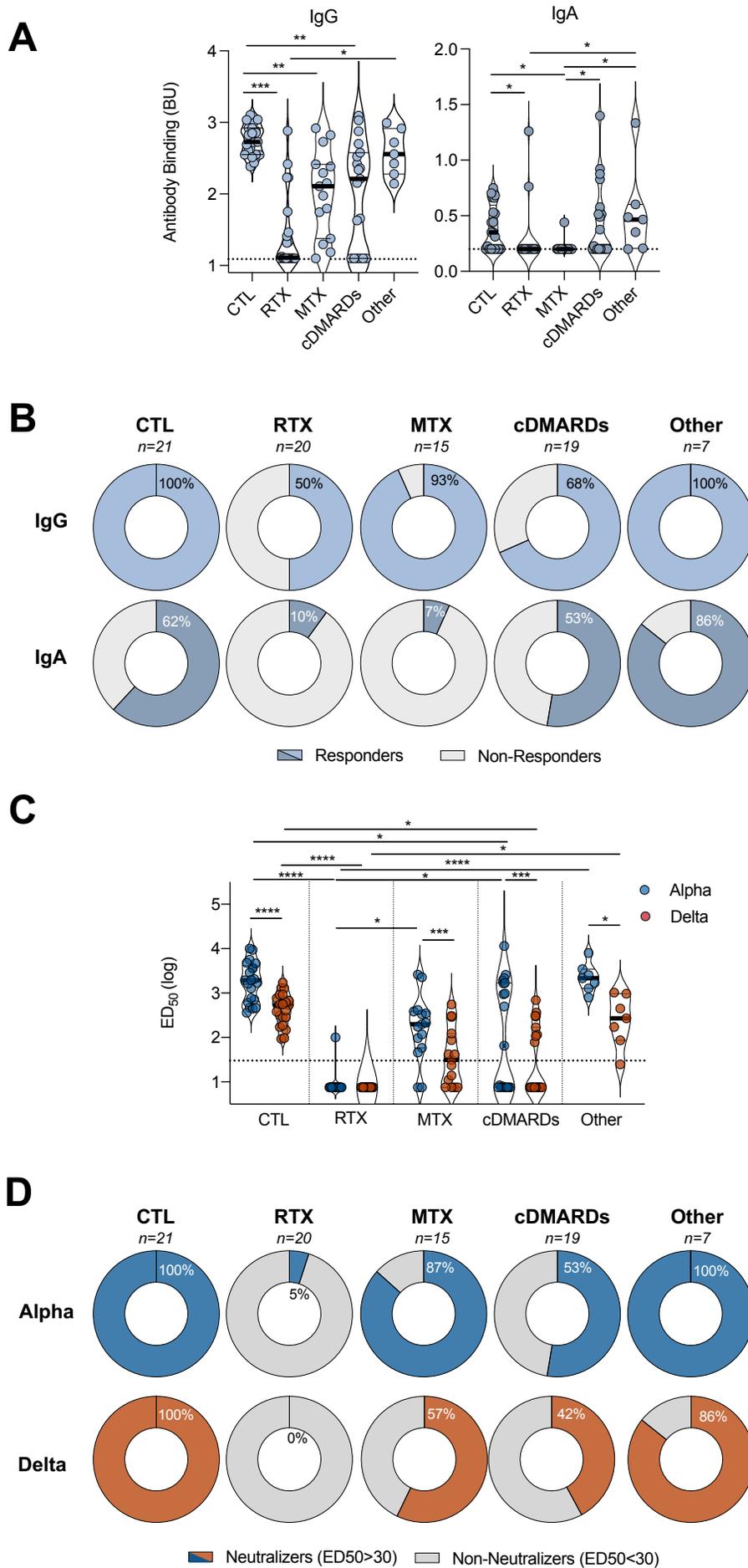


Figure 3. Cellular Immune Response to SARS-Cov-2 After BNT162b2 Vaccine.

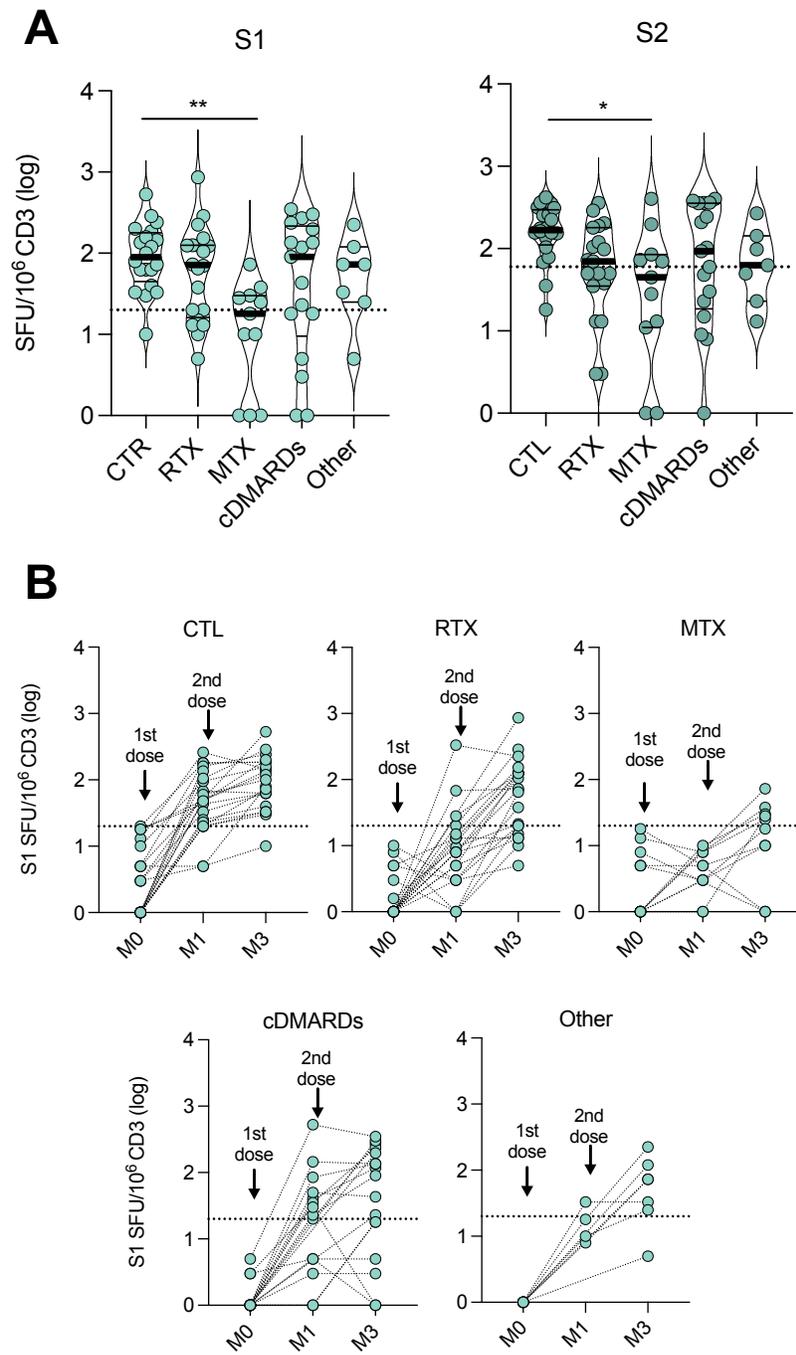


Figure 4. Relationship Between Humoral and Cellular Immune Responses Against SARS-CoV-2.

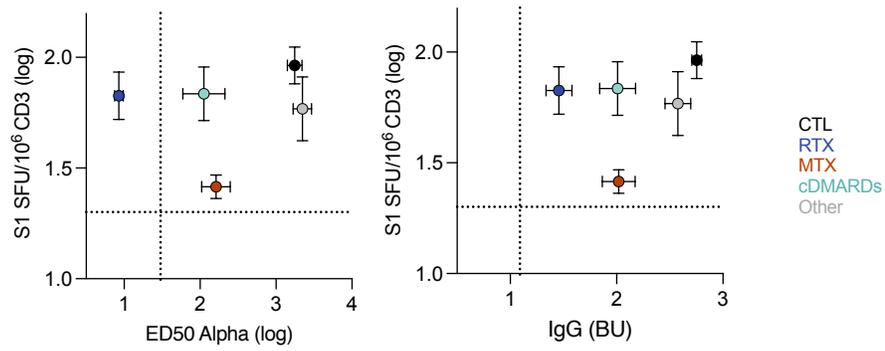
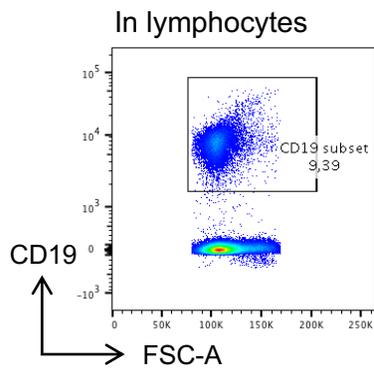


Figure S1. Gating strategy for immunoprofiling of B cell subpopulation compositions.



CD27+ IgD- : Switched memory B cells

CD27+ IgD+ : Zone marginal B cells

CD27- IgD+ : Naive B cells

CD27+24-38hi : Plasmablasts

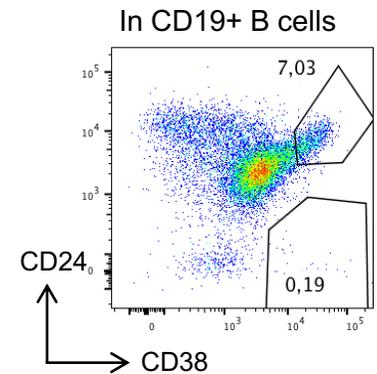
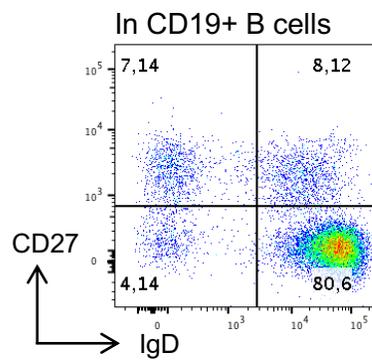
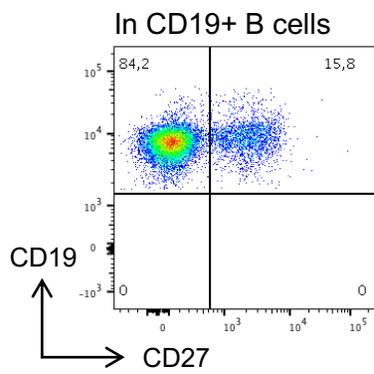
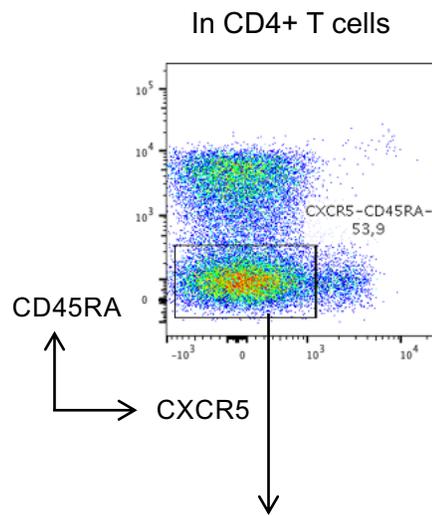
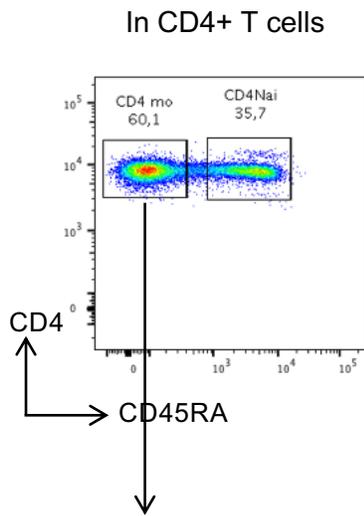
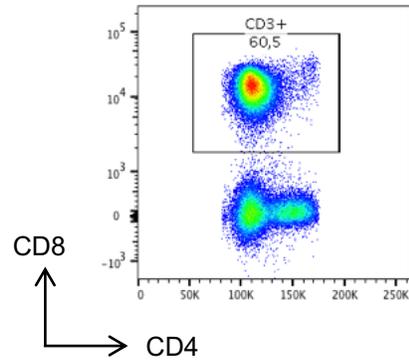
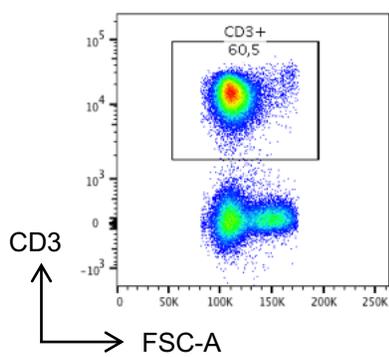
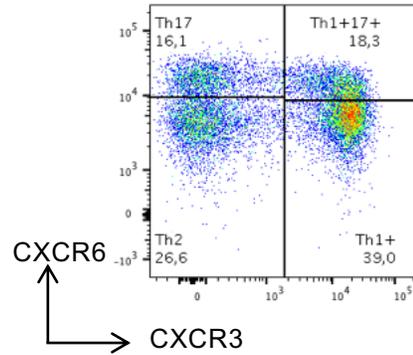
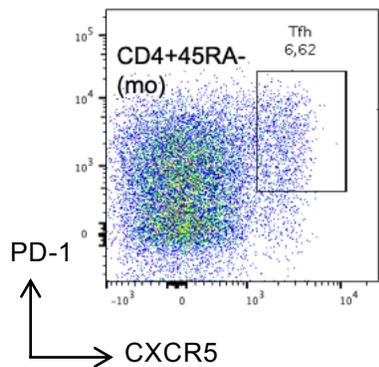


Figure S2. Gating strategy for immunoprofiling of T cell subpopulation compositions.



In CD45RA- memory CD4+ T cells

In CXCR5- CD45RA- memory CD4+ T cells



PD-1+ CXCR5+ follicular helper CD4+ T cells

CXCR3+ CXCR6- TH1 CD4+ T cells

Figure S3. Laboratory Findings in Patients Included in the Study.

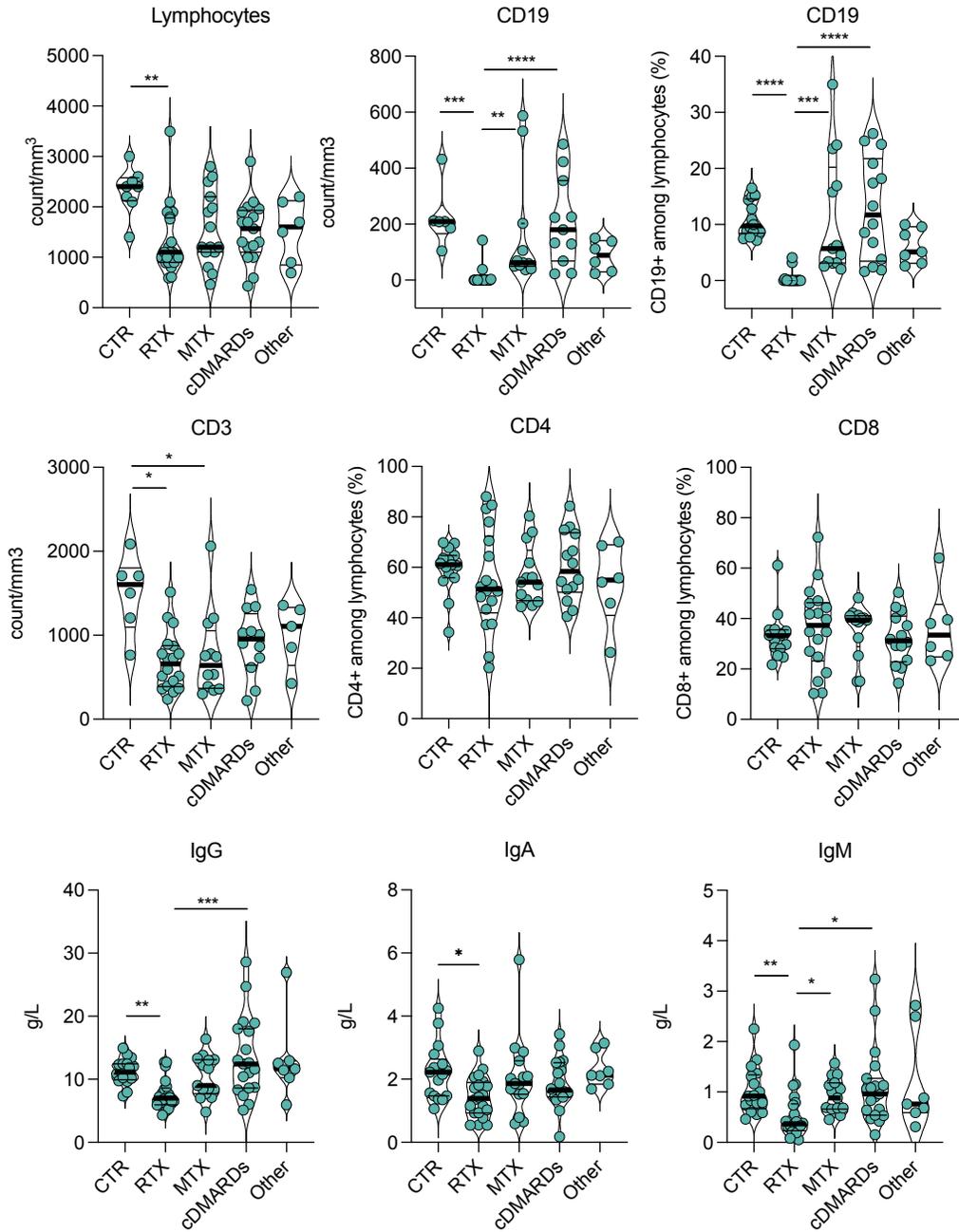


Figure S4. Immunoprofiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells at Baseline.

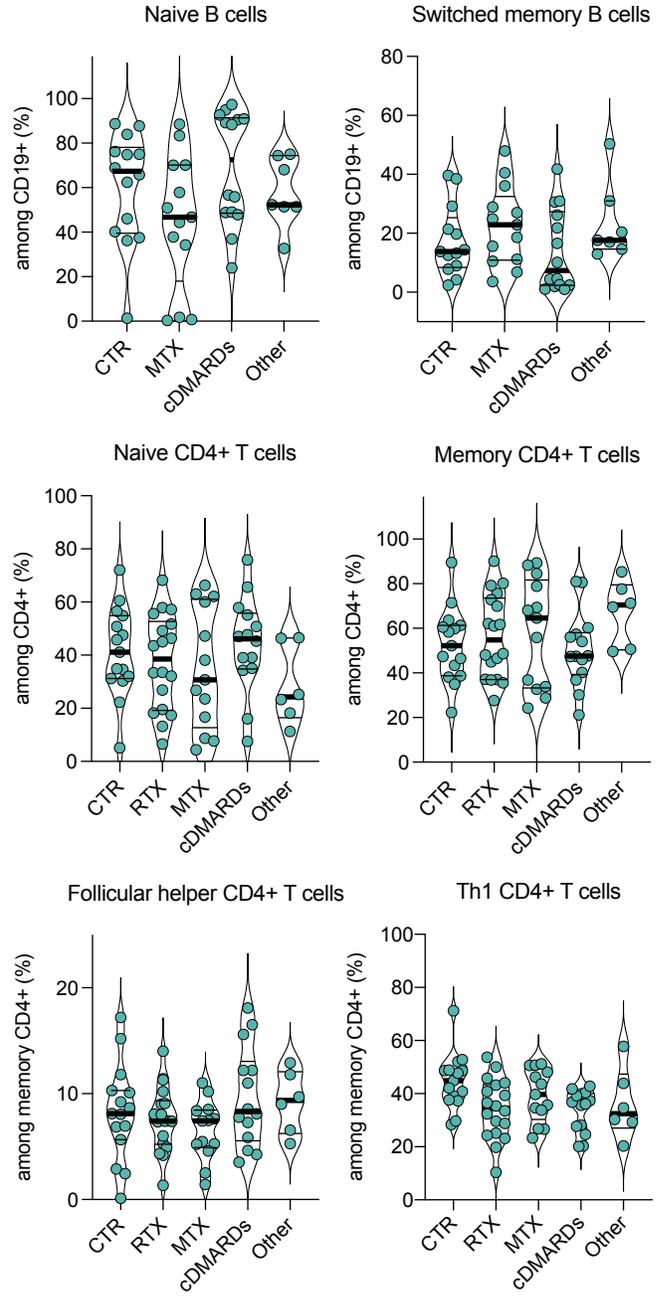


Figure S5. Kinetics of Anti-Spike IgG and IgA after BNT162b2 Vaccine.

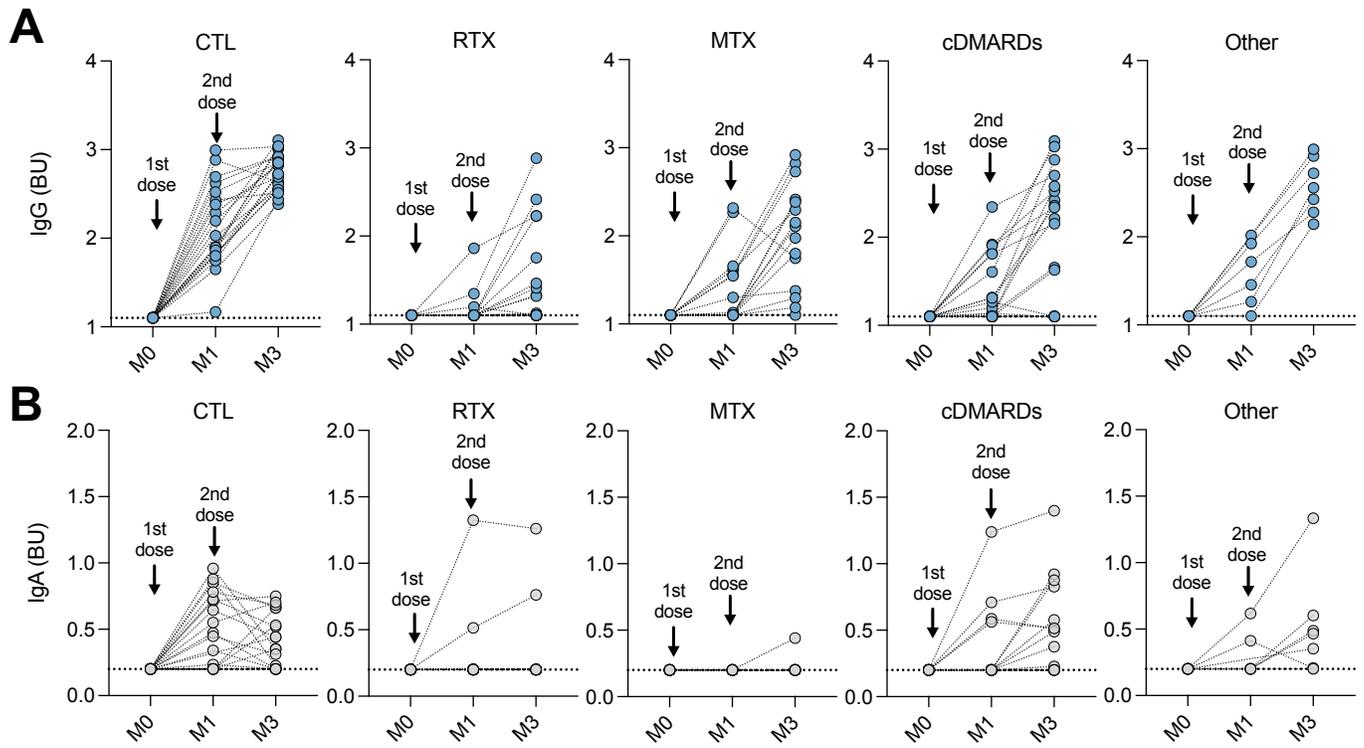


Figure S6. Kinetics of TH1 CD4+ T cells, Follicular Helper CD4+ T cells, Plasmablasts and Switched Memory B cells After BNT162b2 Vaccine.

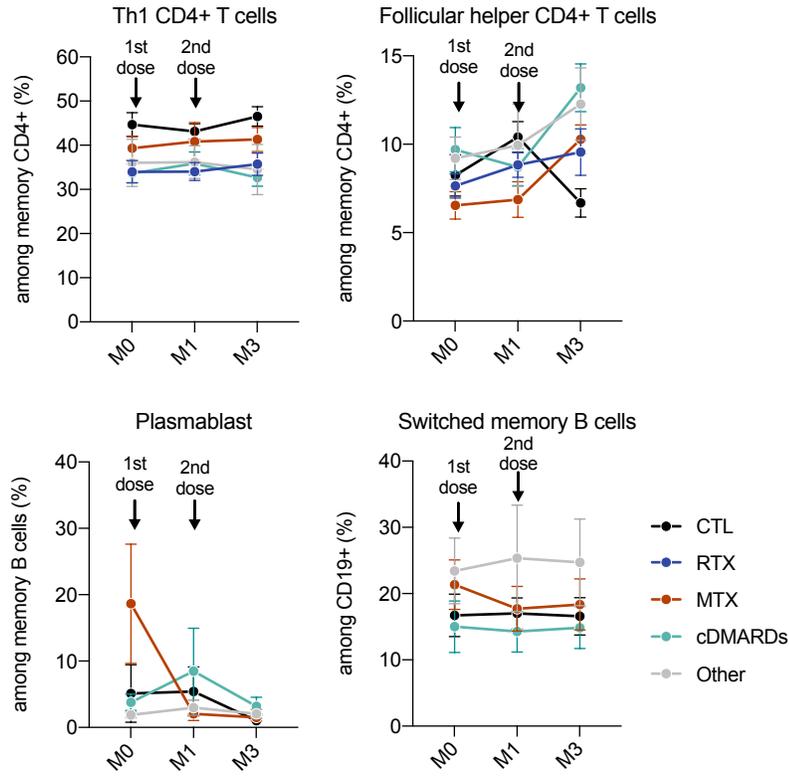


Figure S7. Cross-Neutralization Between Alpha and Delta Variants and Correlation with specific Anti-Spike IgG Levels at 3 Months.

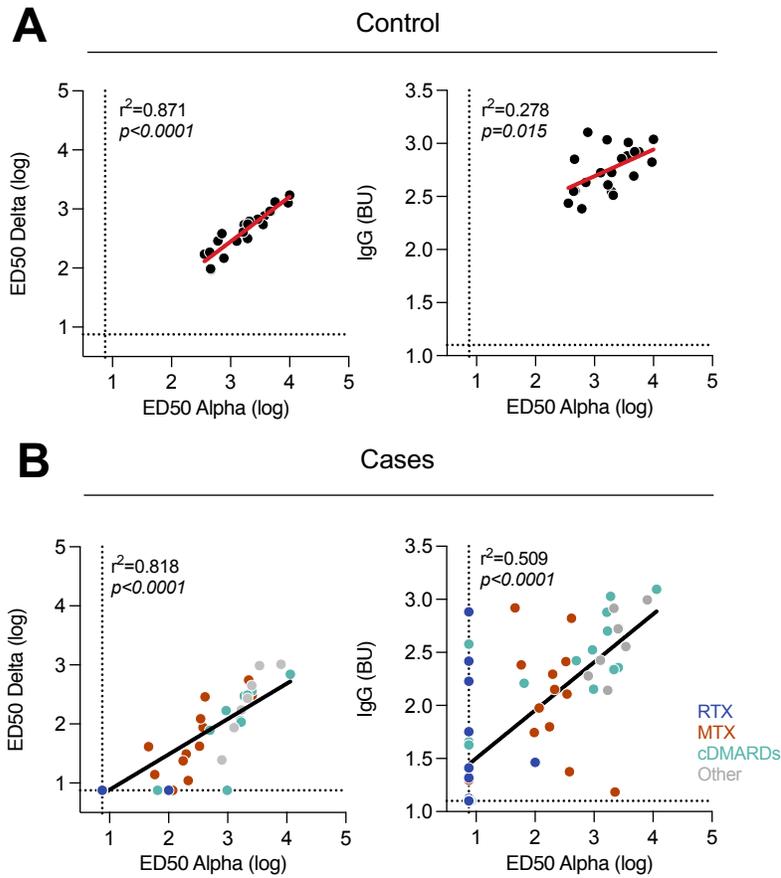


Figure S8. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Convalescent Vaccinated Individuals.

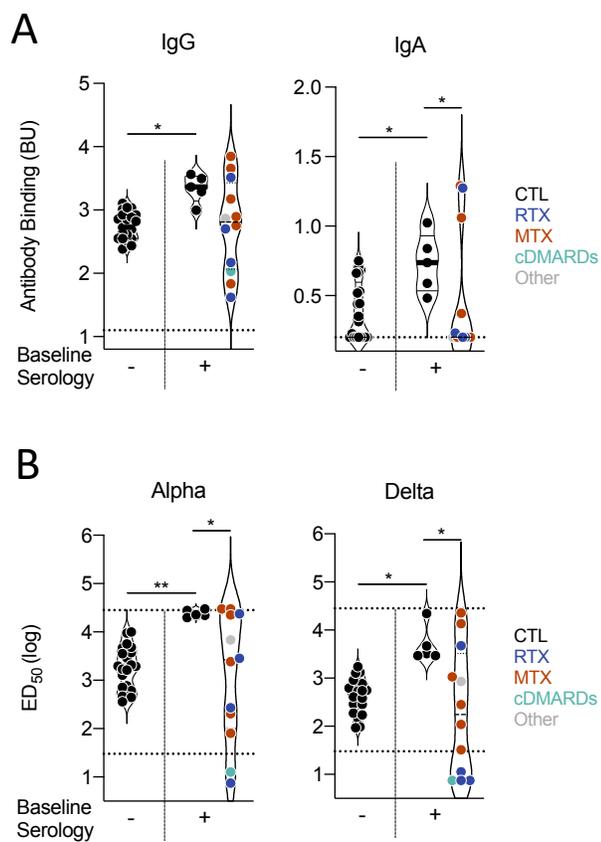
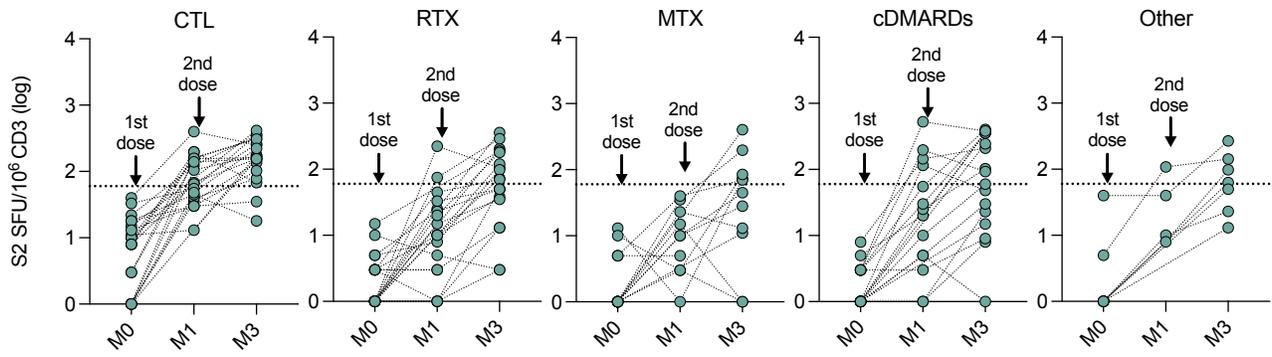


Figure S9. Kinetics of specific T-cell response against the SARS-CoV-2 S2 peptide pool.



Annexe 5 : Article 4 - en cours de rédaction

Meynier, S., O'Donoghue[†], A., Abdesslem[†], G., Caye, A., Strullu, M., Arfeuille, C., Luka, M., **Delage, L.**, ..., Rieux-Laucat, R. (2021). From Ras-associated Autoimmune Leukoproliferative Disorder to leukemia. *Article en cours de rédaction*

[†] These authors contributed equally to this work

Ras-associated lymphoproliferative disease (RALD) is a benign autoimmune disease associated with activating KRAS or NRAS somatic mutations. RALD share clinical features with a rare RAS-driven pediatric malignancy, the juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Intriguingly, some RALD patients progress to overt leukemia. T lymphocytes from RALD patients exhibit a resistance to the BIM-mediated Activated-Cell Autonomous Death (ACAD), but a normal FAS/FASLG-mediated Activation-Induced Cell Death (AICD). To understand and characterize the pathophysiological link between these two diseases, we assessed these apoptosis pathways in RALD, JMML and in a RALD patient who developed leukemia. We found that T cells from JMML patients exhibit a normal ACAD but an impaired AICD function related to a reduced FASL expression. By single cell RNA sequencing, we show a reduction of AICD signature, defined by FASL, Perforin, Granzyme B and TNF- α , in NK and cytotoxic CD8 T cells, between RALD stage and JMML stage. This process would be orchestrated by the patients' monocytes modifying the epigenetic of apoptosis genes, inhibiting their mRNA expression, in cytotoxic cells and thus reducing their capacity to monitor cancer cells.

Annexe 6 : Liste des primers PCR pour le séquençage en Sanger

Tableau 19: Primers pour confirmer les mutations de la cohorte de patients atteints du syndrome des plaquettes grises

Gène	Famille GPS	Exon	Primer Forward (3' -> 5')	Primer Revers (3' ->5')
NBEAL2	Famille 1	34	CTGGAGCCCCAGACTGC	GTGTCAGGGGAACCTCACC
NBEAL2	Famille 2	29	AGAGGGAAAGTCTGGAGGGG	AGGCAAGTCCACACTCACAG
NBEAL2	Famille 3	15	TGACCATGAGTTTGCCCGAA	GGACCCCAGTGGCTAAAGTC
NBEAL2	Famille 4	14	GATACAGCACCTACCCCTGC	GGACCAGGTTCTGGCTGAAG
NBEAL2	Famille 4	39	TGACCCCTCTAAGTGGTGCT	GGGGAGAATGGAGACAGGGA
NBEAL2	Famille 6	21	GGTCTGGAGGATCTGGGGAA	GAATGAGCAGAGGGCTCAGG
NBEAL2	Famille 6	45	CGAGGAGGCCCTCAATGTCTT	CCCCCATACTCTCCCATGTTT
NBEAL2	Famille 7	50	GTATGAACAGCCTTGGAGCTGG	CAGTGTGTATGATCACAGTTCCATC
NBEAL2	Famille 8	41	CAGACTAGGGGCAGATAAGG	GCAGACACATACTCCGACTC
NBEAL2	Famille 8	52	GAAGGCCAGATTGTGGTACAGA	AGGGGATATACACCAACTTGCG

Tableau 20: primers PCR pour confirmer les mutations des patients porteurs d'une mutation hétérozygote de LRBA et d'une mutation hétérozygote de NBEAL2

Gène	Mutation	Exon	Primer Forward (3' -> 5')	Primer Revers (3' ->5')
NBEAL2	c.3584G>A	25	CTGGGGTTCAGGGAGGTACA	CCTGAGGGACTGACCAGACT
LRBA	c.2527C>T	21	AAACTAAAGAAATTGCAATAGATGGA	CCCCGAAAAAGAAACACATTTAG
NBEAL2	c.2062C>T	15	TGACCATGAGTTTGCCCGAA	GGACCCCAGTGGCTAAAGTC
LRBA	c.109C>T	2	GAAGCGGGTGGCTAGTAGTG	ACCACATGGCTCCAGCTTTA

Tableau 21: Primers PCR pour confirmer les mutations des patients porteurs d'une mutation hémizygotique de DOCK11

Gène	Famille	Exon	Primer Forward (3' -> 5')	Primer Revers (3' ->5')
DOCK11	Famille A	36	TCATTGATGCTGAACTAATTACCAA	TGCTGGGCTTTAAAGATGGT
DOCK11	Famille B	38	TGGAGTGTTGGCCACTTATCT	CATCATATTGGCAATTTAAACCAGG
DOCK11	Famille C	8	TCCTGAGGGAGGGGAACAAA	GTCTATCAACCTCCACAGTCAC
DOCK11	Famille D	12	AGTCTGTTGTTTTGGAATGCCCT	GCCCTCAAACCTCAGTAACCAGA

Annexe 7 : Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR

Tableau 22: Primers utilisés pour les expériences de RT-qPCR

Gène	Primer Forward (3' -> 5')	Primer Revers (3' ->5')
CTLA-4	CACTATCCAAGGACTGAGGGC	GGCACGGTTCTGGATCAATTA
GAPDH	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	TTCACACCCATGACGAACAT
Actin	CGTCTTCCCCTCCATCGTG	TCGATGGGGTACTTCAGGGT
HPRT1	GAAAAGGACCCACGAAGTGT	AGTCAAGGGCATATCCTACAACA

Annexe 8 : Panels d'anticorps utilisés pour l'étude de l'expression des checkpoints immunitaires sur les lymphocytes T

Tableau 23: Panel d'anticorps pour l'étude de l'expression des checkpoints immunitaires inhibiteurs sur les lymphocytes T - mise au point sur le cytomètre spectral Sony SP6800

CHECKPOINTS INHIBITEURS – SONY SP6800 – LYMPHOCYTES T				
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
TCRab	Pe/Dazzle594	IP26	Sony	2133625
CD4	BV750	SK3	Biolegend	344643
CD8	AF532	RPA-T8	Thermofisher	58-0088-42
CD25	PE	2A3	BD	341011
CD127	BV570	A019D5	Biolegend	351307
CD45RA	Pacific blue	HI100	Sony	2120615
CCR7	FITC	G043H7	Sony	2366080
CTLA-4	APC	L3D10	Sony	2349535
BTLA	BV605	J168-540	BD	743986
LAG3	PE EF610	3DS223H	Thermofisher	61-2239-41
PD-1	BV421	EH12-2H7	Biolegend	329919
TIM3	BV711	F38-2E2	Sony	2325115
TIGIT	PECy7	A15153G	Biolegend	372713

Tableau 24: Panel d'anticorps pour l'étude de l'expression des checkpoints immunitaires activateurs sur les lymphocytes T - mise au point sur le cytomètre spectral Sony SP6800

CHECKPOINTS ACTIVATEURS – SONY SP6800 – LYMPHOCYTES T				
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
TCRab	Pe/Dazzle594	IP26	Sony	2133625
CD4	BV750	SK3	Biologend	344643
CD8	AF532	RPA-T8	Thermofisher	58-0088-42
CD25	PE	2A3	BD	341011
CD127	BV570	A019D5	Biologend	351307
CD45RA	Pacific blue	HI100	Sony	2120615
CCR7	FITC	G043H7	Sony	2366080
CD28	BV421	CD28.2	Sony	2114645
CD27	APC Cy7	O323	Biologend	302815
OX40	PerCp5.5	Ber-ACT35	Biologend	350009
ICOS	AF700	C398-4A	Biologend	313527
GITR	APC	621	Biologend	311609
4-1BB	BV605	4B4-1	Sony	2149105

Annexe 9 : Panels d'anticorps utilisés pour l'immunophénotypage des PBMC en parallèle des expériences de sc RNA seq

Tableau 25: Panel pour marquer les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques

PANEL B, mono, DC – PBMC – Spectral Sony SP6800				
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD19	AF488	HIB19	Biolegend	302219
IgD	PE	IA6-2	Biolegend	348204
CD11c	PE/Dazzle 594	3.9	Biolegend	301642
HLA-DR	PE/Cy5	L243	Biolegend	307608
CD24	PerCP/Cy5.5	ML5	Biolegend	311116
CD141	PE/Cy7	M80	Biolegend	344110
IgM	BV421	MHM-88	Biolegend	314516
CD14	Pacific Blue	63D3	Biolegend	367122
CD3	BV510	OKT3	Biolegend	317332
CD56	BV510	5.1H11	Biolegend	362534
CD16	BV570	3G8	Biolegend	302036
CD45	BV605	2D1	Biolegend	368524
CD1c	AF647	L161	Biolegend	331510
CD123	BV711	6H6	Biolegend	306030
Viabilité	Zombie NIR	-	Biolegend	423105

Tableau 26: Panel pour marquer les lymphocytes T

PANEL T - PBMC – Spectral Sony SP6800				
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD45RA	AF488	HI100	Biolegend	304114
CD279 (PD1)	PE	EH12.2H7	Biolegend	329906
CXCR3	PE/Dazzle 594	G025H7	Biolegend	353736
HLA-DR	PE/Cy5	L243	Biolegend	307608
CD57	PerCP/Cy5.5	HNK-1	Biolegend	359622
CD38	PE/Cy7	HB-7	Biolegend	356608
CCR7	BV421	G043H7	Biolegend	353208
CD56	Pacific Blue	5.1H11	Biolegend	362520
CD3	BV510	OKT3	Biolegend	317332
CD16	BV570	3G8	Biolegend	302036
CD4	BV605	OKT4	Biolegend	317438
CCR6	BV650	G034E3	Biolegend	353426
CD8a	BV711	RPA-T8	Biolegend	301044
Viabilité	Zombie NIR	-	Biolegend	423105

Tableau 27: Panel pour marquer les cellules NK, MAIT et les TReg

PANEL TREG / NK / MAIT - PBMC – Spectral Sony SP6800				
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD45RA	AF488	HI100	Biologend	304114
CD161	PE	HP-3G10	Biologend	339904
CCR4	PE/Dazzle 594	L291H4	Biologend	359420
CD45	PerCP	2D1	Biologend	368506
CD25	PerCP/Cy5.5	BC96	Biologend	302626
TCR V α 7.2	PE/Cy7	3C10	Biologend	351712
TCR V α 24-J α 18	BV421	6B11	Biologend	342916
CD56	Pacific Blue	5.1H11	Biologend	362520
CD3	BV510	OKT3	Biologend	317332
HLA-DR	BV570	L243	Biologend	307638
CD4	BV605	OKT4	Biologend	317438
CD127	BV650	A019D5	Biologend	351326
CD8a	BV711	RPA-T8	Biologend	301044
Viabilité	Zombie NIR	-	Biologend	423105

Annexe 10 : Panel CyTOF utilisé

Tableau 28: Liste des anticorps du panel CyTOF Maxpar Direct Immune Profiling (Fluidigm) et des 8 marqueurs supplémentaires – panel pouvant être réalisé sur sang total ou sur PBMC

PANEL MAXPAR IMMUNE - CYTOF				
Marqueur	Métal	Clone	Fournisseur	Référence
CD45	89Y	HI30	Fluidigm	kit SKU 201325
CCR6	141Pr	G034E3	Fluidigm	kit SKU 201325
CD123	143Nd	6H6	Fluidigm	kit SKU 201325
CD19	144Nd	HIB19	Fluidigm	kit SKU 201325
CD4	145Nd	RPA-T4	Fluidigm	kit SKU 201325
CD8a	146Nd	RPA-T8	Fluidigm	kit SKU 201325
CD11c	147Sm	Bu15	Fluidigm	kit SKU 201325
CD16	148Nd	3G8	Fluidigm	kit SKU 201325
CD45RO	149Sm	UCHL1	Fluidigm	kit SKU 201325
CD45RA	150Nd	HI100	Fluidigm	kit SKU 201325
CD161	151Eu	HP-3G10	Fluidigm	kit SKU 201325
CCR4	152Sm	L291H4	Fluidigm	kit SKU 201325
CD25	153Eu	BC96	Fluidigm	kit SKU 201325
CD27	154Sm	O323	Fluidigm	kit SKU 201325
CD57	155Gd	HCD57	Fluidigm	kit SKU 201325
CXCR3	156Gd	G025H7	Fluidigm	kit SKU 201325
CXCR5	158Gd	J252D4	Fluidigm	kit SKU 201325
CD28	160Gd	CD28.2	Fluidigm	kit SKU 201325
CD38	161Dy	HB-7	Fluidigm	kit SKU 201325
CD56	163Dy	NCAM16.2	Fluidigm	kit SKU 201325
TCR $\gamma\delta$	164Dy	B1	Fluidigm	kit SKU 201325
CD294	166Er	BM16	Fluidigm	kit SKU 201325
CCR7	167Er	G043H7	Fluidigm	kit SKU 201325
CD14	168Er	63D3	Fluidigm	kit SKU 201325
CD3	170Er	UCHT1	Fluidigm	kit SKU 201325
CD20	171Yb	2H7	Fluidigm	kit SKU 201325
CD66b	172Yb	G10F5	Fluidigm	kit SKU 201325
HLA-DR	173Yb	LN3	Fluidigm	kit SKU 201325
IgD	174Yb	IA6-2	Fluidigm	kit SKU 201325
CD127	176Yb	A019D5	Fluidigm	kit SKU 201325
Cell-ID Intercalator	103Rh	-	Fluidigm	kit SKU 201325
PD-1	165Ho	EH12.2H7	Fluidigm	SKU 3165041D

TIM3	169Tm	F38-2E2	Fluidigm	SKU 3169028B
FAS <i>(après couplage)</i>	116Cd	DX2	BD pour l'anticorps Fluidigm pour le kit de couplage	555670 SKU 201116A
TIGIT	209Bi	MBSA43	Fluidigm	SKU 3209013B
GITR	159Tb	621	Fluidigm	SKU 3159020B
OX40	142Nd	ACT35	Fluidigm	SKU 3142018B
ICOS	175Lu	C398.4A	Fluidigm	SKU 3175039B
CTLA-4 <i>(après couplage) *</i>	162Dy	BNI3	Biolegend pour l'anticorps Fluidigm pour le kit de couplage	369602 SKU 201162A

* *CTLA-4 a été marqué de façon intracellulaire*

Annexe 11 : Panel des 128 autoantigènes testés par antigen microarray

Tableau 29: Liste des 128 autoantigènes plasmatiques testés grâce au « antigen microarray »

En collaboration avec l'équipe du Dr Quan-Zhen Li, du Centre Médical du Sud-Ouest de l'Université du Texas, à Dallas, Texas, USA. Ce tableau a été mis en forme par le Dr Caroline Besnard.

Catégorie	Cible antigénique	Maladie associée
Antigènes nucléaires	ADN double-brin, ADN génomique, ADN simple-brin	Lupus érythémateux systémique (LES)
	Nucléosome, chromatine	LES
	Core histone, histones (H1, H2A, H2B, H3, H4)	LES
	Scl-70, ADN topoisomérase I	Sclérodémie systémique
	Centromères : CENP-A, CENP-B	Sclérodémie systémique
	PCNA, Ku (P70/P80)	LES
	Mi-2 (composant du nucléosome), TIF1/TRIM33, MDA5/IFIH1	Dermatomyosite
	SP100	cholangite biliaire primitive (CBP)
	ARN simple-brin	LES
	Antigènes du syndrome de Gougerot-Sjögren de type A (Ro/SSA, 52 kDa et Ro/SSA, 60 kDa) et de type B (La/SSB)	Syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)
	Antigène Smith : Sm, Sm/RNP, SmD, SmD1, SmD2, SmD3	LES
	U1-snRNP 68/70, U1-snRNP A, B/B' et C	Connectivites
	Exosome nucléaire : PM/Scl-75 et PM/Scl 100	Sclérodémie systémique
	Nucléoline (C23)	
	Phosphoprotéines ribosomales : P0, P1, P2	
	Histidyl-tRNA synthétase (Jo-1), thréonyl-tRNA synthétase (PL-7), alanyl-tRNA synthtase (PL-12)	Dermatomyosite
	SRP54	
	POLB	
Protéines membranaires et cytoplasmiques	ANCA : MPO, PR3 et BPI	
	LKM1, LC1	Hépatite auto-immune (HAI) de type 2
	Cytochrome C	LES
	M2, antigène mitochondrial	CBP
	TTG	Maladie coeliaque
	Beta2-microglobuline	LES, Polyarthrite Rhumatoïde (PR)
	Protéoglycanes : aggrecane, alpha-fodrine, chondroïtine sulfate C, décorine-bovin, héparane sulfate, HSPG, protéoglycane	
	Récepteur muscarinique	Myasthénie
	Myosine	
	Vimentine	

Antigènes associés à la membrane nucléaire	gp210, Nup 62	
Protéines de la matrice cellulaire	Collagènes (I, II, III, IV, V, VI)	Sclérodémie systémique
	Fibrinogène (IV, S)	
	Fibronectine, vitronectine	
Phospholipides	Beta2-GP1, cardiolipine, GP2	Syndrome des anti-phospholipides (SAPL)
Protéines spécifiques du glomérule	MBG	Maladie de Goodpasture
	Alpha-actinine, laminine, amyloïde, élastine, matrigel	
	AGTR	
Protéines spécifiques de la thyroïde	Thyroglobuline, thyroperoxydase	Thyroïdite d'Hashimoto
Protéines spécifiques du tube digestif	Gliadine, peptides de gliadine déaminée	Maladie coeliaque
Protéines spécifiques du système nerveux central	AQP4, protéine basique de la myéline, sphingomyéline	
Protéines microbiennes	Lipopolysaccharides, EBNA1	
Protéines d'agents externes	Entactine EDTA, matrigel	
Protéines circulantes	Complément : C1q, C3, C3a, C4, C5, C6, C7, C8, C9	LES
	Facteurs de la coagulation : prothrombine, héparine	
	Facteurs intrinsèques : B, D, H, I, P	
	Facteur intrinsèque	Maladie de Biermer
	Protéines de l'inflammation : CRP, TNF-alpha	
	Albumine glyquée humaine	
	Hémocyanine, peroxyredoxine 1	
	Insuline	Diabète
	DAMP : S100	

Annexe 12 : Liste des gènes PID (Primary Immune Deficiency) utilisés pour l'analyse des exomes

Tableau 30: Liste des gènes utilisés lors de l'analyse des exomes à la recherche de déficits immunitaires

ACD	CIITA	IL21R	NOS2	STAT3
ACP5	CLPB	IL23R	NRAS	STAT4
ACTB	COLEC11	IL2RA	NSMAF	STAT5B
ACTN1	COPA	IL2RB	NSMCE3	STIM1
ADA	CORO1A	IL2RG	OAS1	STING1
ADA2	CR2	IL36RN	ORAI1	STK4
ADAM17	CSF2RA	IL6R	OTULIN	STN1
ADAR	CSF2RB	IL6ST	PARN	STX11
ADORA2A	CSF3R	IL7	PAX1	STXBP2
AICDA	CTC1	IL7R	PAX5	STXBP3
AIRE	CTLA4	INO80	PCNA	TALDO1
AK2	CTNBL1	IRAK1	PDCD1	TAP1
ALPI	CTPS1	IRAK4	PDCD1LG2	TAP2
AP3B1	CTSC	IRF1	PGM3	TAPBP
AP3D1	CXCR2	IRF2BP2	PIK3CA	TAZ
APOL1	CXCR4	IRF3	PIK3CD	TBK1
ARHGEF1	CYBA	IRF4	PIK3CG	TBX1
ARPC1B	CYBB	IRF7	PIK3R1	TBX21
ATM	CYBC1	IRF8	PLCG2	TCF3
B2M	DACT1	IRF9	PMS2	TCN2
BACH2	DBR1	ISG15	PNP	TDO2
BCL10	DCLRE1B	ITCH	POLA1	TERC
BCL11B	DCLRE1C	ITGAX	POLD1	TERT
BLM	DEF6	ITGB2	POLD2	TET2
BLNK	DGAT1	ITK	POLE	TFRC
BLOC1S6	DIAPH1	ITPKB	POLE	TGFB1
BTK	DKC1	JAGN1	POLE2	TGFBR1
BTLA	DNAJC21	JAK1	POMP	TGFBR2
C1QA	DNASE1L3	JAK2	PRF1	THBD
C1QB	DNMT3B	JAK3	PRKCD	TICAM1
C1QC	DOCK11	KDM6A	PRKDC	TIFA
C1R	DOCK2	KMT2A	PSMB10	TIGIT
C1S	DOCK8	KMT2D	PSMB2	TINF2
C2	DSG1	KPNA2	PSMB8	TLR3
C3	ELANE	KRAS	PSMG2	TMC6
C4A	EOMES	LAG3	PSTPIP1	TMC8
C4B	EPG5	LAMTOR2	PTCRA	TMIGD2

C5	ERBIN	LAT	PTEN	TNFAIP3
C6	ERCC6L2	LCK	PTPN11	TNFAIP3
C7	EXTL3	LGALS9	PTPRC	TNFRSF13B
C8A	FAAP24	LIG1	PVR	TNFRSF13C
C8B	FADD	LIG4	PVRIG	TNFRSF14
C8G	FADD	LIPA	RAB27A	TNFRSF18
C9	FAS	LPIN2	RAB27A	TNFRSF1A
CACNA1F	FASLG	LRBA	RAC1	TNFRSF4
CARD11	FCGR3A	LYST	RAC2	TNFRSF9
CARD11	FCHO1	MAGT1	RAG1	TNFSF12
CARD14	FCN3	MALT1	RAG2	TNFSF13
CARD8	FERMT1	MAN2B2	RASGRP1	TNFSF14
CARD9	FERMT3	MAP3K14	RBCK1	TNFSF18
CARD9	FNIP1	MAPK8	RC3H1	TNFSF4
CARMIL2	FOXP1	MAPK8	REL	TNFSF9
CARMIL2	FOXP3	MASP1	RELA	TOM1
CASP10	FPR1	MASP2	RELB	TOP2B
CASP8	G6PC3	MBL2	RFX5	TPP2
CBL	G6PD	MCM4	RFXANK	TPP2
CCBE1	GATA2	MEFV	RFXAP	TRAC
CD160	GF11	MOGS	RHOH	TRAF3
CD19	GIMAP5	MPO	RIPK1	TRAF3IP2
CD200	GIMAP6	MR1	RIPK1	TREX1
CD200R1	GINS1	MRE11	RMRP	TRIM22
CD226	HAVCR2	MRTFA	RNASEH2A	TRNT1
CD244	HAVCR2	MRTFA	RNASEH2B	TTC37
CD247	HAX1	MS4A1	RNASEH2C	TTC7A
CD27	HELLS	MSH6	RNASEL	TYK2
CD274	HHLA2	MSN	RNF168	UNC119
CD276	HRAS	MTHFD1	RNF31	UNC13D
CD28	HYOU1	MVK	RNU4ATAC	UNC93B1
CD3D	ICOS	MYD88	RORC	UNG
CD3E	ICOSLG	MYO5A	RPSA	USB1
CD3G	IDO1	MYSM1	RTEL1	USP18
CD4	IFIH1	NBAS	SAMD9	VPS13B
CD40	IFNAR1	NBEA	SAMD9L	VPS45
CD40LG	IFNAR2	NBEAL1	SAMHD1	VSIR
CD46	IFNG	NBEAL2	SBDS	VTCN1
CD48	IFNGR1	NBN	SEC61A1	WAS
CD55	IFNGR2	NCF1	SEMA3E	WASF2
CD59	IGHM	NCF2	SERPING1	WDFY3
CD70	IGKC	NCF2	SH2D1A	WDFY4

CD79A	IGLL1	NCF4	SH3BP2	WDR1
CD79B	IKBKB	NCKAP1L	SH3KBP1	WDR81
CD80	IKBKG	NCKAP1L	SH3KBP1	WIPF1
CD81	IKZF1	NECTIN2	SHARPIN	XIAP
CD86	IKZF2	NFAT5	SKIV2L	XRCC4
CD8A	IKZF3	NFATC1	SLC11A1	ZAP70
CD96	IKZF4	NFATC2	SLC29A3	ZBTB24
CDC42	IL10	NFE2L2	SLC35C1	ZNF341
CDCA7	IL10RA	NFKB1	SLC39A7	
CDH17	IL10RB	NFKB2	SLC46A1	
CEACAM1	IL12B	NFKBIA	SLC7A7	
CEBPE	IL12RB1	NFKBID	SMARCAL1	
CFB	IL12RB2	NHEJ1	SNORA31	
CFD	IL17A	NHP2	SOCS1	
CFH	IL17F	NLRC4	SP110	
CFHR1	IL17RA	NLRP1	SPI1	
CFI	IL17RC	NLRP12	SPINK5	
CFP	IL18	NLRP2	SPPL2A	
CHD7	IL18BP	NLRP3	SRP54	
CHUK	IL1RN	NOD2	STAT1	
CIB1	IL21	NOP10	STAT2	

Annexe 13 : Liste des gènes associés à des fonctions plaquettaires ou à des thrombopénies constitutionnelles pour l'analyse d'exome

Tableau 31: Liste des 122 gènes associés à des fonctions plaquettaires

ABCG5	CD226	GNAS	LAT	PLCB2	SLFN14
ABCG8	CD36	GP1BA	LCP2	PLCG2	SNAPIN
ACTN1	CDC42	GP1BB	LYST	PPP1CB	SRC
ACVRL1	CLEC1B	GP6	MASTL	PRKACG	STIM1
ADAMTS13	CYCS	GP9	MECOM	PRKCD	STX11
ADCY7	DIAPH1	GUCY1A1	MLPH	PRKG1	STXBP2
ADRA2A	DKC1	GUCY1B1	MPIG6B	PTEN	TBXA2R
AKT1	DTNBP1	HOXA11	MPL	PTGS1	TBXAS1
AKT2	EPHB2	HPS1	MRTFA	PTPN11	THPO
ANKRD26	ETV6	HPS3	MYH9	PTPRC	TPM4
ANO6	F2R	HPS4	MYO5A	RAB27A	TRPM7
AP3B1	F2RL3	HPS5	NBEAL2	RABGGTA	TTC37
AP3D1	FERMT3	HPS6	ORAI1	RAI1	TUBB1
ARPC1B	FLI1	HYOU1	P2RX1	RASGRP2	VPS11
BLOC1S1	FLNA	INPP5D	P2RY1	RASGRP2	VPS33B
BLOC1S3	FYB1	ITGA2	P2RY12	RBM8A	VWF
BLOC1S4	GATA1	ITGA2B	PEAR1	RUNX1	WAS
BLOC1S5	GFI1	ITGB1	PIK3CD	SELP	WDR66
BLOC1S6	GFI1B	ITGB3	PIK3R1	SERPINE1	
BTK	GNA13	ITPR1	PLA2G4A	SH2B3	
CALR	GNAQ	JAK2	PLAU	SLC35A1	

Annexe 14 : Génération d'une lignée de cellules souches pluripotentes induites

Avec l'aide de la plateforme iPS de l'institut Imagine, une lignée de cellules souches pluripotentes induites a été générée à partir des PBMC du patient 1 décrit au paragraphe 5.1, porteur d'une mutation hétérozygote de LRBA (p.P37S) et hétérozygote de NBEAL2 (p.R688C).

Cette annexe décrit les étapes de génération de cette lignée et les contrôles de qualité effectués.

IMAGINE031 IPS CELL LINE

General information

I. Description

IMAGINE031 human induced pluripotent stem cells (iPSC) line derived from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). IMAGINE031 IPS cells are cryopreserved in an ultra-low temperature freezer (-150°C).

	IMAGINE031
Product description	human peripheral blood mononuclear cells reprogrammed with four factors (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) using Sendai virus
Diagnosis	
Mutation	
Gender	male
Age	
Medium	mTeSR1
Feeder or matrix substrate	Vitronectin
Passages method	Mechanical cutting

II. History

Reprogramming kit: CytoTune™_IPS 2.0 Sendai Reprogramming kit, lot L2160042

Virus titer : KOS : 1.4×10^8 cMyc: 1.2×10^8 Klf4 : 1.1×10^8

MOI : 5-5-3

Reprogramming medium : StemPro®-34 medium supplemented with IL3, IL6, SCF, Flt3-L then StemPro®-34 medium without cytokines (see annex 1).

Reprogramming support : Vitronectin, Laminin-521

Number of transduced cells : 2.5×10^5 cells

Reprogramming efficiency : 0.14% on Laminin-521 ; 0.09% on Vitronectin

Oxygen tension : Normoxia

Number of frozen vials with passage number > 8 : #15 = 16 ; #26 = 12 ; #30 = 17 ; #34 = 13 (see annex 2)

Number of frozen vials for the back up : 30 vials (see annex 3)

Quality testing and results

I. Tests

The following tests have been made:

Test description	Test method	Test specification	Results
Mycoplasma	Luciferase test	Negative	Pass
Alkaline Phosphatase Activity	Alkaline phosphatase staining	Positive	Pass
Karyotype	SNP array	Arr(1-22)X , XYx1	Pass
Identity match	SNP array	Match parental cell line	Pass
Transcription factor	Immunostaining	Expression of stem cell markers	Pass
pluripotency	EB formation	Expression of all three primary germ layers	Pass
	Scorecard assay		Pass
Post-thaw viable cell recovery	Colony doubling	Colony formation within 5 days	

II. Alkaline Phosphatase Activity

One dish of IPS cell are fixed with ethanol and then stained with 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate / Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) Sigma alkaline phosphatase alkaline staining kit.

Figure 1: Alkaline phosphatase staining of IMAGINE031.

III. Karyotype

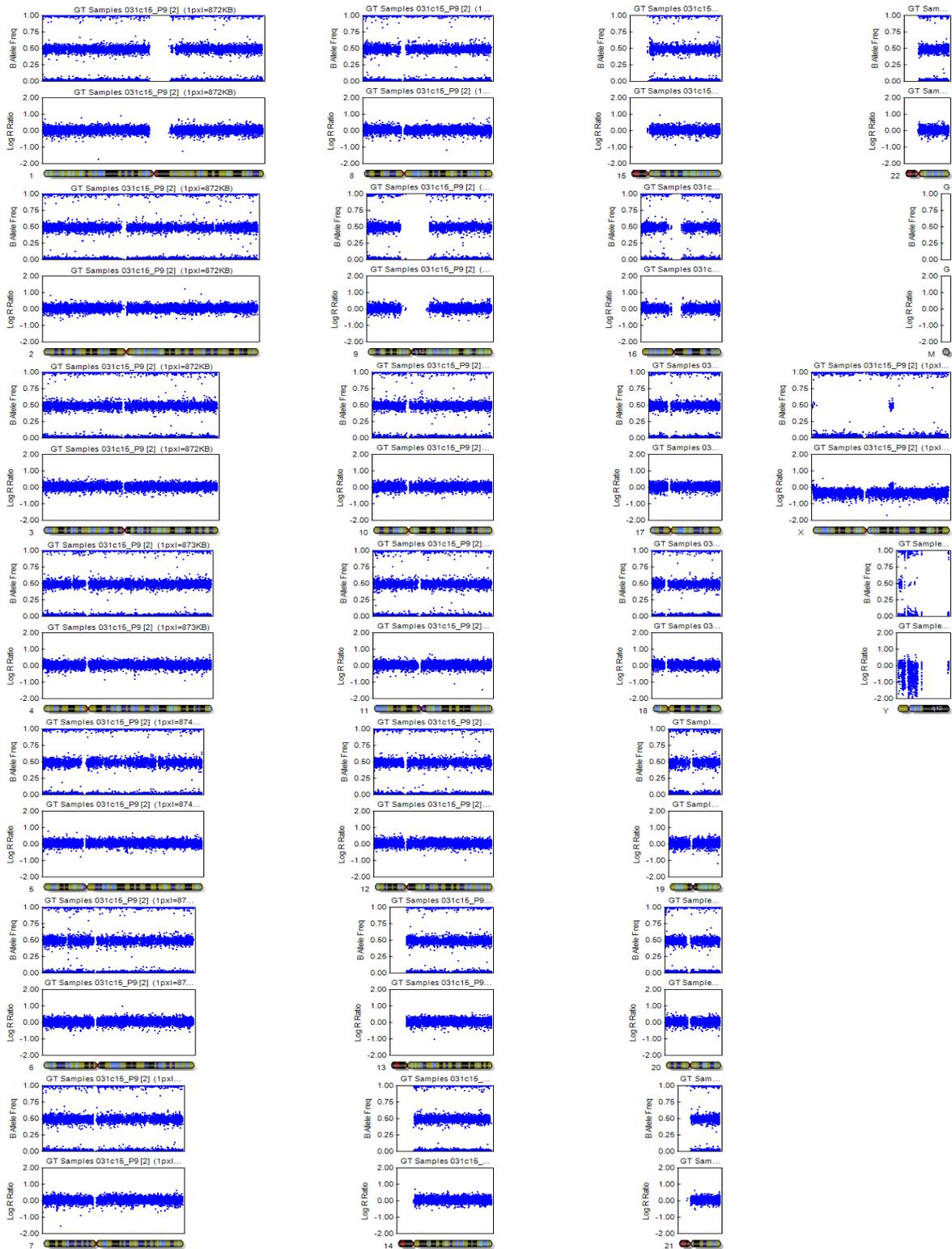


Figure 2: IMAGINE031c15 P9 analysis showing a normal male karyotype (46, XY). The same result has been observed for IMAGINE031c26 P9.

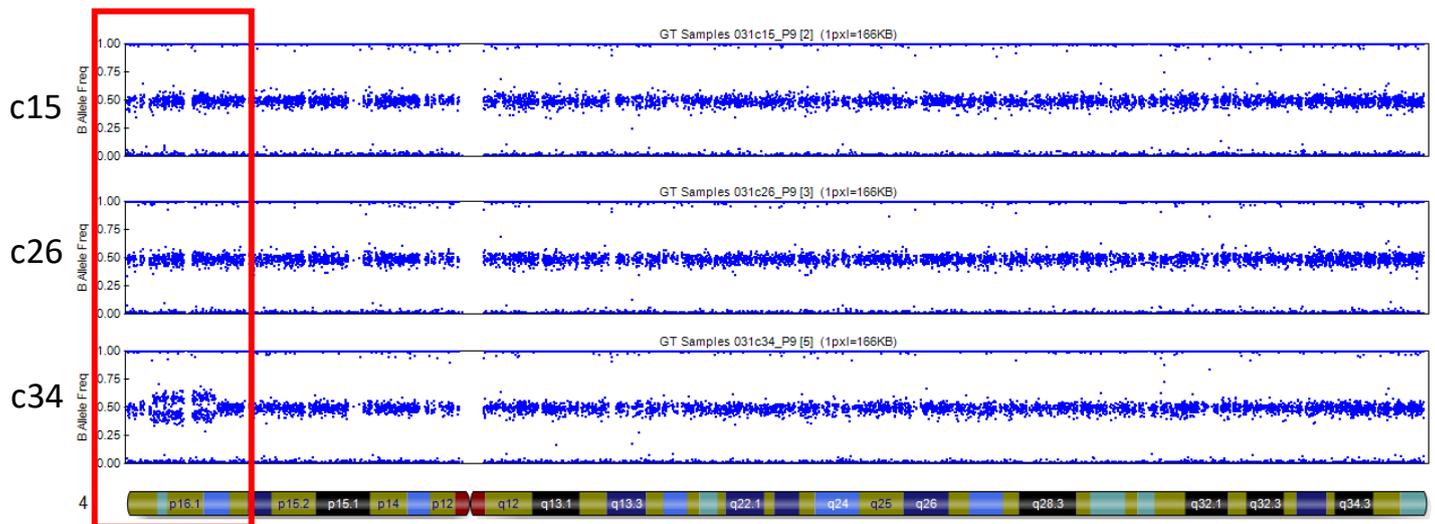


Figure 2bis: Duplication at 4p16.1 ranging from 3.700.000 to 13.800.000 (genome build 37) including ~ 160 genes

IV. Identity match

In the absence of DNA extracted from starting PBMC, IPS clone genotypes are compared to each other. All ips clone genotypes match to each other which confirms their common origin. They don't match with any other IPS cell lines produced in the iPS platform.

Name	Chr	Address	PBMC031	031c15	031c26	031c34
rs1083877	1	38801842	ND	AB	AB	AB
rs10193825	2	91650478	ND	AB	AB	AB
rs1006514	7	8750147	ND	AB	AB	AB
rs10102855	8	63807151	ND	AB	AB	AB
rs10839595	11	6785828	ND	BB	BB	BB
rs10840745	12	56668899	ND	AB	AB	AB
rs11087000	20	76729179	ND	BB	BB	BB
rs11089816	22	5672150	ND	AB	AB	AB
Sexe			XY	XY	XY	XY

V. Surface antigen and transcription factor expression

IPS cells are stained for the transcription factors Oct4, Sox2. These markers are expressed in undifferentiated human pluripotent stem cells.

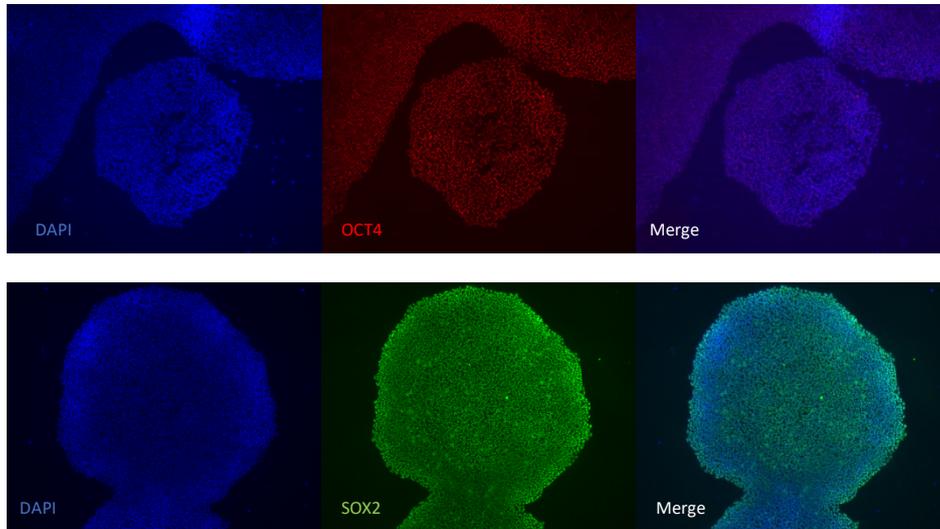


Figure 3: OCT4/SOX2 expression in IMAGINE031c15. The same result has been observed in IMAGINE031c26.

VI. Pluripotency

1) EB formation

Cells are directed to differentiate into embryoid bodies (for 7 days) and then plated onto gelatin coated dishes to assess the pluripotency of the cell line.

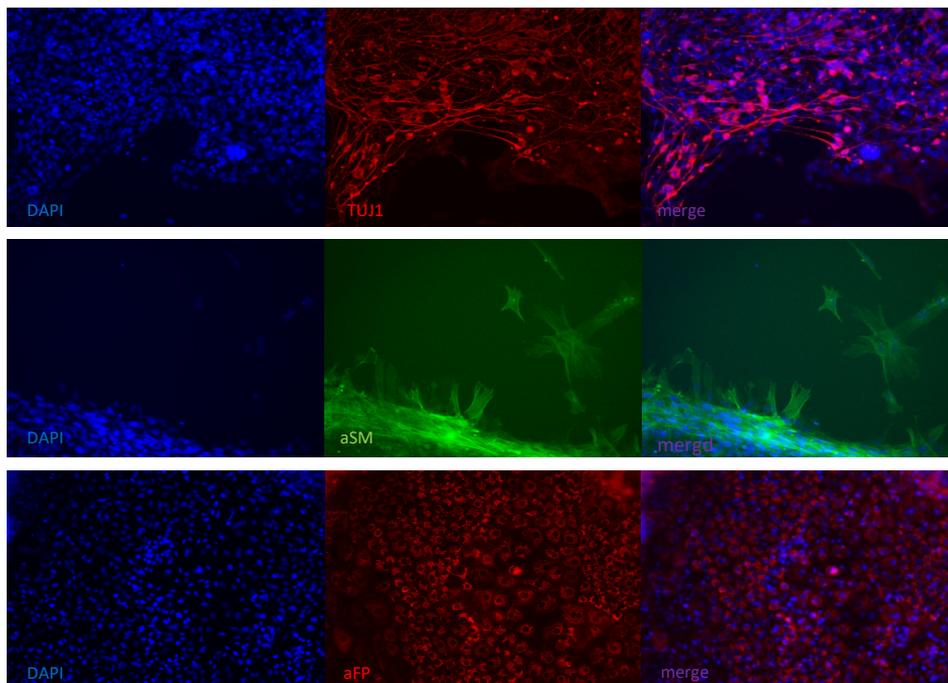
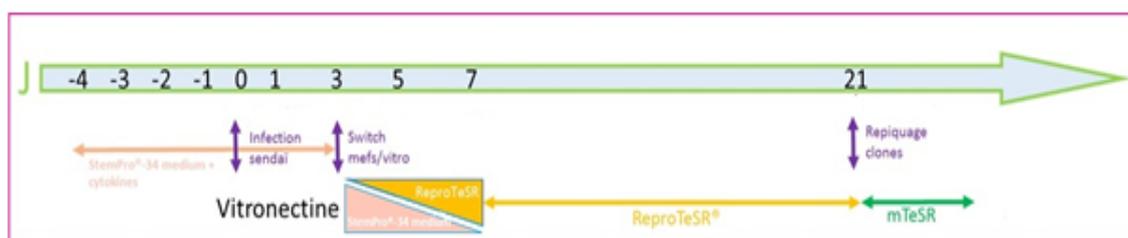


Figure 4: Three primary germ layers expression in IMAGINE031c26. The same result has been observed in IMAGINE031c15.

ANNEX 1

IMAGINE031's reprogramming workflow :



ANNEX 2

IMAGINE031's frozen vials with passage number > 8:

IMAGINE031c15 P8 Vitro/mTeSR 23/07/2019	IMAGINE031c15 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c15 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c15 P10 Vitro/mTeSR 06/08/2019	IMAGINE031c15 P10 Vitro/mTeSR 06/08/2019	IMAGINE031c15 P11 Vitro/mTeSR 12/08/2019	IMAGINE031c15 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c15 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c15 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019
IMAGINE031c15 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c15 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c15 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c15 P13 Vitro/mTeSR 27/08/2019	IMAGINE031c15 P13 Vitro/mTeSR 27/08/2019	IMAGINE031c15 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019	IMAGINE031c15 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019		
IMAGINE031c26 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c26 P10 Vitro/mTeSR 06/08/2019	IMAGINE031c26 P10 Vitro/mTeSR 06/08/2019	IMAGINE031c26 P10 Vitro/mTeSR 08/08/2019	IMAGINE031c26 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c26 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019
IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019	IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019	IMAGINE031c26 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019						
IMAGINE031c30 P8 Vitro/mTeSR 23/07/2019	IMAGINE031c30 P8 Vitro/mTeSR 23/07/2019	IMAGINE031c30 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c30 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c30 P10 Vitro/mTeSR 06/08/2019	IMAGINE031c30 P10 Vitro/mTeSR 08/08/2019	IMAGINE031c30 P11 Vitro/mTeSR 12/08/2019	IMAGINE031c30 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c30 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019
IMAGINE031c30 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c30 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c30 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c30 P12 Vitro/mTeSR 19/08/2019	IMAGINE031c30 P13 Vitro/mTeSR 27/08/2019	IMAGINE031c30 P13 Vitro/mTeSR 27/08/2019	IMAGINE031c30 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019	IMAGINE031c30 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019	
IMAGINE031c34 P8 Vitro/mTeSR 23/07/2019	IMAGINE031c34 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c34 P9 Vitro/mTeSR 01/08/2019	IMAGINE031c34 P10 Vitro/mTeSR 08/08/2019	IMAGINE031c34 P10 Vitro/mTeSR 12/08/2019	IMAGINE031c34 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c34 P11 Vitro/mTeSR 14/08/2019	IMAGINE031c34 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019	IMAGINE031c34 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019
IMAGINE031c34 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019	IMAGINE031c34 P12 Vitro/mTeSR 21/08/2019	IMAGINE031c34 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019	IMAGINE031c34 P14 Vitro/mTeSR 04/09/2019					

ANNEX 3

IMAGINE031's frozen vials for the back up :

IMAGINE031c33 P2 Vitro/mTeSR 12/06/2019	IMAGINE031c16 P3 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c15 P3 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c34 P2 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c33 P3 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c33 P3 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c26 P2 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c25 P2 Vitro/mTeSR 17/06/2019	IMAGINE031c16 P3 Vitro/mTeSR 17/06/2019
IMAGINE031c25 P3 Vitro/mTeSR 18/06/2019	IMAGINE031c14 P3 Vitro/mTeSR 18/06/2019	IMAGINE031c4 P3 Vitro/mTeSR 18/06/2019	IMAGINE031c12 P3 Vitro/mTeSR 18/06/2019	IMAGINE031c14 P4 Vitro/mTeSR 21/06/2019	IMAGINE031c4 P4 Vitro/mTeSR 21/06/2019	IMAGINE031c12 P4 Vitro/mTeSR 21/06/2019	IMAGINE031c30 P4 Vitro/mTeSR 26/06/2019	IMAGINE031c26 P4 Vitro/mTeSR 26/06/2019
IMAGINE031c15 P4 Vitro/mTeSR 21/06/2019	IMAGINE031c34 P4 Vitro/mTeSR 26/06/2019	IMAGINE031c30 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c4 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c26 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c15 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c15 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c26 P5 Vitro/mTeSR 03/07/2019	IMAGINE031c34 P6 Vitro/mTeSR 10/07/2019
IMAGINE031c15 P6 Vitro/mTeSR 10/07/2019	IMAGINE031c26 P6 Vitro/mTeSR 10/07/2019	IMAGINE031c30 P6 Vitro/mTeSR 10/07/2019						

Annexe 15 : Comparaison de nos résultats d'interactome NBEAL2 à ceux de Mayer et al, 2018, Blood.

Gene name	Data of Mayer et al				Our data	
	Uniprot AC	Description	Validation (Reverse IP) by Mayer et al	Protein Class	Ratio ctrls / GPS2	Ratio ctrls / GPS1
HSPB1	C9J3N8	Heat shock protein beta-1	not tested	enzymes/enzyme modulators	#DIV/0!	1,33
SEC16A	J3KNL6	Protein transport protein Sec16A	Interaction confirmed	protein binding	#DIV/0!	#DIV/0!
STAU1	Q5JW30	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	#DIV/0!	2,49
VAC14	Q08AM6	Protein VAC14 homolog	Interaction confirmed	receptor activity/receptor activity	#DIV/0!	1,58
NBEAL2	H7C3Y7	Neurobeachin-like protein 2 (Fragment)	NA (Bait)	phospholipid binding	665,43	19,97
TUBB4A	P04350	Tubulin beta-4A chain	not tested	cytoskeletal proteins	66,36	0,78
RPS8	Q5JR95	40S ribosomal protein S8	not tested	nucleic acid binding	9,28	1,50
GIGYF2	C9JW88	ERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 (Fragmen	not tested	nucleic acid binding	7,62	1,28
BAG2	O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	7,15	#DIV/0!
YTHDF2	Q9Y5A9	YTH domain family protein 2	not tested	nucleic acid binding	5,41	0,80
FAM120A	H7C0T0	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	5,26	12,97
LARP1	E5RH50	La-related protein 1 (Fragment)	not tested	protein translation	5,18	2,69
EIF4G1	G5E9S1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	not tested	protein translation	4,82	2,55
OGT	O15294	cetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa	not tested	enzymes/enzyme modulators	4,80	1,08
POLR2B	C9J4M6	DNA-directed RNA polymerase	not tested	enzymes/enzyme modulators	4,70	3,35
ATXN2L	Q8WWM7-6	Isoform 6 of Ataxin-2-like protein	not tested	nucleic acid binding	4,43	4,99
UPF1	Q92900-2	Isoform 2 of Regulator of nonsense transcripts 1	not tested	nucleic acid binding	4,37	3,35
DDX17	G5E9L5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	not tested	transcription factors/cofactors	3,70	0,44
RPL24	C9JXB8	60S ribosomal protein L24	not tested	nucleic acid binding	3,67	1,52
NONO	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	not tested	transcription factors/cofactors	3,58	1,06
ZC3HAV1	Q7Z2W4-2	Isoform 2 of Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	3,47	1,49
TUBG1	K7EKE5	Tubulin gamma-1 chain	not tested	cytoskeletal proteins	3,45	1,65
DNAJA1	P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	3,33	1,62
SLTM	HOYKH2	SAFB-like transcription modulator (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	3,27	1,46
CRLF3	Q8IUI8-2	Isoform 2 of Cytokine receptor-like factor 3	not tested	protein dimerization	3,22	0,90
SORD	HOYLA4	Sorbitol dehydrogenase	not tested	enzymes/enzyme modulators	3,06	1,25
BAG6	B0UX83	HLA-B associated transcript 3	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	2,95	4,22
HUWE1	HOY5W0	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (Fragment)	not tested	enzymes/enzyme modulators	2,87	1,07
C14orf166	HOYJB9	UPF0568 protein C14orf166 (Fragment)	not tested	protein dimerization	2,80	1,35
SHMT1	B4DPM9	Serine hydroxymethyltransferase	not tested	enzymes/enzyme modulators	2,80	1,23
PABPC4	Q13310-2	Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 4	not tested	nucleic acid binding	2,68	0,92

LARP4B	H0Y4V9	La-related protein 4B (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	2,67	1,62
DNAJA2	O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	2,52	0,96
UBAP2L	H0Y5H6	Ubiquitin-associated protein 2-like (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	2,49	3,13
APOL2	Q9BQE5	Apolipoprotein L2	not tested	receptor activity/receptor activity	2,44	1,17
AIP	O00170	AH receptor-interacting protein	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	2,41	2,18
AGO2	Q9UKV8	Protein argonaute-2	not tested	protein translation	2,38	1,83
CCT8	G5E9B2	Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (Theta), isoform CRA_a	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	2,37	1,11
RFC5	P40937	Replication factor C subunit 5	not tested	enzymes/enzyme modulators	2,22	1,51
CAPRN1	E9PLA9	Caprin-1 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	2,20	1,26
DNAJC7	K7ELJ8	DnaJ homolog subfamily C member 7	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	2,11	1,00
PSMC2	B7Z5E2	26S protease regulatory subunit 7	not tested	enzymes/enzyme modulators	2,06	0,89
HNRNPA0	Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	not tested	enzymes/enzyme modulators	2,05	1,36
RANGAP1	B0QYT6	Ran GTPase activating protein 1 (Fragment)	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,98	1,14
RUVBL2	Q9Y230	RuvB-like 2	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	1,94	1,27
NTPCR	Q9BSD7	Cancer-related nucleoside-triphosphatase	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,91	1,36
HSPA1B	F8VZJ4	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Interaction not replicated	chaperones/heat shock prtoteins	1,91	1,10
PABPC1	P11940	Polyadenylate-binding protein 1	not tested	protein translation	1,87	1,03
SERBP1	Q8NC51-4	Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	not tested	nucleic acid binding	1,79	1,07
RPS13	E9PS50	40S ribosomal protein S13 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	1,76	0,77
RUVBL1	E7ETRO	RuvB-like 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,76	1,55
HNRNPAB	D6R9P3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	not tested	transcription factors/cofactors	1,75	0,98
FARSA	B4E363	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,74	1,01
NUDT21	H3BV41	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 5 (Fragment)	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,69	1,68
TUBB	F8VW92	Tubulin beta chain	Interaction not replicated	cytoskeletal proteins	1,68	1,06
RTCB	Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	not tested	nucleic acid binding	1,67	1,00
RPL10A	P62906	60S ribosomal protein L10a	not tested	nucleic acid binding	1,66	0,80
POLR2E	P19388	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,66	1,00
MTHFD1	G3V3L6	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,63	0,99
TARDBP	B4DJ45	TAR DNA-binding protein 43	not tested	transcription factors/cofactors	1,63	1,25
TUBB2A	Q13885	Tubulin beta-2A chain	not tested	cytoskeletal proteins	1,53	0,49
TUBB4B	P68371	Tubulin beta-4B chain	Interaction not replicated	cytoskeletal proteins	1,53	1,02
GPN1	B5MBZ5	GPN-loop GTPase 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,50	1,30
HNRNPD	D6RF44	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	not tested	transcription factors/cofactors	1,35	1,00
CCAR2	G3V119	DBIRD complex subunit KIAA1967	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,28	1,12
UBC	F5H265	Polyubiquitin-C (Fragment)	Interaction not replicated	enzymes/enzyme modulators	1,26	1,07
ILF3	G5E9M5	Interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa, isoform CRA_b	not tested	nucleic acid binding	1,23	0,70
HNRNPA3	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	not tested	nucleic acid binding	1,23	1,11

POLR1C	O15160-2	Isoform 2 of DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	not tested	enzymes/enzyme modulators	1,17	1,04
ALYREF	Q86V81	THO complex subunit 4	not tested	nucleic acid binding	1,12	0,77
PABPN1	Q86U42-2	Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 2	not tested	nucleic acid binding	1,03	0,98
RALY	Q5QPRMN0A	ein, autoantigenic (HnRNP-associated with lethal yellow homolog (M	not tested	nucleic acid binding	1,02	1,97
HNRNPR	Q2L7G6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	not tested	nucleic acid binding	1,02	0,73
LARP4	G5E976	La ribonucleoprotein domain family, member 4, isoform CRA_h	not tested	nucleic acid binding	0,95	0,56
CPSF4	O95639	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4	not tested	nucleic acid binding	0,91	0,54
RBBP7	E9PC52	Histone-binding protein RBBP7	not tested	nucleic acid binding	0,86	0,94
RBMX	H0Y6E7	binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed (Frag	not tested	nucleic acid binding	0,77	1,19
CPSF1	Q10570	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	0,50	#DIV/0!
TUBB6	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	not tested	cytoskeletal proteins	0,03	0,25
AKAP8	O43823	A-kinase anchor protein 8	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
AKAP8L	Q9ULX6-2	Isoform 2 of A-kinase anchor protein 8-like	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
ALDH7A1	P49419-2	Isoform 2 of Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
AMOT	Q4VCS5-2	Isoform 2 of Angiomotin	not tested	receptor activity/receptor activity	NA	NA
ATXN2	H0YH87	Ataxin-2 (Fragment)	Interaction not replicated	receptor activity/receptor activity	NA	NA
BAG4	O95429-2	Isoform 2 of BAG family molecular chaperone regulator 4	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	NA	NA
CAMKC2aAlci	D6RHX9	m/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha (Fragmen	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
CDC42EP1	Q00587-2	Isoform 2 of Cdc42 effector protein 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
CHERP	Q8IWX8	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	not tested	ion channel binding	NA	NA
CPEB4	H0YBG1	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 (Fragment)	not tested	protein translation	NA	NA
CPSF7	J3QT54	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 7 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
DNAJB6	C9JB42	DnaJ homolog subfamily B member 6 (Fragment)	not tested	chaperones/heat shock prtoteins	NA	NA
DOCK7	H0Y7L2	Dedicator of cytokinesis protein 7 (Fragment)	Interaction confirmed	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
EIF4G3	B1AN89	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	not tested	protein translation	NA	NA
ELAVL2	B1AM48	(Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B) (Fi	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
FIP1L1	G3XAD6	FIP1 like 1 (S. cerevisiae), isoform CRA_d	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
FMR1	A8MQB8	Fragile X mental retardation protein 1	not tested	protein dimerization	NA	NA
FXR2	I3L1Z2	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 (Fragment)	not tested	protein dimerization	NA	NA
GTF3C5	Q5T7U1	General transcription factor 3C polypeptide 5	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
HAX1	E9PIQ7	HCLS1-associated protein X-1	not tested	interleukin-1 binding	NA	NA
HELZ	J3QS41	Probable helicase with zinc finger domain	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
IGF2BP2	F8W930	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	not tested	protein translation	NA	NA
IGF2BP3	F8WD15	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	not tested	protein translation	NA	NA
LSM12	K7ELG9	Protein LSM12 homolog	not tested	unclassified	NA	NA
MOV10	Q5JR04	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (Mouse)	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
NCOA1	B5MCN7	Nuclear receptor coactivator 1	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA

NCOR1	O75376-2	Isoform 2 of Nuclear receptor corepressor 1	not tested	transcription factors/cofactors	NA	NA
NUFIP2	Q7Z417	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	Interaction not replicated	nucleic acid binding	NA	NA
PIKFYVE	E9PDH4	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (Fragment)	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
PRRC2A	C9J1F6	Protein PRRC2A	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
PUM1	E9PR38	Pumilio homolog 1	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
QKI	F5GYT7	Protein quaking	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
RANBP2	F8WBP7	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
RBM14	Q96PK6	RNA-binding protein 14	not tested	transcription factors/cofactors	NA	NA
RBM7	G3V1T9	RNA binding motif protein 7, isoform CRA_a	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
RBMS1	E7EPF2	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
SRBD1	B7Z6X7	S1 RNA-binding domain-containing protein 1	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
STAU2	G5EA18	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
SUGP2	E7ETX7	SURP and G-patch domain-containing protein 2	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
THRAP3	Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	not tested	transcription factors/cofactors	NA	NA
TNRC6A	H3BTQ1	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
TRO	B1AKE8	Trophinin (Fragment)	not tested	protein binding	NA	NA
TUBA1A	G3V1U9	Tubulin alpha-1A chain	Interaction not replicated	cytoskeletal proteins	NA	NA
TUBA3C	Q13748	Tubulin alpha-3C/D chain	not tested	cytoskeletal proteins	NA	NA
UBR5	E7EMW7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
YBX3	P16989	DNA-binding protein A	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
YLPM1	H0YIQ2	YLP motif-containing protein 1 (Fragment)	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
ZFR	Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
ZNF318	Q5VUA4	Zinc finger protein 318	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
ZNF326	Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
CDC73	Q6P1J9	Parafibromin	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA
HNRNPA3	E7EWI9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	not tested	nucleic acid binding	NA	NA
F8W810	F8W810	unknwon function	not tested	enzymes/enzyme modulators	NA	NA

Tableau 32: Comparaison des protéines trouvés dans l'interactome de Mayer et al, avec les protéines trouvées dans notre interactome NBEAL2

En bleu sont indiquées les protéines trouvées dans les deux interactomes (le nôtre et celui de Mayer et al). Les interactions reproduites (ou) en immunoprécipitation par Mayer et al sont indiquées. Les ratios intensités des controles/patient de notre interactome sont indiquées dans les deux dernières colonnes. Les valeurs de ces ratios permettent de mettre en évidence les protéines retrouvées par Mayer et al comme interagissant de façon spécifique.

Bibliographie

1. Wang, L., Wang, F.-S. & Gershwin, M. E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine* **278**, 369–395 (2015).
2. Goodnow, C. C. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Cell* **130**, 25–35 (2007).
3. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Masson, P. L., Pillai, S. & CO, J. S. &. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. (Elsevier Health Sciences, 2020).
4. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* **12**, 517–531 (2012).
5. Stavnezer, J. & Amemiya, C. T. Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology* **16**, 257–275 (2004).
6. Akkaya, M., Kwak, K. & Pierce, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* **20**, 229–238 (2020).
7. Janeway, C. A. & Murphy, K. *Immunobiologie de Janeway*. (De Boeck Supérieur, 2018).
8. Sewell, A. K. Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol* **12**, 669–677 (2012).
9. Lee, C. H. *et al.* Predicting Cross-Reactivity and Antigen Specificity of T Cell Receptors. *Frontiers in Immunology* **11**, 2498 (2020).
10. von Herrath, M. G. & Harrison, L. C. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 223–232 (2003).
11. Kumar, P., Bhattacharya, P. & Prabhakar, B. S. A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *Journal of Autoimmunity* **95**, 77–99 (2018).
12. Lucca, L. E. & Dominguez-Villar, M. Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol* **20**, 680–693 (2020).
13. Hou, T. Z. *et al.* A Transendocytosis Model of CTLA-4 Function Predicts Its Suppressive Behavior on Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **194**, 2148–2159 (2015).
14. Carneiro, B. A. & El-Deiry, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 395–417 (2020).
15. Thome, M. & Tschopp, J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by flip. *Nat Rev Immunol* **1**, 50–58 (2001).
16. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231–241 (2008).
17. Nagamine, K. *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* **17**, 393–398 (1997).
18. Conteduca, G., Indiveri, F., Filaci, G. & Negrini, S. Beyond APECED: An update on the role of the autoimmune regulator gene (AIRE) in physiology and disease. *Autoimmunity Reviews* **17**, 325–330 (2018).
19. Villaseñor, J., Benoist, C. & Mathis, D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunological Reviews* **204**, 156–164 (2005).
20. Hori, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
21. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330–336 (2003).
22. d’Hennezel, E., Dhuban, K. B., Torgerson, T. & Piccirillo, C. The immunogenetics of

- immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of Medical Genetics* **49**, 291–302 (2012).
23. Goudy, K. *et al.* Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clinical Immunology* **146**, 248–261 (2013).
 24. Rieux-Laucat, F. *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347–1349 (1995).
 25. Rieux-Laucat, F., Magérus-Chatinet, A. & Neven, B. The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective FAS or FAS-Ligand Functions. *J Clin Immunol* **38**, 558–568 (2018).
 26. Magerus-Chatinet, A. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**, 486–490 (2013).
 27. Bolze, A. *et al.* Whole-Exome-Sequencing-Based Discovery of Human FADD Deficiency. *The American Journal of Human Genetics* **87**, 873–881 (2010).
 28. Chun, H. J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395–399 (2002).
 29. Immune Checkpoint Signaling Pathway - Creative Diagnostics. <https://www.creative-diagnostics.com/immune-checkpoint-signaling-pathway.htm>.
 30. Shrager, S. H. & Kiel, C. SnapShot: APC/T Cell Immune Checkpoints. *Cell* **183**, 1142-1142.e1 (2020).
 31. Granier, C. *et al.* Les « immune checkpoints », comment ça marche. *Annales de Pathologie* **37**, 18–28 (2017).
 32. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med* **375**, 1767–1778 (2016).
 33. Vanamee, É. S. & Faustman, D. L. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci. Signal.* **11**, eaao4910 (2018).
 34. Ward-Kavanagh, L. K., Lin, W. W., Šedý, J. R. & Ware, C. F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* **44**, 1005–1019 (2016).
 35. Postow, M. A., Sidlow, R. & Hellmann, M. D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **378**, 158–168 (2018).
 36. Ogishi, M. *et al.* Inherited PD-1 deficiency underlies tuberculosis and autoimmunity in a child. *Nat Med* 1–9 (2021) doi:10.1038/s41591-021-01388-5.
 37. Béziat, V. *et al.* Humans with inherited T cell CD28 deficiency are susceptible to skin papillomaviruses but are otherwise healthy. *Cell* **184**, 3812-3828.e30 (2021).
 38. Tangye, S. G. *et al.* Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* **40**, 24–64 (2020).
 39. Somekh, I. *et al.* CD137 deficiency causes immune dysregulation with predisposition to lymphomagenesis. *Blood* **134**, 1510–1516 (2019).
 40. Byun, M. *et al.* Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. *The Journal of Experimental Medicine* **210**, 1743–1759 (2013).
 41. Kuehn, H. S. *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. **6** (2014).
 42. Schubert, D. *et al.* Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* **20**, 1410–1416 (2014).
 43. Grimbacher, B. *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* **4**, 261–268 (2003).
 44. Salzer, U. *et al.* ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology* **113**, 234–240 (2004).
 45. Warnatz, K. *et al.* Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and

provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* **107**, 3045–3052 (2006).

46. Shahinian, A. *et al.* Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**, 609–612 (1993).
47. Gayden, T. *et al.* Germline HAVCR2 mutations altering TIM-3 characterize subcutaneous panniculitis-like T cell lymphomas with hemophagocytic lymphohistiocytic syndrome. *Nat Genet* **50**, 1650–1657 (2018).
48. Polprasert, C. *et al.* Frequent germline mutations of HAVCR2 in sporadic subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Blood Advances* **3**, 588–595 (2019).
49. van Montfrans, J. M. *et al.* CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **129**, 787-793.e6 (2012).
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. Alkhairy, O. K. *et al.* Novel mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, immunologic, and genetic characterization of human CD27 deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **136**, 703-712.e10 (2015).
52. Abolhassani, H. *et al.* Combined immunodeficiency and Epstein-Barr virus–induced B cell malignancy in humans with inherited CD70 deficiency. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 91–106 (2016).
53. Izawa, K. *et al.* Inherited CD70 deficiency in humans reveals a critical role for the CD70–CD27 pathway in immunity to Epstein-Barr virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 73–89 (2016).
54. Ferrari, S. *et al.* Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *PNAS* **98**, 12614–12619 (2001).
55. Kutukculer, N. *et al.* Disseminated cryptosporidium infection in an infant with hyper-IgM syndrome caused by CD40 deficiency. *The Journal of Pediatrics* **142**, 194–196 (2003).
56. Al-Saud, B. K. *et al.* Clinical, Immunological, and Molecular Characterization of Hyper-IgM Syndrome Due to CD40 Deficiency in Eleven Patients. *J Clin Immunol* **33**, 1325–1335 (2013).
57. Roussel, L. *et al.* Loss of human ICOSL results in combined immunodeficiency. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 3151–3164 (2018).
58. Allen, R. C. *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990–993 (1993).
59. Aruffo, A. *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* **72**, 291–300 (1993).
60. Mitsuiki, N., Schwab, C. & Grimbacher, B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? *Immunological Reviews* **287**, 33–49 (2019).
61. Romo-Tena, J., Gómez-Martín, D. & Alcocer-Varela, J. CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity Reviews* **12**, 1171–1176 (2013).
62. Rudd, C. E., Taylor, A. & Schneider, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological Reviews* **229**, 12–26 (2009).
63. 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).
64. Ovcinnikovs, V. *et al.* CTLA-4–mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Science Immunology* **4**, (2019).
65. Gámez-Díaz, L. & Seidel, M. G. Different Apples, Same Tree: Visualizing Current Biological and Clinical Insights into CTLA-4 Insufficiency and LRBA and DEF6 Deficiencies. *Front. Pediatr.* **9**, (2021).

66. Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506–511 (2003).
67. Hudson, L. L., Rocca, K., Song, Y. W. & Pandey, J. P. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* **111**, 452–455 (2002).
68. 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).
69. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in CtlA-4. *Science* **270**, 985–988 (1995).
70. Mavrakis, K. J., McKinlay, K. J., Jones, P. & Sablitzky, F. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA. *Experimental Cell Research* **294**, 335–344 (2004).
71. El Masri, R. & Delon, J. RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. *Nat Rev Immunol* 1–15 (2021) doi:10.1038/s41577-021-00500-7.
72. Serwas, N. K. *et al.* Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis. *Nat Commun* **10**, 3106 (2019).
73. Fournier, B. *et al.* DEF6 deficiency, a mendelian susceptibility to EBV infection, lymphoma, and autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **147**, 740-743.e9 (2021).
74. Lopez-Herrera, G. *et al.* Deleterious Mutations in LRBA Are Associated with a Syndrome of Immune Deficiency and Autoimmunity. *The American Journal of Human Genetics* **90**, 986–1001 (2012).
75. Lo, B. *et al.* Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* **349**, 436–440 (2015).
76. Cullinane, A. R., Schäffer, A. A. & Huizinga, M. The BEACH is hot: A LYST of emerging roles for BEACH-domain containing proteins in human disease. *Traffic* **14**, (2013).
77. Jogl, G. *et al.* Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *EMBO J.* **21**, 4785–4795 (2002).
78. Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M. & Saraste, M. The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 441–445 (1999).
79. Burgess, A., Mornon, J.-P., de Saint-Basile, G. & Callebaut, I. A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. *Bioinformatics* **25**, 1219–1222 (2009).
80. Barbosa, M. D. F. S. *et al.* Identification of the homologous beige and Chediak–Higashi syndrome genes. *Nature* **382**, 262–265 (1996).
81. Nagle, D. L. *et al.* Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak–Higashi syndrome. *Nat Genet* **14**, 307–311 (1996).
82. Sharma, P. *et al.* Chediak-Higashi syndrome: A review of the past, present, and future. *Drug Discovery Today: Disease Models* **31**, 31–36 (2020).
83. Holland, P., Torgersen, M. L., Sandvig, K. & Simonsen, A. LYST Affects Lysosome Size and Quantity, but not Trafficking or Degradation Through Autophagy or Endocytosis. *Traffic* **15**, 1390–1405 (2014).
84. Zeligson, Alvin. S., Windhorst, Dorothy. B., White, James. G. & Good, Robert. A. The Chediak-Higashi Syndrome: Formation of Giant Melanosomes and the Basis of Hypopigmentation**From the Division of Dermatology and the Department of Pediatrics, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota 55455. *Journal of Investigative Dermatology* **49**, 575–581 (1967).
85. Sepulveda, F. E. *et al.* LYST Controls the Biogenesis of the Endosomal Compartment Required for Secretory Lysosome Function. *Traffic* **16**, 191–203 (2015).

86. Perou, C. M. *et al.* Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet* **13**, 303–308 (1996).
87. Mulhern, M. S. *et al.* NBEA: Developmental disease gene with early generalized epilepsy phenotypes. *Annals of Neurology* **84**, 788–795 (2018).
88. Nair, R. *et al.* Neurobeachin regulates neurotransmitter receptor trafficking to synapses. *The Journal of Cell Biology* **200**, 61 (2013).
89. Repetto, D. *et al.* Molecular Dissection of Neurobeachin Function at Excitatory Synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* **10**, (2018).
90. Su, Y. *et al.* Neurobeachin Is Essential for Neuromuscular Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* **24**, 3627–3636 (2004).
91. Glentis, S. *et al.* Exome Sequencing in BRCA1- and BRCA2-Negative Greek Families Identifies MDM1 and NBEAL1 as Candidate Risk Genes for Hereditary Breast Cancer. *Frontiers in Genetics* **10**, 1005 (2019).
92. Chen, J. *et al.* Identification and characterization of NBEAL1, a novel human neurobeachin-like 1 protein gene from fetal brain, which is up regulated in glioma. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **125**, 147–155 (2004).
93. Bindesbøll, C. *et al.* NBEAL1 controls SREBP2 processing and cholesterol metabolism and is a susceptibility locus for coronary artery disease. *Sci Rep* **10**, 4528 (2020).
94. Filimonenko, M. *et al.* The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alfy. *Molecular Cell* **38**, 265–279 (2010).
95. Clausen, T. H. *et al.* p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**, 330–344 (2010).
96. Napoli, E. *et al.* Beyond autophagy: a novel role for autism-linked Wdfy3 in brain mitophagy. *Sci Rep* **8**, 11348 (2018).
97. Napoli, E. *et al.* Wdfy3 regulates glycophyagy, mitophagy, and synaptic plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab* 0271678X211027384 (2021) doi:10.1177/0271678X211027384.
98. Stessman, H. A. F. *et al.* Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nat Genet* **49**, 515–526 (2017).
99. Le Duc, D. *et al.* Pathogenic WDFY3 variants cause neurodevelopmental disorders and opposing effects on brain size. *Brain* **142**, 2617–2630 (2019).
100. Kadir, R. *et al.* ALFY-Controlled DVL3 Autophagy Regulates Wnt Signaling, Determining Human Brain Size. *PLOS Genetics* **12**, e1005919 (2016).
101. Iossifov, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216–221 (2014).
102. Orosco, L. A. *et al.* Loss of Wdfy3 in mice alters cerebral cortical neurogenesis reflecting aspects of the autism pathology. *Nat Commun* **5**, 4692 (2014).
103. Dragich, J. M. *et al.* Autophagy linked FYVE (Alfy/WDFY3) is required for establishing neuronal connectivity in the mammalian brain. *eLife* **5**, e14810 (2016).
104. Zhao, H. *et al.* An intronic variant associated with systemic lupus erythematosus changes the binding affinity of Yinyang1 to downregulate WDFY4. *Genes Immun.* **13**, 536–542 (2012).
105. Kochi, Y. *et al.* Splicing variant of *WDFY4* augments MDA5 signalling and the risk of clinically amyopathic dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* **77**, 602–611 (2018).
106. Yuan, Q. *et al.* WDFY4 Is Involved in Symptoms of Systemic Lupus Erythematosus by Modulating B Cell Fate via Noncanonical Autophagy. *J.I.* **201**, 2570–2578 (2018).
107. Theisen, D. J. *et al.* WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* **362**, 694–699 (2018).
108. Barbet, G. & Blander, J. M. A key ingredient for priming killer T cells. *Science* **362**, 641–642 (2018).

109. Gulsuner, S. *et al.* Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred. *Genome Res.* **21**, 1995–2003 (2011).
110. Alazami, A. M. *et al.* Accelerating Novel Candidate Gene Discovery in Neurogenetic Disorders via Whole-Exome Sequencing of Prescreened Multiplex Consanguineous Families. *Cell Reports* **10**, 148–161 (2015).
111. Komara, M., John, A., Suleiman, J., Ali, B. R. & Al-Gazali, L. Clinical and molecular delineation of dysequilibrium syndrome type 2 and profound sensorineural hearing loss in an inbred Arab family. *American Journal of Medical Genetics Part A* **170**, 540–543 (2016).
112. Cappuccio, G. *et al.* An extremely severe phenotype attributed to WDR81 nonsense mutations. *Annals of Neurology* **82**, 650–651 (2017).
113. Su, J. *et al.* Novel compound heterozygous frameshift variants in WDR81 associated with congenital hydrocephalus 3 with brain anomalies: First Chinese prenatal case confirms WDR81 involvement. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* **9**, e1624 (2021).
114. Cavallin, M. *et al.* WDR81 mutations cause extreme microcephaly and impair mitotic progression in human fibroblasts and Drosophila neural stem cells. *Brain* **140**, 2597–2609 (2017).
115. Liu, X. *et al.* The BEACH-containing protein WDR81 coordinates p62 and LC3C to promote aggrephagy. *Journal of Cell Biology* **216**, 1301–1320 (2017).
116. Adam-Klages, S. *et al.* FAN, a Novel WD-Repeat Protein, Couples the p55 TNF-Receptor to Neutral Sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937–947 (1996).
117. Ségui, B. *et al.* Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* **108**, 143–151 (2001).
118. Forsberg, J. *et al.* Caspase-2 associates with FAN through direct interaction and overlapping functionality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **499**, 822–828 (2018).
119. Werneburg, N., Guicciardi, M. E., Yin, X.-M. & Gores, G. J. TNF- α -mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **287**, G436–G443 (2004).
120. PtdIns(4,5)P-restricted plasma membrane localization of FAN is involved in TNF-induced actin reorganization. *The EMBO Journal* **26**, 3308–3321 (2007).
121. Möhlig, H. *et al.* The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C. *Experimental Cell Research* **313**, 2703–2718 (2007).
122. Leidal, A. M. *et al.* The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat Cell Biol* **22**, 187–199 (2020).
123. Leidal, A. M. & Debnath, J. LC3-dependent extracellular vesicle loading and secretion (LDELS). *Autophagy* **16**, 1162–1163 (2020).
124. Kahr, W. H. *et al.* Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* **43**, 738–740 (2011).
125. Raccuglia, G. Gray platelet syndrome. *The American Journal of Medicine* **51**, 818–828 (1971).
126. Nurden, A. T. & Nurden, P. The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Reviews* **21**, 21–36 (2007).
127. Albers, C. A. *et al.* Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for Gray Platelet Syndrome. *Nat Genet* **43**, 735–737 (2011).
128. Gunay-Aygun, M. *et al.* NBEAL2 is mutated in Gray Platelet Syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet* **43**, 732–734 (2011).
129. Transcript: NBEAL2-205 (ENST00000450053.8) - Exons - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 104.

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000160796;r=3:46979666-47009704;t=ENST00000450053.

130. Deppermann, C. *et al.* Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J. Clin. Invest.* (2013) doi:10.1172/JCI69210.
131. Kahr, W. H. A. *et al.* Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2^{-/-} mice. *Blood* **122**, 3349–3358 (2013).
132. Guerrero, J. A. *et al.* Gray platelet syndrome: proinflammatory megakaryocytes and a-granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice. **124**, 12 (2014).
133. Tomberg, K. *et al.* Spontaneous 8bp Deletion in Nbeal2 Recapitulates the Gray Platelet Syndrome in Mice. *PLoS One* **11**, (2016).
134. Drube, S. *et al.* The Neurobeachin-like 2 Protein Regulates Mast Cell Homeostasis. *The Journal of Immunology* **199**, 2948–2957 (2017).
135. Sowerby, J. M. *et al.* NBEAL2 is required for neutrophil and NK cell function and pathogen defense. *J Clin Invest* **127**, 3521–3526 (2017).
136. Lo, R. W., Li, L., Leung, R., Pluthero, F. G. & Kahr, W. H. A. NBEAL2 (Neurobeachin-Like 2) Is Required for Retention of Cargo Proteins by α -Granules During Their Production by Megakaryocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **38**, 2435–2447 (2018).
137. Lo, R. W. *et al.* The endoplasmic reticulum protein SEC22B interacts with NBEAL2 and is required for megakaryocyte α -granule biogenesis. *Blood* **136**, 715–725 (2020).
138. Drouin, A. *et al.* Newly recognized cellular abnormalities in the gray platelet syndrome. *Blood* **98**, 1382–1391 (2001).
139. Gunay-Aygun, M. *et al.* Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood* **116**, 4990–5001 (2010).
140. Kahr, W. H. A. & Dror, Y. Gray platelet syndrome: macrothrombocytopenia with deficient α -granules. *Blood* **120**, 2543–2543 (2012).
141. White, J. G. & Brunning, R. D. Neutrophils in the gray platelet syndrome. *Platelets* **15**, 333–340 (2004).
142. Chedani, H., Dupuy, E., Massé, J.-M. & Cramer, E. M. Neutrophil secretory defect in the gray platelet syndrome: A new case. *Platelets* **17**, 14–19 (2006).
143. Rensing-Ehl, A. *et al.* Gray platelet syndrome can mimic autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **126**, 1967–1969 (2015).
144. Sims, M. C. *et al.* Novel manifestations of immune dysregulation and granule defects in gray platelet syndrome. *Blood* **136**, 1956–1967 (2020).
145. Aarts, C. E. M. *et al.* Neutrophil specific granule and NETosis defects in gray platelet syndrome. *Blood Advances* **5**, 549–564 (2021).
146. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 134–147 (2018).
147. Les pathologies plaquettaires. *MHEMO* <https://mhemo.fr/les-pathologies/les-pathologies-plaquettaires/>.
148. Machlus, K. R. & Italiano, J. E. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. in *Platelets* 25–46 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00002-3.
149. Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. <https://www-jci-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/view/26674/pdf> (2005) doi:10.1172/JCI26674.
150. Lasne, D., Borgel, D. & Kauskot, A. Sialylation and thrombocytopenia. *Hématologie* **26**, 250–260 (2020).
151. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* **23**, 177–189 (2009).
152. Heijnen, H. & Sluijs, P. van der. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **13**, 2141–2151 (2015).
153. Li, J. L., Zarbock, A. & Hidalgo, A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and

- immune surveillance. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 2193–2204 (2017).
154. Selvadurai, M. V. & Hamilton, J. R. Structure and function of the open canalicular system – the platelet’s specialized internal membrane network. *Platelets* **29**, 319–325 (2018).
155. Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T. & Hwa, J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **6**, 153 (2019).
156. Thomas, S. G. The Structure of Resting and Activated Platelets. in *Platelets* 47–77 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00003-5.
157. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264–274 (2011).
158. Nicolai, L., Gaertner, F. & Massberg, S. Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights. *Trends in Immunology* **40**, 922–938 (2019).
159. Maouia, A., Rebetz, J., Kapur, R. & Semple, J. W. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfusion Medicine Reviews* **34**, 209–220 (2020).
160. Gay, L. J. & Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **11**, 123–134 (2011).
161. Lucotti, S. & Muschel, R. J. Platelets and Metastasis: New Implications of an Old Interplay. *Front Oncol* **10**, 1350 (2020).
162. Guerrero, J. A. *et al.* Gray platelet syndrome: proinflammatory megakaryocytes and α -granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice. *Blood* **124**, 3624–3635 (2014).
163. Despotovic, J. M. & Bussel, J. B. Immune Thrombocytopenia (ITP). in *Platelets* 707–724 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00039-4.
164. Arnold, D. M. *et al.* Misdiagnosis of primary immune thrombocytopenia and frequency of bleeding: lessons from the McMaster ITP Registry. *Blood Advances* **1**, 2414–2420 (2017).
165. Maclachlan, A., Watson, S. P. & Morgan, N. V. Inherited platelet disorders: Insight from platelet genomics using next-generation sequencing. *Platelets* **28**, 14 (2017).
166. Lambert, M. P. Update on the inherited platelet disorders: *Current Opinion in Hematology* **22**, 460–466 (2015).
167. Oved, J. H., Lambert, M. P., Kowalska, M. A., Poncz, M. & Karczewski, K. J. Population based frequency of naturally-occurring loss-of-function variants in genes associated with platelet disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **n/a**.
168. Palma-Barqueros, V. *et al.* Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 4521 (2021).
169. Nurden, A. T. & Nurden, P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica* (2020) doi:10.3324/haematol.2019.233197.
170. Shim, Y. J. Genetic classification and confirmation of inherited platelet disorders: current status in Korea. *Clin Exp Pediatr* **63**, 79–87 (2020).
171. Germeshausen, M. *et al.* MECOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Advances* **2**, 586–596 (2018).
172. Schlegelberger, B. & Heller, P. G. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Seminars in Hematology* **54**, 75–80 (2017).
173. Noris, P. *et al.* Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* **117**, 6673–6680 (2011).
174. Noetzli, L. *et al.* Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **47**, 535–538 (2015).
175. Di Paola, J. & Porter, C. C. ETV6-related thrombocytopenia and leukemia predisposition. *Blood* **134**, 663–667 (2019).
176. Crispino, J. D. & Horwitz, M. S. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood*

129, 2103–2110 (2017).

177. Rabbolini, D. J., Morel-Kopp, M.-C., Ward, C. M. & Stevenson, W. S. *GFI1B* variants associated with thrombocytopenia. *Platelets* **28**, 525–527 (2017).
178. Ferreira, C. R. *et al.* Combined alpha-delta platelet storage pool deficiency is associated with mutations in *GFI1B*. *Molecular genetics and metabolism* **120**, 288 (2017).
179. Pluthero, F. G. & Kahr, W. H. A. Gray platelet syndrome: *NBEAL2* mutations are associated with pathology beyond megakaryocyte and platelet function defects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **19**, 318–322 (2021).
180. Hofmann, I. *et al.* Congenital macrothrombocytopenia with focal myelofibrosis due to mutations in human *G6b-B* is rescued in humanized mice. *Blood* **132**, 1399–1412 (2018).
181. Bastida, J. M., Benito, R., González-Porras, J. R. & Rivera, J. *ABCG5* and *ABCG8* gene variations associated with sitosterolemia and platelet dysfunction. *Platelets* **32**, 573–577 (2021).
182. Westbury, S. K. *et al.* Phenotype description and response to thrombopoietin receptor agonist in *DIAPH1*-related disorder. *Blood Advances* **2**, 2341–2346 (2018).
183. Martinelli, S. *et al.* Functional Dysregulation of *CDC42* Causes Diverse Developmental Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics* **102**, 309–320 (2018).
184. 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).
185. Latham, S. L. *et al.* Variants in exons 5 and 6 of *ACTB* cause syndromic thrombocytopenia. *Nat Commun* **9**, 4250 (2018).
186. Candotti, F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol* **38**, 13–27 (2018).
187. Kahr, W. H. A. *et al.* Loss of the Arp2/3 complex component *ARPC1B* causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nat Commun* **8**, 14816 (2017).
188. Brigida, I. *et al.* T-cell defects in patients with *ARPC1B* germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood* **132**, 2362–2374 (2018).
189. Seo, A. *et al.* Inherited thrombocytopenia associated with mutation of *UDP-galactose-4-epimerase (GALE)*. *Human Molecular Genetics* **28**, 133–142 (2019).
190. Lacruz, R. S. & Feske, S. Diseases caused by mutations in *ORAI1* and *STIM1*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1356**, 45–79 (2015).
191. Rognoni, E., Ruppert, R. & Fässler, R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of Cell Science* **129**, 17–27 (2016).
192. Dupuis, A., Bordet, J.-C., Eckly, A. & Gachet, C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *JCM* **9**, 2508 (2020).
193. Huizing, M. *et al.* Hermansky–Pudlak syndrome: Mutation update. *Human Mutation* **41**, 543–580 (2020).
194. Castaño-Jaramillo, L.-M. *et al.* Diagnostic and therapeutic caveats in Griscelli syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology* **93**, e13034 (2021).
195. Green, M. R., Sambrook, J. & Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
196. Green, M. R. & Sambrook, J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harb Protoc* **2017**, pdb.prot093450 (2017).
197. Meyts, I. *et al.* Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 957–969 (2016).
198. Zhu, H., Luo, H., Yan, M., Zuo, X. & Li, Q.-Z. Autoantigen Microarray for High-throughput Autoantibody Profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **13**, 210–218 (2015).
199. Lanneau, C., Kalouche, G., Cai, X., Lo-Presti, F. & Potting, C. Genetic

- Manipulation/Modulation for Target Discovery and Validation. in *Target Discovery and Validation* 233–276 (John Wiley & Sons, Ltd, 2019). doi:10.1002/9783527818242.ch9.
200. Concordet, J.-P. & Haeussler, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research* **46**, W242–W245 (2018).
201. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**, 827–832 (2013).
202. Magerus-Chatinet, A. & Rieux-Laucat, F. In Vitro Evaluation of the Apoptosis Function in Human Activated T Cells. in *CD95: Methods and Protocols* (ed. Legembre, P.) 33–40 (Springer, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6780-3_4.
203. Martin, E. *et al.* CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation. *Nature* **510**, 288–292 (2014).
204. Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434–443 (2020).
205. Ng, P. C. & Henikoff, S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* **31**, 3812–3814 (2003).
206. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248–249 (2010).
207. Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J. & Kircher, M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* **47**, D886–D894 (2019).
208. Amberger, J., Bocchini, C. A., Scott, A. F. & Hamosh, A. McKusick’s Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). *Nucleic Acids Res* **37**, D793–D796 (2009).
209. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 1–14 (2013).
210. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* **44**, W90–W97 (2016).
211. Monaco, G. *et al.* RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Reports* **26**, 1627–1640.e7 (2019).
212. Nowicka, M. *et al.* CyTOF workflow: differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. (2019) doi:10.12688/f1000research.11622.3.
213. Hou, T. Z. *et al.* Study of an extended family with CTLA-4 deficiency suggests a CD28/CTLA-4 independent mechanism responsible for differences in disease manifestations and severity. *Clinical Immunology* **188**, 94–102 (2018).
214. Schwab, C. *et al.* Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **142**, 1932–1946 (2018).
215. Chen, Y. *et al.* The regulation of DOCK family proteins on T and B cells. *J Leukoc Biol* JLB.1MR0520-221RR (2020) doi:10.1002/JLB.1MR0520-221RR.
216. Tangye, S. G. *et al.* Human inborn errors of the actin cytoskeleton affecting immunity: way beyond WAS and WIP. *Immunology & Cell Biology* **97**, 389–402 (2019).
217. Sakabe, I., Asai, A., Iijima, J. & Maruyama, M. Age-related guanine nucleotide exchange factor, mouse Zizimin2, induces filopodia in bone marrow-derived dendritic cells. *Immun Ageing* **9**, 1–9 (2012).
218. Matsuda, T., Yanase, S., Takaoka, A. & Maruyama, M. The immunosenescence-related gene Zizimin2 is associated with early bone marrow B cell development and marginal zone B cell formation. *Immun Ageing* **12**, 1–12 (2015).
219. Kennedy, J. M. *et al.* CCDC88B is a novel regulator of maturation and effector functions of T cells during pathological inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **211**, 2519–2535 (2014).
220. Liu, H. *et al.* Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects

in leprosy. *Nat Genet* **47**, 267–271 (2015).

221. Fischer, A. *et al.* A Novel Sarcoidosis Risk Locus for Europeans on Chromosome 11q13.1. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 877–885 (2012).
222. Fodil, N. *et al.* CCDC88B is required for pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Commun* **8**, 932 (2017).
223. Ham, H., Huynh, W., Schoon, R. A., Vale, R. D. & Billadeau, D. D. HkRP3 Is a Microtubule-Binding Protein Regulating Lytic Granule Clustering and NK Cell Killing. *J.I.* **194**, 3984–3996 (2015).
224. Olivier, J.-F. *et al.* CCDC88B is required for mobility and inflammatory functions of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **108**, 1787–1802 (2020).
225. Manieri, N. A., Chiang, E. Y. & Grogan, J. L. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends in Immunology* **38**, 20–28 (2017).
226. Harjunpää, H. & Guillerey, C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clinical & Experimental Immunology* **200**, 108–119 (2020).
227. Joller, N. *et al.* Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* **40**, 569–581 (2014).
228. Kurtulus, S. *et al.* TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* **125**, 4053–4062 (2015).
229. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology* **10**, 48–57 (2009).
230. Hafler, J. P. *et al.* CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes & Immunity* **10**, 5–10 (2009).
231. Lee, N., Kim, D. & Kim, W.-U. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* **10**, 270 (2019).
232. Choi, S. *et al.* Transcription factor NFAT5 promotes macrophage survival in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **127**, 954–969 (2017).
233. Wang, Z. *et al.* Specific macrothrombocytopenia/hemolytic anemia associated with sitosterolemia: Eosinophilia in routine blood samples and the subsequent risk of hematological malignancies and death. *Am. J. Hematol.* **89**, 320–324 (2014).
234. Andres, O. *et al.* Use of Targeted High-Throughput Sequencing for Genetic Classification of Patients with Bleeding Diathesis and Suspected Platelet Disorder. *TH Open* **02**, e445–e454 (2018).
235. Ferrari, S. *et al.* New heterozygous variant in *GP1BB* gene is responsible for an inherited form of macrothrombocytopenia. *Br J Haematol* **184**, 855–858 (2019).
236. Cai, H. Diagnostic des pathologies plaquettaires: optimisation de l’exploration des granules denses plaquettaires. 204 (2016).
237. Leo, V. C. *et al.* Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **13**, 643 (2015).
238. Jones, M. L. *et al.* Rapid genetic diagnosis of heritable platelet function disorders with next-generation sequencing: proof-of-principle with Hermansky–Pudlak syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **10**, 306–309 (2012).
239. Pluthero, F. G. & Kahr, W. H. A. Recent advances in inherited platelet disorders: *Current Opinion in Hematology* **26**, 313–319 (2019).
240. Michelson, A., Cattaneo, M., Frelinger, A. & Newman, P. *PLATELETS Fourth Edition.* (2019).
241. Thul, P. J. *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, eaal3321 (2017).
242. Braun, A., Anders, H.-J., Gudermann, T. & Mammadova-Bach, E. Platelet-Cancer Interplay: Molecular Mechanisms and New Therapeutic Avenues. *Front Oncol* **11**, 665534

(2021).

243. Wijgaerts, A. *et al.* The transcription factor GATA1 regulates NBEAL2 expression through a long-distance enhancer. *Haematologica* **102**, 695–706 (2017).
244. Bresnick, E. H., Lee, H.-Y., Fujiwara, T., Johnson, K. D. & Keles, S. GATA Switches as Developmental Drivers. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 31087–31093 (2010).
245. Kiykim, A. *et al.* Abatacept as a Long-Term Targeted Therapy for LRBA Deficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **7**, 2790-2800.e15 (2019).
246. Lee, S. *et al.* Abatacept alleviates severe autoimmune symptoms in a patient carrying a de novo variant in CTLA-4. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 327–330 (2016).
247. Shields, C. L. *et al.* Assessment of CTLA-4 Deficiency–Related Autoimmune Choroidopathy Response to Abatacept. *JAMA Ophthalmology* **134**, 844–846 (2016).
248. van Leeuwen, E. M., Cuadrado, E., Gerrits, A. M., Witteveen, E. & de Bree, G. J. Treatment of Intracerebral Lesions with Abatacept in a CTLA4-Haploinsufficient Patient. *J Clin Immunol* **38**, 464–467 (2018).
249. Egg, D. *et al.* Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* S0091674921008915 (2021) doi:10.1016/j.jaci.2021.04.039.
250. Simon, T. A. *et al.* Comparative risk of malignancies and infections in patients with rheumatoid arthritis initiating abatacept versus other biologics: a multi-database real-world study. *Arthritis Res Ther* **21**, 228 (2019).
251. Favier, R. *et al.* Correction of Severe Myelofibrosis, Impaired Platelet Functions and Abnormalities in a Patient with Gray Platelet Syndrome Successfully Treated by Stem Cell Transplantation. *Platelets* 1–5 (2019) doi:10.1080/09537104.2019.1663809.
252. Conforti, F. *et al.* Cancer immunotherapy efficacy and patients’ sex: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology* **19**, 737–746 (2018).
253. Boutros, C. *et al.* Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 473–486 (2016).
254. Xu, J., Brosseau, J.-P. & Shi, H. Targeted degradation of immune checkpoint proteins: emerging strategies for cancer immunotherapy. *Oncogene* **39**, 7106–7113 (2020).
255. Ren, Y. *et al.* TRAPPC4 regulates the intracellular trafficking of PD-L1 and antitumor immunity. *Nat Commun* **12**, 5405 (2021).
256. Mayer, L. *et al.* Nbeal2 interacts with Dock7, Sec16a, and Vac14. *Blood* **131**, 1000–1011 (2018).
257. Dobbs, K. *et al.* Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *New England Journal of Medicine* **372**, 2409–2422 (2015).
258. Zhang, Q. *et al.* Combined Immunodeficiency Associated with DOCK8 Mutations. *New England Journal of Medicine* **361**, 2046–2055 (2009).
259. Helbig, K. I., Mroske, C., Moorthy, D., Sajan, S. a. & Velinov, M. Biallelic loss-of-function variants in DOCK3 cause muscle hypotonia, ataxia, and intellectual disability. *Clinical Genetics* **92**, 430–433 (2017).
260. Iwata-Otsubo, A. *et al.* DOCK3-related neurodevelopmental syndrome: Biallelic intragenic deletion of DOCK3 in a boy with developmental delay and hypotonia. *American Journal of Medical Genetics Part A* **176**, 241–245 (2018).
261. Wiltrout, K. *et al.* Variants in DOCK3 cause developmental delay and hypotonia. *Eur J Hum Genet* **27**, 1225–1234 (2019).
262. Perrault, I. *et al.* Mutations in DOCK7 in Individuals with Epileptic Encephalopathy and Cortical Blindness. *The American Journal of Human Genetics* **94**, 891–897 (2014).
263. Shaheen, R. *et al.* Recessive Mutations in DOCK6, Encoding the Guanidine Nucleotide Exchange Factor DOCK6, Lead to Abnormal Actin Cytoskeleton Organization and Adams-Oliver Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **89**, 328–333 (2011).
264. Sukalo, M. *et al.* DOCK6 Mutations Are Responsible for a Distinct Autosomal-

- Recessive Variant of Adams–Oliver Syndrome Associated with Brain and Eye Anomalies. *Human Mutation* **36**, 593–598 (2015).
265. Wang, N., Wu, W.-I. & De Lozanne, A. BEACH family of proteins: Phylogenetic and functional analysis of six Dictyostelium BEACH proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* **86**, 561–570 (2002).
266. Sereni, L. *et al.* Autonomous role of Wiskott-Aldrich syndrome platelet deficiency in inducing autoimmunity and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **142**, 1272–1284 (2018).
267. Wieland, A. & Ahmed, R. Immunological lessons from CD28 deficiency in humans. *Cell* **184**, 3595–3597 (2021).
268. Holzlova, E. *et al.* Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Somatic Fas Mutations. *New England Journal of Medicine* **351**, 1409–1418 (2004).
269. Pistillo, M. P. CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood* **101**, 202–209 (2003).
270. Oyewole-Said, D. *et al.* Beyond T-Cells: Functional Characterization of CTLA-4 Expression in Immune and Non-Immune Cell Types. *Front. Immunol.* **0**, (2020).
271. Merlo, A. *et al.* Inhibitory Receptors CD85j, LAIR-1, and CD152 Down-Regulate Immunoglobulin and Cytokine Production by Human B Lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**, 705–712 (2005).
272. Pioli, C., Gatta, L., Ubaldi, V. & Doria, G. Inhibition of IgG1 and IgE Production by Stimulation of the B Cell CTLA-4 Receptor. *The Journal of Immunology* **165**, 5530–5536 (2000).
273. Quandt, D., Hoff, H., Rudolph, M., Fillatreau, S. & Brunner-Weinzierl, M. C. A New Role of CTLA-4 on B Cells in Thymus-Dependent Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* **179**, 7316–7324 (2007).
274. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* **41**, 1026–1039 (2014).
275. Kuiper, H. M., Brouwer, M., Linsley, P. S. & Lier, R. A. van. Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells. *The Journal of Immunology* **155**, 1776–1783 (1995).
276. Laurent, S. *et al.* CTLA-4 is expressed by human monocyte—derived dendritic cells and regulates their functions. *Human Immunology* **71**, 934–941 (2010).
277. M, H. *et al.* Dendritic Cell-Secreted Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Regulates the T-cell Response by Downmodulating Bystander Surface B7. *Stem Cells and Development* (2016) doi:10.1089/scd.2016.0009.
278. Wang, X. B. *et al.* CTLA4 is expressed on mature dendritic cells derived from human monocytes and influences their maturation and antigen presentation. *BMC Immunol* **12**, 21 (2011).
279. Halpert, M. M. *et al.* MHC class I and II peptide homology regulates the cellular immune response. *The FASEB Journal* **34**, 8082–8101 (2020).
280. Lougaris, V. *et al.* CTLA-4 regulates human Natural Killer cell effector functions. *Clinical Immunology* **194**, 43–45 (2018).
281. Wang, X.-B. *et al.* Expression of CTLA-4 by Human Monocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* **55**, 53–60 (2002).
282. Yang, Y. *et al.* CTLA-4 expression by B-1a B cells is essential for immune tolerance. *Nat Commun* **12**, 525 (2021).
283. Jeremiah, N. *et al.* Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. <https://www-jci-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/view/79100/pdf> (2014) doi:10.1172/JCI79100.

284. Liu, Y. *et al.* Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. *N Engl J Med* **371**, 507–518 (2014).