



Rôle des facteurs de la réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire

Sophie Kaltenbach

► **To cite this version:**

Sophie Kaltenbach. Rôle des facteurs de la réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire. Génétique. Université René Descartes - Paris V, 2015. Français. <NNT : 2015PA05T038>. <tel-01356265>

HAL Id: tel-01356265

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01356265>

Submitted on 25 Aug 2016

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

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

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Spécialité « Développement, génétique, neurobiologie et vieillissement »

Laboratoire Dynamique du Génome et Système Immunitaire

UMR1163 Institut Imagine – Hôpital Necker-Enfants Malades (Paris)

Rôle des facteurs de la réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire

Par Sophie Kaltenbach

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Jean-Pierre de Villartay

Présentée et soutenue publiquement le 12 novembre 2015

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Serge Romana - Président du jury

Monsieur le Professeur Laurent Mauvieux - Rapporteur

Madame le Docteur Isabelle Meyts - Rapporteur

Monsieur le Docteur Jean-Pierre de Villartay - Directeur de thèse

Rôle des facteurs de réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire.

Résumé :

Le système immunitaire est particulièrement dépendant des mécanismes de réparation de l'ADN, en effet le développement du système immunitaire adaptatif nécessite certains mécanismes de réparation de l'ADN, lors de la recombinaison V(D)J et lors de la commutation de classe des immunoglobulines. De plus, le système hématopoïétique est par sa nature très sensible aux lésions spontanées de l'ADN. Il existe chez l'homme de nombreux déficits immunitaires directement liés à un défaut de réparation de l'ADN. L'identification du gène responsable est importante pour un conseil génétique familial approprié et pour la prise en charge médicale. Nous avons accès aujourd'hui à de puissants outils de dépistage génétique grâce au séquençage à haut débit et la liste des gènes responsables d'un déficit immunitaire s'allonge de plus en plus rapidement.

La première partie de ce travail porte sur la mise au point d'un nouvel outil de dépistage rapide des déficits de la réparation de l'ADN, en particulier dans le cas de déficit immunitaires. Ce test est fondé sur l'observation d'un biais du répertoire du TCR α des lymphocytes T circulants lorsque les thymocytes ont une durée de vie diminuée, or un défaut de réparation de l'ADN entraîne une diminution de la survie thymocytaire. Nous avons mis au point deux techniques, par biologie moléculaire et par cytométrie en flux, pour détecter un éventuel biais du répertoire du TCR α et évaluer la pertinence de ce test dans les déficits immunitaires liés à un défaut de réparation de l'ADN. Un biais a notamment été détecté dans les cas de déficit en facteur du NHEJ et en ATM.

Nous avons également établi en collaboration avec le service d'Immunologie Clinique de l'hôpital Saint-Louis une cohorte de patients atteints de déficit immunitaire commun variable (DICV) dont la présentation clinique est évocatrice d'un défaut de réparation de l'ADN. Une série de test fonctionnels de dépistages de déficit de la réparation de l'ADN ainsi que des analyses génétiques (CGH array, séquençage complet de l'exome) ont été fait chez ces patients afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les DICV. Parmi les 18 patients analysés, dans 5 cas on retrouve une sensibilité cellulaire accrue aux agents génotoxiques et chez 15 patients, un gène candidat a été identifié. Ces résultats sont encore préliminaires et la caractérisation génétique et fonctionnelle des mutations identifiées sera poursuivie par notre équipe.

Pour finir, nous avons entrepris l'exploration génétique et fonctionnelle de deux mutations identifiées chez une jeune patiente atteinte de déficit immunitaire combiné (CID) associé à un syndrome lymphoprolifératif et une auto-immunité, et chez qui une hypersensibilité cellulaire à la Mitomycine C, agent pontant de l'ADN, a été détectée. La première mutation a été identifiée dans le gène *ELKS* qui code pour un facteur impliqué dans la réparation de l'ADN. La complémentation fonctionnelle de ce gène prouve l'implication de cette mutation dans l'hypersensibilité des cellules de la patiente à la MMC. Nous avons développé un modèle murin KO conditionnel de ce gène dans les cellules hématopoïétiques qui n'a pas montré de défaut de développement du système immunitaire. La deuxième mutation identifiée se situe dans le gène *BACH2* codant pour un répresseur transcriptionnel très impliqué dans le développement du système immunitaire. Les souris KO pour ce gène ont un phénotype proche du déficit immunitaire décrit chez cette patiente. Les investigations de cette mutation sont en cours chez elle et chez les membres de sa famille également porteurs de la mutation.

Mots clés : Réparation de l'ADN, Déficiences immunitaires, Instabilité génomique, Répertoire TCR α , Séquençage de l'exome

Role of DNA repair factors in genome dynamics in the immune system

Abstract:

The immune system is particularly dependent on DNA damage response (DDR) pathways. The development of the adaptive immune system requires certain DDR mechanisms, in particular during the V(D)J recombination and during class switch recombination (CSR), furthermore, the hematopoietic system is very sensitive to spontaneous DNA lesions. Therefore, there are many immune deficiencies in human directly related to a DDR deficiency. The identification of the responsible gene is important for appropriate genetic counseling. Today, we have access to powerful genetic screening tools, in particular next generation sequencing (NGS) and the list of genes responsible for immune deficiency is growing rapidly.

The first part of this work focuses on the development of a new screening tool for DDR defects, in particular in the case of immune deficiency, and evaluation of clinical interest. This test is based on the observation of a bias of the TCR α repertoire in circulating T lymphocytes when thymocyte lifespan is diminished and we know that DDR defect causes decreased thymocyte survival. We have developed two techniques, by molecular biology and by flow cytometry, to detect a potential bias of the TCR α repertoire and assess the suitability of this test in some immunodeficiencies linked to a DDR defect. A significant bias was detected in the case of ATM and NHEJ factor deficiency.

Furthermore, we have established a cohort of patients suffering from common variable immunodeficiency (CVID) with a clinical presentation highly suggestive of DDR defect, in collaboration with the Clinical Immunology Service of Hôpital Saint-Louis (Paris). Functional test for DDR defect and genetic analysis (CGHarray, whole exome sequencing) were performed in these patients to identify new genes involved in CVID. Among the 18 patients analyzed until now, five cases of cellular sensitivity to genotoxic agents have been detected and a candidate gene was identified in 15 of them. These results are still preliminary and our team will pursue genetic and functional characterization of the identified mutations.

Finally, we undertook genetic and functional exploration of two mutations identified in a young patient with combined immunodeficiency (CID) associated with a lymphoproliferative disease and autoimmunity, and in whom a cellular hypersensitivity to mitomycin C, a DNA crosslinking agent, was detected. The first mutation was identified in the *ELKS* gene, which codes for a factor involved in DNA repair. Functional complementation of this gene demonstrates the involvement of this mutation in the hypersensitivity of patient's cells to MMC. We have developed a conditional knockout mouse model of this gene in hematopoietic cells that did not show any defect in development of the immune system. The second mutation was identified in *BACH2* gene encoding a transcriptional repressor involved in the development of the immune system. Knockout mice for this gene have a similar phenotype to the immune deficiency described in this patient. Investigations on this mutation are ongoing in the patient and among family members that also carry the mutation.

Keywords: DNA damage repair, Immune deficiencies, genomic instability, TCR α repertoire, whole exome sequencing.

Remerciements

A Laurent Mauvieux et Isabelle Meyts, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et de venir de loin pour la soutenance. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A Serge Romana, merci d'avoir accepté de présider ce jury. J'ai fait mes premiers pas en cytogénétique il y a 8 ans déjà, merci pour tout ton enseignement depuis ce temps et la confiance que tu me témoignes.

A Jean-Pierre de Villartay, un grand merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, ces trois années ont été riches en enseignement, aussi bien technique que scientifique. J'éprouve une très grande admiration pour ta rigueur, ton impressionnante culture scientifique et toutes ces innovations que tu proposes, toujours au fait des nouveautés techniques.

A Alain Fischer, merci pour votre accueil au sein de l'ex-U768, puis dans ce magnifique environnement de travail à l'institut Imagine. Je mesure la chance que j'ai eu d'avoir pu travailler ici.

A Despina Moshous, ma copine de bureau à Kirmisson. Un immense merci pour ton aide, ton écoute, tes conseils... Tu es pour beaucoup dans l'accomplissement de ce travail, sois assurée de ma profonde reconnaissance.

A Patrick Revy, merci pour tous les précieux conseils et les bonnes idées que tu transmets toujours avec générosité, que ce soit pour améliorer une manip ou pour comprendre un concept ardu. J'apprécie beaucoup la vision que tu as de la recherche scientifique.

A toute notre super équipe DGSi, à mes super copines de bureau (et de pause café, gouter, karaoké...) Marie et Laetitia, à Vincent pour tes blagues, ta sensibilité et ta gentillesse, à Paola pour ta gentillesse et ton aide précieuse pour l'analyse des souris, à Aurélie qui reprend l'étude de la cohorte, à Emilie, Maname, Shu, Benoît France et Benoît Roch, Laurent et Tangui. Un grand merci à vous tous, pour m'avoir formé, aidé, dépanné, et pour tous les bons moments passés ensemble autour d'un gâteau ou d'une bière...

A Sylvain Latour et toute son équipe, en particulier Emmanuel Martin et Christelle Lenoir. Emmanuel, merci pour ta patience quand tu m'as formée à la cytométrie en flux et pour tous les coups de main précieux que tu m'as donné par la suite. C'était un vrai plaisir de travailler avec toi. Christelle, merci pour le temps que tu as passé à reprendre les analyses de patients et pour tous tes coups de main.

A Frédéric Rieux-Laucat et son équipe, en particulier Marie-Claude Stolzenberg pour l'analyse des lymphocytes T régulateurs et Aude Magerus pour son aide dans l'analyse de notre fameuse patiente.

A la plateforme de génétique de l'institut avec nous avons beaucoup collaboré au cours de ce travail, toujours dans la bonne humeur et au SEAT de Villejuif pour s'être occupé efficacement de mes petites souris.

A tous les cliniciens avec qui nous avons collaboré et qui nous ont permis d'analyser de précieux prélèvements : Nizar Mahlaoui, Felipe Suarez, David Boutboul, Claire Fieschi,

Lionel Galicier, Eric Oksenhendler, Marie-Louise Fremond, Valérie Cormier-Daire. Et évidemment aux patients et leurs familles pour leur confiance.

A Capucine Picard et l'équipe du CEDI qui m'ont beaucoup aidé dans la gestion des prélèvements, au laboratoire d'hématologie de Necker et au service d'anatomie-pathologie.

A mon ancienne et future équipe de cytogénétique qui heureusement n'était pas loin car vous m'avez beaucoup manqué pendant ces 3 ans ! Merci au Professeur Vekemans pour votre confiance depuis toutes ces années. Merci à tous ceux qui m'ont aidé pour faire les caryotypes sur milieu cassant. Et surtout un immense merci à mes supers copines Isabelle, Marie-Laure et Ilaria ! J'ai hâte de venir travailler à nouveau avec vous !

Pour finir, je souhaite remercier ma famille qui m'entoure avec bienveillance et qui m'a toujours encouragé dans mes choix ainsi que mes amis précieux.

Et enfin et surtout Quentin ! Tu as su être patient, tu as su m'écouter et m'encourager quand je doutais, tu m'as laissé faire ce choix, un jour en Thaïlande, et je te suis infiniment reconnaissante. Désormais, le meilleur est à venir !

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	15
1. Réparation des lésions de l'ADN	16
A. Signalisation du dommage et checkpoints cellulaires	18
B. Recombinaison homologue	20
C. NHEJ	22
D. Réparation des erreurs d'appariement (MMR, « Mismatch Repair »)	24
2. Le système immunitaire	25
A. Généralités sur le système immunitaire	25
B. Les cellules du système immunitaire adaptatif	26
1) Lymphocytes B	28
2) Lymphocytes T	30
a) Thymus	30
b) Ontogénèse des lymphocytes T	30
c) Différents types de lymphocytes T	33
i. Lymphocytes T CD4	33
ii. Lymphocytes T CD8	33
iii. Quelques lymphocytes particuliers	34
Lymphocytes T régulateurs	34
Lymphocytes iNKT	36
Lymphocytes MAIT	38
3. Réarrangements de l'ADN dans le système immunitaire	40
A. Cassures programmées	40
1) Recombinaison V(D)J	40
a) Principe	40
b) Description du locus	40
c) Description du processus	43
i. Initiation de la réaction : introduction d'une cassure double brin	43
ii. Identification et résolution des cassures	43
d) Particularités du locus TCR α/δ	45
e) Lien entre réparation de l'ADN et recombinaison VDJ	48
2) La commutation de classe des immunoglobulines	50
a) Principe	50
b) Description du locus	50
c) Déroulement du CSR	52
d) Lien entre mécanismes de réparation et CSR	53
B. Cassures spontanées	55
1) Stress réplicatif	55
a) Définition	55
b) Stress réplicatif et développement du système immunitaire	55
2) Stress oxydatif	57

3) Cassures d'origine exogène	58
4. Défaut de la réparation de l'ADN et déficit immunitaire	59
A. Déficits immunitaires associés à un défaut de contrôle du cycle cellulaire après dommage de l'ADN	59
1) L'ataxie-télangiectasie	59
2) Syndrome de Nijmegen	60
B. Déficits immunitaires liés à une anomalie de réparation des blocages de la fourche de réplication	61
1) Syndrome de Bloom	61
2) Anémie de Fanconi	61
C. Déficit immunitaire lié à un défaut de NHEJ, RS-SCID	63
1) Déficit en Artemis	63
2) Déficits en DNA-Ligase IV	63
3) Déficit en Cernunnos	64
4) Déficit en DNA-PKcs	64
5) Déficit en XRCC4	65
D. Cas des déficits immunitaires communs variables (DICV)	66
OBJECTIFS	68
PARTIE 1: MISE AU POINT D'UN NOUVEAU TEST DE DEPISTAGE	69
1. Résultats	69
A. Résultats obtenus par biologie moléculaire	69
1) Principe de la technique	69
2) Résultats	71
B. Mise au point d'une technique par cytométrie en flux	73
1) Vérification de la spécificité des anticorps utilisés en cytométrie en flux	73
2) Résultats obtenus par cytométrie en flux	74
a) Résultats chez les contrôles pédiatriques et adultes	75
b) Résultats chez les patients atteints d'ataxie-télangiectasie	76
c) Résultats pour d'autres déficits de la réparation de l'ADN	78
d) Résultats pour les patients XLP-2	79
2. Discussion	80
A. Pertinence et intérêt d'un nouveau test diagnostique	80
B. Conséquence d'un biais de répertoire	83
C. Pourquoi observe-t-on une diminution de la survie des thymocytes ?	84
3. Matériel et méthodes	85
A. Patients et contrôles	85
B. Extraction des PBL	85
C. Technique de 5'RACE-PCR	85
1) Principe	85
2) Choix des amorces	85
3) Description PGM	86
D. Technique par cytométrie en flux	86
1) Principe	86
2) Choix des anticorps	86
3) Vérification de la spécificité des anticorps	86
PARTIE 2: ANALYSE D'UNE NOUVELLE COHORTE DE PATIENTS	88
1. Rationnel	88
2. Résultats	88
A. Présentation clinique	88

B.	Evaluation du répertoire Valpha par cytométrie en flux	92
C.	Tests fonctionnels	93
D.	Analyse génétique	99
3.	Discussion	103
4.	Matériels et méthodes	105
A.	Critères d'inclusion	105
B.	Etablissement d'une banque d'ADN et de cellules	105
C.	Extraction d'ADN	105
D.	Extraction ARN	105
E.	Isolement des PBL	105
F.	Etablissement d'une lignée de fibroblastes	106
G.	Etablissement d'une lignée B-EBV	106
H.	Test de sensibilité aux agents génotoxiques	106
I.	Blocage G2/M	106
J.	Caryotype sur milieu cassant	106
K.	Analyse des télomères	107
L.	Séquençage de l'exome	107
PARTIE 3: ETUDE FONCTIONNELLE D'UN FACTEUR IMPLIQUE DANS LA REPARATION DE L'ADN		108
1.	Résultats	108
A.	Description clinique et biologique	108
B.	Anatomie-pathologie	112
C.	Bilan immunologique	114
D.	Recherche moléculaire	116
E.	Etude de la réparation de l'ADN in vitro	116
F.	Recherche d'une cause moléculaire au déficit immunitaire	118
1)	Analyse de l'exome	118
2)	Etude de ELKS	121
a)	Complémentation fonctionnelle	121
b)	Etude d'un modèle murin	122
3)	Identification et analyse de BACH2	126
a)	Analyse génétique	126
b)	Description de la protéine	127
c)	Etudes complémentaires chez le patient	128
2.	Discussion	129
A.	Analyse de la mutation identifiée dans <i>ELKS</i>	129
B.	Analyse de la mutation identifiée dans <i>BACH2</i>	131
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES		133
BIBLIOGRAPHIE		136
ANNEXE		160

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation	17
Figure 2 Contrôle du cycle cellulaire après dommage de l'ADN	19
Figure 3 Déroulement de la recombinaison homologue (HR)	21
Figure 4 Déroulement du NHEJ	23
Figure 5 Déroulement du Mismatch Repair (MMR)	24
Figure 6 Représentation schématique du TCR et du BCR	27
Figure 7 Développement des LB dans la moelle osseuse et activation dans les organes lymphoïdes secondaires	29
Figure 8 Représentation schématique du développement des LT dans le thymus	32
Figure 9 Exemple de structure du locus V(D)J	42
Figure 10 Mécanisme de la recombinaison V(D)J	44
Figure 11 Représentation schématique du locus TCR α/δ	45
Figure 12 Vagues successives de réarrangement Valpha/Jalpha	46
Figure 13 Représentation simplifiée de la commutation de classe des Ig (CSR)	51
Figure 14 Génération des cassures de l'ADN au cours du CSR	53
Figure 15 Représentation schématique de la 5'RACE-PCR	70
Figure 16 Résultats obtenus par biologie moléculaire : utilisation des segments Valpha (TRAV) et Jalpha (TRAJ)	72
Figure 17 Résultats obtenus par biologie moléculaire	72
Figure 18 Représentation du locus TCR α	74
Figure 19 Stratégie d'analyse en cytométrie en flux	74
Figure 20 Utilisation des différents segments Valpha analysés par cytométrie en flux en fonction de l'âge	75
Figure 21 Utilisation des segments Valpha chez les patients AT (ATM $^{-/-}$) et les apparentés (ATM $^{-/+}$)	77
Figure 22 Evaluation du biais de répertoire Valpha par cytométrie en flux chez des patients atteints d'un déficit en facteur de la réparation de l'ADN.	78
Figure 23 Taux de cellules iNKT et MAIT et utilisation des segments Valpha $_{24}$ et Valpha $_{7.2}$ chez des patients XLP-2 (XIAP $^{-}$) et contrôles.	79
Figure 24 Répartition des segments Valpha $_{7.2}$ et Valpha $_{24}$ chez les patients DICV	92
Figure 25 Tests de sensibilité à la MMC chez les patients 6 et 7	95
Figure 26 Tests de sensibilité à la MMC chez le patient 18	96
Figure 27 Caryotype sur milieu cassant, patient 7	97
Figure 28 Analyse par Southern Blot des télomères du patient 12 et de sa famille	98
Figure 29 Arbre généalogique de la famille de la patiente	109
Figure 30 Imagerie, IRM cérébral à différents temps (A) et scanner thoracique (B)	110
Figure 31 Dosage des enzymes hépatiques au cours du temps	111
Figure 32 Virémie CMV et EBV au cours du temps	111
Figure 33 Coupes d'histologie et d'immunohistochimie de la rate (A), du poumon (B) et du foie (C)	113
Figure 34 Etude de la réparation de l'ADN <i>in vitro</i>	117
Figure 35 Analyse génétique	119
Figure 36 Complémentation fonctionnelle par Multicolor Competition Assay	121
Figure 37 Vérification de l'inactivation de ELKS par biologie moléculaire et Western Blot	122
Figure 38 Analyse des LT de la rate chez les souris KO conditionnel pour ELKS	124
Figure 39 Analyse du thymus et des LB chez les souris KO conditionnel pour ELKS	125

Figure 40 Séquençage de la mutation c.1394 G>T dans l'exon 7 du gène <i>BACH2</i>	126
Figure 41 Alignement de la région conservée entre BACH1 et BACH2	127
Figure 42 Mesure du taux de lymphocytes T régulateurs chez la patiente, sa mère et un contrôle	128
Tableau 1 Séquences Valpha-Jalpha obtenues après tri cellulaire	73
Tableau 2 Données cliniques des patients analysés	90
Tableau 3 Données cliniques (suite)	91
Tableau 4 Résultats des tests fonctionnels	94
Tableau 5 Résultats analyses génétiques	102
Tableau 6 Bilans immunologiques à différents âges	115
Tableau 7 Gènes identifiés par WES et GWHM	120

Liste des abréviations

A-EJ	Alternative-End Joining
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AF	Anémie de Fanconi
α FP	alpha-foetoprotéine
AHAI	anémie hémolytique auto-immune
AID	Activation-Induced Cytidine Deaminase
AT	Ataxie-télangiectasie
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related
BCR	B Cell Receptor
BER	Base Excision Repair
BIR	Break Induced Recombination
CD	Cluster de différenciation
CDR3	Complementary Determining Region 3
CHO	Chinese Hamster Ovary
CID	Combined Immune Deficiency
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	Class switch Recombination
CSR	Cellule Souche Hématopoïétique
DICV	Déficit Immunitaire Commun Variable
DN	Double Négatif
DP	Double Positif
Ealpha	TCRalpha enhancer
EBV	Epstein-Barr Virus
GWHM	Genome Wide Homozygosity Mapping
HR	Homologous Recombination
Ig	Immunoglobuline
iNKT	invariant Natural Killer T
IPEX	Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked
IR	Rayonnements ionisants
iTreg	invariant T regulator
KO	Knockout
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
MAIT	Mucosal Associated Invariant T
MCA	Multicolor Complementation assay
MMC	Mitomycine C
MMR	Mismatch Repair
MR1	Major Histocompatibility Complex class I related gene protein
MRN	Mre11, Rad50 and Nbs1
NBS	Nijmegen Breakage Syndrome
NER	Nucleotide Excision Repair

NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non Homologous End Joining
NK	Natural Killer
nTreg	natural T regulator
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBL	Peripheral Blood Lymphocyte
PI3K	Phosphatidylinositol 3' kinase-like kinase
PLC	Précurseur Lymphoïde Commun
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTI	purpura thrombopénique idiopathique
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replicative Protein A
RSS	Recombination Specific Sequences
SCID	Severe Combined Immuno Deficient
SHM	Somatic Hyper Mutation
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCR	T Cell Receptor
TEA	T early alpha
Th	T helper
TSLP	Thymic Stromal LymphoPoietin
UNG	Uracil DNA Glycosylase
UV	Ultra-Violet
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
XLP-2	X-linked Lymphoproliferative Syndrome
XRCC	X Ray Cross Complementation Group

Introduction

Le lien entre défaut de réparation de l'ADN et certaines pathologies humaines est établi depuis plusieurs décennies. C'est le cas par exemple du xeroderma pigmentosum, dermatose rare caractérisée par une hypersensibilité aux rayons ultraviolets (UV) induisant des lésions cutanées et oculaires et des cancers cutanés multiples. Cette pathologie a été décrite pour la première fois en 1870 par Moritz Kaposi (Hebra F. et Kaposi M « On disease of the skin, including exanthemata » London - New Sydenham Society) et le lien avec un déficit génétique responsable d'une incapacité pour les cellules de ces patients à réparer des lésions de l'ADN induites par les UV a été établi au cours des années 1960 (Cleaver, 1968).

Les déficits d'origine génétique dans les voies de réparation de l'ADN ont des conséquences très variables en terme de symptomatologie clinique. On décrit notamment des pathologies neurologiques, dermatologiques, des susceptibilités aux cancers, des hémopathies et des déficits immunitaires. Au delà de l'intérêt clinique et dans la prise en charge thérapeutique de ces patients, l'étude des processus moléculaires impliqués dans ces maladies a permis de considérablement accroître la compréhension des mécanismes de maintien de l'intégrité du génome.

Au cours de ce travail, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux défauts de réparation de l'ADN responsables de déficits immunitaires chez l'homme.

1. Réparation des lésions de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été isolé pour la première fois en 1869 par Friedrich Miescher. Au milieu du vingtième siècle, les travaux de Oswald T. Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarthy (Avery et al., 1944) montrent que l'ADN est le support de l'information génétique. La structure de l'ADN est finalement identifiée en 1953 par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953a, 1953b). Cette structure en double hélice utilise la complémentarité des bases azotées, adénine avec thymine et guanine avec cytosine, pour garantir la conservation et la transmission de l'information génétique. Mais l'ADN est une structure fragile, soumise en permanence à des activités métaboliques et à des facteurs exogènes portant atteinte à son intégrité. On estime à plusieurs dizaines de milliers le nombre de lésions par cellule et par jour. Ces lésions pourraient provoquer de graves dommages pour la cellule si n'intervenaient les différents mécanismes de réparation.

Il existe différents types de lésions de l'ADN, des cassures de l'hélice simple brin ou double brin, des mésappariements de nucléotides, des ponts inter-brins ou encore des modifications de base. Pour chaque lésion, la cellule eucaryote possède un mécanisme spécifique de réparation permettant de maintenir l'intégrité du génome (Lord and Ashworth, 2012). La figure 1 récapitule les principales lésions et les systèmes de réparation associés. Brièvement, le mécanisme de réparation par excision de base (BER pour « Base Excision Repair ») prend en charge les modifications de bases qui n'altèrent pas le squelette de l'hélice et les cassures simples brins. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER pour « Nucleotide Excision Repair ») prend en charge les liaisons qui déforment la structure hélicoïdale de l'ADN comme les adduits encombrants liés aux bases, les ponts intra-brin et les dérivés photochimiques (lésions induites par les UV). Les mésappariements sont pris en charge par le MMR (« Mismatch Repair »). Enfin, les cassures doubles brins, particulièrement dangereuse pour la cellule, sont prises en charges par la recombinaison homologue (HR pour « Homologous Recombination ») ou le NHEJ (« Non-Homologous End Joining »).

Certaines de ces voies de réparation ont un rôle particulièrement important au cours du développement du système immunitaire et pour son homéostasie. Nous détaillerons uniquement les deux mécanismes de réparation des cassures double brins, HR et NHEJ ainsi que le MMR.

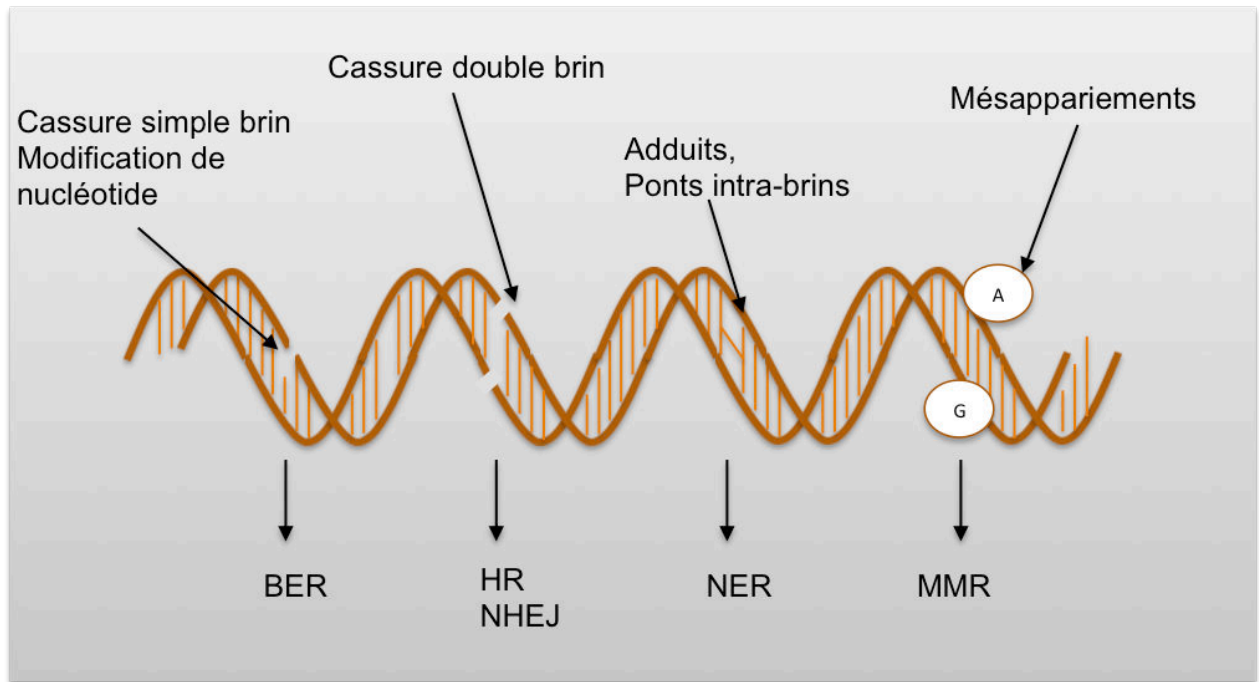


Figure 1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation

En fonction du type de dommage, la cellule eucaryote dispose de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN. Le BER (« Base excision repair ») prend en charge les cassures simple brin et certaines modification de nucléotides, la recombinaison homologue (« Homologous Recombination » HR) et le NHEJ (« Non-Homologous end Joining ») permettent la réparation des cassures doubles brins, les adduits et ponts intra-brins sont éliminés par le NER (« Nucleotide excision Repair ») et enfin le MMR (« Mismatch Repair ») permet de corriger les mésappariements. Figure adaptée de Lord and Ashworth, 2012

A. Signalisation du dommage et checkpoints cellulaires

Lors de l'apparition d'une lésion de l'ADN la cellule active toute une série de voies d'activation biochimiques spécifiques et ordonnées (pour revue Sancar et al., 2004). La toute première réponse est alors un arrêt du cycle cellulaire quelque soit la phase durant laquelle est survenu le dommage.

Les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) sont des protéines de la famille des PIKK (PI-3-kinases) (Durocher and Jackson, 2001) détectrice des dommages, également appelée « sensor ». ATM intervient lorsque surviennent des cassures double brin (Bakkenist and Kastan, 2003) alors que les arrêts de réplication de la fourche sont détectés par ATR (Nam and Cortez, 2011; Paulsen and Cimprich, 2007).

Dans le cas d'une cassure double brin (Figure 2), le complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, est recruté au niveau de la lésion de l'ADN et va activer la protéine ATM. Celle-ci va déclencher une cascade d'activation en phosphorylant à son tour les facteurs du complexe MRN, l'histone H2AX qui joue un rôle essentiel dans le remodelage de la chromatine (Misteli and Soutoglou, 2009), ainsi que les molécules « médiateurs », BRCA1 (Lou et al., 2003), 53BP1 (Wang et al., 2002a) et MDC1 (Goldberg et al., 2003). Les médiateurs sont les molécules faisant le lien entre les détecteurs et les « transducteurs », Chk1 (Pichierri and Rosselli, 2004) et Chk2 (Chaturvedi et al., 1999) (Checkpoint 1/2). Ces protéines « transducteur » sont des sérine/thréonine kinases dont la fonction est de réguler le cycle cellulaire et de permettre l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ces deux kinases ainsi activées vont donc phosphoryler les effecteurs p53 et Cdc25 directement responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (pour revue Chen and Poon, 2008).

Il existe trois points de contrôle du cycle indépendants les uns des autres. Le checkpoint G1/S empêche l'entrée de la cellule en phase S en inhibant l'initiation de la réplication lorsqu'une lésion de l'ADN survient en phase G0/G1. Il existe également un checkpoint intra-S qui est activé si un dommage survient au cours de la réplication. La réplication est alors momentanément arrêtée pour permettre la réparation. Enfin le checkpoint G2/M bloque l'entrée en mitose des cellules pour lesquelles subsistent des dommages en phase G2.

A ce stade, si les lésions de l'ADN sont trop sévères ou dangereuses pour la cellule, un processus d'apoptose va s'enclencher par l'intermédiaire de p53 qui active la transcription de facteurs pro-apoptotiques comme FAS, PUMA ou BAX (Roos and Kaina, 2006). Sinon, les dommages seront réparés soit grâce à la recombinaison homologue (HR « Homologous Recombination ») ou par NHEJ (« Non Homologous End Joining »). Ces deux mécanismes sont régulés de façon distincte selon la phase du cycle cellulaire. La recombinaison homologue est un mécanisme précis de réparation qui utilise une séquence homologue comme matrice de réparation alors que le NHEJ est moins précis mais ne dépend pas d'une séquence homologue.

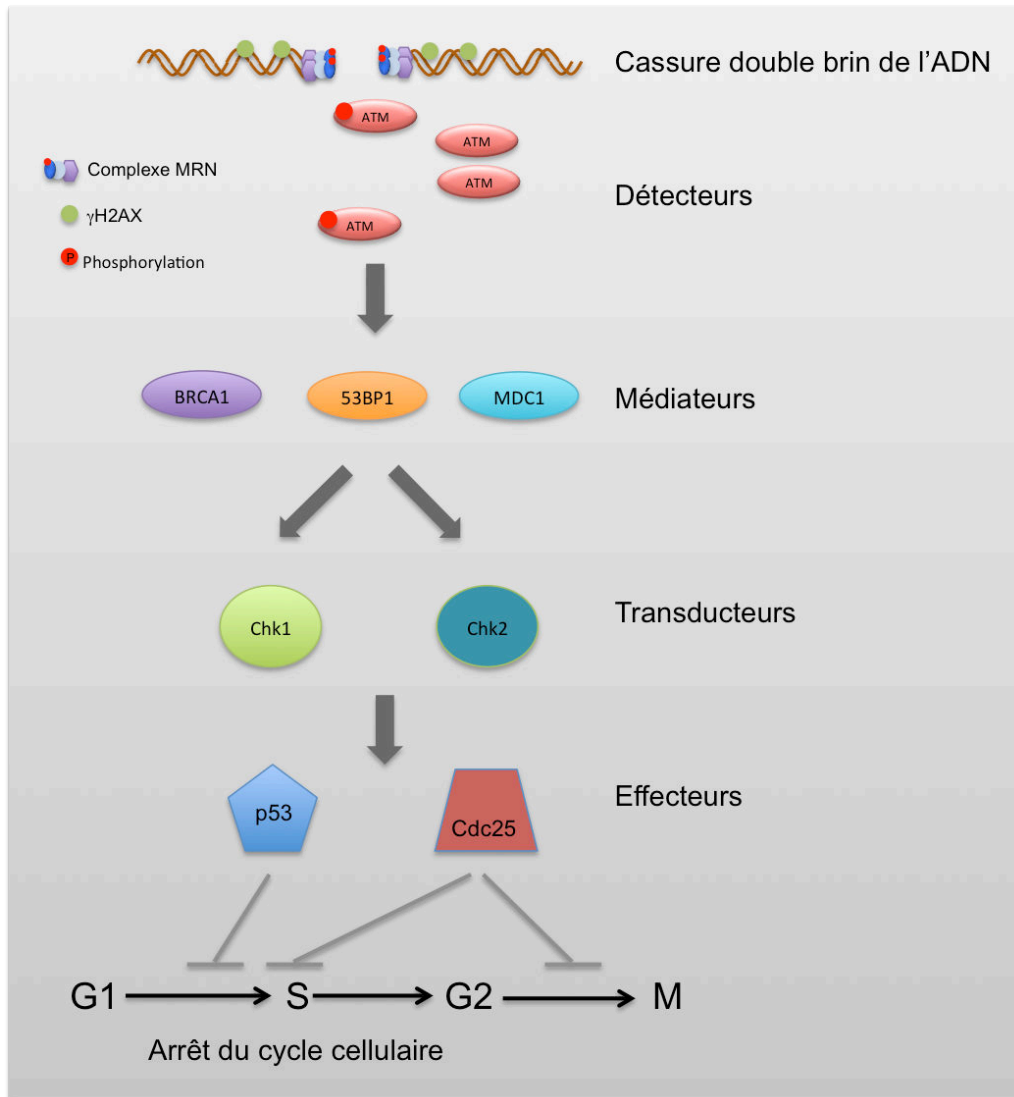


Figure 2 Contrôle du cycle cellulaire après dommage de l'ADN

Dans le cas d'une cassure double brin de l'ADN, les protéines du complexe MRN sont recrutées au niveau de la cassure double brin ce qui permet l'activation de la protéine « détecteur » ATM elle-même phosphorylant le complexe MRN et l'histone H2AX. ATM va également activer les protéines « médiateurs » qui propagent le signal aux « transducteurs » responsables de l'activation des effecteurs en charge de contrôler le cycle cellulaire. Figure adaptée de Sancar, 2004

B. Recombinaison homologue

Comme son nom l'indique, la HR utilise des séquences d'ADN homologue à celles qui ont été lésées comme matrice de réparation. Par conséquent, ce mécanisme ne peut être activé que durant les phases S et G2 du cycle cellulaire quand l'ADN a déjà été répliqué. La présence de deux chromatides sœurs identiques assure ainsi une réparation fidèle. La HR permet la réparation des cassures double brin de l'ADN ainsi que des lésions double brin survenant lors du blocage des fourches de réplication (pour revue Jeggo et al., 2011).

La réparation par recombinaison homologue débute par la résection de la cassure double brin pour former une extrémité 3' simple brin (voir Figure 3). La résection est effectuée chez les vertébrés par le complexe MRN et l'ADN simple brin est stabilisée par les protéines RPA (« Replicative Protein A »). La recombinase RAD51 est à son tour recrutée pour former un nucléofilament sur l'ADN simple brin qui est maintenu dans une conformation tendue afin de permettre la capture du brin homologue. La réaction de nucléation de RAD51 le long du brin d'ADN est catalysée par la protéine BRCA2 (Breast Cancer type 2). La protéine RAD54 de la famille Swi2/Snf2 est recrutée pour rechercher les séquences homologues et les rendre accessibles au filament RAD51/ADN. L'invasion du brin homologue par le nucléofilament aboutit à la formation d'une « D loop » puis d'une jonction Holliday. RAD51 se détache pour permettre l'action des ADN polymérases (San Filippo et al., 2008). Une fois que l'ADN a été synthétisé au point de cassure, la résolution de jonction Holliday peut se faire de deux manières, l'une générant un « crossing-over » et l'autre sans « crossing-over ». Plusieurs protéines interviennent pour déplacer le néo-brin ou pour résoudre les jonctions d'Holliday : les hélicases de la famille RecQ BLM, WRN, RECQL5, ou le complexe MUS81-EME1, ou encore la resolvase GEN1 (pour revue Hartlerode and Scully, 2009).

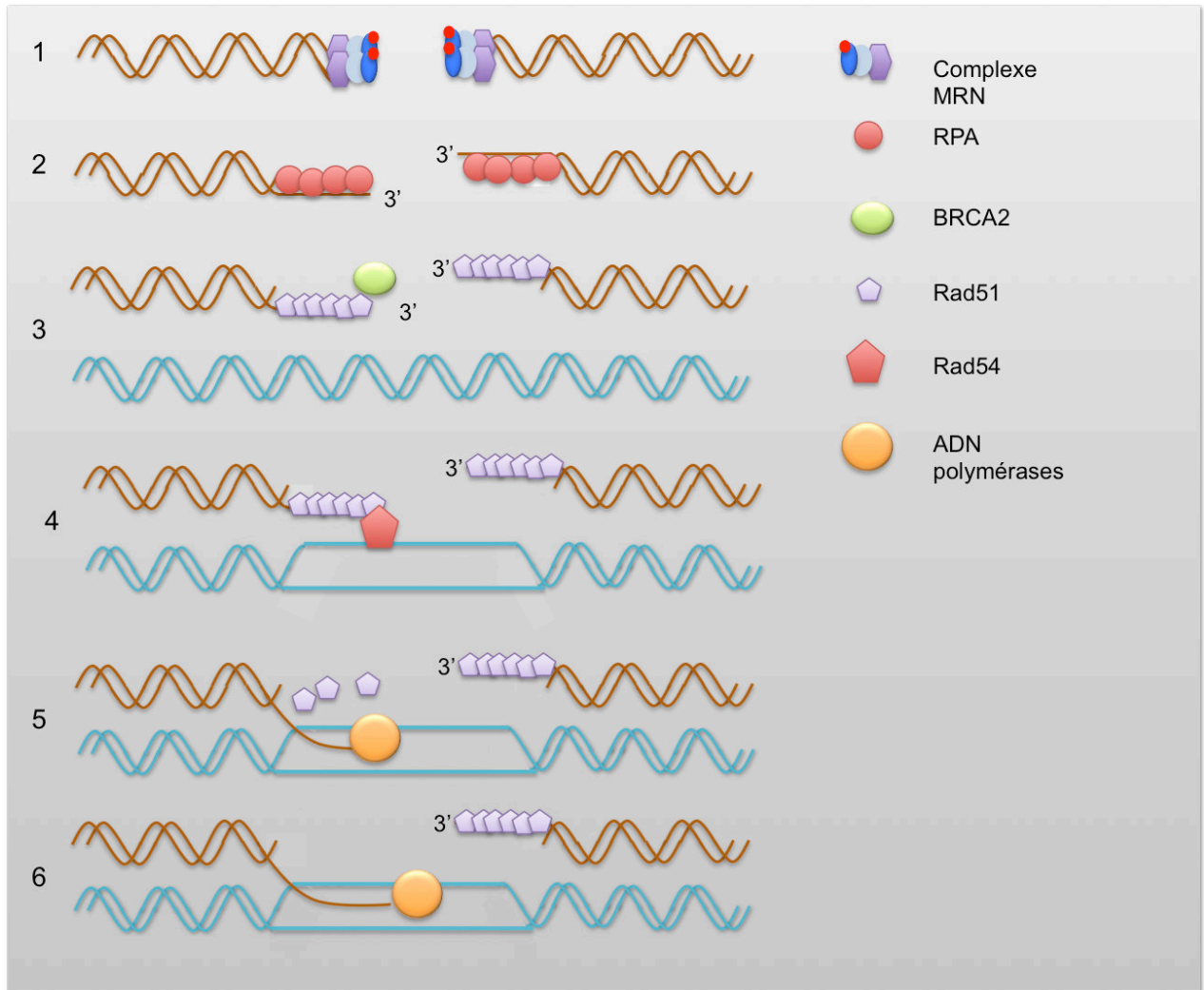


Figure 3 Déroulement de la recombinaison homologue (HR)

L'activité 5'-3' exonucléase du complexe MRN permet la formation d'extrémités d'ADN simple brin 3' sortant au niveau de la cassure (1). Les fragments simple brin sont stabilisés par les protéines RPA (2). Un nucléofilament composé de RAD51 va ensuite recouvrir l'ADN simple brin avec l'aide de BRCA2 (3). RAD51 associé à RAD54 reconnaît la séquence homologue à la région lésée (4) et le fragment simple brin va venir envahir la séquence homologue (5), permettant la formation de la « D-loop » et de la jonction de Holliday (6). Une fois l'ADN resynthétisé, la résolution de la jonction se fait avec ou sans formation d'un « crossing-over ».

C. NHEJ

Le mécanisme de NHEJ ne nécessite pas de séquence homologue pour réparer une lésion de l'ADN, il peut donc être utilisé pour réparer les cassures double brin à n'importe quel moment du cycle cellulaire, cependant cette voie est essentiellement utilisée lors de la phase G1.

Les facteurs du NHEJ constituent un complexe protéique qui s'assemble très rapidement dès que l'ADN lésé a été identifié par le dimère Ku (voir Figure 4). L'hétérodimère Ku est composé de deux protéines de 70 et 86 kDA (KU70 et KU80) est capable de se lier aux cassures double brin de l'ADN, aux cassures simple brin ainsi qu'aux structures en épingle à cheveu (Walker et al., 2001). Le complexe Ku possède une activité hélicase et peut recruter la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK (DNA-PKcs pour DNA-Protein Kinase catalytic subunit) (Gell and Jackson, 1999; Singleton et al., 1999). La DNA-PKcs appartient à la famille des PIKK comme ATM et ATR (Hartley et al., 1995). Ce complexe maintient les extrémités et facilite le recrutement des autres protéines du NHEJ, Artemis, DNA-Ligase IV, XRCC4 et Cernunnos (XLF) (Davis et al., 2014). DNA-PKcs phosphoryle l'ensemble des facteurs du NHEJ. Pour permettre la ligation par la DNA-LigaseIV, l'ADN doit être de qualité suffisante. Plusieurs enzymes peuvent traiter les altérations de l'ADN au niveau de la cassure comme notamment la nucléase Artémis (Ma et al., 2002; Moshous et al., 2001). Le NHEJ va relier les extrémités en apportant le moins de modifications possibles (pour revue Chiruvella et al., 2013).

Un nouveau facteur impliqué dans le NHEJ a été identifié récemment (Ochi et al., 2015; Xing et al., 2015). Ce facteur a été nommé PAXX (PARalog of XRCC4 and XLF) en raison de sa similarité de structure avec les protéines XRCC4 et Cernunnos. PAXX interagit directement avec le complexe Ku et est recruté au niveau des dommages de l'ADN. Des modèles cellulaires d'inactivation de cette protéine par ARN interférence et CRISPR-Cas9 ont montré qu'elle agit en collaboration avec XRCC4 et Cernunnos lors du NHEJ.

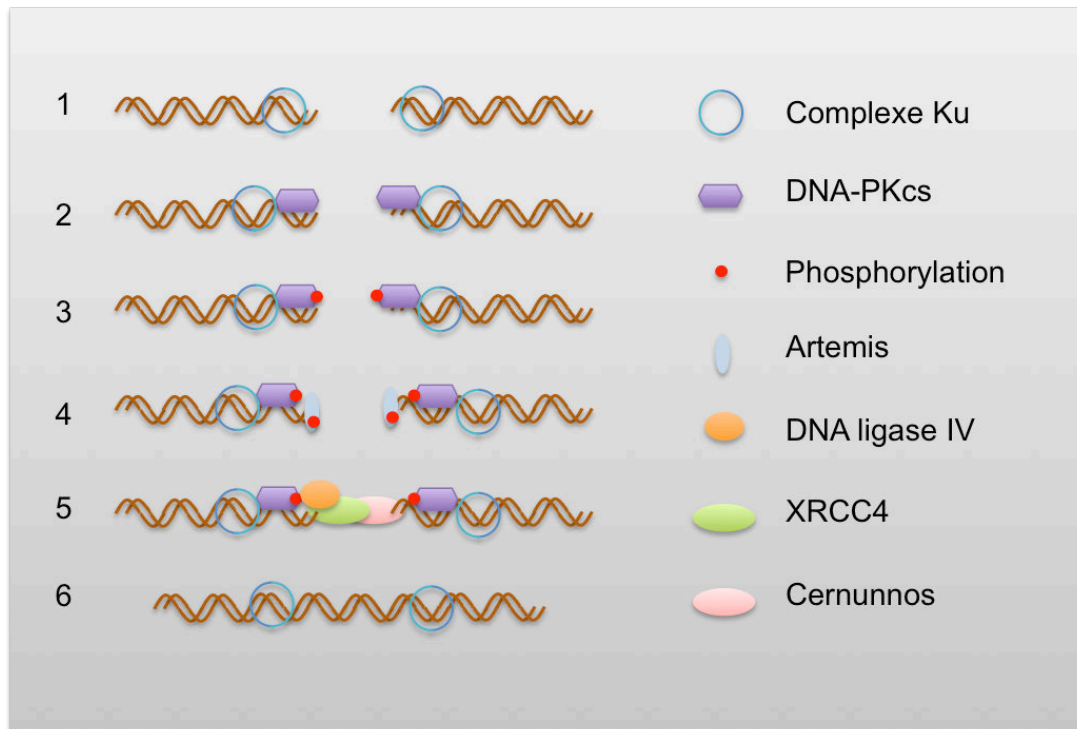


Figure 4 Déroulement du NHEJ

Le dimère Ku (KU70 et KU80) reconnaît la cassure double brin (1). DNA-PKcs est recruté formant avec le dimère Ku le complexe DNA-PK (2) qui maintient et protège les extrémités, DNA-PKcs s'autophosphoryle (3), Artemis intervient pour « nettoyer » les extrémités si nécessaire (4), puis le complexe DNA-ligase IV/XRCC4/Cernunnos permet la ligation des extrémités entre elles (5-6).

D. Réparation des erreurs d'appariement (MMR, « Mismatch Repair »)

Le mécanisme MMR intervient principalement au cours de la réplication de l'ADN, lorsque surviennent des mésappariements de nucléotides, des délétions ou insertions de nucléotides, pour éviter l'apparition de mutation dans la séquence nucléotidique. Le mésappariement (« mismatch ») est détecté par un complexe protéique composé de MSH2 et de MSH6, ce complexe recrute le complexe MLH1/PMS2, qui reconnaît et clive le brin lésé en amont du mésappariement (voir Figure 5). Les protéines PCNA et EXO1 sont ensuite recrutées au site de clivage, EXO1 est une 5'-3' exonucléase qui va dégrader le brin d'ADN lésé jusqu'au mésappariement, le brin 3' sortant est stabilisé par un filament composé par le facteur RPA. Enfin, la DNA polymérase δ synthétise la séquence corrigée et une ligase termine la réparation. (Pour revue Jiricny, 2006).

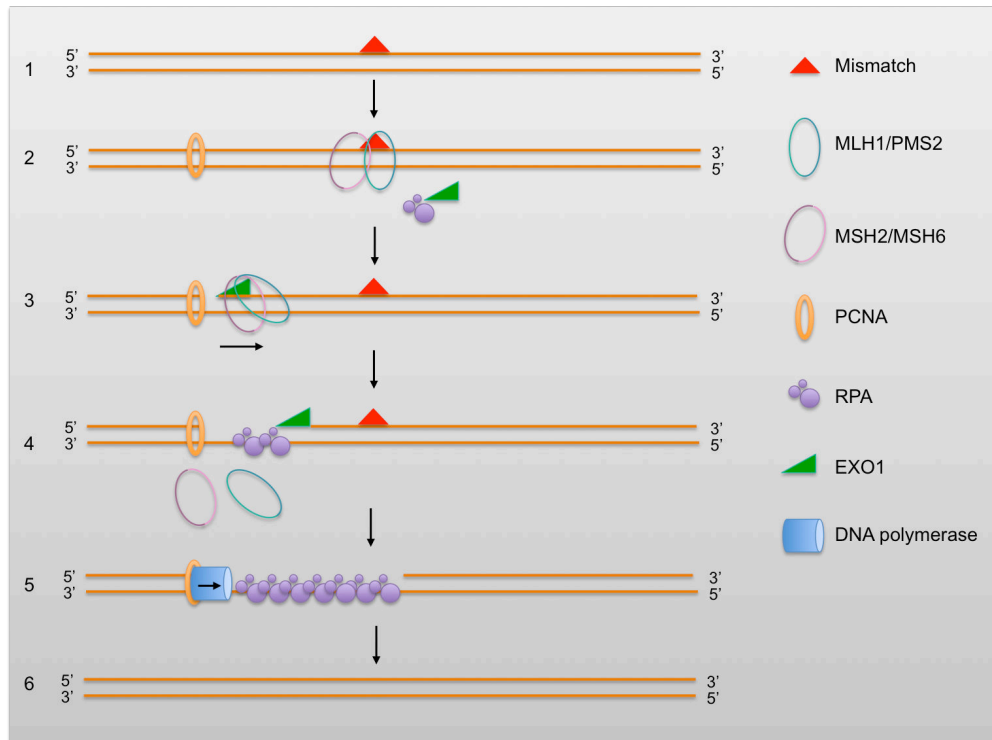


Figure 5 Déroulement du Mismatch Repair (MMR)

Le MMR intervient en cas mésappariement, délétion ou insertion de quelques nucléotides (1). Le défaut est reconnu chez l'homme par MSH2/MSH6 qui associé à MLH1/PMS2 clive le brin en 3' de la lésion (2). EXO1 dégrade le brin lésé (3) et RPA recouvre l'ADN simple brin pour le stabiliser (4). L'ADN polymérase δ synthétise le nouveau brin d'ADN (5-6). (Figure adaptée de Jiricny J. 2006)

2. Le système immunitaire

A. Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des mécanismes de défense d'un organisme contre des agents susceptibles de toucher à son intégrité, en particulier les agents infectieux (virus, bactéries, parasites) et les cellules tumorales. Le système immunitaire est composé de tissus, de cellules et de molécules capables de reconnaître et de lutter contre ces agents définis comme « non-soi » par opposition au « soi » c'est à dire l'ensemble de l'organisme défini par son patrimoine génétique unique.

Il existe deux types de réponse immunitaire, la réponse innée et la réponse adaptative. La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense, la plus immédiate et n'est pas spécifique. Elle est constituée des barrières physiques naturelles de l'organisme (peau, muqueuses), les molécules du complément et d'un ensemble de cellules immunitaire capable d'attaquer un agent étranger par phagocytose ou par réponse inflammatoire. L'activation de ces cellules se fait par un signal danger lors d'une interaction spécifique entre un récepteur du soi le PRR (Pattern Recognition Receptor) et une molécule du non-soi le PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) présents sur les microorganismes. Les PRR sont un ensemble de récepteurs non polymorphes se trouvant sur les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles...

La réponse immunitaire adaptative est d'apparition plus récente au cours de l'évolution, elle n'est présente que chez les vertébrés (Travis, 2009). Il s'agit d'un mécanisme de réponse immunitaire cellulaire et humoral bien plus élaboré et spécifique que la réponse innée avec également le développement de la mémoire immunitaire. Il faut environ 4 jours pour qu'elle se mette en place. Ce sont les lymphocytes via leurs récepteurs spécifiques (BCR et TCR) qui assurent cette réponse.

B. Les cellules du système immunitaire adaptatif

Les principales cellules du système immunitaire adaptatif sont lymphocytes B et T (LB et LT), elles ont plusieurs spécificités : elles possèdent un système de reconnaissance de l'antigène diversifié, sont capables d'expansion cellulaire clonale et sont dotés de mémoire.

Le système de reconnaissance diversifié est porté par les récepteurs transmembranaires de ces cellules : le TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T et le BCR (B Cell Receptor) pour les lymphocytes B. Chaque lymphocyte possède un récepteur unique, spécifique d'un épitope antigénique présenté par une cellule cible. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et ont une structure similaire (voir Figure 6). Ces différents récepteurs sont tous dotés d'une région constante responsable des fonctions effectrices du récepteur et d'une région variable capable de reconnaître spécifiquement l'antigène. Le domaine hypervariable du TCR et du BCR est appelé CDR3 (« Complementary Determining Region 3 ») (Davis and Bjorkman, 1988). Pour permettre la transduction du signal à l'intérieur de la cellule, le TCR s'associe au CD3 et le BCR au complexe $Ig\alpha/Ig\beta$. Le développement et les spécificités de ces récepteurs seront détaillés plus loin.

Ces cellules sont capables d'expansion clonale lorsqu'elles rencontrent l'antigène reconnu spécifiquement par leur récepteur. Cette capacité de prolifération importante et rapide permet une réponse intense et spécifique vis à vis de la cible.

Enfin, la capacité de mémoire correspond à la faculté pour quelques lymphocytes issus de la prolifération clonale de persister dans l'organisme pour permettre une réponse plus rapide et plus vite ciblée en cas de nouvelle infection par l'agent pathogène en cause.

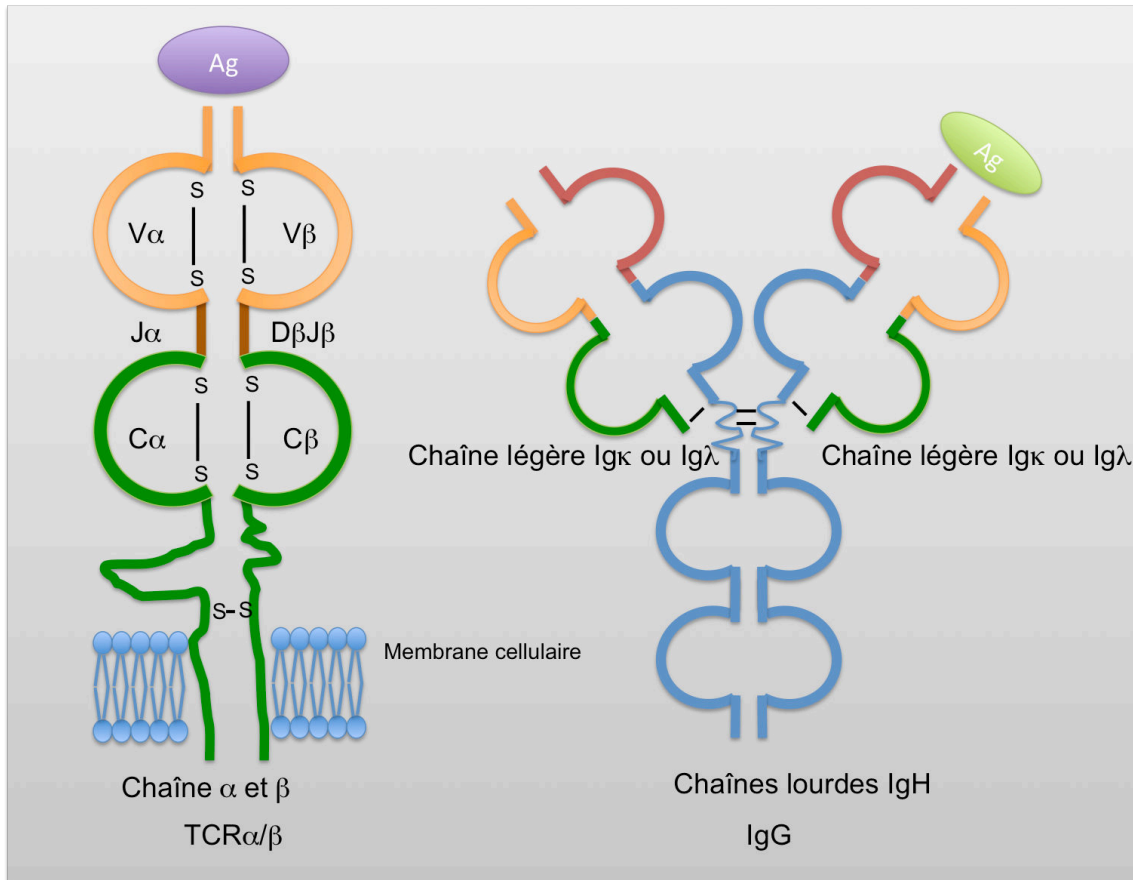


Figure 6 Représentation schématique du TCR et du BCR

A gauche est représenté schématiquement un TCR α/β avec une chaîne alpha et une chaîne beta, la région constante transmembranaire est représentée en vert et la région variable en jaune. Le TCR γ/δ a une structure similaire.

A droite est représentée une IgG soluble, celle-ci est composée de 2 chaînes lourdes IgH et de 2 chaînes légères Ig λ ou Ig κ , ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfure. Le domaine variable reconnaît spécifiquement l'antigène, le domaine constant (en bleu) responsable des fonctions effectrices de Ig peut changer lors de l'activation des LB (voir CSR).

1) Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants et se définissent par la présence d'un BCR. Le BCR est formé de deux chaînes légères (Ig λ ou κ) et de deux chaînes lourdes (IgH) (Figure 6). Chaque LB produit un BCR ayant une spécificité unique grâce aux réarrangements somatiques des régions variables des chaînes lourdes et légères par la recombinaison V(D)J (Tonegawa, 1983). Les LB après avoir été activés, se transforment en plasmocytes et sont capables de sécréter leur Ig, que l'on appelle alors anticorps (Ac).

Les LB se nomment ainsi en référence à la bourse de Fabricius (Cooper et al., 1965), petite glande où se développent les LB, présente uniquement chez les oiseaux. Chez les mammifères, les LB se développent dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (voir Figure 7). Celles-ci donnent naissance aux progéniteurs lymphocytaires communs (PLC) dont une partie migre vers le thymus pour la formation des lymphocytes T, l'autre partie reste dans la moelle pour former les lymphocytes B. Les PLC vont ainsi donner naissance aux cellules pré-pro-B puis aux pro-B, stade durant lequel commence le réarrangement des gènes des IgH, si le réarrangement de l'un des deux allèles est productif alors commence l'expression d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique. Au stade pré-B, la chaîne μ s'exprime à la surface de la cellule en association avec une pseudo-chaîne légère, c'est le pré-BCR. Les cellules commencent leur expansion clonale, par ailleurs les gènes des chaînes légères du BCR sont réarrangés, à ce stade se produit l'exclusion allélique, c'est à dire l'arrêt des réarrangements sur les autres allèles dès qu'un réarrangement est productif ce qui permet d'obtenir un seul type de chaîne légère et un seul type de chaîne lourde. Enfin, au stade B immature, les cellules expriment une IgM de surface et elles subissent la sélection négative qui permet d'éliminer les cellules auto-réactives exprimant des auto-anticorps. Ces LB sortent de la moelle osseuse à ce stade intermédiaire que l'on appelle B transitionnels, ils expriment soit une IgM soit une IgD de surface. Après une sélection en périphérie, ces cellules peuvent devenir des LB folliculaire conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des LT ou bien des LB de la zone marginale impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes (pour revue LeBien and Tedder, 2008).

L'activation du LB se fait lors de la rencontre avec l'antigène que son BCR est capable de reconnaître. Le LB peut ensuite se différencier rapidement en plasmocyte à IgM à durée de vie courte, soit s'activer au sein des centres germinatifs où il subit les processus d'hypermutation somatique (« Somatic Hypermutation » SHM) et de commutation isotypique (« Class Switch Recombination » CSR). Une fois activé, il se différencie en cellule B mémoire ou en plasmocyte.

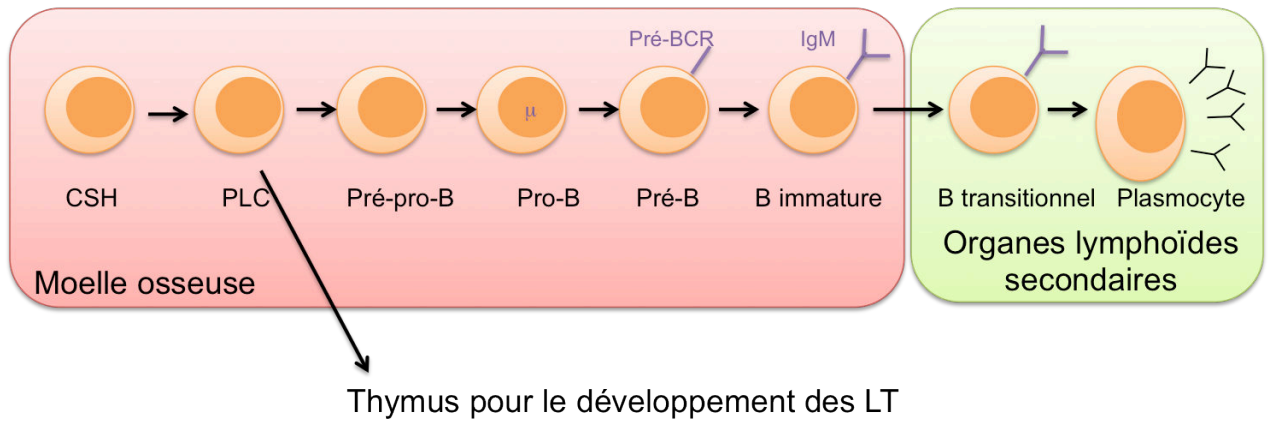


Figure 7 Développement des LB dans la moelle osseuse et activation dans les organes lymphoïdes secondaires

Les LB se développent dans la moelle osseuse à partir des CSH qui se différencient et perdent progressivement leur potentiel pour les autres lignées hématopoïétiques. Certains précurseurs lymphoïdes communs (PLC) quittent la moelle pour coloniser le thymus et s'engager dans la lignée T. Le réarrangement du BCR débute au stade pro-B, au stade pré-B s'exprime en surface le pré-BCR composé du chaîne lourde et d'une pseudo-chaîne légère. Les LB sortent de la moelle osseuse au stade B immature, exprimant une IgM ou une IgD de surface, après élimination des LB autoréactifs. L'activation des LB se fait en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphoïdes).

2) Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont également des cellules de l'immunité adaptative, ils sont responsables des réponses cellulaires et ne reconnaissent que les antigènes présentés par une cellule. Ils se nomment ainsi car ils sont produits par le thymus. Les LT expriment un TCR formé de deux chaînes α/β ou γ/δ . Tout comme le BCR, le TCR a une spécificité unique due aux réarrangements somatiques des régions variables.

a) Thymus

Le thymus est un organe impair, médian, bilobé situé dans le médiastin antérieur. Ces deux lobes sont eux-mêmes formés de plusieurs lobules avec une zone externe appelé corticale et une zone centrale appelée médullaire. Le thymus est l'organe où se développent les LT. Son activité est maximale durant l'enfance puis subit une involution au cours de l'âge adulte avec une activité qui diminue fortement. Les cellules composant le thymus sont en majorité les thymocytes, LT en cours de développement, on y trouve également des cellules épithéliales, des fibroblastes, des macrophages et des cellules dendritiques ainsi que les corpuscules de Hassal, de structure épithéliale, probablement impliqués dans le développement de certains types de LT. La production de LT par le thymus est d'environ 10^8 LT/jour.

b) Ontogénèse des lymphocytes T

Les PLC sorties de la moelle osseuse rentrent dans le thymus par les veinules post capillaires au niveau de la jonction cortico-médullaire, puis vont migrer vers le cortex et enfin dans la médullaire pour y subir leur différenciation en LT (voir Figure 8) (Pour revues Min et al., 2005; Zhu and Paul, 2008). Les thymocytes se développent et prolifèrent en réponse à différentes cytokines produites directement par les cellules épithéliales thymiques, en particulier l'interleukine 7. Leur maturation se caractérise par des phénomènes d'apoptose et de survie cellulaire. Le premier stade de maturation est le stade double négatif (DN), c'est à dire des cellules n'exprimant ni le CD4 ni le CD8, subdivisé en quatre sous-populations (DN1 à DN4) selon l'expression des marqueurs CD25 et CD44. Les cellules DN1 peuvent donner naissance aux LT mais également aux lymphocytes Natural Killer (NK) et aux cellules dendritiques. Au stade DN2, les thymocytes perdent le potentiel de différenciation en cellules dendritiques.

Les réarrangements des loci des TCR δ , TCR γ et TCR β se produisent au stade DN2 et DN3 durant lesquels le complexe RAG1/2 est exprimé. Les thymocytes s'engagent alors simultanément dans les lignées $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Le succès de la recombinaison des TCR δ et TCR γ favorise l'assemblage d'un TCR $\gamma\delta$, alors qu'une recombinaison productive du TCR β favorise l'assemblage du TCR β avec un pré-T α pour former un pré-TCR. Les signaux pré-TCR provoquent la répression de l'expression de RAG1/2 et la prolifération et la

différenciation de thymocytes vers le stade double positif (DP), stade au cours duquel les gènes RAG1/2 sont ré-exprimés et la recombinaison du TCR α initié jusqu'à générer un TCR mature permettant aux thymocytes d'interagir avec les autres cellules du thymus, cellules épithéliales et cellules dendritiques.

Les thymocytes doubles positifs (DP) co-expriment les marqueurs CD4 et CD8, il s'agit du premier stade où s'exprime le complexe TCR-CD3. A ce stade, les thymocytes subissent dans le cortex une sélection positive : seules les cellules dont TCR reconnaît le complexe épitope/CMH avec un faible niveau d'affinité vont survivre et continuer leur développement dans la médulla, les autres seront éliminées par apoptose. Si l'affinité du TCR porte sur une molécule du CMH-I, le marqueur CD4 est perdu et la cellule devient simple positive CD8+. Inversement, si l'affinité est pour une molécule du CMH-II, c'est le marqueur CD8 qui sera perdu pour donner une cellule simple positive CD4+.

Les cellules SP migrent ensuite dans la médulla où elles vont subir la sélection négative. Elles sont alors mises en contact avec des complexes CMH/épitopes du soi présentés par les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales médullaires. Si le TCR a une affinité trop forte pour ces complexes, la cellule va entreprendre un processus d'apoptose. Cette sélection a pour objectif d'éliminer les thymocytes autoréactifs.

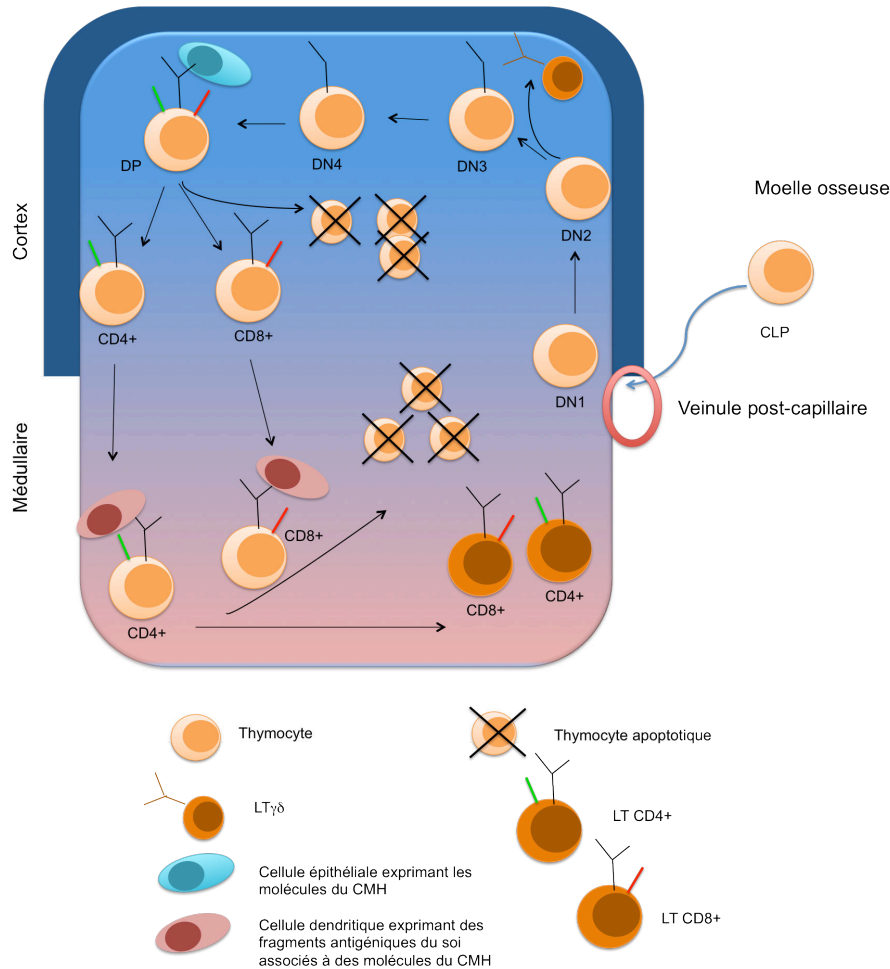


Figure 8 Représentation schématique du développement des LT dans le thymus

Les PLC provenant de la moelle osseuse entrent dans le thymus par les veinules post-capillaires. Le thymocytes commencent leur développement dans le cortex (ici en haut, en bleu). Le réarrangement des TCR β , TCR δ et TCR γ se fait aux stades DN2 et DN3.

Si les réarrangements des TCR γ et TCR δ sont productifs, le thymocyte devient un LT $\gamma\delta$. Si le TCR β réarrangé est productif, il s'exprimera au stade DN4 associé à un pré-TCR α , puis le TCR α est lui-même réarrangé, les thymocytes sont alors doubles positifs (DP) car ils expriment à la fois le CD4 (en vert ici) et le CD8 (en rouge). Les DP subissent la sélection positive dans le cortex permettant de sélectionner les cellules reconnaissant un épitope associé au CMH-I qui deviennent des CD8+ et les cellules qui reconnaissent un épitope associé au CMH-II (CD4+). Les thymocytes ne reconnaissant ni l'un, ni l'autre sont éliminés par apoptose. Les cellules SP CD4+ ou CD8+ migrent ensuite dans la médulla, ici en rose en bas de la figure, où elles subissent la sélection négative permettant d'éliminer les thymocytes autoréactifs reconnaissant trop fortement les épitopes du soi.

c) Différents types de lymphocytes T

i. Lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 sont également appelés LT auxiliaire ou « helper » (Th), ils reconnaissent un antigène lié à une molécule du CMH de classe II. Ces cellules ont un rôle central dans l'activation des lymphocytes B mais également une capacité à stimuler les macrophages, recruter les polynucléaires aux sites d'infection et d'inflammation et un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Quatre types principaux de LT CD4 ont été caractérisés jusqu'à présent : les Th1, Th2, Th17 et les LT régulateurs inductibles (iTreg). Les cellules Th1, Th2 et Th17 sont des cellules T effectrices, qui organisent les réponses immunitaires contre les agents pathogènes. Le destin d'un LT CD4 dépend des signaux cytokiniques induits reçus lors de leur première rencontre avec un antigène. Par exemple, la stimulation par l'IFN γ et l'IL-12 induit une différenciation en Th1 qui lui-même produira de l'IFN γ et de l'IL-2 alors qu'une stimulation par l'IL-4 et l'IL-2 permet la différenciation en Th2 qui produisent essentiellement de l'IL-4. (Pour revue Zhu and Paul, 2008).

ii. Lymphocytes T CD8

Les LT CD8 sont les lymphocytes T cytotoxiques ou « killer ». Ils reconnaissent des antigènes cellulaires présentés par une molécule CMH de classe I. Ces lymphocytes sont capables de lyser directement les cellules cibles, comme par exemple les cellules infectées par un virus ou les cellules cancéreuses. Leur action passe par une libération de granules cytotoxiques contenant de la perforine et les granzymes protéolytiques. Les cellules peuvent également sécréter des cytokines antivirales et activatrices des macrophages. Comme les autres lymphocytes T, ces cellules subissent une prolifération clonale importante lors de la réponse immunitaire et une fois leur action finie, la plupart meurent par apoptose tandis que d'autres se maintiennent pour devenir des lymphocytes mémoires.

iii. *Quelques lymphocytes particuliers*

Lymphocytes T régulateurs

Définition

Les lymphocytes T régulateurs sont un sous-groupe de lymphocytes T CD4 ayant un rôle de régulation périphérique de la réponse immunitaire (revue Sakaguchi et al., 2010). Ils régulent l'action des lymphocytes T effecteurs par leur action immunosuppressive et sont ainsi essentiels à la tolérance aux antigènes du soi (Itoh et al., 1999). On distingue les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) produits par le thymus, et les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) ou adaptatifs produits en périphérie. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux lymphocytes nTreg. Ces nTreg ont été identifiés en 1995 chez la souris (Sakaguchi et al., 1995) et en 2001 chez l'homme (Dieckmann et al., 2001; Levings et al., 2001; Ng et al., 2001). Il s'agit d'une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2, le CD25 et le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box3) (Hori et al., 2003).

Développement

Chez l'homme, les nTreg se développent dans le thymus. Le développement thymique des nTreg se ferait par la sélection de lymphocytes T dont le TCR a une forte affinité d'interaction avec des complexes CMH/peptides du soi présentés par les cellules thymiques stromales (Liston et al., 2008). Il semble que les corpuscules de Hassall créent un microenvironnement favorable à la différenciation des thymocytes en nTreg FoxP3⁺. En effet, ces structures secrètent une hormone thymique appelée TSLP (« Thymic Stromal Lymphopoietin ») (Watanabe et al., 2004, 2005) qui active des cellules dendritiques (DC) immatures, ces cellules permettant ensuite l'induction de FoxP3 au niveau des thymocytes immatures. Les T régulateurs naturels sont donc CD4⁺, CD25⁺ forts, FoxP3⁺.

Le facteur FoxP3 est important non seulement pour le développement des nTreg dans le thymus mais également pour le maintien de la fonction suppressive des nTreg matures. En effet, les mutations perte de fonction du gène *FoxP3* entraînent chez la souris des manifestations auto-immunes sévères (souris Scurfy) (Brunkow et al., 2001) et chez l'homme le syndrome IPEX (« Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked ») associant un déficit immunitaire, une polyendocrinopathie et une entéropathie ainsi qu'un taux élevé d'auto-anticorps (Bennett et al., 2001). Par ailleurs, une inactivation conditionnelle de FoxP3 dans les nTreg matures induit une perte de leur fonction suppressive et l'acquisition par ces cellules de caractéristiques autres, par exemple celles des cellules Th17. Ainsi FoxP3 est un facteur clé de l'identité de ces cellules (Li and Zheng, 2015; Williams and Rudensky, 2007).

Action des nTreg

Les nTreg sont capables de supprimer l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices, comme la production de cytokine, de nombreuses cellules immunitaires incluant les LT CD4 et CD8, les cellules NK et NKT ainsi que les LB et les cellules présentatrices d'antigène *in vitro* et *in vivo*. Ces cellules ont ainsi un rôle central dans la prévention des maladies autoimmunes et de l'allergie mais également dans le maintien d'un greffon allogénique ou dans la tolérance materno-fœtale au cours de la grossesse (Sakaguchi et al., 2010).

Lymphocytes iNKT

Définition

Les cellules iNKT sont une sous-population de $LT\alpha\beta$ très conservées depuis les souris jusqu'à l'homme, ce sont des lymphocytes exprimant certains récepteurs spécifiques des lymphocytes NK. Leur récepteur TCR est invariant, $V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la souris et chez l'homme il sera toujours $V\alpha 24-J\alpha 18/V\beta 11$ (Dellabona et al., 1994; Porcelli et al., 1993). Ce TCR est restreint par le CD1d (CMH de classe I non classique) (Bendelac et al., 1994; Exley et al., 1997). Contrairement aux LT conventionnels, ce récepteur ne reconnaît pas des antigènes protéiques mais des antigènes glycolipidiques. On dénombre 20 à 20 000 iNKT/10⁶ lymphocytes CD3⁺ chez l'homme avec une accumulation dans le foie (1% des LTCD3) et l'omentum (30 à 40% des LT CD3). Le terme iNKT a d'abord été utilisé chez la souris, où il définissait une sous-population de LT qui exprimaient le marqueur NK1.1 (CD161) spécifique des cellules NK (Bendelac et al., 1997). Le premier ligand identifié de ces cellules est l' α -galactosylcéramide (α GalCer), extrait de l'éponge marine *Agelas mauritanus* (Kobayashi et al., 1995).

Chez l'homme, les cellules iNKT périphériques ont un phénotype mémoire, CD45RO⁺, CD62L⁻. Elles sont par ailleurs CD69⁻, HLA-DR⁻ et CD122⁺. Elles peuvent être CD4⁺, CD8⁺ ou encore double négatives (D'Andrea et al., 2000).

Développement des iNKT

Comme les $LT\alpha\beta$ conventionnels, les iNKT dérivent des HSC et se développent dans le thymus. Chez l'homme, ces cellules sortent du thymus à l'état CD4⁺CD161⁻ et terminent leur maturation en périphérie où elles acquièrent alors le marqueur CD161 (Baev et al., 2004). Pour être fonctionnelles, ces cellules ont besoin d'une étape de maturation en périphérie.

Le TCR de ces cellules est invariant, chez l'homme il s'agit du $V\alpha 24-J\alpha 18$ et chez la souris $V\alpha 14-J\alpha 18$. Deux modèles peuvent être proposés concernant le développement de ces cellules dans le thymus : le premier modèle suppose l'existence de précurseurs prédestinés à devenir des iNKT avant l'expression et le réarrangement du TCR, alors que selon le deuxième modèle, des thymocytes deviennent des iNKT quand le réarrangement adéquat a été produit suivi une sélection positive par la rencontre avec le ligand endogène thymique.

Le deuxième modèle est plus probable, chez la souris en effet même si le réarrangement productif $V\alpha 14-J\alpha 18$ est toujours présent, le réarrangement non transcrit sur le deuxième allèle est aléatoire (Shimamura et al., 1997). Par ailleurs, le CDR3 est invariant au niveau de la séquence d'acides aminés mais par au niveau de la séquence nucléotidique (Lantz and Bendelac, 1994). Il a été démontré, également chez la souris, que les cellules iNKT se développent à partir des thymocytes DP, sous la dépendance des facteurs de transcription ROR γ t et Runx1 (Egawa et al., 2005). Les souris déficientes pour ROR γ t n'ont ni iNKT, ni réarrangement $V\alpha 14-J\alpha 18$ (Egawa et al., 2005), or ROR γ t est nécessaire à la

survie des thymocytes DP, permettant la formation du réarrangement $V\alpha 14-J\alpha 18$ (Guo et al., 2002). Si l'on introduit le transgène $V\alpha 14-J\alpha 18$ dans des souris KO pour ROR γ t, les cellules iNKT peuvent se développer (Bezbradica et al., 2005). Ces différentes observations sont donc en faveur d'un développement thymique des iNKT dépendant d'un réarrangement stochastique du $V\alpha 14-J\alpha 18$.

Action des iNKT

Ces cellules auraient un rôle important dans l'immunité anti-cancéreuse, anti-infectieuse, les allergies et l'auto-immunité (pour revue Brennan et al., 2013). Lorsqu'elles sont stimulées, ces cellules produisent de l'IFN- γ et de l'IL4 rapidement. Elles peuvent être activées de différentes manières. La voie classique d'activation est la reconnaissance d'un glycopeptide d'origine bactérienne présenté par le CD1d (Brennan et al., 2011; Venkataswamy and Porcelli, 2010). La seconde voie d'activation est indirecte, par des cellules dendritiques qui sont elles-mêmes activées par leur TLR. Dans ce cas, la cellule dendritique présente un ligand endogène aux cellules iNKT (Salio et al., 2007). Enfin, la dernière voie d'activation se fait de manière indirecte par des cytokines, l'IL-12 et l'IL-18, indépendamment du TCR (Nagarajan and Kronenberg, 2007). Une fois activées, ces cellules prolifèrent et produisent des cytokines, IL-4, IFN- γ entre autres. Leur action passe par la production de molécules cytotoxiques qui vont lyser les cellules cibles (perforine, granzyme, FasL et TRAIL), elles ont également une activité immunosuppressive en tuant des LT et des cellules dendritiques par un mécanisme CD1d-dépendant. Enfin, ces cellules semblent jouer un rôle direct dans la lyse des cellules tumorales. Il a été notamment mis en évidence que des cellules iNKT peuvent reconnaître *in vitro* des cellules tumorales de leucémies myélomonocytaires via le CD1d que ces cellules expriment (Metelitsa et al., 2003).

Lymphocytes MAIT

Définition

Une autre population de LT exprimant un TCR α invariant a été identifiée, chez l'homme il s'agit du TCR V α 7.2-J α 33 avec un CDR3 est de longueur constante, le V β pouvant être V β 13.1, V β 13.3 ou V β 2 (Porcelli et al., 1993; Tilloy et al., 1999). Ces cellules se retrouvent majoritairement au niveau des muqueuses, en particulier de la muqueuse intestinale, d'où leur nom de lymphocytes « Mucosal Associated Invariant T » (MAIT) (Treiner et al., 2003). Ces cellules sont restreintes par le MR1 (Major Histocompatibility Complex class I related gene protein) qui est une molécule du CMH atypique, très conservée. Ces cellules sont présentes dans le sang, les intestins et le foie. Dans le sang des adultes sains, leur phénotype est effecteur mémoire (CD95+, CD62L).

Il était présumé que les cellules MAIT ne pouvaient reconnaître qu'un nombre limité d'antigènes raison de l'utilisation d'une chaîne de TCR α invariant et la restriction par une molécule du CMH non polymorphe (Tilloy et al., 1999). Cependant, des études récentes ont mis en évidence dans ces cellules un répertoire TCR α plus hétérogène, en raison de la variabilité du CDR3 et également par l'identification d'autres segments Jalpha pouvant être utilisé par ces cellules (Gold et al., 2014; Reantragoon et al., 2013). Le TCR de ces cellules est donc finalement qualifié de « semi invariant », et il est probable que les cellules MAIT reconnaissent un nombre plus diversifié de ligands.

Développement des MAIT

Comme les LT classiques, les cellules MAIT se développent dans le thymus où leur TCR est réarrangé par recombinaison somatique suivie d'une sélection positive (Martin et al., 2009; Treiner et al., 2003). Cependant, alors que les LT sont classiquement sélectionnés positivement par interaction avec les cellules épithéliales thymiques exprimant le CMH-I ou du CMH-II, les cellules murines MAIT sont sélectionnées par des cellules doubles positives exprimant des niveaux élevés de MR1 (Martin et al., 2009; Seach et al., 2013). Chez l'homme, MR1 est également exprimé par des thymocytes double positif, les cellules MAIT humaines sont donc probablement sélectionnées de manière similaire aux cellules MAIT murines (Gold et al., 2013). Les MAIT sortent du thymus avec un phénotype naïf pour s'accumuler en périphérie. Leur maturation dépend ensuite de la présence de LB et de la flore commensale.

Action des MAIT

Une fois activées, les cellules MAIT produisent les cytokines pro-inflammatoires, l'IFN- γ et TNF α , et sont cytotoxiques. Des études réalisées dans des souris déficientes pour MR1 suggèrent que les cellules MAIT peuvent fournir un contrôle antibactérien dans les premiers jours suivant l'infection et contribuer à l'amélioration de l'immunité. Chez l'homme,

les cellules MAIT semblent avoir un rôle dans la réponse précoce aux infections bactériennes, notamment contre *Mycobacterium tuberculosis*.

En 2012, les premiers ligands du MR1 ont été identifiés, il s'agit de petites molécules organiques dérivant du métabolisme de l'acide folique (vitamine B9) et de la ribovlavine (vitamine B2) (Kjer-Nielsen et al., 2012). Depuis des dérivés de la riboflavine pouvant activer les MAIT ont été identifiés chez certaines bactéries et champignons (Gold et al., 2014; Soudais et al., 2015).

3. Réarrangements de l'ADN dans le système immunitaire

L'étude de certaines pathologies humaines ainsi que de nombreux modèles animaux ont mis en évidence un lien très fort entre stabilité du génome et développement du système immunitaire. Le système immunitaire possède en effet certaines spécificités qui le rendent non seulement dépendant des systèmes de réparations des lésions de l'ADN mais également très sensible aux dommages de l'ADN.

A. Cassures programmées

1) Recombinaison V(D)J

a) Principe

La réponse immune adaptative a comme nous l'avons vu, un rôle crucial dans la défense contre les agents pathogènes grâce à sa capacité à générer un répertoire immunitaire contre un panel virtuellement infini d'antigènes, qu'ils soient solubles ou cellulaires. Ce répertoire est porté par les récepteurs aux antigènes des LT et des LB, respectivement les TCR et BCR et la génération de ce très large répertoire est possible grâce à la recombinaison V(D)J.

La recombinaison V(D)J est le processus moléculaire au cours duquel sont remaniés les séquences nucléotidiques des loci codant pour les parties variables du BCR et du TCR. Ce processus commence au stade proB du développement des LB pour le réarrangement du BCR et au stade DN du développement des LT pour le réarrangement du TCR. Cette recombinaison permet de générer le large répertoire des régions variables de ces récepteurs.

b) Description du locus

Les TCR et les BCR sont composés d'une région constante (C) responsable des fonctions effectrices des récepteurs et d'une région variable qui permet la reconnaissance de l'Ag. Au niveau moléculaire, on retrouve sur le locus des régions variables différents segments appelés Variabilité (V), Diversité (D) et Jonction (J). Ces segments V, D, J et C, sont présents en quantité variable selon la chaîne. Les segments de gène V, D et J sont groupés par nature en amont de la région des segments C et séparés les uns des autres par des séquences non codantes (Figure 9A). La région variable des chaînes TCR α , TCR δ , Ig λ et Ig κ est constituée uniquement de segments V et J (réarrangement V-J) alors que celle des TCR β , TCR γ et IgH comprend aussi des segments D (réarrangement V-D-J). Les réarrangements chromosomiques intervenant durant la recombinaison V(D)J vont permettre de rapprocher physiquement un

segment V, un segment J et éventuellement un segment D, selon la configuration du locus. Ces réarrangements se font aléatoirement.

Chez l'homme, les gènes codant le TCR α et le TCR δ sont situés sur un même locus sur le chromosome 14, les gènes codant le TCR β et le TCR γ sont situés sur le chromosome 7, respectivement sur le bras long et sur le bras court. Les gènes des chaînes lourdes IgH sont sur le chromosome 14 et ceux des chaînes légères Ig κ et Ig λ sur le chromosome 2 et 22 respectivement (Bassing et al., 2002; Krangel, 2009; Tonegawa, 1983).

Chaque segment V, D et J est flanqué par une séquence RSS (Recombination Specific Sequences) (Sakano et al., 1979) (Figure 9B). Les RSS sont situés en 3' des segments V, en 5' des segments J et de part et d'autre des segments D quand ils sont présents. Les RSS sont composées d'un heptamère palindromique hautement conservé séparé d'un nonamère riche en A/T par une séquence de 12 ou 23 paires de base. La recombinaison se fait exclusivement entre deux RSS de taille différente : c'est la règle du 12/23. L'organisation des loci des TCR et BCR permet d'éviter que la recombinaison n'ait lieu entre deux segments de même type (Lu et al., 2008).

Chez l'homme, grâce aux différentes combinaisons des segments V, D et J, on estime qu'environ 10^8 à 10^9 Ig et 10^{15} TCR différents peuvent être générés.

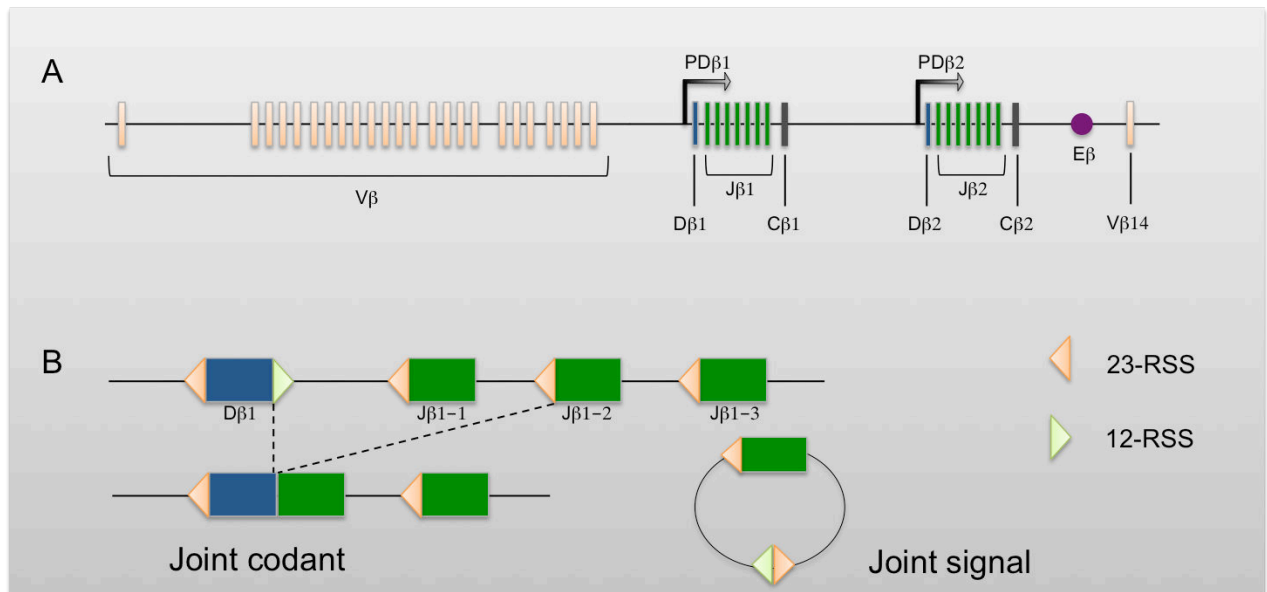


Figure 9 Exemple de structure du locus V(D)J

Ici est représenté le locus du TCRβ pour illustrer la structure du locus V(D)J (la représentation n'est pas à l'échelle).

A : Les différents segments Vβ sont représentés en beige, Dβ en bleu, le Jβ en vert et enfin la région constante Cβ en gris. Les régions régulatrices PDβ et Eβ sont également représentées.

B : Les séquences 12-RSS sont situées en 5' des segments D et V (non représenté) et les séquences 23-RSS en 3' des segments D et J. La recombinaison se fait de manière aléatoire entre 2 séquences RSS distinctes, 23 et 12. Cette disposition permet d'éviter des réarrangements entre 2 segments de même nature. Le cas présenté ici montre un réarrangement D-J, avec formation du joint codant et excision du joint signal.

c) Description du processus

i. *Initiation de la réaction : introduction d'une cassure double brin*

L'initiation de la recombinaison V(D)J se fait grâce à l'action des enzymes RAG1 (Schatz et al., 1989) et RAG2 (Oettinger et al., 1990) dont l'expression est strictement limitée aux lymphocytes immatures. Les enzymes RAG1 et RAG2 sont nécessaires et suffisantes pour initier la recombinaison V(D)J au niveau des loci cibles sur les gènes codant les récepteurs aux antigènes. Le complexe RAG1/RAG2 va reconnaître les séquences RSS et induire une cassure simple brin à la limite de l'heptamère et du segment codant adjacent (Kim et al., 1999; Landree et al., 1999). L'extrémité 3' OH sortante va ensuite effectuer une attaque nucléophile sur la liaison phosphodiester du brin opposé. Il en résulte la formation de deux cassures doubles brins avec deux extrémités en épingle à cheveu sur le chromosome, ce sont les extrémités codantes (« Coding Ends ») et deux extrémités franches phosphorylées en 5' sur le segment chromosomique excisé que l'on appelle extrémités signal (« Signal Ends ») (Ma et al., 2002) (voir Figure 10). Le complexe RAG1/2 maintiennent les extrémités codantes et signal dans un complexe post-clivage ce qui permet de stabiliser et de diriger les jonctions qui interviendront dans les étapes suivantes (Agrawal and Schatz, 1997). (Pour revue Schatz and Ji, 2011)

ii. *Identification et résolution des cassures*

Le NHEJ est le mécanisme utilisé par les lymphocytes en cours de développement pour permettre la résolution des cassures doubles brins générées lors de la recombinaison V(D)J. L'hétérodimère constitué des facteurs Ku70 et Ku80 reconnaît les extrémités signal et codantes de l'ADN. Un joint signal est formé par la ligation des extrémités signal. Cette ligation des extrémités signal franches nécessite uniquement la présence des facteurs Ku70, Ku80, XRCC4 et DNA Ligase IV. Cette réaction aboutit à la production du joint signal, circulaire et excisé du chromosome (Lees-Miller and Meek, 2003).

Pour la formation du joint codant, l'hétérodimère Ku70/Ku80 fixé sur les extrémités en épingle à cheveu recrute la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN, DNA-PKcs (Lu et al., 2008). Ce complexe ensuite recrute et phosphoryle la protéine Artémis. Cette protéine activée possède une activité endonucléase qui permet d'ouvrir ces structures en épingle à cheveu (Ma et al., 2002, 2005). Lors de cette ouverture, des nucléotides vont être supprimés ou ajoutés aux extrémités codantes par la TdT (« Terminal deoxynucleotidyl Transferase »), ce qui permet d'augmenter encore plus la diversité des séquences pour un même réarrangement V(D)J (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993). La ligation des extrémités codantes est finalement réalisée par facteurs XRCC4, DNA Ligase IV, et Cernunos (Figure 10).

Ainsi, les segments des gènes du TCR et des Ig sont assemblés au cours du développement des LT et LB grâce à la recombinaison V(D)J pour créer la diversité des récepteurs qui reconnaissent un nombre important d'Ag. L'excision et l'addition de nucléotides par le facteur TdT au niveau des jonctions permettent le développement d'un répertoire quasi infini.

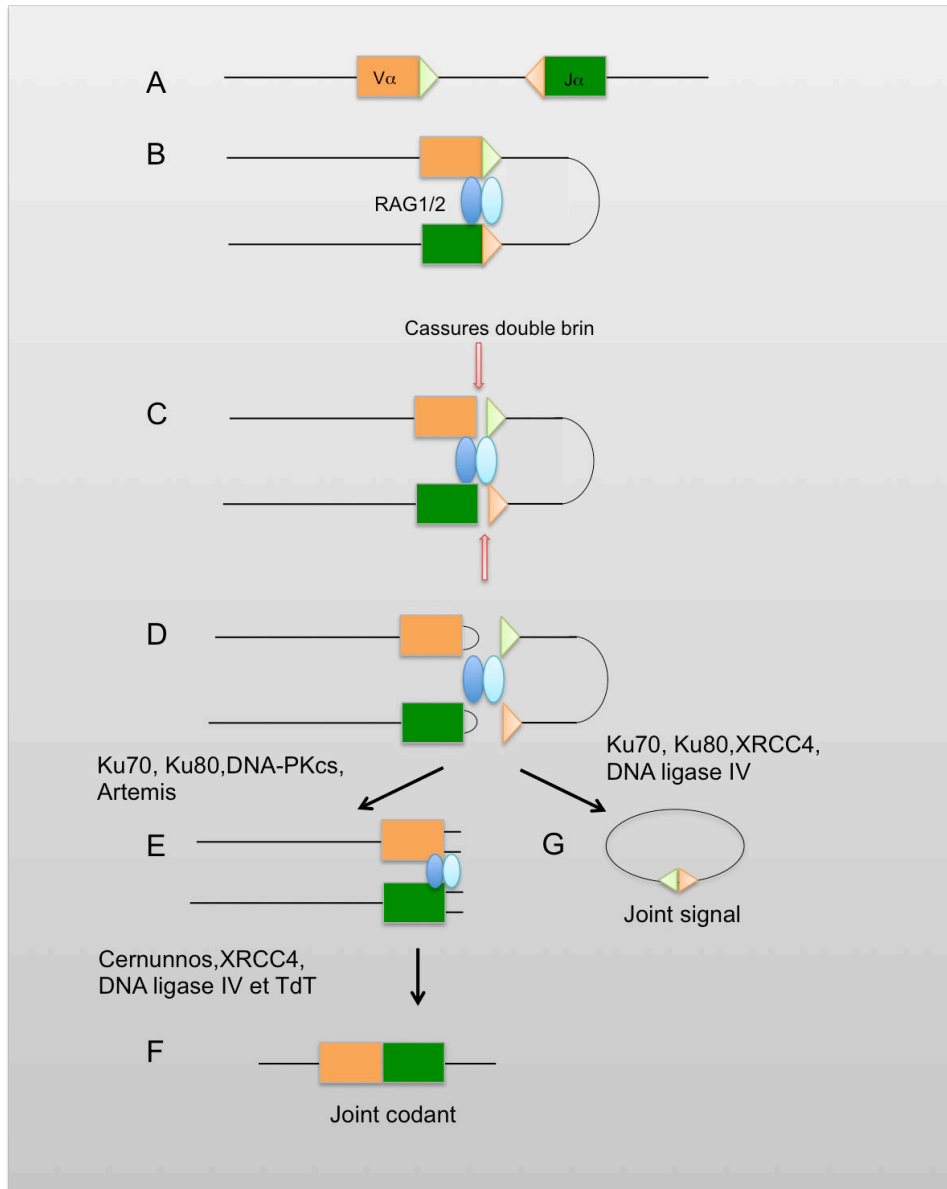


Figure 10 Mécanisme de la recombinaison V(D)J

Exemple de recombinaison V(D)J entre un segment $V\alpha$ flanqué d'une séquence 12-RSS et un segment $J\alpha$ flanqué d'une séquence 23-RSS (A). Le complexe RAG1/RAG2 reconnaît les séquences RSS et les rapproche physiquement pour former une synapse (B), puis génère deux cassures double brins entre la séquence RSS et les segments codant $V\alpha$ et $J\alpha$ (C). Les extrémités sortantes des segments codant sont en épingle à cheveu alors que les extrémités signal du segment excisé sont franches (D). Au niveau du joint codant, le complexe Ku70/Ku80 associé à DNA-PKcs phosphoryle Artemis qui ouvre les structures en épingle à cheveu (E), les facteurs du NHEJ pourront alors effectuer la ligation des extrémités après ajout ou suppression de quelques nucléotides par TdT (F). Sur le joint signal, les extrémités franches sont réparées directement par les facteurs du NHEJ sans intervention de Artemis (G).

d) Particularités du locus TCR α/δ

Les gènes codant les récepteurs aux antigènes des LT (TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ) sont chacun réarrangés par recombinaison V(D)J selon des programmes distincts au cours du développement des lymphocytes T. Ces programmes dépendent de facteurs génétiques et épigénétiques, comme des changements dans la structure de la chromatine qui modifie l'accès des séquences RSS pour le complexe RAG1/2. Le locus du TCR δ a la particularité d'être enchâssé au sein du locus TCR α tout en étant indépendant de celui-ci (Figure 11) (Krangel, 2009).

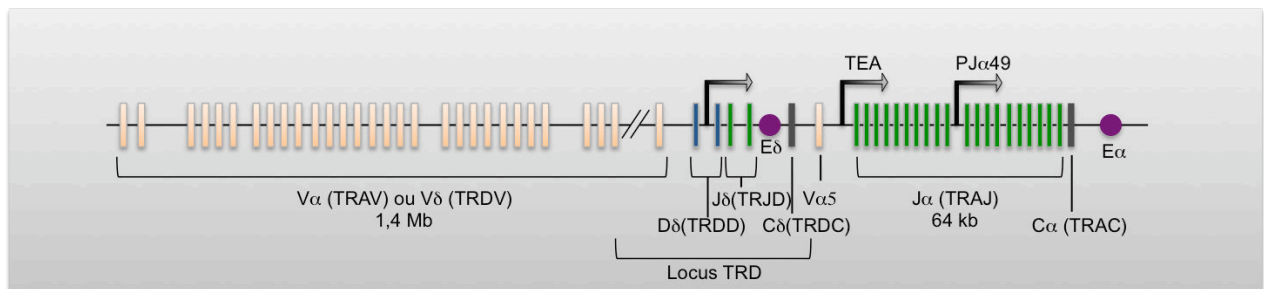


Figure 11 Représentation schématique du locus TCR α/δ

Le locus du TCR δ (TRD) est enchâssé au sein du locus du TCR α , cependant ces deux locus sont régulés de manière indépendante l'un et l'autre.

Le réarrangement des gènes codant pour la chaîne TCR α au stade DP a plusieurs spécificités. Tout d'abord, le réarrangement Valpha/Jalpha se produit simultanément sur les deux allèles en raison d'une absence apparente d'exclusion allélique (Malissen et al., 1992). D'autre part, le réarrangement initial du TCR α est soumis à des vagues de recombinaison (Krangel et al., 2004; Mauvieux et al., 2001). Le TCR α réarrange en premier temps des segments Jalpha et Valpha proximaux, respectivement à l'extrémité 5' du locus Jalpha et 3' du locus Valpha, sous la dépendance du TEA (Villey et al., 1996). Si le premier réarrangement n'a pas été productif, il se produit un réarrangement secondaire qui utilise un segment Jalpha et un segment Valpha plus distaux remplaçant le Valpha/Jalpha primaire (Hawwari and Krangel, 2007) (voir figure 12). Les réarrangements sont effectués sur les deux allèles. Dès qu'un réarrangement Valpha/Jalpha est productif, cela enclenche la sélection positive qui induit la répression de l'expression des gènes RAG1/2. Ces réarrangements secondaires jouent un rôle clé dans la formation du répertoire du TCRalpha. En effet, les thymocytes DP ayant une capacité limitée à subir les réarrangements secondaires ont un répertoire Valpha/Jalpha inhabituellement biaisé (figure 12). La durée de vie des thymocytes affecte directement le nombre de réarrangements Valpha/Jalpha possibles (Guo et al., 2002). Ceci a été observé dans des modèles murins où la durée de vie des thymocytes est augmentée (BclX1 transgénique) ou diminuée (ROR γ déficiente) (Sun et al., 2000). On observe alors respectivement un biais en faveur des segments Jalpha les plus proximaux et les plus distaux (voir figure 12). Ceci a également été observé dans les souris déficientes pour Cernunnos

(Vera et al., 2013). Ces souris présentent un biais de l'utilisation du répertoire du TCR α vers les segments proximaux en 3' pour le Valpha et en 5' pour le Jalpha suggérant une diminution de la durée de vie des thymocytes. Chez la souris le TCR invariant des cellules iNKT utilise des segments distaux Valpha et Jalpha (V α 14-J α 18). On note chez les souris déficientes pour ROR γ une baisse importante du nombre de lymphocytes iNKT (Hager et al., 2007), une observation similaire a été faite chez des souris déficientes pour cMyb, facteur intervenant pour maintenir la survie des thymocytes DP (Hu et al., 2010).

Des biais de répertoire ont également été décrits chez l'homme, dans le cas d'un patient déficient pour Cernunnos (Vera et al., 2013) et chez des patients déficients pour RORC (Okada et al., 2015). Dans ces deux cas, le très faible taux d'utilisation des segments distaux s'accompagne d'une diminution, voire d'une absence, de lymphocytes MAIT et iNKT. En effet, ces deux populations utilisent respectivement le Valpha7.2 et le Valpha24 qui sont tous deux des segments également distaux chez l'homme.

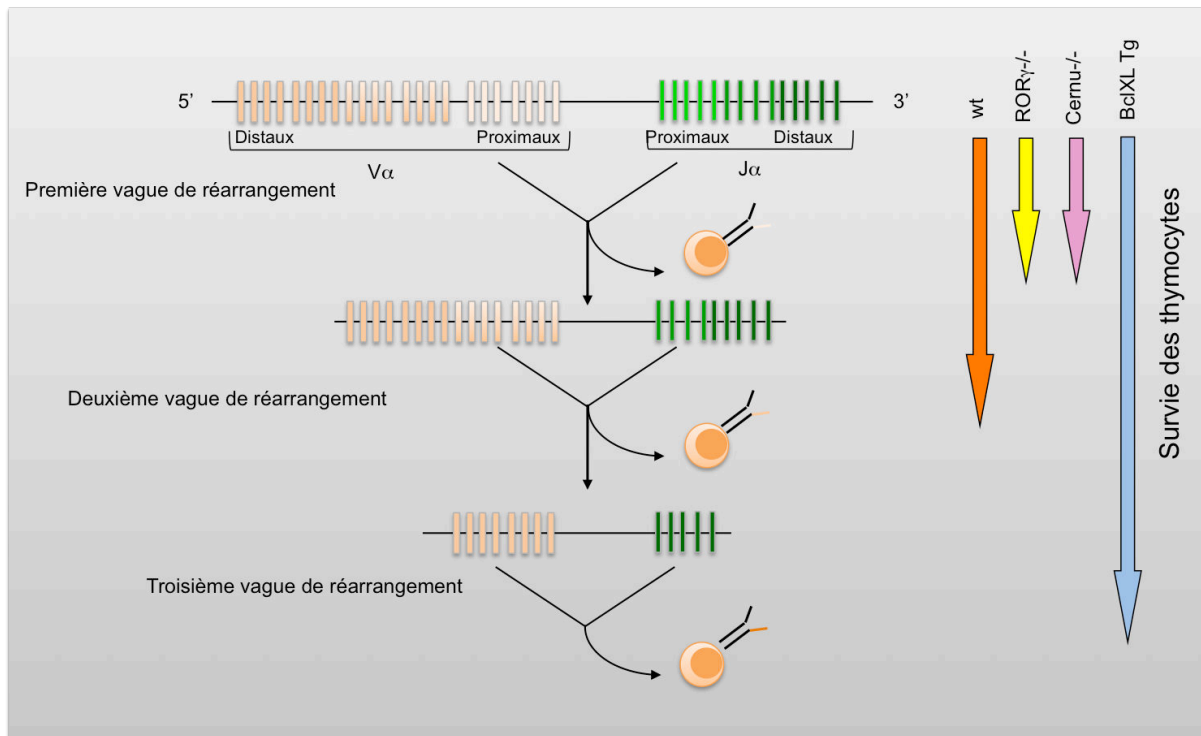


Figure 12 Vagues successives de réarrangement Valpha/Jalpha

Le locus du TCR α est réarrangé au stade DP par plusieurs vagues successives. La première vague utilise des segments Valpha et Jalpha proximaux, si celle-ci n'aboutit pas à un réarrangement productif, un autre réarrangement utilisant des segments plus distaux est enclenchée, puis éventuellement une troisième jusqu'à ce que le réarrangement soit productif et permette la synthèse d'un TCR α fonctionnel. Il est nécessaire que les thymocytes DP survivent suffisamment longtemps pour permettre les dernières vagues. On observe des biais de répertoire en faveur des segments proximaux en cas de survie diminuée des thymocytes (souris ROR γ ^{-/-} et Cernu^{-/-}), inversement on observe un biais en faveur des segments les plus distaux chez les souris BclXL Tg transgéniques chez qui la survie des thymocytes DP est augmentée.

Deux éléments, le promoteur « T early alpha » (TEA) et le « TCRalpha enhancer » (Ealpha), régulent en cis les réarrangements du TCRalpha (voir Figure 11). Les souris

dépourvues en Ealpha montre un défaut profond de la recombinaison et de l'expression du TCRalpha qui est associé à une altération de la structure de la chromatine sur l'ensemble du locus Jalpha (Krangel et al., 2000). Le promoteur TEA est situé immédiatement en 5' du cluster des segments Jalpha, il aurait pour rôle d'initier les réarrangements du TCR α à l'extrémité 5' du locus Jalpha en ouvrant la chromatine grâce à l'acétylation des histones (Mauvieux et al., 2003). Les souris dépourvues de TEA et de son promoteur montrent une absence de recombinaison des neuf segments Jalpha les plus proximaux, en 5' (Villey et al., 1996).

e) Lien entre réparation de l'ADN et recombinaison VDJ

Un des mécanismes de la réparation de l'ADN, le NHEJ, a un rôle essentiel au cours du développement et de la maturation des lymphocytes pour permettre la recombinaison V(D)J.

Le premier lien entre recombinaison V(D)J et réparation de l'ADN vient de l'étude des souris SCID (« Severe Combined Immuno Deficient ») identifiées en 1980 comme une souche naturelle ne possédant ni LT ni LB (Bosma and Carroll, 1991). Différentes études ont montré une sensibilité importante de ces souris aux radiations ionisantes, conséquence d'un défaut général dans les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN (Biedermann et al., 1991; Fulop and Phillips, 1990; Hendrickson et al., 1991). Durant la recombinaison V(D)J, ce défaut se traduit par une incapacité à réparer les cassures induites par le complexe RAG1/2 et par conséquent un blocage du développement des LB et LT (Roth et al., 1992). Le lien entre recombinaison V(D)J et réparation de l'ADN a été également étudié *in vitro* dans des lignées cellulaires radiosensibles CHO (« Chinese Hamster Ovary ») en étudiant la capacité de ces cellules à pouvoir effectuer une recombinaison V(D)J sur un substrat extrachromosomique après l'introduction des gènes codant RAG1 et RAG2. Quatre groupes de complémentation nommés « X Ray Cross Complementation Group » (XRCC4 à XRCC7) ont ainsi été identifiés (Pergola et al., 1993; Taccioli et al., 1993). Les facteurs XRCC5, XRCC6 et XRCC7 correspondent au complexe DNA-PKcs/Ku70/Ku80. La souris SCID est elle-même déficiente en XRCC7, soit DNA-PKcs.

Plus généralement, chez la souris, un défaut dans l'un des facteurs du NHEJ conduit au développement d'animaux immunodéficients ne possédant ni LB, ni LT (de Villartay et al., 2003). Ainsi le NHEJ est absolument indispensable au bon déroulement de la recombinaison V(D)J. Les souris sont viables dans le cas d'une inactivation de Ku70, Ku80 ou DNA-PKcs alors que l'absence de XRCC4 ou de DNA-ligase IV est létale au stade embryonnaire en raison d'une apoptose neuronale importante (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998).

Le facteur Artemis a été identifié grâce à l'étude de patients atteints de SCID radiosensibles, c'est à dire présentant une absence de LT et de LB associé à une hypersensibilité aux radiations ionisantes (Moshous et al., 2001; Nicolas et al., 1998). L'absence d'Artemis chez ces patients cause un défaut général dans la machinerie de réparation de l'ADN. La formation du joint signal est peu affectée chez patients, tout comme chez les patients ou souris déficients pour DNA-PKcs (Roth et al., 1992). L'étude de ces différentes conditions a ainsi permis de comprendre l'activité DNA endonucléase de Artemis ainsi que ses interactions avec DNA-PKcs (Ma et al., 2002; Moshous et al., 2001). Si le rôle de Artemis lors de recombinaison V(D)J est relativement clair, sa fonction lors de la réparation des cassures doubles brins qui surviennent aléatoirement dans le génome est encore floue. Cette protéine agit probablement en « nettoyant » les extrémités de l'ADN cassé pour faciliter la réparation.

Les souris déficientes pour le facteur Cernunnos ont un déficit majeur de réparation des cassures double brin, observable *in vitro* dans les fibroblastes. Elles présentent par ailleurs une lymphopénie T due principalement à un défaut de survie des thymocytes mais non liée à un défaut intrinsèque de la recombinaison V(D)J (Vera et al., 2013). Il a été proposé que le filament formé par XRCC4 et Cernunnos lors du NHEJ (Ropars et al., 2011), nécessaire pour l'attache des extrémités double brin d'ADN cassé pourrait être remplacé dans sa fonction par le complexe post-clivage Rag1/Rag2 dans les cellules lymphoïdes lors de la recombinaison V(D)J (Vera et al., 2013).

2) La commutation de classe des immunoglobulines

a) Principe

Les LB naïfs sont activés dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, après stimulation antigénique par le BCR et activation du récepteur CD40 par le CD40L. Les LB subissent alors deux événements majeurs conduisant à la diversification des anticorps. Il s'agit de la commutation de classe des chaînes lourdes des Ig (CSR pour «Class Switch Recombination») et de l'Hypermutation Somatic (SHM pour «Somatic Hypermutation»). Ces événements correspondent à deux formes de réarrangement génique somatiques des gènes des Ig qui permettent d'augmenter l'affinité des Ac (SHM) et de modifier leur fonction effectrice (CSH). Ils sont induits dans une même fenêtre temporelle et spatiale mais ne sont pas nécessairement liés. Le CSR se fait au niveau de la région constante de l'Ig et les SHM dans la région variable. Ces deux processus sont dépendants de l'expression de l'enzyme AID (« Activation-Induced Cytidine Deaminase ») (Hackney et al., 2009; Neuberger, 2008; Pan-Hammarström et al., 2007). Les hypermutations somatiques consistent en l'introduction de mutations et plus rarement des insertions et des délétions dans la séquence de nucléotides des exons de la région variable des gènes d'Ig. Ceci permet de générer des immunoglobulines avec une forte affinité pour les antigènes et permet la sélection positive des LB portant à leur surface les Ig le plus efficaces. Nous détaillerons plus particulièrement le mécanisme de CSR.

b) Description du locus

Le CSR est un réarrangement chromosomique au niveau de la région constante (C) du gène IgH qui permet le remplacement de la région constante initiale C_{μ} par l'une des autres régions constantes, $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\alpha 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 4}$, C_{ϵ} et $C_{\alpha 2}$ chez l'homme. Ce changement de région constante permet aux LB activées de modifier l'isotype des anticorps (IgA, IgG ou IgE) avec pour conséquence des fonctions effectrices différentes (pour revue Stavnezer and Schrader, 2014).

Le locus des régions constantes est détaillé dans la figure 13. Chaque région C possède en 5' une région I (promotrice) et une région S (pour Switch). Celle-ci est composée de courtes séquences répétitives pentamériques (GAGCT et GGGCT) qui diffèrent en longueur et en nombre de régions. Au cours du CSR, une délétion de l'ADN génomique est nécessaire entre la région S située en amont de la région C_{μ} et la région S du segment constant choisi (on parlera de région acceptrice).

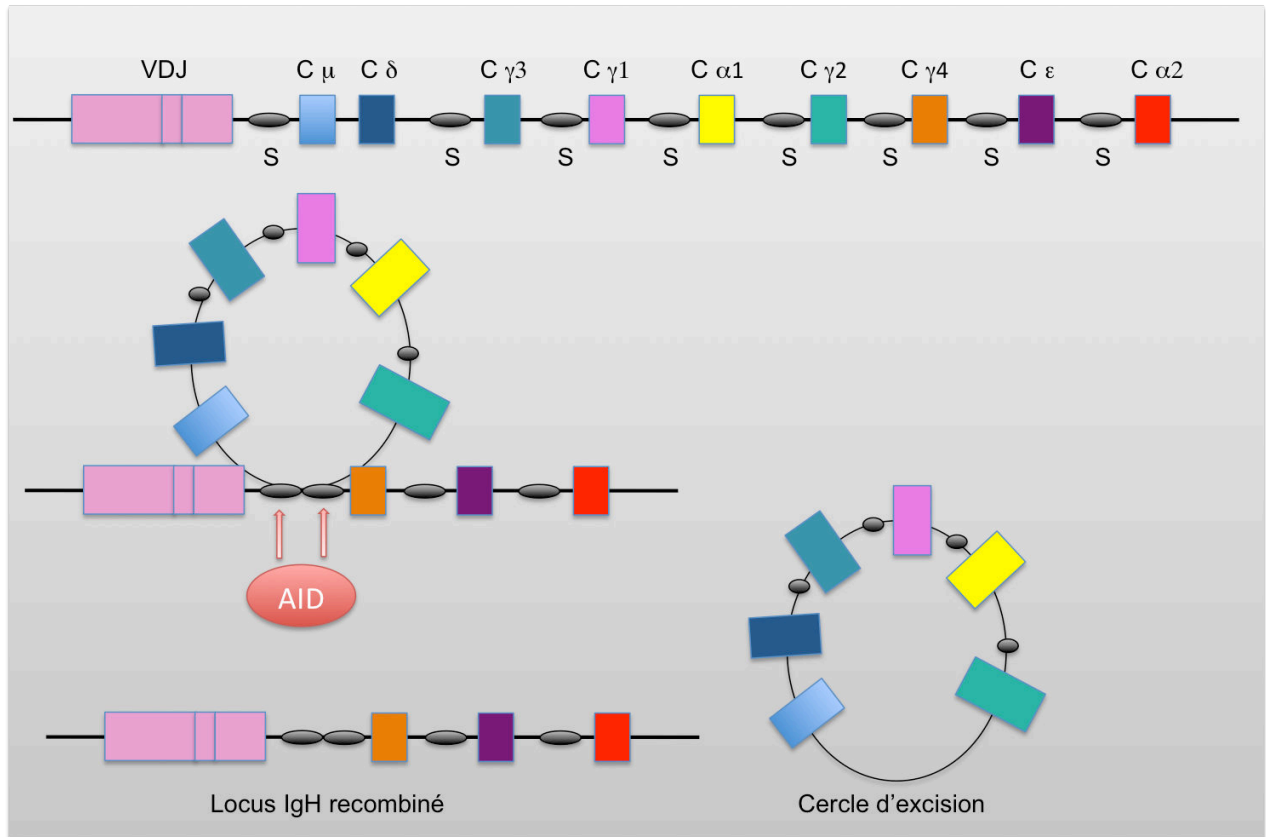


Figure 13 Représentation simplifiée de la commutation de classe des Ig (CSR)

Locus de la région constante des IgH chez l'homme à l'état germinale (en haut). Les LB naïfs expriment soit une IgM soit une IgD, avec une région constante respective C μ ou C δ dépendant d'un épissage alternatif. Le CSR réarrange le segment chromosomique entre la région S en amont de C μ et une autre région S en amont d'une autre région constante ce qui permet de modifier l'isotype des anticorps, IgA, IgG ou IgE selon la région réarrangée (en bas). Les cassures doubles brins au niveau des régions S sont initiées par l'enzyme AID, le NHEJ permet la réparation du locus ainsi réarrangé. Le segment chromatidien inclus entre les deux régions S est excisé.

c) Déroulement du CSR

Le choix de la région C acceptrice dépend des cytokines présentes dans l'environnement du LB. Par exemple, l'IL-4 induit une commutation de l'IgM en IgE.

Pour que le CSR se fasse, les régions S doivent passer par une étape de cassure double brin de l'ADN (Wuerffel et al., 1997) initiée par l'enzyme AID (revue Chandra et al., 2015), qui est spécifiquement exprimée dans les LB activées subissant le CSR (Muramatsu et al., 1999, 2000; Revy et al., 2000). AID est essentielle pour le CSR et la SHM puisque les LB de patients et des souris déficientes en AID sont incapables de produire les SHM et de procéder au CSR (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Ce déficit conduit chez l'homme à un syndrome hyper IgM (HIGM2) caractérisé par une quantité normale ou élevée d'IgM sérique, contrastant avec l'absence de Ig d'autres isotypes (G, A, E) (Revy et al., 2000). Les patients souffrant de ce syndrome sont très sensibles aux infections bactériennes et doivent être substitués en Ig.

AID agit probablement directement sur des régions S de l'ADN en modifiant des cytosines en uracile par un processus de désamination (voir Figure 14) (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Nambu et al., 2003; Pham et al., 2003). Ce processus démarre lors de la transcription des régions cibles riches en guanidines (« G-rich »). Les ARNm produits riches en cytosines interagissent avec le brin codant de l'ADN de la région S, créant ainsi des structures hybrides stables ADN/ARN nommé « R-loop » (Reaban and Griffin, 1990; Reaban et al., 1994; Shinkura et al., 2003). Les régions S ouvertes deviennent temporairement des ADN simple-brins riches en cytosine qui peuvent être la cible d'AID. AID modifie alors les cytosines en résidus uracile par son activité cytidine désaminase (Chaudhuri et al., 2003). Bien que AID modifie préférentiellement le seul brin « G-rich », le brin matrice peut dans une moindre mesure être également désaminé par l'AID (Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003), ceci entraîne des mésappariements uracile-guanine qui sont reconnus et enlevés par l'Uracil DNA Glycosylase (UNG), créant un site abasique. L'endonucléase APE (« Apyrimidique Endonucléase »), enzyme du BER, reconnaît ce site et introduit une cassure simple-brin dans l'ADN. Il est probable que les facteurs du MMR interviennent pour permettre la formation de cassures double-brin dans la région S. Ce mécanisme aboutit à la formation d'une cassure double brin dans la région S_{μ} et une dans la région S acceptrice. Le chromosome est réparé entre la région S_{μ} et la région S acceptrice grâce au NHEJ. Le fragment d'ADN contenu entre ces régions S est excisé (voir Figure 14).

Si elle n'était pas strictement régulée, l'enzyme AID pourrait être un agent mutagène puissant en raison de son activité de cytidine désaminase. Par conséquent son expression est limitée aux LB activées, et sa localisation cellulaire semble être elle aussi régulée.

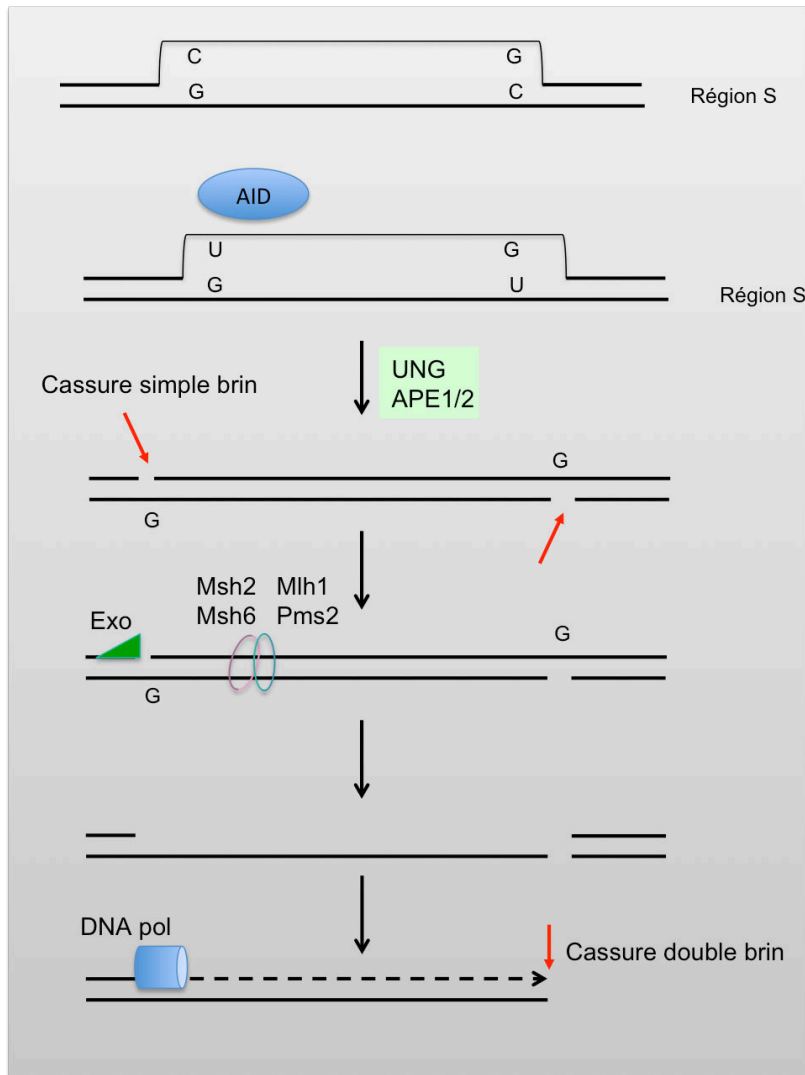


Figure 14 Génération des cassures de l'ADN au cours du CSR

L'enzyme AID convertit des cytosines en uraciles par désamination, les mésappariements G/U sont reconnus par UNG et l'endonucléase APE va générer des cassures simple-brin. Différents facteurs du MMR (Exo, Msh2/Msh6, Mlh1/Pms2) interviennent pour générer la cassure double brin.

d) Lien entre mécanismes de réparation et CSR

Comme pour la recombinaison V(D)J, le CSR dépend du NHEJ pour son bon déroulement. Cependant il a été montré qu'en l'absence de NHEJ fonctionnel, le CSR utilise un mécanisme alternatif appelé « Alternative-End Joining » (A-EJ), utilisant des régions de micro-homologie pour réparer les cassures double brin (Kotnis et al., 2009; Soulas-Sprauel et al., 2007).

Dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle de Artemis dans les LB mature, le CSR est peu altéré mais on observe une augmentation de la taille des micro-homologies de séquences aux jonctions entre $S\mu$ et $S\gamma 1$, $S\gamma 3$ ou $S\alpha$ (Rivera-Munoz et al., 2009). Les modèles murins d'inactivation de XRCC4 ou DNA-ligase IV montrent une diminution du CSR et une augmentation de l'utilisation des régions de micro-homologie (Soulas-Sprauel et al., 2007; Yan et al., 2007). En l'absence d'ATM, 53BP1, NSB1 ou Mre11, on retrouve également une diminution du CSR avec augmentation des régions de micro-homologie (Kotnis et al., 2009).

Chez l'homme, l'étude des jonctions générées par le CSR chez des patients déficient pour Ligase IV (Pan-Hammarström et al., 2005), Artemis (Du et al., 2008) ou Cernunnos (Du et al., 2012) montre la présence de longues séquences de microhomologies et une absence de jonction directes, en faveur d'une utilisation préférentiel de l'A-EJ.

Mais le NHEJ n'est pas le seul mécanisme de réparation de l'ADN nécessaire au CSR, en effet l'enzyme APE1 génératrice de cassures simple brin est également impliquée dans le mécanisme de réparation BER. Par ailleurs, il a été observé chez des souris déficientes pour certains facteurs impliqués dans le MMR comme MSH2, MSH6, PMS2 ou MLH1 une diminution de la commutation isotypique. Ainsi ce mécanisme joue certainement un rôle important au cours du CSR. Des travaux ont également montré qu'une double inactivation du NHEJ et du MMR chez des souris « Knock-out » à la fois pour XRCC4 et l'un des facteurs du MMR (MLH1, EXO1 ou MSH2) ont un CSR diminué par rapport aux souris déficientes uniquement pour XRCC4, ces résultats suggèrent que les protéines intervenant dans le MMR ont une action importante pour garantir une bonne efficacité du CSR, probablement en amont de la formation de la cassure double brin (Eccleston et al., 2011).

Il a également été identifié un rôle important de BRCA1 lors du CSR. En effet dans les cellules de patients déficients pour BRCA1, on observe une utilisation préférentielle de l'A-EJ au détriment du NHEJ lors du CSR. Ainsi il semble que BRCA1 promeut la voie classique du NHEJ et participe au maintien de la stabilité du génome durant l'activation des LB (Björkman et al., 2015). Par ailleurs, les souris déficientes pour Fanca, facteur intervenant dans la voie Fanconi, n'ont pas de défaut de CSR mais on retrouve chez elles des anomalies de la séquence jonctionnelle avec présence d'insertions. Il semble que Fanca soit nécessaire durant le CSR pour stabiliser les duplex entre régions de microhomologie afin d'éviter la recombinaison par A-EJ (Nguyen et al., 2014).

B. Cassures spontanées

1) Stress réplicatif

a) Définition

Chez les eucaryotes, la synthèse de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire est initiée à partir d'origines de réplication distribuées tout le long du génome. La réplication se poursuit par l'avancement des fourches de réplifications, dans le but de parfaitement reproduire l'information génétique. La fourche de réplication est une structure fragile et les ADN polymérases impliquées dans la réplication sont très sensibles aux variations de la structure de la double hélice d'ADN. Un certain nombre d'évènements peuvent perturber l'avancement des fourches de réplication, c'est ce que l'on appelle le stress réplicatif. Ces évènements peuvent être des modifications de la structure de l'ADN, comme des cassures simple brin ou des mésappariements, des modifications de la chromatine ou encore un déficit en nucléotides ou en facteurs impliqués dans la réplication. La perturbation de la réplication de l'ADN entraîne des blocages voire un effondrement de la fourche de réplication avec pour conséquence l'apparition d'une cassure double brin. Les cellules eucaryotes ont plusieurs mécanismes pour résoudre ces blocages de la réplication, notamment un mécanisme appelé BIR (« Break Induced Recombination ») qui fait intervenir les facteurs impliqués dans la recombinaison homologue ou la synthèse translésionnelle qui fait intervenir des polymérases de la famille Y (pour revue Carr and Lambert, 2013).

On estime qu'il se produit environ 10.000 lésions de l'ADN par jour et par cellule simplement dues au métabolisme cellulaire. Ces lésions sont évidemment bien plus fréquentes lors des phases de proliférations cellulaires intenses. Le système immunitaire est par conséquent lui-même particulièrement sensible à ce type de lésion. En effet, le système immunitaire connaît au moins deux phases au cours desquelles la prolifération cellulaire est importante. La première a lieu dans la moelle osseuse et le thymus lors du développement des cellules hématopoïétiques. Cette phase concerne toutes les cellules hématopoïétiques, plaquettes, hématies, granulocytes, monocytes et lymphocytes. La deuxième phase de prolifération intense a lieu lors de la réponse immune en elle-même durant laquelle les cellules du système immunitaire connaissent une phase de prolifération clonale importante.

b) Stress réplicatif et développement du système immunitaire

Les liens entre le développement des systèmes hématopoïétique et immunitaire et la réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont émergés récemment (Blanpain et al., 2011; Rossi et al., 2008; Seita et al., 2010). Il a été mis en évidence un rôle important de p53 et de l'une de ces cibles transcriptionnelles p21CDKN1A/CIP1/WAF1, ainsi que de certains régulateurs de la phase S, dans la régulation du cycle des CSH et de leur apoptose (Abbas and Dutta, 2009; Cheng et al., 2000; Liu et al.,

2009; Milyavsky et al., 2010). Une réponse p53-dépendante lors de l'accumulation de dommages de l'ADN est impliquée dans le vieillissement des CSH au cours de la vie aussi bien dans les conditions physiologiques que dans le cas de souris déficientes pour les voies de réparation de l'ADN (Blanpain et al., 2011; Niedernhofer, 2008; Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007). Une détérioration de ces mécanismes de contrôle sont responsables d'une instabilité génétique, d'une insuffisance médullaire progressive et du développement d'hémopathies malignes (Niedernhofer, 2008).

Chez l'homme, l'anémie de Fanconi (AF) est une pathologie causée par des mutations bialléliques dans l'un des 15 gènes FANC, dont les produits participent à la voie Fanconi/BRCA (Moldovan and D'Andrea, 2009). Cette voie intervient lors de la réparation des dommages à l'ADN induits au cours d'un stress répliatif pour maintenir l'intégrité du génome. Les fonctions biochimiques précises de la voie Fanconi/BRCA ne sont pas claires, mais il existe des preuves substantielles qu'elle favorise la recombinaison homologue. Les patients AF ont un risque tumoral élevé et développent progressivement une aplasie médullaire (Kutler et al., 2003). Il a été montré récemment que les CSH de patients AF s'épuisent en raison d'une activation prolongée de p53 et de p21 en réponse au stress répliatif et l'accumulation des dommages de l'ADN, ceci étant à l'origine d'un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. L'inactivation de p53 dans des cellules murines AF restaure la capacité proliférative. Ces résultats mettent en évidence le rôle de l'accumulation de lésions de l'ADN spontanées constitutif à un défaut de réparation de l'ADN comme un mécanisme central de l'aplasie médullaire chez les patients AF (Ceccaldi et al., 2012). Il semble que la fréquence des cassures spontanées de l'ADN soit augmentée dans les CSH quand celles-ci sortent de leur état quiescent en réponse à un stress, par exemple une infection ou une hémorragie chronique (Walter et al., 2015).

Les facteurs impliqués lors de la recombinaison homologue pourraient également avoir un rôle non négligeable lors du développement des lymphocytes. La protéine Bca1 est fortement exprimée dans la lignée T. Une inactivation conditionnelle de Bca1 dans les LT de souris provoque un défaut de développement thymique. Les thymocytes expriment alors excessivement p53 et l'on observe une augmentation de l'instabilité chromosomique ainsi qu'une forte mortalité cellulaire. L'association du déficit en Bca1 avec une inactivation de p53 restaure le phénotype en ce qui concerne le développement des thymocytes mais pas des LT en périphérie. Par conséquent, un déficit en Bca1 induit chez la souris un défaut de développement des LT non pas en raison d'un défaut de recombinaison V(D)J mais à cause d'une augmentation de l'apoptose des thymocytes et d'un défaut de prolifération des lymphocytes T en périphérie (Mak et al., 2000).

2) Stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un excès d'espèces actives de l'oxygène (ROS « Reactive Oxygen Species ») ou d'espèces réactives de l'azote (RNS « Reactive Nitrogen Species ») qui sont générées par différents mécanismes, en particulier par le métabolisme intrinsèque des cellules et l'exposition à des agents exogènes. Les ROS et RNS sont des agents chimiques puissants qui ont un rôle physiologique important, leur action peut être bénéfique ou délétère pour les cellules en fonction du contexte. Les ROS sont directement responsables de l'oxydation de protéines, de l'ADN et de lipides ce qui peut causer des dommages tissulaires. Le stress oxydatif est également impliqué dans certaines pathologies inflammatoires. La mitochondrie est l'organite principal à l'origine de la production de ROS qui sont formés dans les conditions physiologiques lors de la production d'ATP par la chaîne respiratoire. Un excès de ROS active la voie NF- κ B entraînant une augmentation de l'expression de certaines cytokines, chimiokines et autres molécules de l'inflammation. Le stress oxydatif a un rôle majeur durant la réponse immunitaire contre un agent infectieux. Les cellules activées de l'immunité innée vont en effet produire des ROS toxiques pour ces microorganismes suite à l'activation des enzymes NADPH-oxydase et myeloperoxydase. Cependant un stress oxydatif trop important durant ces phases de réponse immunitaire peut entraîner une inflammation chronique comme dans le cas de l'infection au VHC par exemple qui provoque à terme une cirrhose puis un cancer du foie.

L'excès de ROS est également particulièrement toxique pour l'ADN et peut être directement impliqué dans la mort cellulaire. Les lésions de l'ADN induites sont l'oxydation des bases comme le 8-oxoguanine (8-oxoG), le 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-G), 2-hydroxyadenine, hydroxycytosine, les sites abasiques ou encore les cassures doubles brins ou simples brins. Ces lésions peuvent entraîner l'apparition de mutation de l'ADN potentiellement responsables d'une transformation tumorale, de neuro-dégénération ou d'athérosclérose. Les voies de réponses aux dommages de l'ADN sont alors sollicitées pour répondre à ces lésions de l'ADN avec une activation des protéines ATM, p53 et de la voie NF- κ B (pour revue Fontes et al., 2015). Il est probable que le stress oxydatif participe au vieillissement des cellules du système immunitaire, il est par conséquent essentiel pour ces cellules de pouvoir se protéger contre ces agents potentiellement toxiques afin de garantir l'homéostasie du système immunitaire. Il a notamment été décrit un rôle du facteur ATM dans la capacité d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques lié à la production de ROS (Ito et al., 2004). Des souris *Atm*^{-/-} présentent en effet dès 24h de vie une insuffisance médullaire progressive résultant d'un déficit dans la fonction des CSH qui est associé à un excès de ROS. Un traitement par des agents anti-oxydants restaure la capacité de reconstitution du compartiment hématopoïétique par ces CSH permettant ainsi de prévenir l'insuffisance médullaire. Les ROS auraient également un rôle dans l'épuisement des CSH des patients AF (Zhang et al., 2007).

3) Cassures d'origine exogène

De nombreuses molécules chimiquement actives peuvent réagir avec les nucléotides de manière semblable aux métabolites cellulaires et occasionner des lésions de l'ADN. Certaines molécules libèrent de façon directe ou indirecte, quand elles sont métabolisées, des ROS entraînant des dommages tels que décrits précédemment.

Il existe également des drogues génotoxiques directement toxiques pour l'ADN. Ces drogues peuvent être utilisées dans les chimiothérapies anti-cancéreuses dans le but de tuer les cellules tumorales à fort index prolifératif. Ce sont par exemple les agents alkylants comme le cisplatine qui lient un groupement alkyle sur une base purique modifiant la conformation de l'hélice. La mitomycine C (MMC) et le diepoxybutane sont des agents pontant créant des ponts inter-brins responsables de l'apparition d'une cassure double-brin lors de la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase (etoposide, doxorubicine, camptotecine) inhibent les enzymes nécessaires au déroulement de la double hélice lors de la réplication et par conséquent sont à l'origine d'effondrement de la fourche de réplication et de cassure double brin.

Les rayonnements UV émis par le soleil sont à l'origine de deux types de lésions par réaction photochimique au niveau de pyrimidines adjacentes, les dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) et les photoproduits pyrimidine(6-4) pyrimidone (64PPs). Les CPD sont facilement désaminés, provoquant la transformation de cytosines en uracile, mutation spécifique provoquée par les rayons UV (Ikehata and Ono, 2011).

Enfin, les rayonnements ionisants (IR) provoquent des dommages directs, en particulier des cassures double brin mais également des lésions de nucléotides et des ponts inter-brins.

Tous ces agents exogènes agissent à bas bruit en permanence sur nos organismes, rayons UV du soleil, rayonnements cosmiques, pesticides dans l'alimentation... Les systèmes de réparation de l'ADN sont là pour garantir l'intégrité du génome face à ces agressions. Les traitements anticancéreux (chimiothérapie et radiothérapie) sont eux bien plus agressifs et provoquent de nombreux effets indésirables imputables à cette action génotoxique. Les cellules les plus fragiles sont celles qui connaissent une prolifération importante et en particulier les cellules de la moelle osseuse. Ainsi l'insuffisance médullaire est un événement relativement fréquent au cours d'un traitement anticancéreux. Par ailleurs, chez les patients atteints d'un déficit de la réparation de l'ADN, le risque de réaction anormalement excessive à ces traitements est réel, d'où l'importance de pouvoir les dépister facilement.

4. Défaut de la réparation de l'ADN et déficit immunitaire

Les systèmes de réparation de l'ADN sont donc essentiels pour le développement du système immunitaire et également pour garantir son homéostasie. Il existe chez l'homme un certain nombre de déficits constitutionnels dans des voies de réparation de l'ADN qui ont une incidence sur le système immunitaire, provoquant déficits immunitaires plus ou moins sévères, parfois associés à d'autres manifestations comme l'auto-immunité, le risque de développement tumoral ou encore des anomalies du développement. Ces pathologies sont toutes rares, certaines sont décrites depuis de nombreuses années et d'autres sont de découverte plus récente. Nous allons passer en revue certains de ces déficits.

A. Déficits immunitaires associés à un défaut de contrôle du cycle cellulaire après dommage de l'ADN

1) L'ataxie-télangiectasie

L'ataxie-télangiectasie (AT) a été décrite dans les années 50, comme l'association d'une ataxie cérébelleuse progressive, les télangiectasies oculaires et des affections pulmonaires (Boder and Sedgwick, 1958). Cette affection s'accompagne également d'un déficit humoral, d'une hypoplasie thymique, de radiosensibilité et d'une susceptibilité accrue au développement de tumeurs (Peterson et al., 1964). Cette maladie est la conséquence de mutations perte de fonction dans le gène ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) de transmission autosomique récessive à pénétrance complète. Cette affection est rare, l'incidence est estimée à un cas pour 40 000 à 100 000 naissances (Swift et al., 1986; Woods and Taylor, 1992). La protéine ATM appartient à la famille protéique des phosphatidylinositol-3-kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, le transport protéique intracellulaire et la réponse aux dommages de l'ADN (Lavin et al., 1995). Cette famille protéique inclus ATM, ATR, DNA-PKcs, mTOR et ATX/hSMG-1. ATM est une grosse protéine de 350 kDa avec une activité Ser/Thr kinase qui est activée lors de la survenue de dommage de l'ADN. Le rôle d'ATM au cours de la réparation de l'ADN a été vu précédemment.

A l'exception d'une mutation fondatrice retrouvée dans la population juive marocaine, la majorité des mutations identifiées dans ce gène sont des mutations uniques. Plus de 80% de ces mutations sont prédites pour générer une protéine tronquée et par conséquent instable. Il existe également quelques mutations avec effet dominant négatif dans le domaine kinase (Chun and Gatti, 2004).

Les cellules des patients atteints d'AT ont une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et aux drogues radiomimétiques (Cornforth and Bedford, 1985), c'est pourquoi ces patients

sont à très haut risque de réponse excessive à la radiothérapie. Cette radiosensibilité est associée à un léger défaut de la réparation des cassures de l'ADN et une augmentation des réarrangements chromosomiques en particulier au niveau des loci des gènes codant pour les Ig et les TCR dans les lymphocytes. La protéine ATM pourrait avoir un rôle de « sensor » durant la recombinaison V(D)J (Perkins et al., 2002). Un défaut d'ATM entraîne une incapacité pour la cellule d'activer ces checkpoints G1/S et G2/M après lésion de l'ADN (Beamish and Lavin, 1994). Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des manifestations cliniques dans cette pathologie sont peu clairs. Il semblerait que ce soit lié à une érosion accélérée des télomères (Qi et al., 2003).

2) Syndrome de Nijmegen

Le syndrome de Nijmegen (NBS pour « Nijmegen Breakage Syndrome ») est également une maladie rare qui se caractérise par une microcéphalie, une dysmorphie faciale, un retard de croissance, un déficit immunitaire et un risque important de développement d'hémopathie maligne. Elle a été décrite pour la première fois en 1981 (Weemaes et al., 1981) et elle a une incidence plus élevée dans les populations slaves d'Europe centrale et orientale par effet fondateur.

Le syndrome est dû à des mutations du gène *NBS1*, codant pour la nibrine (Carney et al., 1998; Matsuura et al., 1998; Varon et al., 1998). Plus de 90% des malades sont porteurs de la mutation fondatrice slave, une délétion de 5 paires de bases, entraînant la production de protéines tronquées partiellement fonctionnelles. NBS1 est l'une des protéines du complexe MRN dont la fonction est de détecter et de se lier aux cassures doubles brins. NBS1 a trois domaines fonctionnels, un domaine en N-terminal permettant les interactions protéine-protéine, un domaine d'interaction avec ATM et un domaine d'interaction avec MRE11.

Les cellules des patients NBS ont des caractéristiques proches de celles des patients AT, notamment l'instabilité chromosomique (spontanée et induite), l'hypersensibilité cellulaire aux radiations ionisantes *in vitro* et défaut de contrôle du cycle cellulaire (Featherstone and Jackson, 1998). Comme pour les AT, le diagnostic précoce est essentiel pour prévenir les infections sévères et l'exposition dangereuse aux radiations ionisantes.

B. Déficiences immunitaires liées à une anomalie de réparation des blocages de la fourche de réplication

1) Syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom a été décrit pour la première fois en 1954 par David Bloom (Bloom, 1954). Il s'agit d'un syndrome rare, qui se caractérise par un retard de croissance intra-utérin et post-natal sévère, des érythèmes survenant lors d'une exposition au soleil ainsi que des infections respiratoires et ORL fréquentes. Le risque de développer un cancer de tout type est particulièrement élevé. Une caractéristique de cette maladie est la formation importante d'échange de chromatides sœurs que l'on observe dans les caryotypes de ces patients (German, 1993).

Une mutation homozygote dans le gène *BLM* est responsable de cette pathologie (Ellis et al., 1995). *BLM* code pour une 3'-5' ADN hélicase de type RecQ et possède dans sa région centrale un domaine contenant sept motifs hélicase consensus très bien conservés. A ce jour, neuf mutations différentes du gène *BLM* ont été décrites dont quatre conduisent à la formation de protéines tronquées ne possédant plus de domaine hélicase consensus.

La fonction précise des hélicases RecQ est encore peu élucidée. *BLM* aurait un rôle important au niveau de la HR en facilitant la migration de branche au niveau des D-loop et des jonctions de Holliday (Bachrati et al., 2006; van Brabant et al., 2000; Karow et al., 2000), en éliminant les nucléofilaments de RAD51, par conversion des fourches de réplication bloquées en jonction de Holliday (Bugreev et al., 2007; Ralf et al., 2006) et enfin dans la résolution des jonctions de Holliday (Plank et al., 2006; Raynard et al., 2006; Wu and Hickson, 2003; Wu et al., 2006a).

Ainsi, l'inactivation de *BLM* entraîne dans les cellules en culture une accumulation de mutations, de remaniements géniques et chromosomiques dont les plus caractéristiques et spécifiques sont les échanges entre chromatides ((Hickson, 2003; Kitano, 2014).

2) Anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique à transmission autosomique récessive décrite en 1927 par Guido Fanconi (revue Soulier, 2011). C'est une maladie rare (1/360 000 naissances) avec présence d'un effet fondateur dans les populations juives ashkénazes (Whitney et al., 1993). Cliniquement, cette maladie se caractérise par l'apparition d'une insuffisance médullaire parfois chez des enfants très jeunes, des anomalies de développement notamment retard de croissance, anomalies de pigmentation de la peau ou malformations de la colonne du pouce et d'une forte prédisposition aux cancers, en particulier aux hémopathies malignes (leucémie aiguë myéloblastique et syndromes myélodysplasiques). Au niveau biologique, on retrouve une élévation de l'hémoglobine foetale et de l'alpha-foetoprotéine (α FP), ainsi qu'une macrocytose érythrocytaire. Les cellules de ces patients sont particulièrement sensibles aux agents pontants comme la MMC. Enfin le caryotype lymphocytaire de ces patients est caractéristique, avec la présence importante de cassures chromosomiques et d'images triradiales après traitement par les agents pontants (Schroeder

et al., 1964). Des mutations dans quinze gènes impliqués dans la voie Fanconi ont été identifiées. Cette voie comprend le complexe FANC « coeur » (FANC A, B, C, E, F, G, L, et M) qui permet l'ubiquitination de FANCD2 et FANCI lors de la détection de dommages de l'ADN. Un autre complexe (FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, FANCP/SLX4, FANCO/RAD51C) interagit avec l'hétérodimère FANCD2/FANCI en aval de l'ubiquitination. L'activation de la voie FANC se fait par les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) tels qu'ATR, CHK1 et ATM. Les gènes FANC semblent donc être des coordinateurs de la réparation (Moldovan and D'Andrea, 2009) avec un rôle majeur lors des dommages survenant au cours de la réplication de l'ADN (de Winter and Joenje, 2009).

C. Déficit immunitaire lié à un défaut de NHEJ, RS-SCID

Comme nous l'avons vu précédemment, la recombinaison V(D)J est indispensable au bon développement des LB et des LT. Un déficit dans certains facteurs du NHEJ entraîne donc une impossibilité pour les lymphocytes en développement d'accomplir la recombinaison V(D)J. Ainsi il existe certaines formes de déficit immunitaire profond avec une absence complète de LB et LT, dus à un déficit constitutionnel dans certains facteurs indispensables au NHEJ.

Ce sont les déficits immunitaires combinés sévères radiosensible (RS-DICS). En effet, toutes les cellules de ces patients sont également touchées par un défaut profond de réparation des cassures double brin ce qui les rends par conséquent particulièrement sensibles aux radiations ionisantes et drogues radiomimétiques.

1) Déficit en Artemis

L'identification du gène Artemis a été faite au sein de notre équipe au début des années 2000. Cette découverte a été faite suite à l'analyse de certains patients SCID T-B- dont les fibroblastes et les cellules de la moelle osseuse présentaient une sensibilité accrue aux IR (Cavazzana-Calvo et al., 1993; Nicolas et al., 1998), ce sont les premiers patients qualifiés de « RS-SCID ». Ces patients n'ont pas de mutation dans les gènes RAG1 et RAG2 et présentent un défaut de recombinaison V(D)J *in vitro* (Nicolas et al., 1998). L'analyse du génome des patients RS-SCID (Moshous et al., 2000) a permis l'identification du gène responsable de ce phénotype clinique, le gène Artémis (Moshous et al., 2001) et le défaut moléculaire a été complété par la forme sauvage du gène Artémis. La plupart des mutations sont situées dans le domaine catalytique et entraînent une perte totale de fonction de la protéine.

Des mutations hypomorphes ont également été trouvées chez des patients présentant un déficit immunitaire combinée (CID « Combined Immune Deficiency ») avec prédisposition au développement de lymphome (Moshous et al., 2003). Chez ces patients, les mutations se trouvent dans le dernier exon du gène et laissent le domaine catalytique intact permettant donc une activité résiduelle de la protéine. Ces patients avec mutation hypomorphe ont une lymphopénie B et T sévère avec hypogammaglobulinémie ainsi qu'une radiosensibilité des fibroblastes.

2) Déficiences en DNA-Ligase IV

Très peu de patients avec une mutation de la DNA-Ligase IV ont été décrits, et toutes les mutations identifiées sont hypomorphes. Le premier patient décrit ne présentait pas de déficit immunitaire mais succomba à la suite d'un traitement par radiothérapie au cours d'une leucémie. En raison de la radiosensibilité de ce patient, les gènes des facteurs du NHEJ ont été séquencés ce qui a permis d'identifier la mutation dans DNA Ligase IV (Riballo et al., 1999). Deux ans plus tard, une série de 4 patients fut rapportée avec un phénotype clinique légèrement différent, proche de celui des patients NBS, associant déficit immunitaire et anomalies du développement (microcéphalie, dysmorphie faciale) (O'Driscoll et al., 2001).

Le déficit immunitaire de ces patients est probablement dû à une maturation incomplète des LB et LT suite à une recombinaison V(D)J inefficace. Mais il est possible que ce soit également la conséquence d'un défaut de réparation des dommages de l'ADN survenant durant les phases de prolifération (Buck et al., 2006a), associé à une activation prolongée de p53. En effet, les souris KO pour DNA ligase IV meurent à l'état embryonnaire suite à une apoptose massive des neurones en développement (Frank et al., 1998) et l'on sait que les cellules du système nerveux en développement sont particulièrement sensibles à l'apoptose induite par les dommages de l'ADN non réparés (Abner and McKinnon, 2004).

3) Déficit en Cernunnos

Les patients atteints d'un déficit en Cernunnos présentent un tableau clinique similaire à celui des patients ayant une mutation hypomorphe de la DNA-Ligase IV : un RS-SCID avec microcéphalie et retard de croissance. Le déficit immunitaire est moins sévère que pour des patients mutés pour Artemis avec quelques LB et LT circulants résiduels, on retrouve parfois une auto-immunité et une hypogammaglobulinémie (Buck et al., 2006b). L'identification du gène responsable de ce RS-SCID a été faite par complémentation fonctionnelle de la radiosensibilité des fibroblastes de patients par une banque de cDNA (Buck et al., 2006b).

Les mutations décrites sont variables avec des mutations faux-sens, non-sens ou des délétions entraînant un décalage du cadre de lecture. L'analyse des fibroblastes dérivés des patients montrent des défauts de la recombinaison V(D)J in vitro ainsi qu'un défaut de réparation des cassures double brin les rendant sensibles au IR et aux drogues génotoxiques (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006b; Dai et al., 2003). Contrairement aux souris déficientes pour DNA ligase IV et XRCC4, les souris déficientes pour Cernunnos sont viables bien qu'elles présentent une instabilité génomique et des réarrangements chromosomiques spontanés (Zha et al., 2007). Par ailleurs, Cernunnos n'est pas indispensable au NHEJ mais son absence confère une diminution de la durée de vie des thymocytes (Riballo et al., 2009; Vera et al., 2013). Il semble donc que si le complexe DNA Ligase IV/XRCC4 est essentiel à la vie, Cernunnos n'est pas indispensable pour la survie et le développement embryonnaire aussi bien chez l'homme que chez la souris.

4) Déficit en DNA-PKcs

Le premier cas de mutation dans le gène *PRKDC* responsable d'un déficit en DNA-PKcs chez l'homme a été décrit en 2009 avec une présentation clinique proche des patients ayant un déficit en Artemis, c'est à dire un SCID sans autres anomalies associées (van der Burg et al., 2009). Une mutation faux-sens (L306R) dans le domaine FAT en C-terminal de la protéine a été identifiée conservant l'activité kinase de la protéine mais impactant l'activité de Artemis. Plus récemment, un cas de RS-SCID avec une mutation hétérozygote composite de DNA-PKcs a été rapporté (Woodbine et al., 2013). Ce patient montrait en plus du déficit immunitaire une dysmorphie faciale, un retard de croissance important et une microcéphalie. L'activité kinase résiduelle de la protéine était quasi nulle, l'une des mutations causant une protéine inactive et l'autre une diminution importante de son activité. Ce cas souligne le rôle

probablement très important de DNA-PKcs dans le développement neuronal chez l'homme. Deux cas de mutations dans *PRKDC* ont également été rapportés chez des patients présentant un déficit immunitaire associé à une auto-immunité (Mathieu et al., 2015) suggérant un rôle de DNA-PKcs dans la régulation de l'auto-immunité. D'autres mutations homozygotes dans ce gène ont été rapportées chez des enfants issus de familles consanguines irlandaises (Casey et al., 2012).

5) Déficit en XRCC4

Cinq études ont récemment rapporté chez 12 patients différents des mutations dans le gène *XRCC4* identifiées grâce aux nouvelles techniques de séquençage haut débit de l'exome (WES « Whole Exome Sequencing ») (Bee et al., 2015; de Bruin et al., 2015; Guo et al., 2015; Murray et al., 2015; Shaheen et al., 2014). Les symptômes cliniques principaux sont un nanisme microcéphalique primordial, une insuffisance gonadique, un syndrome métabolique précoce et des cardiomyopathies. Mais de manière surprenante, aucun déficit immunitaire n'a été décrit chez ces patients. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le développement lymphocytaire normal de ces patients (de Villartay, 2015). Une première hypothèse est celle de mutations hypomorphes de *XRCC4* laissant une activité suffisante pour permettre la recombinaison V(D)J. Cependant, si l'on compare aux cas des mutations de DNA Ligase IV où les mutations hypomorphes induisent tout de même un défaut de développement lymphocytaire, cette hypothèse semble peu probable (Murray et al., 2014). Une seconde hypothèse est la présence d'un ou plusieurs facteurs ayant une activité redondante à *XRCC4* lors de la recombinaison V(D)J. Etant donné que *XRCC4* appartient à la même famille protéique que Cernunnos et qu'un nouveau facteur récemment identifié, PAXX (Ochi et al., 2015; Xing et al., 2015), semble avoir une activité redondante à Cernunnos, on peut imaginer également une redondance avec *XRCC4*. La dernière hypothèse serait une activité de *XRCC4* limitée à la stabilisation de DNA Ligase IV dans la recombinaison V(D)J alors son activité serait bien plus nécessaire dans d'autres situations, par exemple pour la réparation des lésions de l'ADN au cours du développement neuronal. Comme Ligase IV, la souris *XRCC4* KO est létale à l'état embryonnaire mais il n'est pas exclu que ce phénotype soit causé par l'instabilité constante de Ligase IV, *XRCC4* est en effet essentiel à la stabilisation de Ligase IV (Ropars et al., 2011).

D. Cas des déficits immunitaires communs variables (DICV)

Les déficits immunitaires communs variables (DICV) sont des maladies du système immunitaire caractérisées par une hypogammaglobulinémie à l'origine d'une susceptibilité accrue aux infections bactériennes. La prévalence des DICV est estimée entre 1/25.000 et 1/50.000 touchant autant les hommes que les femmes. La maladie se déclare le plus souvent au début de l'âge adulte avec parfois un retard de diagnostic. Elle se manifeste généralement par des infections ORL et pulmonaires à répétition avec un risque important de pneumopathie chronique. Dans 28% des cas sont associés des manifestations auto-immunes, purpura thrombopénique idiopathique (PTI) et/ou anémie hémolytique auto-immune (AHAI) essentiellement, dans 8% des cas on retrouve un lymphome et dans 7% des cas un autre type de cancer. Le traitement repose essentiellement sur la substitution en immunoglobulines humaines polyvalentes, par voie intraveineuse ou sous-cutanée et sur une antibiothérapie ciblée. Une prise en charge spécifique doit être mise en place en cas de maladies auto-immunes ou malignes (Resnick et al., 2012).

Les DICV sont donc un ensemble de déficits immunitaires hétérogènes sur le plan clinique, la majorité des cas de DICV sont sporadiques et leur origine n'est pas connue (Liadaki et al., 2013; Ochs, 2014). Il arrive que plusieurs membres d'une même famille soient atteints par un DICV, renforçant l'hypothèse d'une origine génétique dans certains cas (Vorechovský et al., 1995) et la consanguinité parentale aggrave le phénotype (Rivoisy et al., 2012).

Dans environ 10% des cas une mutation perte de fonction dans un facteur intervenant au cours de la différenciation des LB est identifiée. Des mutations faux-sens dans le gène codant pour le facteur TACI de la famille des récepteurs au TNF et intervenant lors du CSR ont par exemple été retrouvées chez des patients non apparentés présentant un DICV ou un déficit isolé en IgA (Castigli et al., 2005; Salzer et al., 2005). Des mutations dans le gène codant pour ICOS (« inducible costimulator on activated T cell »), facteur intervenant lors de l'activation T dépendante des LB ont également été retrouvés (Grimbacher et al., 2003) ainsi que des mutations dans le récepteur BAFF-R (Warnatz et al., 2009), le CD19 (van Zelm et al., 2006) ou encore le CD20 (Kuijpers et al., 2010).

Plus récemment, des mutations autosomiques dominantes dans *NF-κB2* (Chen et al., 2013) qui intervient dans la voie non-canonique de NF-κB et dans *PIK3CD* (Angulo et al., 2013; Lucas et al., 2014) et *PIK3RI* (Deau et al., 2014) qui codent pour des sous-unités de la PI-3 kinase (Vanhaesebroeck et al., 2010) ont été identifiées.

Enfin, des mutations hétérozygotes dans *CTLA4* peuvent causer un syndrome « DICV-like » avec hypogammaglobulinémie, déficit progressif en LB, lymphoprolifération cérébrale, pulmonaire et digestive (Kuehn et al., 2014).

Nous avons vu que les systèmes de réparation de l'ADN sont nécessaires pour le bon déroulement du CSR et des SHM. Il est donc légitime de penser que certains DICV pourraient

être dus à un déficit dans l'un de ces systèmes de réparation. Plusieurs études récentes ont ainsi mis en évidence chez des patients atteints de DICV des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Par exemple, des polymorphismes non-synonymes ont été identifiés au niveau du gène *MSH5* chez des patients atteints de DICV et de déficit en IgA (Sekine et al., 2007). Ce gène code pour une protéine formant un hétérodimère avec *MSH4*, toutes deux sont des protéines du MMR (Clark et al., 2013). Cet hétérodimère a un rôle essentiel au cours de la recombinaison homologue lors de la méiose et également au cours du CSR (Snowden et al., 2004). Il a en effet été montré dans des modèles murins déficients pour l'un ou l'autre de ces facteurs, un déficit profond en IgG3 ainsi que des anomalies de la jonction avec la présence de régions de microhomologie. Chez les patients présentant des polymorphismes du gène *MSH5*, le séquençage des jonctions des Ig montre une augmentation des régions de microhomologies, similaire à ce qui a été trouvé chez la souris. Il semble donc que le complexe *MSH4/5* promeut au cours du CSR la résolution des cassures de l'ADN par le NHEJ en diminuant les régions de microhomologie (Sekine et al., 2007).

En partant de l'hypothèse qu'un défaut de réparation de l'ADN puisse être responsable d'un défaut de CSR et par conséquent d'un DICV et/ou déficit en IgA, une étude a évalué 27 gènes candidats impliqués dans le métabolisme de l'ADN (Offer et al., 2010). Des mutations dans les gènes *MLH1*, *RAD50* et *NBS1* ont été identifiées chez 4 des 96 patients étudiés. Un patient atteint de déficit en IgA (*IgAD*) était porteur de trois mutations dans les gènes *MSH2*, *MLH1* et *NSB1*. Un second patient *IgAD* était porteur de deux mutations hétérozygotes composites dans *RAD50*. Enfin, deux nouveaux SNP ont été identifiés dans la région 3'UTR de *MRE11*. Les auteurs ont également montré que les cellules immortalisées portant une des mutations identifiées dans *RAD50* sont particulièrement sensibles aux radiations ionisantes. De façon plus générale, cette étude montre que des variants génétiques dans des gènes associés au MMR ou à la signalisation des dommages de l'ADN sont associés à certains DICV.

Objectifs

Les vertébrés ont un système immunitaire adaptatif particulièrement sophistiqué dont le développement nécessite certains mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier lors de la recombinaison V(D)J et lors du CSR. Par ailleurs, le système hématopoïétique est par sa nature très sensible aux lésions spontanées de l'ADN. Comme nous l'avons vu, il existe chez l'homme de nombreux déficits immunitaires directement liés à un défaut de réparation de l'ADN. Ces pathologies sont toutes rares et le diagnostic génétique n'est pas toujours aisé, en effet pour un même gène muté, la présentation clinique peut être variable d'un patient à l'autre, et à l'inverse certaines pathologies d'origine génétique différente ont des présentations cliniques similaires, enfin le déficit immunitaire est d'intensité variable, parfois même absent. L'identification du gène responsable est importante pour un conseil génétique familial approprié et pour la prise en charge médicale, en particulier s'il existe un risque de radiosensibilité. Nous avons accès aujourd'hui à de puissants outils de dépistage génétique grâce au séquençage à haut débit et la liste des gènes responsables d'un déficit immunitaire s'allonge plus en plus en rapidement (Al-Herz et al., 2014).

L'objectif de ce travail est la mise au point et l'évaluation d'outils de dépistage de défaut de la réparation de l'ADN responsables de déficit immunitaire et l'exploration fonctionnelle de nouvelles mutations génétiques identifiées.

La première partie de ce travail concerne la mise au point d'un nouvel outil de dépistage rapide des déficits de la réparation de l'ADN, en particulier dans le cas de déficit immunitaires, et d'évaluer son intérêt clinique.

Par ailleurs, nous avons établi en collaboration avec le service d'Immunologie Clinique de l'hôpital Saint-Louis une cohorte de patients atteints de DICV chez qui l'on suspecte fortement un défaut de réparation de l'ADN. Une série de test de dépistages de déficit de la réparation de l'ADN et un séquençage complet de l'exome ont été fait de manière systématique chez ces patients afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les DICV.

Pour finir, nous avons étudié deux mutations identifiées chez une jeune patiente atteinte de CID associé à une lymphoprolifération et une auto-immunité et chez qui une hypersensibilité à la MMC a été détecté au niveau cellulaire. La première mutation se situe dans un gène impliqué dans la réparation de l'ADN, la deuxième dans un gène impliqué dans le développement du système immunitaire. Ce travail porte sur l'exploration fonctionnelle de ces deux mutations tant au niveau de la réparation de l'ADN que du développement du système immunitaire.

Partie 1: Mise au point d'un nouveau test de dépistage

Nous avons vu dans l'introduction la particularité du locus du TCR α qui subit plusieurs vagues de réarrangements, d'abord sur les segments Valpha et Jalpha proximaux, puis sur les segments plus distaux, et qu'une survie suffisante des thymocytes DP est nécessaire pour permettre les réarrangements les plus distaux. Une étude récente de notre équipe a mis en évidence un biais de répertoire du TCR α chez les souris déficientes pour Cernunnos et chez un patient porteur d'une mutation homozygote de ce même gène (Vera et al., 2013). Suite à cette observation, nous avons voulu confirmer qu'un défaut de réparation de l'ADN entraîne bien une survie diminuée des thymocytes qui peut être détectée par l'observation d'un biais de répertoire sur les LT en périphérie. Nous avons donc développé un test d'analyse du répertoire du TCR α et évalué l'intérêt de ce test dans le dépistage des déficits immunitaires liés à un défaut de réparation de l'ADN.

1. Résultats

A. Résultats obtenus par biologie moléculaire

L'analyse du répertoire Valpha-Jalpa a été mise au point par une technique de biologie moléculaire : une 5'RACE PCR suivi de séquençage haut débit, chez quelques contrôles et patients dont le diagnostic est connu.

1) Principe de la technique

La technique de 5'RACE-PCR permet d'amplifier des ADN complémentaires (cDNA) à l'aide d'une amorce universelle en 5' de la séquence à amplifier (SMARTer IIA), ajoutée au cours de l'étape de reverse transcription. Cette technique permet donc d'amplifier, à partir de cDNA, les parties variables (Valpha-Jalpa) du récepteur TCR α avec un seul couple d'amorce : l'amorce sens sur l'amorce universelle ajoutée en 5' et l'amorce anti-sens sur la partie constante du TCR α . Les produits de PCR sont ensuite séquencés par séquençage haut débit (NGS) pour obtenir la séquence de produits uniques. La technique de 5'RACE-PCR est schématisée sur la figure 15.

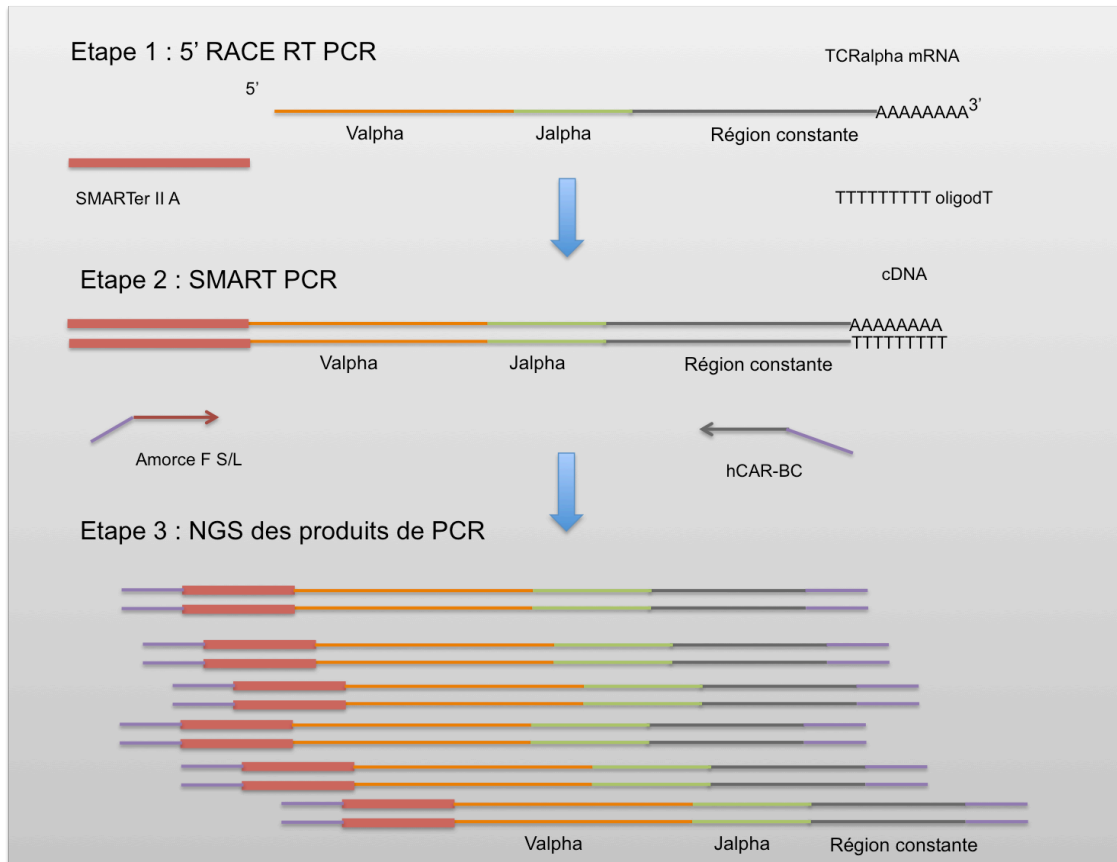


Figure 15 Représentation schématique de la 5'RACE-PCR

La première étape de reverse transcription permet d'ajouter en 5' du cDNA un oligonucléotide SMARTerIIA (SM2A). Au cours de la deuxième étape, l'amplification des cDNA du TCR α se fait à l'aide d'amorces universelles, amorce sens sur le SM2A (en rouge) et anti-sens sur la région constante (en gris), éventuellement associées à des adaptateurs et barre-code pour le séquençage haut-débit. Enfin dans la troisième étape, les produits de PCR sont séquencés après purification, grâce à une plateforme de séquençage haut-débit ou dans certains cas par sous-clonage dans un vecteur.

2) Résultats

Les résultats sont représentés par un nuage de point en 2 dimensions, avec les segments Valpha (TRAV) en ordonnées et Jalpha (TRAJ) en abscisses (figure 16). Les couples de segment Valpha/Jalpa distaux d'une part (valeurs hautes) et proximaux d'autre part (valeurs basses) sont sélectionnés par une fenêtre, ces pourcentages ont ensuite été reportés sur un histogramme (figure 17).

Pour les deux contrôles représentés, les taux de segments Valpha-Jalpa proximaux sont de 11,4 et 13,9% et les taux de segments distaux sont de 10,1 et 18,1%. Dans le cas des deux patients ATM^{-/-}, les taux de segments proximaux sont légèrement plus élevés que chez les contrôles (14,9 et 15,1%) avec des taux de segments distaux plus faibles (3,68 et 8,9%) suggérant un biais d'utilisation en faveur des segments les plus proximaux. Ce biais est bien plus marqué dans le cas des patients atteints d'un déficit dans l'un des facteurs du NHEJ. Pour le patient Cernunnos^{-/-} par exemple, le taux de segments distaux est quasi nul (0,366%) alors que le taux de segments proximaux est très élevé (44,7%), on retrouve un résultat similaire pour le patient Ligase IV^{-/-} (2,82% et 41,6% respectivement).

Ces résultats confirment que certains défauts de la réparation de l'ADN (déficit en ATM ou en NHEJ) induisent un biais dans l'utilisation du répertoire Valpha-Jalpa en faveur des segments les plus proximaux. Ce biais est la conséquence d'une durée de vie limitée des thymocytes causée par le déficit en réparation de l'ADN.

Cette technique de biologie moléculaire, bien que très simple dans sa mise en place, est délicate car dépendante de la qualité des ARN et donc des échantillons et elle est également très coûteuse. Nous avons en parallèle mis au point une technique d'identification de ce biais de répertoire par cytométrie en flux, plus robuste et moins onéreuse.

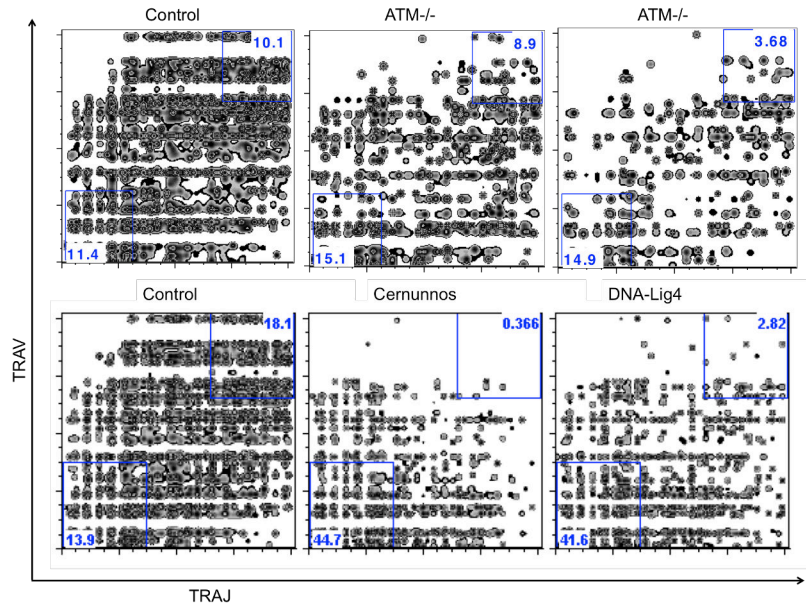


Figure 16 Résultats obtenus par biologie moléculaire : utilisation des segments Valpha (TRAV) et Jalpha (TRAJ)

Le nuage de point représente les segments Jalpha (TRAJ) en abscisses et Valpha (TRAV) en ordonnées, plus les segments sont proximaux, plus ils sont à l'origine des axes. Deux contrôles, deux patients ATM^{-/-}, un patient Cernunnos^{-/-} et un patient DNA-Ligase IV^{-/-} ont été analysés. Les fenêtres sélectionnant les couples de segments proximaux et distaux sont déterminées de manière arbitraire et identique pour chaque échantillon.

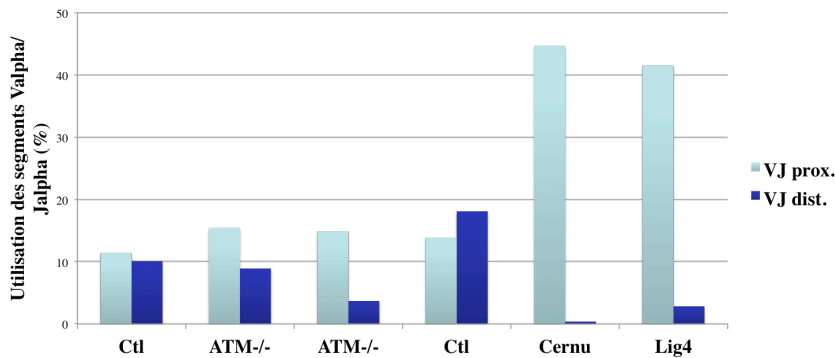


Figure 17 Résultats obtenus par biologie moléculaire

Le pourcentage de couples Valpha/Jalproximal (bleu clair) et Valpha/Jalproximal (bleu foncé) déterminé sur le nuage de point est représenté en histogramme. On note une augmentation très importante d'utilisation des segments proximaux chez les patients déficients en NHEJ (Cernunnos et Ligase IV) au détriment des segments distaux. Pour les patients ATM^{-/-}, on note également une augmentation d'utilisation des segments proximaux et une diminution d'utilisation des segments distaux, cependant moins marqué que chez les patients NHEJ.

B. Mise au point d'une technique par cytométrie en flux

1) Vérification de la spécificité des anticorps utilisés en cytométrie en flux

Pour mettre au point la technique de cytométrie en flux, nous avons dans un premier temps validé la spécificité des anticorps anti-Valpha disponibles sur le marché (Valpha2, Valpha7.2, Valpha12.1 et Valpha24). Pour cela, nous avons trié les sous-populations lymphocytaires grâce aux différents anticorps anti-Valpha puis séquencé les séquences Valpha/Jalpa des ARNm des lymphocytes triés grâce à une 5'RACE-PCR. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 1. Le séquençage après tri cellulaire des différentes sous-populations montre que les anticorps Valpha7.2, Valpha12.1 et Valpha24 sont suffisamment spécifiques avec respectivement 100%, 73% et 84% de séquences correspondant au segment attendu. En revanche l'anticorps anti-Valpha2 n'est pas spécifique et ne sera donc pas utilisé dans ce test. Le Valpha7.2 est le segment le plus distal du locus TCR α , Valpha24 est également distal et Valpha12.1 est médian (voir figure 18).

Tableau 1 Séquences Valpha-Jalpa obtenues après tri cellulaire

Selon la nomenclature (<http://www.imgt.org/>), Valpha2 = TRAV12-1, Valpha7.2 = TRAV1-2, Valpha12.1 = TRAV19, Valpha24 = TRAV10.

Valpha2	Valpha7.2	Va12.1	Valpha24
27 séquences analysables	30 séquences analysables	24 séquences analysables	25 séquences analysables
24 séquences productives	8 séquences productives	11 séquences productives	19 séquences productives
TRAV12-1 TRAJ49	TRAV1-2 TRAJ11	TRAV19 TRAJ10	TRAV10 TRAJ10
TRAV12.1 TRAJ49	TRAV1-2 TRAJ33	TRAV19 TRAJ18	TRAV10 TRAJ15
TRAV13-1 TRAJ4	TRAV1-2 TRAJ34	TRAV19 TRAJ18	TRAV10 TRAJ17
TRAV13-1 TRAJ8	TRAV1-2 TRAJ34	TRAV19 TRAJ26	TRAV10 TRAJ18
TRAV13-2 TRAJ15	TRAV1-2 TRAJ42	TRAV19 TRAJ34	TRAV10 TRAJ18
TRAV13-2 TRAJ39	TRAV1-2 TRAJ11	TRAV19 TRAJ47	TRAV10 TRAJ18
TRAV19 TRAJ20	TRAV1-2 TRAJ11	TRAV19 TRAJ6	TRAV10 TRAJ20
TRAV21 TRAJ37	TRAV1-2 TRAJ11	TRAV19 TRAJ9	TRAV10 TRAJ30
TRAV21 TRAJ45		TRAV9 TRAJ52	TRAV10 TRAJ4
TRAV25.01 TRAJ44		TRAV12-1 TRAJ43	TRAV10 TRAJ4
TRAV29/DV5 TRAJ20		TRAV12-1 TRAJ43	TRAV10 TRAJ4
TRAV29/DV5 TRAJ49			TRAV10 TRAJ4
TRAV8-1 TRAJ21			TRAV10 TRAJ30
TRAV8-2 TRAJ8			TRAV10 TRAJ18
TRAV8-3 TRAJ54			TRAV10 TRAJ17
TRAV8-4 TRAJ13			TRAV10 TRAJ17
TRAV8-4 TRAJ13			TRAV13-2 TRAJ49
TRAV9-2 TRAJ44			TRAV13-2 TRAJ52
TRDV1 TRAJ58			TRAV13-2 TRAJ49
TRAV9-2 TRAJ44			
TRAV29/DV5 TRAJ49			
TRAV29/DV5 TRAJ20			
TRAV21 TRAJ45			
TRAV21 TRAJ37			

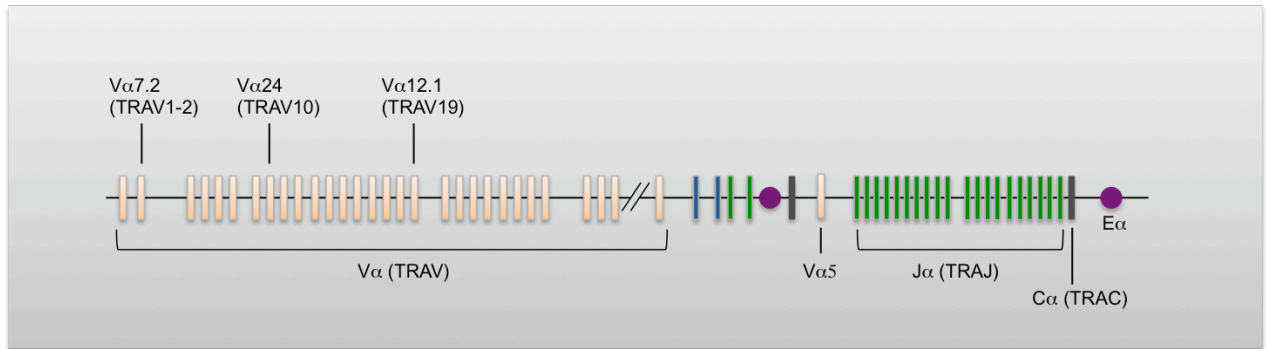


Figure 18 Représentation du locus TCR α

La position relative des trois anticorps anti-Valpha validés pour cette technique est représentée sur ce schéma. Le Valpha7.2 est l'un des segments les plus distaux, suivi du Valpha24, le Valpha12.1 est médian.

2) Résultats obtenus par cytométrie en flux

Nous avons ensuite testé ce panel d'anticorps en cytométrie en flux, pour évaluer s'il permet de détecter des biais d'utilisation du répertoire Valpha sur les LT naïfs et/ou mémoires selon la stratégie de marquage en figure 19.

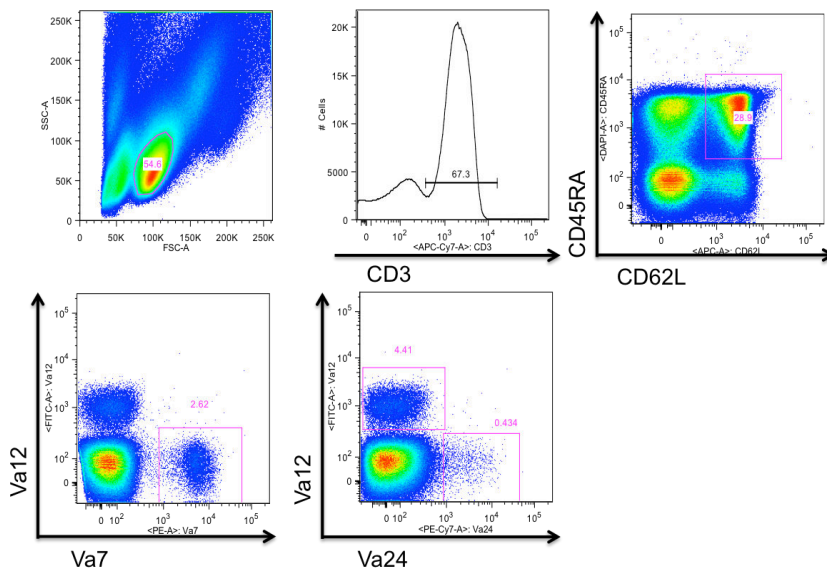


Figure 19 Stratégie d'analyse en cytométrie en flux

Les lymphocytes sont sélectionnés sur le nuage de point en SSC/FSC, les LT sont sélectionnés grâce au marqueur CD3, puis les LT naïfs doubles positifs CD45RA/CD62L. Le pourcentage d'utilisation des différents segments Valpha est établi parmi les LT naïfs et/ou totaux.

a) Résultats chez les contrôles pédiatriques et adultes

Le pourcentage d'utilisation des segments Valpha7.2, Valpha24 et Valpha12.1 parmi les LT totaux et naïfs a été évalué sur un panel de PBL de contrôles sains pédiatriques et adultes. Il n'a pas été observé de variation en fonction de l'âge (figure 20).

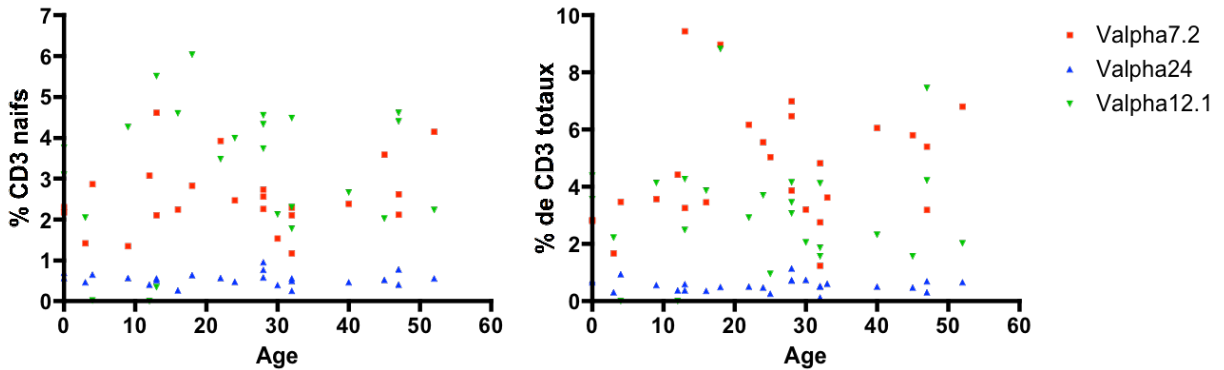


Figure 20 Utilisation des différents segments Valpha analysés par cytométrie en flux en fonction de l'âge

A gauche, pourcentage d'utilisation des segments Valpha7.2 (rouge), Valpha24 (bleu) et Valpha12.1 (vert) parmi les LT naïfs en fonction de l'âge, à droite, pourcentage d'utilisation parmi les LT totaux. On n'observe pas de différence d'utilisation en fonction de l'âge.

b) Résultats chez les patients atteints d'ataxie-télangiectasie

Pour évaluer la pertinence de ce marqueur pour le dépistage de maladies de la réparation, nous avons évalué ces paramètres au sein d'une cohorte de patients atteints d'ataxie-télangiectasie adultes et pédiatriques. Nous avons également évalué, dans certains cas, les parents des patients, hétérozygotes pour la mutation dans le gène ATM (voir figure 21). Parmi les LT naïfs, on retrouve chez les individus contrôle un pourcentage moyen d'utilisation du Valpha7.2 de 2,49%, chez les individus ATM^{-/-} un pourcentage moyen de 0,90% et chez les individus ATM^{+/-} 2,52%. La différence est significative entre les patients ATM^{-/-} et les contrôles ($p < 0,0001$) et entre les patients et les individus hétérozygotes ($p < 0,0001$). Concernant les Valpha24, on retrouve une moyenne de 0,52% pour les contrôles, 0,24% pour les patients ATM^{-/-} et 0,75% pour les individus ATM^{+/-}. Comme pour le Valpha7.2, la différence est significative entre les patients ATM^{-/-} d'une part et les contrôles et ATM^{+/-} d'autre part. Par ailleurs, on note également une augmentation significative de l'utilisation du Valpha24 chez les individus ATM^{+/-} par rapport aux contrôles ($p = 0,0005$) pour laquelle nous n'avons pas d'explication pour le moment. Les résultats obtenus par l'analyse des LT CD3⁺ totaux sont totalement similaires. Il est donc possible d'analyser ces paramètres sur les deux types de population.

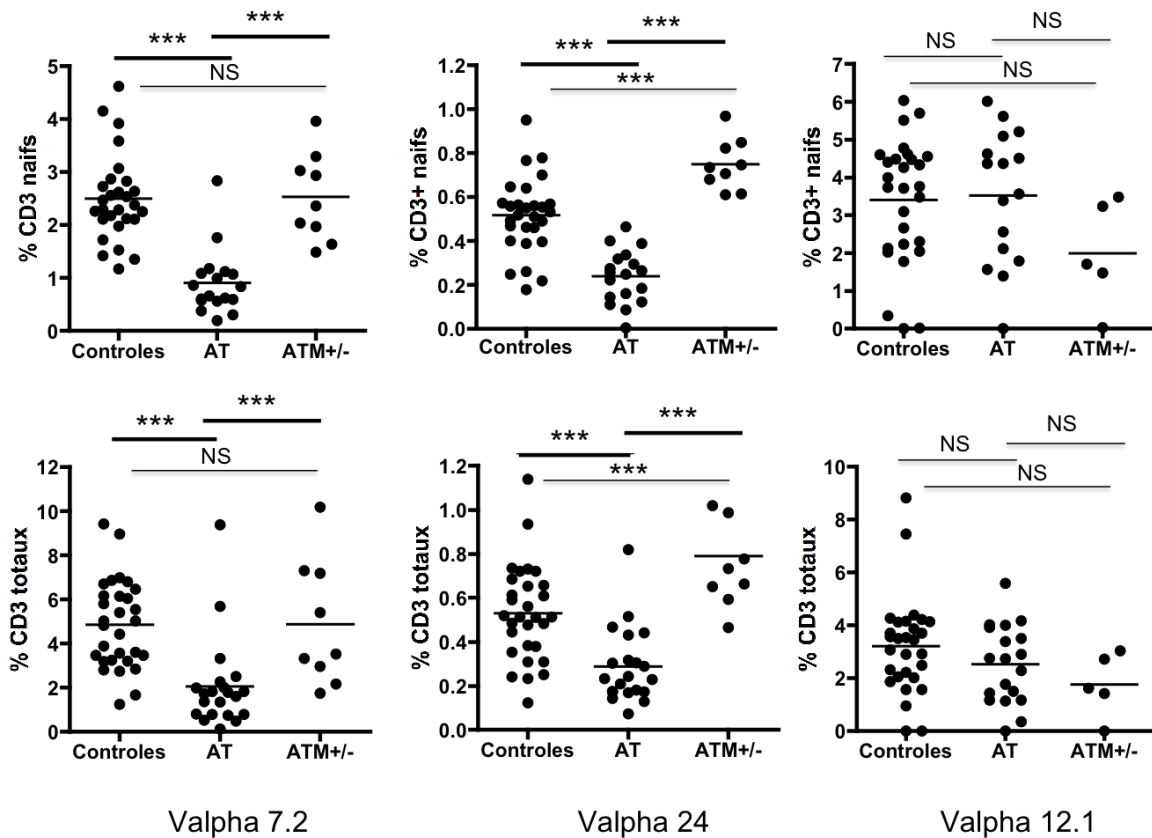


Figure 21 Utilisation des segments Valpha chez les patients AT ($ATM^{-/-}$) et les apparentés ($ATM^{+/-}$)

On observe une diminution significative de l'utilisation des segments les plus distaux (Valpha7.2 et Valpha24) chez les patients AT par rapport aux contrôles aussi bien lorsqu'on mesure sur les LT CD3+ naïfs (en haut) que sur les LT totaux (en bas) ($p < 0,0001$ dans chaque cas). En ce qui concerne le Valpha12.1, qui est un segment médian du locus Valpha, on ne note pas de différence significative entre les contrôles et les patients AT ($p = 0,84$ pour les CD3 naïfs et $p = 0,17$ pour les CD3 totaux).

Les individus hétérozygotes pour la mutation du gène *ATM* ont des résultats similaires à ceux observés chez les contrôles sains. Entre les individus $ATM^{+/-}$ et les patients $ATM^{-/-}$, on trouve une différence significative pour le Valpha7.2 et le Valpha24 ($p = 0,0002$ et $p < 0,0001$) mais pas pour le Valpha12.1 ($p = 0,0906$). Et entre les individus $ATM^{+/-}$ et les contrôles on trouve une augmentation significative de l'utilisation du Valpha24 ($p = 0,0005$) et pas de différences significatives pour le Valpha7.2 et le Valpha12.1 ($p = 0,9577$ et $p = 0,0503$).

c) Résultats pour d'autres déficits de la réparation de l'ADN

Ces résultats montrent qu'il existe bien un biais de l'utilisation des segments Valpha les plus distaux chez ces patients AT et que celui-ci peut être détecté facilement par une technique de cytométrie en flux. Nous avons donc évalué l'intérêt de ce test pour le dépistage d'autres maladies de la réparation de l'ADN.

Nous avons pu évaluer un patient atteint d'un syndrome de Bloom, un patient atteint d'une anémie de Fanconi et un patient atteint d'un syndrome de Cornelia de Lange avec une mutation homozygote dans le gène *NIPBL* (Figure 22). Un biais de répertoire a été détecté uniquement dans le cas de la mutation dans *NIPBL*. L'analyse d'une cohorte plus large de patients Cornelia de Lange est intéressante pour valider ce résultat qui suggère un rôle de la protéine NIPBL dans la survie thymocytaire.

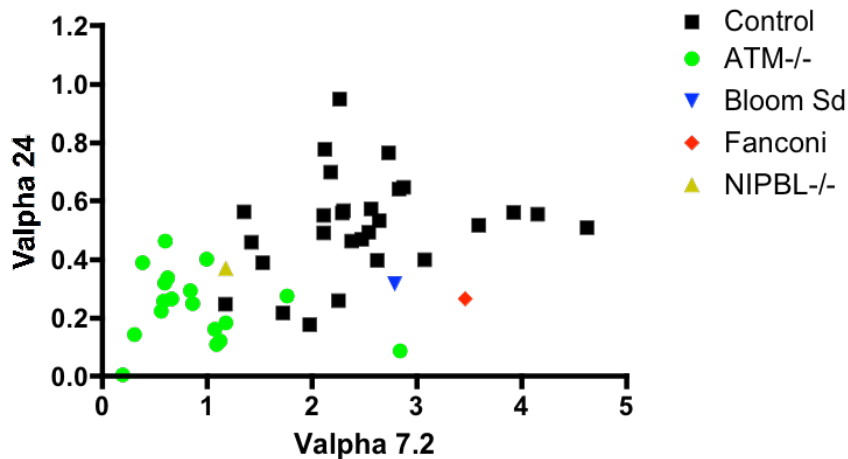


Figure 22 Evaluation du biais de répertoire Valpha par cytométrie en flux chez des patients atteints d'un déficit en facteur de la réparation de l'ADN.

Pourcentage d'utilisation du Valpha24 en fonction du pourcentage d'utilisation du Valpha7.2 sur les LT CD3+ naïfs. Pour le patient Fanconi (rouge) et le patient Bloom (bleu) testés ici, on retrouve une utilisation des segments Valpha distaux (Valpha7.2 et Valpha24) similaire aux contrôles. Pour le patient Cornelia de Lange (*NIPBL*-/-) (jaune) ont retrouvé en revanche un résultat similaire aux patients *ATM*-/- (verts). Ces résultats préliminaires devront être confirmés sur d'autres échantillons.

d) Résultats pour les patients XLP-2

Un déficit constitutionnel en facteur XIAP est responsable d'un déficit immunitaire appelé XLP-2 (« X-linked lymphoproliferative syndrome-2 ») (Rigaud et al., 2006) caractérisé par un risque important de lymphohistiocytose, de lymphoprolifération liée à l'EBV et par un déficit en cellules iNKT et MAIT (Gérart et al., 2013). Les cellules iNKT ont un TCR invariant utilisant le segment Valpha24 et les cellules MAIT ont un TCR semi-invariant utilisant le Valpha7.2 (voir introduction). Nous avons voulu évaluer si ces déficits en iNKT et MAIT chez les patients XLP-2 sont associés à un biais plus global de répertoire Valpha. Après analyse par cytométrie en flux, on n'observe pas de différence significative dans l'utilisation globale des segments Valpha24 et Valpha7.2 chez les patients XLP-2 par rapport aux contrôles (figure 23) alors que le taux de cellules iNKT et MAIT, déterminé respectivement avec les marqueurs Valpha24/Vbeta11 et CD161/Valpha7.2, est significativement diminué ce qui suggère que la baisse des iNKT et des MAIT n'est pas imputable à une diminution de la survie des thymocytes chez les patients XLP-2.

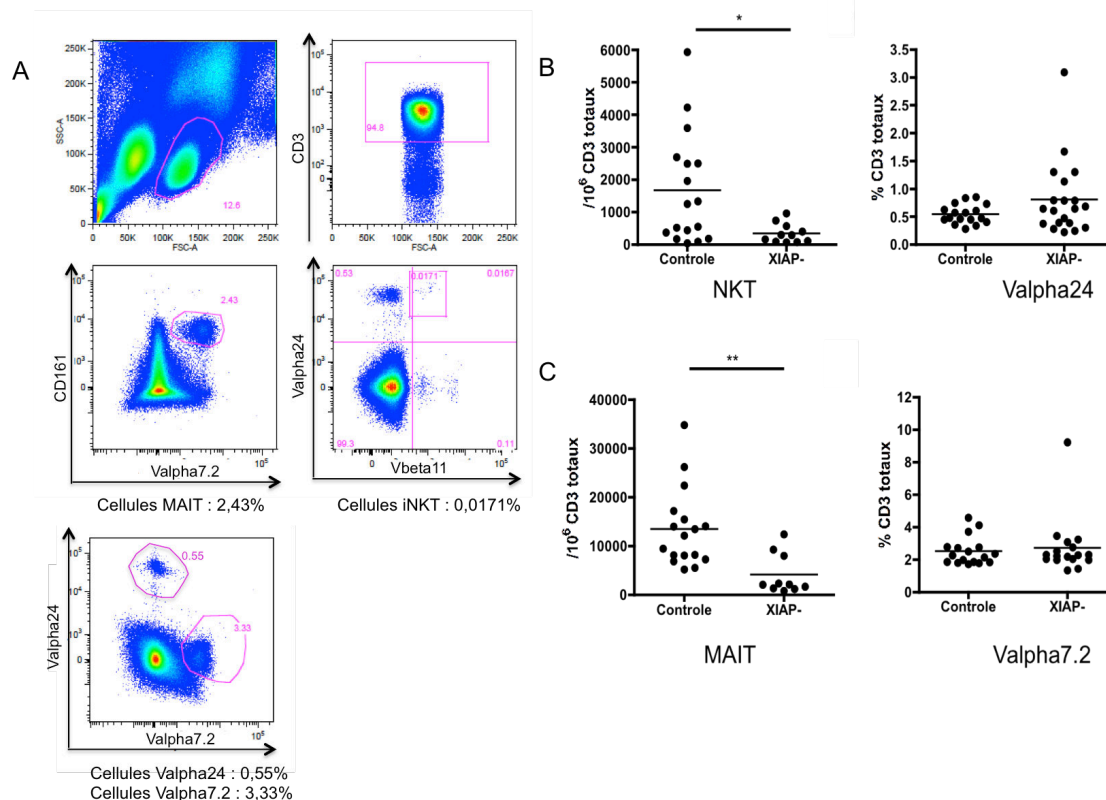


Figure 23 Taux de cellules iNKT et MAIT et utilisation des segments Valpha24 et Valpha7.2 chez des patients XLP-2 (XIAP-) et contrôles.

Stratégie de marquage par cytométrie en flux des lymphocytes iNKT et MAIT (A). Les lymphocytes iNKT sont identifiés parmi les LT CD3+ avec les marqueurs Valpha24 et Vbeta11 et les lymphocytes MAIT avec les marqueurs Valpha7.2 et CD161. Dans l'exemple présenté, on note d'une part 0,0171% de iNKT parmi les LT CD3+ avec 0,55% d'utilisation globale du Valpha24 et d'autre part 2,43% de MAIT avec 3,33% d'utilisation globale du Valpha7.2.

Alors que le taux de cellules NKT (B) et MAIT (C) est significativement plus faible chez les patients XLP-2 comparé aux contrôles ($p=0,024$ et $p=0,0012$ respectivement), on n'observe pas de différence d'utilisation de deux segments Valpha24 et Valpha7.2 ($p=0,41$ et $p=0,8$).

2. Discussion

A. Pertinence et intérêt d'un nouveau test diagnostic

Les causes moléculaires des déficits immunitaires primitifs sont multiples (Al-Herz et al., 2014). Notre projet était de mettre au point un test de dépistage rapide des déficits immunitaires liés à un défaut dans les voies de réparation de l'ADN. Nous sommes partis de l'observation d'un biais de répertoire du TCR α en faveur des segments les plus proximaux quand il existe un défaut de survie des thymocytes, aussi bien chez l'homme (Okada et al., 2015; Vera et al., 2013) que chez la souris (Guo et al., 2002; Hu et al., 2010; Sun et al., 2000; Vera et al., 2013). Or, nous savons que la survie des thymocytes dépend de réseaux transcriptionnels spécifiques (Wang et al., 2011) mais également qu'un défaut de réparation de l'ADN entraîne une diminution de la survie des thymocytes (Mak et al., 2000; Matei et al., 2006, 2007; Vera et al., 2013). Nous avons donc évalué l'intérêt de rechercher un biais de répertoire Valpha dans les cas de déficits immunitaires liés à un défaut de réparation de l'ADN.

La technique par biologie moléculaire utilisant une 5'RACE PCR a été testée dans quelques cas de déficit immunitaire connu, un déficit en Cernunnos, un déficit en DNA-Ligase IV et deux cas d'AT (figures 16 et 17). Cette technique permet d'évaluer le répertoire aussi bien sur les segments Valpha que Jalpha, et pour un grand nombre de transcrit. Les résultats que nous avons obtenus confirment la présence d'un biais de répertoire, très important dans les cas de déficit en NHEJ, moindre dans les déficits en ATM, par rapport aux contrôles. Cette technique, bien que simple d'exécution, est très sensible à la qualité des échantillons et nécessite un certain taux de LT circulant. Or ces patients sont souvent très lymphopéniques ce qui rend l'analyse finalement délicate. Par ailleurs, cette technique utilise le plateau technique de séquençage haut débit et est par conséquent onéreuse.

Nous avons donc développé une technique, moins chère et moins dépendante de la qualité des échantillons, par cytométrie en flux avec les anticorps anti-Valpha disponibles sur le marché. Le biais de répertoire a été mis en évidence sur une cohorte de patients AT (figure 21) validant notre hypothèse et confirmant l'intérêt de ce test pour le dépistage des AT. En revanche, aucun biais n'a été détecté par cette technique chez un patient Fanconi et un patient Bloom. D'après ces premiers résultats, il semble donc que le biais de répertoire est principalement présent et détectable dans les cas de déficit en NHEJ et en ATM mais pas dans le cas d'un déficit dans la voie Fanconi ou en hélicase BLM. Cependant ces résultats nécessitent d'être confirmés sur une plus large cohorte de patients Bloom, Fanconi et si possible pour d'autres déficits de la réparation comme les patients NBS.

Nous avons également eu accès au prélèvement d'un patient atteint d'un syndrome de Cornelia de Lange dû à une mutation homozygote dans le gène *NIPBL* (Liu and Krantz, 2009). La protéine NIPBL, de la famille des cohésines, intervient lors de la ségrégation des

chromosomes et également au cours des processus de réparation de l'ADN (Enervald et al., 2013; Oka et al., 2011). De manière intéressante, ce patient présente un biais d'utilisation des segments distaux (Valpha7.2 et Valpha24) similaire à celui détecté chez les patients AT (figure 21). Le rôle des cohésines au cours de la recombinaison V-J du TCR α a été étudié dans un modèle murin pour lequel la cohésine Rad21 est spécifiquement inactivée dans les thymocytes au stade DP, donc non en cycle, par l'expression d'une Cre sous la dépendance du promoteur du CD4 (Seitan et al., 2011). Les thymocytes de ces souris ont une durée de vie conservée et sont capables de se différencier, mais on observe tout de même un biais de répertoire du TCR α . Dans ce modèle murin, le biais de répertoire du TCR α ne serait donc pas dû à une diminution de la durée de vie des thymocytes DP, mais il semble que la perte de Rad21 induit une perturbation de l'architecture de la chromatine du locus du TCR α , au niveau des sites de liaison des cohésines qui flanquent le TEA et l'Ealpha. Les cohésines seraient donc requises pour les interactions entre promoteur (TEA) et enhancers (Ealpha) et pour le recrutement du complexe RAG aux sites RSS.

Ce test de dépistage pourrait donc également permettre de détecter d'autres déficits de la réparation de l'ADN, sans qu'ils soient forcément liés à un déficit immunitaire. Là encore, ce résultat préliminaire devra être confirmé par l'étude d'autres patients Cornelia de Lange.

Le segment Valpha24 est le segment invariant des lymphocytes iNKT et le segment Valpha7.2 est le segment invariant des lymphocytes MAIT. Dans certains déficits immunitaires, on retrouve un déficit dans l'une et/ou l'autre de ces sous-populations, en particulier le syndrome XLP-2 causé par une mutation dans le gène *XIAP* (Gérart et al., 2013; Rigaud et al., 2006). Les résultats que nous obtenons montrent qu'il n'y a pas de corrélation chez ces patients entre le déficit en iNKT et en MAIT et les biais de répertoire (figure 23). Donc, si un biais de répertoire se traduit par un déficit en iNKT et MAIT (Okada et al., 2015; Vera et al., 2013), la réciproque n'est pas forcément vraie. Une observation similaire a été faite chez des souris pour lesquelles le facteur de transcription Runx1 a été inactivé spécifiquement dans les thymocytes DP (Egawa et al., 2005) : ces souris n'ont pas de iNKT mais sans qu'il n'y ait de diminution de la production du réarrangement V α 14/J α 18. Runx1 est sans doute nécessaire à la survie ou à la sélection des précurseurs iNKT en aval de la formation du TCR. Chez les patients XLP-2, le déficit en iNKT et en MAIT ne serait pas dû à un défaut de survie des thymocytes limitant le réarrangement du TCR α , mais serait probablement la conséquence d'une susceptibilité accrue de ces deux sous-populations lymphocytaires à l'apoptose, une fois les cellules matures en périphérie (Gérart et al., 2013). Par conséquent, le dosage de ces sous-populations dans la démarche diagnostique d'un déficit immunitaire ne se substitue pas à l'évaluation du répertoire Valpha.

Chez les souris *Rorc*^{-/-} (*Rorc* code pour ROR γ t), la durée de vie des thymocytes DP est diminuée, induisant une incapacité à réarranger les segments les plus distaux du TCR α (Guo et al., 2002), notamment les segments nécessaires à la formation des iNKT et des MAIT. Il a été décrit récemment des mutations homozygotes perte de fonction dans le gène *RORC* chez des individus atteints d'une susceptibilité aux infections par les mycobactéries et aux candidoses (Okada et al., 2015). Le séquençage haut-débit des réarrangements du TCR α chez ces patients a révélé une diminution de l'utilisation des segments les plus distaux, en

particulier des segments Valpha7.2 et Valpha24, et une absence de iNKT et de MAIT. Ces résultats confirment l'intérêt de rechercher un biais du répertoire du TCR α pour identifier une diminution de la survie des thymocytes DP. De plus cette étude d'Okada et collaborateurs, confirme que de manière similaire aux iNKT (Egawa et al., 2005) le développement des MAIT est dépendant de ROR γ t et donc de la survie des thymocytes DP.

L'étude du répertoire du TCR α par cytométrie en flux se poursuit au laboratoire, aussi bien dans des cas de pathologies diagnostiquées que pour des patients en cours d'exploration afin d'évaluer sur une plus large population de patients la pertinence de ce test.

B. Conséquence d'un biais de répertoire

Il est probable que le biais du TCR α ait une conséquence clinique, notamment en raison de la diminution de certaines sous-populations lymphocytaires comme nous l'avons vu. Les lymphocytes invariant iNKT et MAIT utilisent en effet des segments Valpha distaux.

Des ligands des cellules MAIT récemment identifiés (Gold et al., 2014; Kjer-Nielsen et al., 2012; Soudais et al., 2015) indiquent que ces cellules ont un rôle spécifique au cours de la réponse immunitaire antibactérienne (Chandra and Kronenberg, 2015), notamment au cours de la réponse contre *Mycobacterium tuberculosis*, il a en effet été montré que ces cellules s'accumulent au site d'infection (Le Bourhis et al., 2010). Les cellules iNKT ont également un rôle spécifique et important au cours de la réponse immunitaire anti-bactérienne (Gao and Williams, 2015) et peut-être anti-tumorale (Metelitsa et al., 2003). On peut donc supposer qu'il puisse exister une sensibilité accrue à certains agents bactériens dans le cas de déficit en LT invariant. Cependant, chez les patients *RORC*^{-/-}, la susceptibilité aux infections par les mycobactéries semble marginalement être due aux déficits en iNKT et MAIT (Okada et al., 2015). En effet, la réponse *in vitro* à la stimulation au BCG est équivalente pour les PBL purifiés de ces patients et pour un mélange de PBL de patient et de MAIT issus de donneurs sains.

Une diminution de ces populations lymphocytaires a été également observée dans certaines pathologies dysimmunitaires comme l'asthme (Hinks et al., 2015; Vijayanand et al., 2007) ou le lupus érythémateux disséminé (Cho et al., 2014), suggérant un rôle potentiel de ces cellules dans le développement de ces pathologies.

Il existe peut-être d'autres types de lymphocytes invariants. Des cellules appelées « germline-encoded mycolyl lipid-reactive T cells » (GEM) ont été identifiées en 2013 (Van Rhijn et al., 2013), ce sont des lymphocytes T utilisant un TCR α invariant composé des segments TRAV1-2 (Valpha7.2) et TRAJ9 et d'un CDR3 constant. Ces cellules diffèrent des MAIT par leur segment Jalpha, leur TCR β et leur spécificité antigénique. Une autre étude a mis en évidence par séquençage haut-débit la présence d'autres TCR α invariant chez l'homme (van Schaik et al., 2014). Ces TCR α invariant utilisent à chaque fois des segments Valpha et Jalpha distaux. Ainsi, en plus des MAIT et NKT dont les fonctions sont de plus en plus connues, il existe probablement d'autres sous-populations lymphocytaires T pas encore caractérisées, utilisant un TCR α invariant, distal, dont le nombre est diminué en cas de biais de répertoire dû à un défaut de réparation de l'ADN.

Pour le moment la conséquence d'une diminution de ces sous-populations n'est pas claire, mais l'étude de ces biais de répertoire et de la diminution des sous-populations de LT invariant est un champ d'étude probablement très prometteur dans l'étude des pathologies dysimmunitaires et tumorales.

C. Pourquoi observe-t-on une diminution de la survie des thymocytes ?

Nous supposons que le biais observé chez les patients AT et les patients déficients pour un facteur du NHEJ est dû à une diminution de la survie des thymocytes mais cette létalité n'est pas encore très bien comprise. Le réarrangement du TCR α se déroule au stade où les thymocytes sont double positifs, dans la région corticale du thymus. Les thymocytes DP ne sont pas en phase de prolifération donc la diminution de la survie ne serait pas due à l'accumulation de lésion de l'ADN induites par le stress réplicatif.

Nous savons que l'absence de certains facteurs du NHEJ entraîne une très forte apoptose des neurones post-mitotiques de la zone intermédiaire et de la plaque corticale, ce phénomène est observé dans le cas des souris déficientes pour DNA-ligase IV ou XRCC4 (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998) et c'est probablement la cause des microcéphalies observés chez les patients porteurs de mutation dans Cernunnos, DNA ligase IV ou encore XRCC4. Comme les thymocytes DP, ces neurones post-mitotiques sont dans un état quiescent succédant une phase répllicative importante (stade DN4 pour les thymocytes). Les lésions de l'ADN à ce stade quiescent sont prises en charge par le NHEJ avec un rôle essentiel de la protéine ATM pour le déclenchement de l'apoptose via p53 (Lee et al., 2001). Les lésions de l'ADN survenant au stade DP peuvent être le reliquat de lésions de l'ADN survenues au cours des phases répliquatives précédentes, en parallèle avec ce qui a été montré pour les neurones post-mitotiques (Gatz et al., 2011), pour lesquels il semble que le point de contrôle G2/M ne s'active pas et serait donc permissif pour un certain nombre de cassures double brin de l'ADN. Par ailleurs, notre équipe a montré que les thymocytes murins déficients pour Cernunnos subissent une apoptose importante dépendante de p53 (Vera et al., 2013).

Chez la souris, en l'absence de l'ATM, on observe un retard de maturation des thymocytes SP associé à une diminution de l'efficacité du réarrangement Valpha-Jalpha. ATM a donc probablement un rôle majeur, direct, au cours de ce réarrangement V-J (Vacchio et al., 2007). Les lésions de l'ADN dans les thymocytes au stade DP pourraient également être dues à une production importante de ROS. Il a été décrit un rôle de ATM dans la survie des CSH en présence de ROS. Les souris *Atm*^{-/-} présentent en effet un épuisement rapide des CSH. La capacité de survie des CSH est restaurée par un traitement par un agent antioxydant (Ito et al., 2004). On peut supposer que les ROS soient également à l'origine de lésions de l'ADN s'accumulant dans les thymocytes et qu'ATM aurait un rôle protecteur contre ces lésions.

3. Matériel et méthodes

A. Patients et contrôles

Les échantillons de sang utilisés au cours de ce travail proviennent de patients pédiatriques et adultes, suivis à Necker ou à Saint-Louis. Ce sont des patients atteints de déficits immunitaires déjà étiquetés ou en cours d'investigation. Tous les patients, ou leurs parents pour les enfants mineurs, ont donné leur accord pour ce test. Les contrôles pédiatriques proviennent de « fonds de tube » anonymes fournis par le laboratoire d'hématologie de Necker. Les contrôles adultes proviennent de volontaires sains.

B. Extraction des PBL

L'extraction des PBL (« Peripheral Blood Lymphocytes ») se fait à partir d'un échantillon de 5 à 20 ml de sang frais prélevé sur héparine ou EDTA. Le sang est dilué volume à volume dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen®) et déposé sur un milieu de séparation (Lymphoprep™) suivi d'une centrifugation 20 minutes à 2000 tours par minutes. L'anneau contenant les PBL est récupéré, lavé et les cellules sont comptées. Cinq millions de PBL sont utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux et 5 millions sont lysés dans du Trizol® en prévision d'une extraction d'ARN, s'il reste des cellules, celles-ci sont congelées.

C. Technique de 5'RACE-PCR

1) Principe

La technique de 5'RACE-PCR permet d'amplifier des ADN complémentaires (cDNA) à l'aide d'une amorce universelle en 5' de la séquence à amplifier. Cette technique permet d'amplifier, à partir de cDNA, les parties variables (Valpha-Jalpha) du récepteur TCR α avec un seul couple d'amorce (voir figure 15).

Une fois l'ARN extrait, celui est reverse-transcrit en cDNA grâce à l'enzyme SuperScript II (Invitrogen®) en présence de dNTP, d'oligo-dT et d'une amorce particulière appelée SMarter IIA (SM2A) qui se fixe en 5' des ARN messagers à transcrire. Une SMART PCR permet ensuite d'amplifier tous les cDNA du récepteur Valpha en utilisant une amorce sens sur la séquence unique de l'oligonucléotide SM2A et une amorce anti-sens sur la région constante du récepteur TCR α . La PCR est effectuée avec une enzyme robuste et fidèle de type Taq Advantage-GC (Clontech). Les produits de PCR sont séquencés individuellement, soit par sous-clonage dans un vecteur type pCR2.1®-TOPO® TA (Invitrogen), soit par séquençage haut-débit (NGS).

2) Choix des amorces

Le séquençage par NGS nécessite l'ajout de « barre-codes » et d'adaptateurs. L'amorce sens est un mélange de 2 amorces appelées Short-UPM et Long-UPM aux concentrations

respectives de 5 μ M et 1 μ M avec présence d'une séquence « adaptateur » en 5' de l'amorce Short-UPM. Les amorces anti-sens possèdent en 5' un « barre-code » spécifique pour chaque échantillon pour permettre de les identifier.

Amorces utilisées :

SM2A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAUGGG
Long-UPM	ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short-UPM	ctaatacgactcactatagggc
HuCAR3	GTCTCTCAGCTGGTACACG

3) Description PGM

Le séquençage haut-débit de ces produits de PCR se fait sur un appareil Ion Personal Genome Machine® (PGMTM) qui permet le séquençage de produits uniques de taille allant jusqu'à 500pb. Plusieurs échantillons de patients sont séquencés en parallèle, ils seront identifiés individuellement par leur « barre-code ». L'analyse bioinformatique se fait par alignement des séquences obtenues sur la base de données IMGT (<http://www.imgt.org>).

D. Technique par cytométrie en flux

1) Principe

Les PBL sont marqués 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière avec des anticorps suivant :

Anti-CD3-APC (MACS), anti-CD62L-PE (BD), anti-CD45RA-VioBlue (MACS), anti-Valpha12-FITC (Thermo), anti-Valpha7.2-PerCP Cy5.5 (Sony Biotechnology), anti-Valpha2-FITC (Thermo) et anti-Valpha24-PE Cy7 (BD).

Après 2 lavages avec du PBS+2%SVF, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur un appareilBD LSRFortessaTMet les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

2) Choix des anticorps

Le pourcentage d'utilisation des différents segments Valpha est établi sur les lymphocytes T naïfs et/ou totaux. Les lymphocytes sont sélectionnés sur le nuage de cellules SCC/FSC, puis les LT sont sélectionnés par le CD3, enfin les LT naïfs sont identifiés comme étant les LT double positifs CD62L+/CD45RA+. Le pourcentage d'utilisation des différents segments Valpha est estimé d'une part parmi les LT totaux et d'autre part parmi les LT naïfs (Figure 19).

3) Vérification de la spécificité des anticorps

Les lymphocytes isolés d'une poche de sang de donneur fournie par l'établissement français du sang (EFS) sont marqués avec les anticorps anti-CD3, anti-Valpha2, anti-Valpha12, anti-Valpha7.2 et anti-Valpha24. Les sous-populations lymphocytaires Valpha sont

triées individuellement sur un trieur cellulaire BD FACS Aria, puis lysées dans le Trizol®, l'ARN de chaque sous-population est ensuite extrait selon le protocole Trizol®. Le mRNA est transcrit en cDNA suivit d'une SMART-PCR spécifique des récepteur TCR α (voir Protocole 5'RACE-PCR).

Les produits de PCR sont clonés dans un vecteur TOPO-TA-PCR2 (Invitrogen®) suivi d'une transformation de bactéries compétentes TOP10 selon les indications du fabricant. Une PCR est effectuée pour chaque colonie bactérienne (GoTaq® Promega), le produit de PCR est séquencé par la technique de Sanger (ABI Prism® Applied Biosystems) et la séquence est alignée sur la base de données IMGT afin de connaître précisément le segment Valpha utilisé.

Partie 2: Analyse d'une nouvelle cohorte de patients

1. Rationnel

Dans 80% des cas, l'origine moléculaire des DICV n'est pas connue. Etant donné l'implication importante des systèmes de réparation de l'ADN dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire, il est tout à fait pertinent de suspecter un défaut de réparation de l'ADN pour certains de ces cas. Une étude en collaboration avec le service d'Immunologie Clinique de l'hôpital Saint-Louis (Pr Oksenhendler) a été lancée depuis trois ans afin d'explorer des patients adultes issus de la cohorte DEFI, ayant un DICV associé à l'apparition de lymphomes et/ou dysmorphie. Nous analysons le TCR-Valpha par cytométrie en flux sur les PBL de ces patients, nous explorons également les voies de réparation de l'ADN sur les fibroblastes de ces patients et enfin nous recherchons une cause moléculaire à ces DICV par analyse génétique.

2. Résultats

A. Présentation clinique

En 3 ans, 18 patients de la cohorte DEFI ont été inclus dans cette étude. Les tableaux 2 et 3 récapitulent la présentation clinique de ces patients.

Tous les patients étudiés sont adultes, l'âge variant de 19 à 62 ans au moment de l'inclusion dans cette étude. On compte 7 hommes pour 11 femmes. On note une consanguinité familiale dans 3 cas (n°2, 3 et 12). Dans 5 cas, il existe une histoire familiale de déficit immunitaire et/ou de cancer (n°6, 9, 11, 13 et 14 qui sont sœurs et 17 et 18 qui sont frères et sœur).

Au niveau clinique, tous ces patients ont un déficit immunitaire caractérisé par une hypogammaglobulinémie dans tous les cas, parfois associée à une lymphopénie plus ou moins profonde (1, 2, 3, 11, 12, 16). Six patients présentent également des manifestations autoimmunes (2, 7, 8, 10, 12, 18).

Chez 10 patients, on rapporte une histoire de cancer solide ou d'hémopathie maligne, lymphome de Hodgkin ou lymphome B à grandes cellules le plus souvent. Trois cancers différents ont été diagnostiqués chez la patiente n°6 (Lymphome d'Hodgkin, tumeur de l'ovaire et mélanome) dont le frère a également une lourde histoire tumorale (tumeur

germinale du testicule et lymphome d'Hodgkin). Elément notable dans notre étude, 2 patients ont présentés une toxicité majeure à la chimiothérapie (1 et 4).

La majorité des patients présentent également des anomalies du développement (15/18). Une microcéphalie dans 7 cas (2, 7, 8, 10, 11, 12, 16), une dysmorphie dans 9 cas (1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 17) et un retard de croissance dans 2 cas (16 et 18). Certains patients ont également un retard mental (5 et 7). Une patiente souffre de schizophrénie et d'épilepsie (18).

Parmi les autres éléments cliniques notables, il existe une atteinte pulmonaire grave chez deux patientes (8 et 12) et des lymphoproliférations liées à l'EBV chez les patients 16 et 17 (frère et sœur).

Tableau 2 Données cliniques des patients analysés

Patient	Age Sexe	Déficit immunitaire	Auto-immunité	Hémopathie/cancer	Anomalie du développement	Autres	Histoire familiale	Consan- guinité
Patient 1	20/H	Hypogammaglobulinémie, lymphopénie		Lymphome B agressif	Dysmorphie	Toxicité majeure de la chimiothérapie		
Patient 2	40/F	lymphopénie profonde, hypogammaglobulinémie	Hématologique et thyroïdienne	Lymphome B à grandes cellules	Microcéphalie			oui
Patient 3	19/H	Neutropénie chronique, Lymphopénie B et NK		Prolifération LT CD8+	Dysmorphie, hypoacousie	Choc septique		oui
Patient 4	30/H			Lymphome B à grandes cellules	Palais ogival, micrognathisme, oreilles basses	Toxicité majeure de la chimiothérapie		
Patient 5	25/F	Hypogammaglobulinémie			Malformation vélopalatine	Retard mental		
Patient 6	42/F	Hypogammaglobulinémie		Lymphome d'Hodgkin, tumeur de l'ovaire, mélanome	Dysmorphie	Pré-mutation Xfra	Tumeur du testicule lymphome d'hodgki chez le frère	
Patient 7	25/F	Hypogammaglobulinémie	Auto-immunité anti-plaquettaire		Microphthalmie, palais ogival	Retard psychomoteur		
Patient 8	45/F	Déficit immunitaire	Hépatite auto- immune		Microcéphalie	Fibrose pulmonaire		
Patient 9	44/H	Hypogammaglobulinémie		Lymphome de haut-grade	Dysmorphie		Sœur ayant un lymphome oculaire/cérébral	

Tableau 3 Données cliniques (suite)

Patient	Age Sexe	Déficit immunitaire	Auto-immunité	Hémopathie/cancer	Anomalie du développement	Autres	Histoire familiale	Consan- guinité
Patient 10	30/H	Hypogammaglobulinémie	Lupus à début pédiatrique		Microcéphalie			
Patient 11	25/H	Absence de LB			Microcéphalie, palais ogival, oreilles basses	SAM, polyneuropathies	Décès paternel à l'âge de 25 ans	
Patient 12	26/F	Hypogammaglobulinémie, lymphopénie T	Hypothyroïdie auto-immune	Lymphome T cutané	Microcéphalie	Atteinte pulmonaire grave		oui
Patient 13	58/F	Hypogammaglobulinémie		Lymphome B à grandes cellules		Pneumopathie	Lymphome refractaire chez frère, hypogamma. chez sœur (n°14) et fils	
Patient 14	62/F	Hypogammaglobulinémie					sœur de n°13	
Patient 15	23/F	Hypogammaglobulinémie		Lymphome d'Hodgkin				
Patient 16	35/F	Hypogammaglobulinémie, lymphopénie CD4+			Retard de croissance, microcéphalie, scoliose	Lymphoprolifération s liées à l'EBV	Sœur de n°17	
Patient 17	25/H	Hypogammaglobulinémie		Lymphome d'Hodgkin	Dysmorphie, retard mental	Lymphoprolifération s liées à l'EBV	Frère de n°16	
Patient 18	45/F	Hypogammaglobulinémie	Tyroïdite et cytopénies auto- immunes		Retard de croissance	Schizophrénie, épilepsie, maladie coeliaque		

B. Evaluation du répertoire Valpha par cytométrie en flux

De manière systématique, nous avons évalué le répertoire Valpha chez ces patients afin de détecter un éventuel biais d'utilisation des segments les plus distaux. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 24. Seuls deux cas se détachent dans les taux faibles de Valpha24 et Valpha7.2, à des valeurs proches de celles obtenues pour les patients AT, ce sont les cas 16 et 17 qui sont frère et sœur avec respectivement 0,67% de Valpha7.2 et 0,35% de Valpha24 pour le patient 16 et 0,81% de Valpha7.2 et 0,35% de Valpha24 pour le patient 17. Cependant le cas 16 était sous chimiothérapie quand cette analyse a été faite, ce résultat est par conséquent sous réserve.

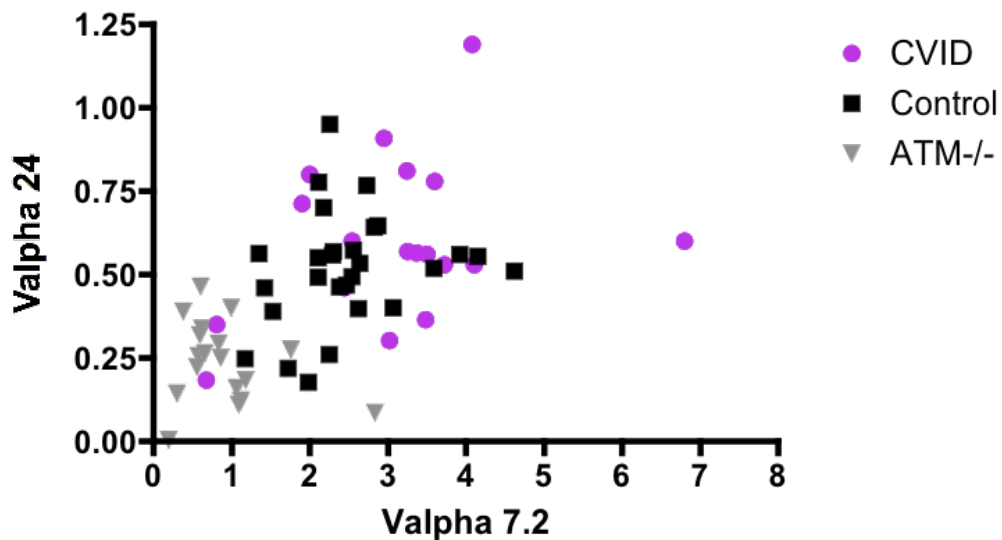


Figure 24 Répartition des segments Valpha7.2 et Valpha24 chez les patients DICV

Analyse par cytométrie en flux sur les LT CD3+ naïfs, les échantillons contrôle sont représentés par des carrés noirs, les échantillons ATM-/- par des triangles gris et les patients DICV par des ronds violets.

C. Tests fonctionnels

Nous avons établis des lignées de fibroblastes primaires et immortalisés par l'antigène SV40 pour 14 patients. Pour les patients 4 et 10 nous n'avons pas pu obtenir de fibroblastes en raison d'un échec de culture et pour les patients 13 et 14 nous n'avons pas reçu de biopsie de peau pour le moment. Pour certains patients, nous avons également établi des lignées de lymphocytes immortalisés par l'EBV (lignée B-EBV) (patients 7, 9, 13 et 16). Le diagnostic moléculaire du patient 5 ayant été rapidement posé, nous n'avons entrepris pour lui aucune étude fonctionnelle. Les résultats obtenus pour ces tests fonctionnels sont récapitulés dans le tableau 4.

Nous avons recherché une sensibilité des cellules des patients à certaines drogues génotoxiques. Parmi les résultats notables, on retrouve une sensibilité à la Mitomycine C (agent pontant de l'ADN) chez les patients 1, 3, 6, 7 et 18, à un niveau comparable à ce qui est observé pour les patients atteints d'anémie de Fanconi (AF). Pour les patients 3, 6, 7 et 18, on retrouve également un blocage des cellules en phase G2 après traitement par la MMC mais cette analyse est normale chez le patient 1. Pour compléter ces résultats, nous avons effectué une recherche de cassures chromosomiques après traitement par la MMC à partir de PBL frais pour les patients 6 et 7. Dans les deux cas, on n'observe pas d'augmentation des cassures chromosomiques (voir figures 25, 26 et 27).

Les autres agents génotoxiques testés sont la phléomycine et les radiations ionisantes générant tous deux des cassures doubles brins, du VP-16 (étoposide) qui est un inhibiteur de topoisomérase, des UV et de l'hydroxyurée (inhibiteur de la ribonucléotide-réductase, blocage de la réplication de l'ADN). Nous n'avons observé aucune sensibilité pour les patients testés avec ces différents agents.

Tableau 4 Résultats des tests fonctionnels

S : sensible, R : résistant

Cas	MMC	Phléomycine	IR	VP-16	Hydroxurée	UV	Checkpoint G2M/MMC	Cassures Chr/MMC	Téломères
1	S	R	R				N		
2	R	R	R						
3	S	R	R				++		
4	Analyses non faites, pas de cellules								
5	Analyses non faites, diagnostic moléculaire (Syndrome de Jacobson)								
6	S	R	R				++	N	
7	S	R	R				++	N	
8	R	R		R					Normaux
9	R	R		R	R	R			
10	Analyses non faites, pas de cellules								
11	R	R	R	R					
12	R	R							Raccourcissement et fusion télomérique
13	Analyses non faites, pas de cellules								
14	Analyses non faites, pas de cellules								
15	Analyses en cours								
16	R	R		R					
17	Analyses en cours								
18	S	R		R			++		

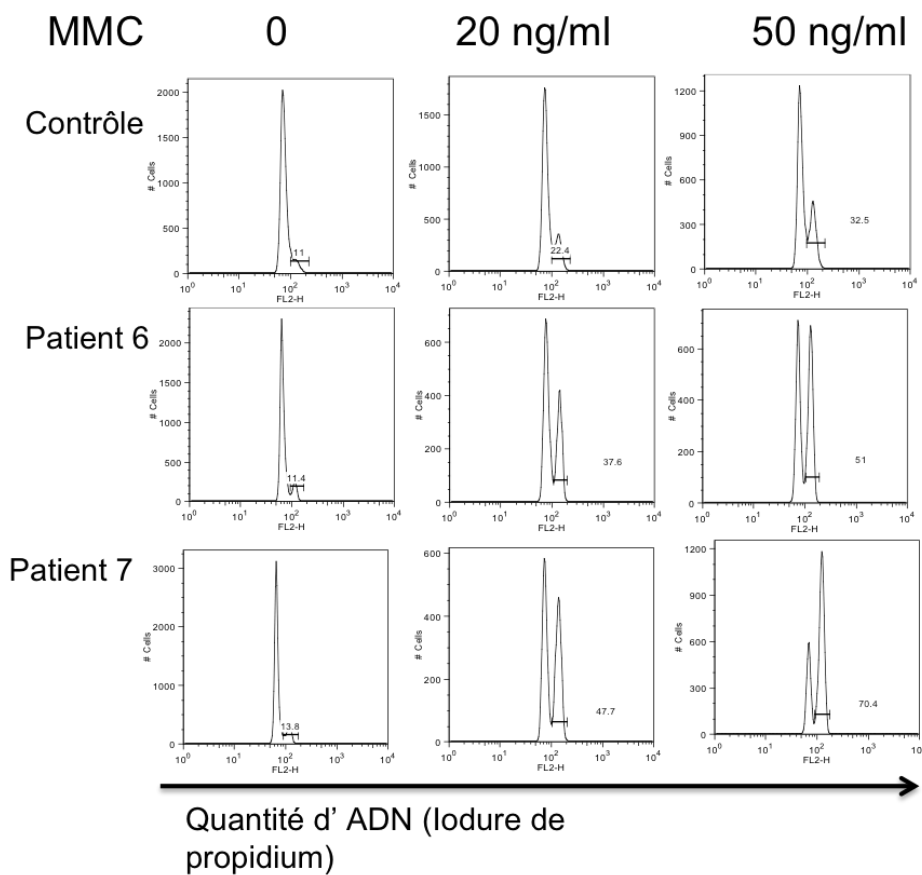
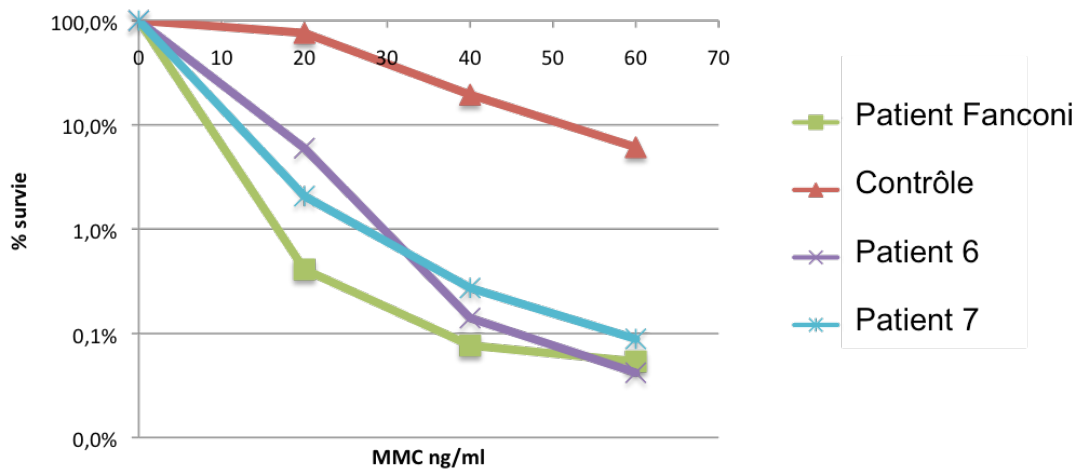


Figure 25 Tests de sensibilité à la MMC chez les patients 6 et 7

Les fibroblastes immortalisés SV40 des patients 6 (courbe violette) et 7 (courbe bleue) ont une sensibilité accrue à la MMC, similaire à ce qui est observé pour les cellules d'un patient atteint de l'anémie de Fanconi (courbe verte). Le traitement par la MMC entraîne un blocage des fibroblastes primaires de ces mêmes patients en phase G2, que l'on peut détecter par l'analyse en cytométrie de flux de la quantité d'ADN par marquage par l'iodure de propidium.

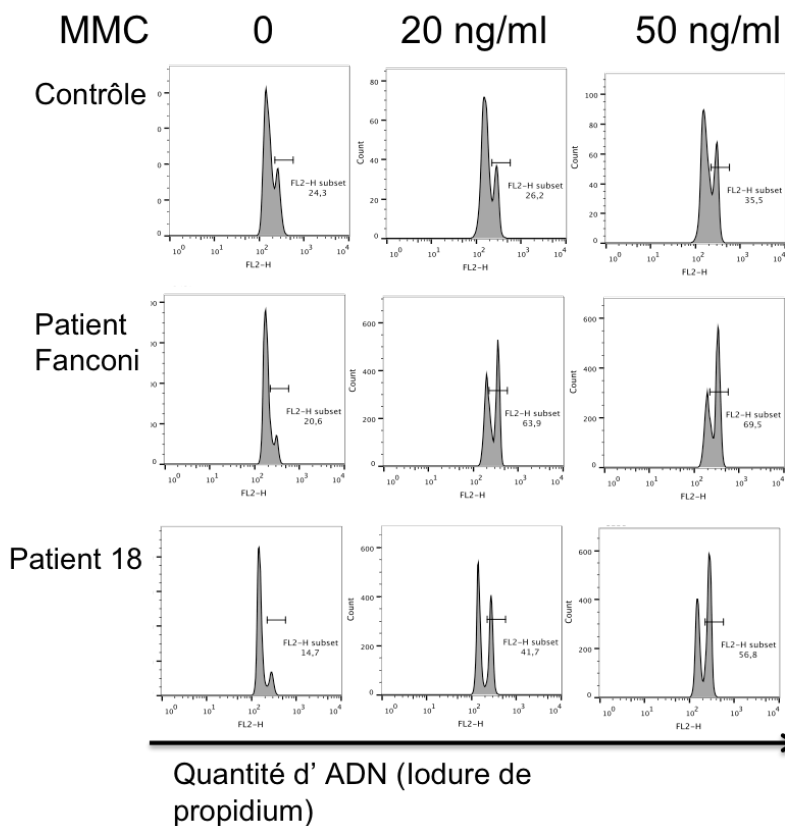
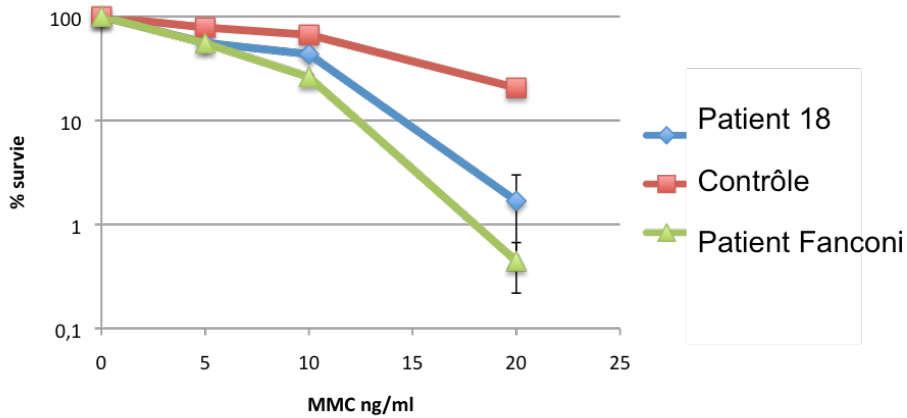
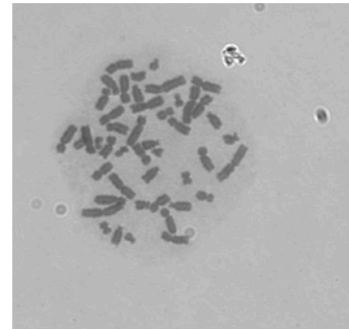
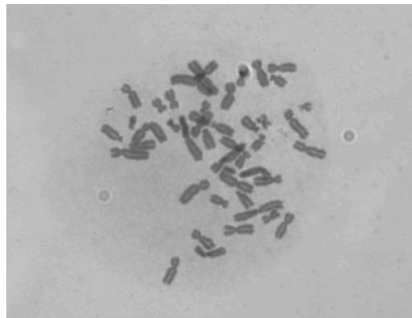


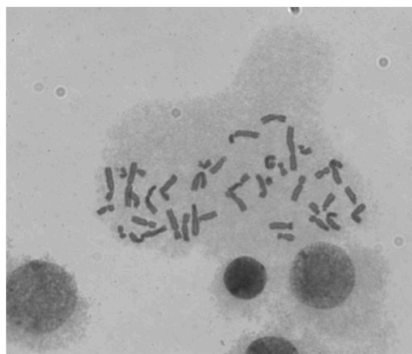
Figure 26 Tests de sensibilité à la MMC chez le patient 18

Les fibroblastes immortalisés SV40 du patient 18 (courbe bleue) ont une sensibilité accrue à la MMC, similaire à ce qui est observé pour les cellules d'un patient atteint de l'anémie de Fanconi (courbe verte). Le traitement par la MMC entraîne un blocage des fibroblastes primaires de ce patient en phase G2, que l'on peut détecter par l'analyse en cytométrie de flux de la quantité d'ADN par marquage par l'iodure de propidium.

Sans MMC



60 ng/ml
MMC



Résultats : pas de cassures

Figure 27 Caryotype sur milieu cassant, patient 7

Mitoses obtenues pour le patient 7, après traitement des PBL en culture par la MMC. On n'observe pas d'augmentation des cassures chromosomiques de ce patient contrairement à ce qui est observé pour les patients AF.

Deux patients présentent une atteinte pulmonaire importante qui peut être liée à un défaut de maintien des télomères (Kannengiesser et al., 2014, 2015; Stuart et al., 2015), par conséquent nous avons mesuré par Southern Blot la longueur des télomères chez ces deux patients. La taille des télomères est normale pour le patient 8 alors que pour le patient 12 on note un raccourcissement ainsi qu'une image suggérant une fusion télomérique, ceci étant en faveur d'une anomalie du maintien des télomères (figure 28).

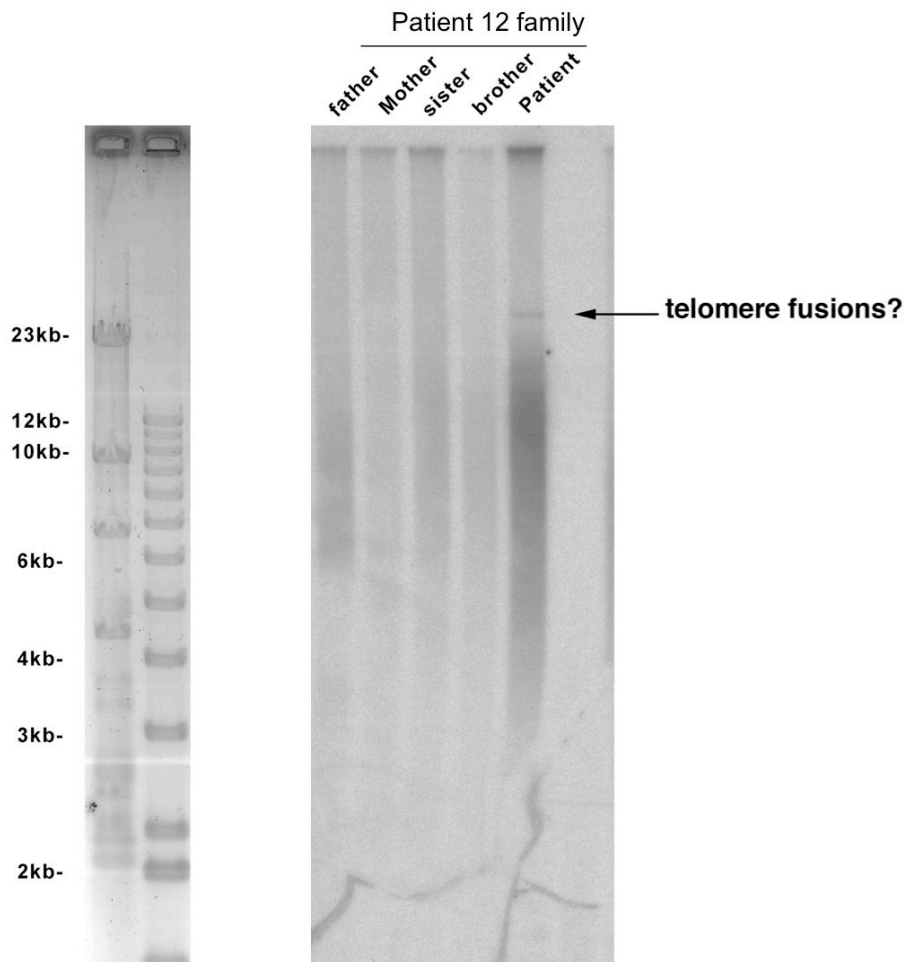


Figure 28 Analyse par Southern Blot des télomères du patient 12 et de sa famille

La taille des télomères du patient 12 est légèrement diminuée et on note surtout une image suggérant la présence d'une fusion télomérique (flèche) en faveur d'une anomalie du maintien des télomères chez ce patient.

D. Analyse génétique

En dehors du patient 2, tous les patients ont bénéficié d'une analyse génétique (résultats repris dans le tableau 5).

Une CGH array a permis d'identifier une délétion sur le chromosome 15 pour le patient 4, avec un gène candidat assez fort au sein de la délétion, le gène *FAN1* (FANCD2/FANCI-associated nucléase 1) qui code pour une nucléase probablement impliquée dans la réparation des blocage des fourches de la réplication (Takahashi et al., 2015). Quatre cas de microdélétion sur le chromosome 15 impliquant ce gène ont été décrit (Trujillo et al., 2012) ainsi que des cas de mutations ponctuelles (Zhou et al., 2012), à chaque fois liés à un défaut de réparation de l'ADN. Ce patient est l'un des deux ayant subi une toxicité majeure de la chimiothérapie, la délétion de ce gène *FAN1* au regard des cas précédemment décrits est tout à fait susceptible d'être responsable de cette toxicité. Malheureusement nous n'avons pu effectuer aucune analyse phénotypique sur les cellules de ce patient. Celui-ci est aujourd'hui décédé, nous ne pourrions donc pas aller plus loin dans l'étude ce cas. Le séquençage du second allèle de *FAN1* ne montrait pas de mutation et il n'a pas été possible d'effectuer des analyses génétiques complémentaires chez les parents, cependant la possibilité d'une haploinsuffisance reste à envisager.

Le patient 5 a également bénéficié d'une analyse génétique par CGH array qui a mis en évidence une délétion sur le bras long du chromosome 11 responsable du syndrome de Jacobsen caractérisé par un retard mental, une dysmorphie et une thrombocytopénie (Mattina et al., 2009) et pour lequel la présence d'un déficit immunitaire a déjà été décrit (Seppänen et al., 2014), par conséquent nous n'avons pas entrepris d'analyses fonctionnelles chez ce patient.

Pour les patients 16 et 17, qui sont frère et sœur, un séquençage ciblé par la méthode de Sanger a mis en évidence une mutation hétérozygote dans l'exon 11 du gène *PIK3R1* entraînant un défaut d'épissage. *PIK3R1* code pour la sous-unité p85alpha de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui a un rôle important dans la signalisation cellulaire au cours de la prolifération, de la survie et du trafic cellulaire (Vanhaesebroeck et al., 2010). Des mutations hétérozygotes dans ce gène dans les DICV ont été décrites récemment (Deau et al., 2014). Ces deux patients sont ceux ayant une diminution du Valpha24 et du Valpha7.2 comparable à ce qui observé chez les patients AT. Nous n'avons pas détecté de sensibilité aux agents génotoxiques chez le patient 16, les analyses sont en cours pour le patient 17. Le biais de répertoire Valpha sera exploré chez d'autres patients porteurs de cette mutation et s'il est confirmé, il sera intéressant d'étudier si cette mutation est responsable d'une diminution de la durée de vie des thymocytes et par quel mécanisme.

Tous les autres patients ont bénéficiés d'un séquençage complet de l'exome (WES). L'analyse des résultats s'est faite selon le contexte familial, par exemple nous avons privilégié la recherche de mutations homozygotes dans les cas de consanguinité et nous avons recherché en priorité des mutations dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et/ou le

développement du système immunitaire. Nous avons exclus les variants décrits dans les bases de données en ligne (60K exome, EVS 4000K) ainsi que les variants décrits dans la base interne de Necker à une fréquence supérieure à 1%.

Une mutation dans le gène *CCDC22* (coiled-coil domain containing 22) situé sur le chromosome X a été identifiée chez le patient 3, qui est un homme. Ce gène code pour une protéine intervenant dans la régulation de NF- κ B par son interaction avec COMMD1 (Starokadomskyy et al., 2013). Des mutations de ce gène ont été associées à des retards mentaux liés à l’X (Kolanczyk et al., 2015). Nous attendons un prélèvement d’ADN de la mère du patient pour rechercher un biais d’inactivation du chromosome X qui pourrait confirmer l’implication de cette mutation dans la maladie. Les cellules de ce patient sont sensibles à la MMC, le lien entre ce gène et la réponse aux dommages de l’ADN sera donc à déterminer.

Chez le patient 6, deux mutations hétérozygotes composites ont été identifiées dans le gène *FAT1*. Ce gène code pour un suppresseur de tumeur, membre de la superfamille des cadhérines (Dunne et al., 1995). Cette protéine est probablement importante au cours du développement cérébral (Badouel et al., 2015) et des mutations somatiques ou une surexpression de ce gène ont été décrites dans des leucémies (Ardjmand et al., 2013; de Bock et al., 2012; Neumann et al., 2015) et cancers solides (Furukawa et al., 2015). Ce patient est également un de ceux dont les cellules sont sensibles à la MMC, sans augmentation des cassures chromosomiques. Le lien entre FAT1 et la réparation de l’ADN devra également être exploré.

Pour le patient 7, dont les cellules sont sensibles à la MMC, nous avons identifié deux mutations hétérozygotes dans deux gènes potentiellement intéressants. La première touche le gène *BAP1* (BRCA1-associated protein-1) pour lequel des mutations germinales ont été décrites (Gerami et al., 2015; Klebe et al., 2015; Rai et al., 2015), responsables d’une prédisposition au cancer probablement liée à un défaut de réparation des cassures double brin de l’ADN (Ismail et al., 2014; Yu et al., 2014). La deuxième mutation touche le gène *EXD3* qui est une exonucléase 3’-5’ pour laquelle une mutation non-sens homozygote a été identifiée chez un autre patient atteint d’un déficit immunitaire et présentant une hypersensibilité à la MMC (donnée non publiées).

Une mutation hétérozygote dans le gène *FANCA*, impliqué dans la voie Fanconi a été identifiée chez le patient 8. Cependant, les cellules de ce patient ont une résistance normale à la MMC.

Plusieurs mutations intéressantes ont été identifiées chez le patient 9. Une mutation hétérozygote dans le gène *ATM*, deux mutations hétérozygotes composites dans le gène *ATR*, tous deux impliqués dans la signalisation des dommages de l’ADN (voir introduction) et également une mutation hétérozygote dans le gène *PIK3C2B* codant pour la sous-unité C2beta de la PI3K. La mutation hétérozygote de *PIK3C2B* apparaît comme particulièrement intéressant compte tenu du préalable des mutations PIK3R1 et PIK3CD dans les DICV et

également en raison de la très forte induction de l'expression de ce gène dans les LB matures de la rate chez les souris et chez l'homme (immgen.org). Les cellules du patient ne semblent pas sensibles à un large panel d'agents génotoxiques testés chez ce patient (MMC, phléomycine, VP16, hydroxyurée, UV).

Pour le patient 11, nous avons identifié une mutation homozygote perte de fonction dans le gène *ENDOV*, gène très conservé depuis les bactéries jusqu'à l'homme (Fladeby et al., 2012) dont une fonction dans la réparation de l'ADN a été décrite chez les bactéries (Ishino et al., 2015). Ce variant est très rare dans la population générale mais a une prévalence d'environ 3% dans les populations d'Asie du Sud, d'où est originaire ce patient. Par conséquent cette mutation n'a pas été retenue.

Chez le patient 12, qui a des anomalies des télomères et qui est issu d'une famille consanguine, nous avons identifié une mutation homozygote non-sens dans le gène *CEP78* codant pour une protéine du centrosome. La fonction précise de cette protéine n'est pas connue. Le séquençage intrafamilial a retrouvé cette mutation homozygote chez la mère, un frère et une sœur bien portant. Il s'agit donc d'un polymorphisme

Les patientes 13 et 14 sont sœurs, elles présentent toutes les deux une mutation hétérozygote dans le gène *PINK1* (PTEN induced putative kinase 1) codant pour une serine/thréonine kinase localisée dans la mitochondrie (Poole et al., 2008), activant des signaux d'autophagie dans la mitochondrie (Lazarou et al., 2015) mais non impliquée dans la voie PTEN (Unoki and Nakamura, 2001). Des variants de ce gène ont été associés à la maladie de Parkinson (Brooks et al., 2009).

Deux mutations hétérozygotes composites dans le gène *BRCA2* ont été identifiées chez la patiente 15. Ces deux variants ont une fréquence très faible dans la population générale et on peut donc penser que l'association des deux soit délétère.

Pour finir, nous avons identifié chez le patient 18 une mutation homozygote dans le gène *DMBT1* (Deleted in malignant brain tumors 1) impliqué dans certains cancers (Motomura et al., 2012; Torabi et al., 2015). Ce gène code pour une glycopotéine participant à la réponse antibactérienne au niveau des muqueuses intestinales et orales (Loimaranta et al., 2009; Rosenstiel et al., 2007) et pourrait être impliquée dans la maladie de Crohn (Diegelmann et al., 2013). Nous avons également identifié une mutation hétérozygote dans *PIK3C2B*, gène également muté chez le patient 9. Il est intéressant de noter que des variants non synonymes ont été identifié dans *PIK3C2B* chez des patients schizophrènes (Fromer et al., 2014), pathologie dont souffre également ce patient. Les cellules de ce patient sont sensibles à la MMC alors que celle du patient 9 ne le sont pas. On peut donc *a priori* penser que les mutations de *PIK3C2B* ne sont pas responsables d'un défaut de réparation de l'ADN. En revanche, l'implication de la mutation homozygote de *DMBT1* dans cette sensibilité à la MMC devra être explorée.

Pour les patients 1 et 10, aucun gène candidat n'est ressorti de ce séquençage de l'exome.

Tableau 5 Résultats analyses génétiques

WES : Whole Exome Sequencing

Cas	Analyse génétique	Gène	Type de mutation
1	WES	/	
2	/	/	
3	WES	CCDC22	Lié à l'X
4	CGH array	FAN1	Haploinsuffisance ?
5	CGH array	Syndrome de Jacobsen	Haploinsuffisance
6	WES	FAT1	Hétérozygote composite
7	WES	BAP1	Hétérozygote
		EXD3	Hétérozygote
8	WES	FANCA	Hétérozygote
9	WES	ATM	Hétérozygote
		ATR	Hétérozygote composite
		PIK3C2B	
10	WES	/	
11	WES	ENDO V	Homozygote
12	WES	CEP78	Homozygote
13	WES	PINK1	Hétérozygote
14	WES	PINK1	Hétérozygote
15	WES	BRCA2	Hétérozygote composite
16	Séquençage Sanger	PIK3R1	Hétérozygote
17	Séquençage Sanger	PIK3R1	Hétérozygote
18	WES	DMBT1	Homozygote
		PIK3C2B	Hétérozygote

3. Discussion

La collaboration que nous avons entamée depuis trois ans avec le service d'Immunologie Clinique de l'hôpital Saint-Louis a permis d'analyser 18 patients atteints de DICV associé à des cancers et/ou des anomalies du développement. Nous avons sélectionné ces patients sur leur présentation clinique et leur histoire familiale très évocatrice d'un défaut de réparation de l'ADN.

Nous avons détecté un biais de répertoire seulement chez deux de ces patients (16 et 17), la fratrie touchée par une mutation hétérozygote dans le gène *PIK3R1*. Les mutations de ce gène ont été décrites récemment (Deau et al., 2014). Une étude plus large du répertoire TCR α de ces patients sera pertinente pour confirmer la réalité de ce biais chez ces patients. Si un biais de répertoire du TCR α est confirmé, il sera intéressant de comprendre à quel niveau cette protéine intervient dans le développement des thymocytes. Les premières analyses fonctionnelles n'ont pas mis en évidence d'hypersensibilité des cellules de ces patients aux agents génotoxiques testés.

Les analyses fonctionnelles sur les cellules des patients ont mis en évidence une hypersensibilité à la MMC dans 5 cas dont l'un des deux patients présentant une toxicité majeure à la chimiothérapie.

Les analyses génétiques ont permis de proposer une cause moléculaire possible au DICV dans 15 cas sur les 18. Si l'on se rapporte à la littérature, les délétions identifiées par CGH array chez les patients 4 et 5 sont très certainement à l'origine de leur pathologie. En effet, des délétions de *FAN1* ont déjà été décrites (Trujillo et al., 2012) ainsi que le déficit immunitaire dans le syndrome de Jacobsen (Seppänen et al., 2014). Il n'y a pas de doute non plus pour la mutation de *PIK3R1* identifiée chez les patients 16 et 17. Concernant les autres mutations identifiées par WES, nous en avons exclu quelques unes, soit en raison d'une prévalence importante dans une population bien spécifique (patient 11 : ENDOV dans la population d'Asie du Sud), soit en raison de la ségrégation familiale (patient 12 : CEP78). Pour les autres, il sera nécessaire d'accomplir plus d'analyses, par exemple une complémentation fonctionnelle, avant de confirmer leur responsabilité dans les pathologies.

Les différentes bases de données à notre disposition, en libre accès ou bien celle de la plateforme d'analyse génomique de l'institut Imagine à Necker, permettent de savoir si les variants identifiés sont déjà décrits, auquel cas probablement bénins, ou bien absent de la population non malade. Le fait qu'un variant ne soit pas décrit dans la population saine est un argument fort, bien que non suffisant, pour son implication dans la pathologie. Cependant dans le cas d'un individu unique et non d'une cohorte, l'interprétation peut être délicate. En effet, certaines des mutations hétérozygotes identifiées ces dernières années dans les DICV sont à pénétrance variable, par exemple les individus porteurs d'une mutation hétérozygote de *CTLA4* (Schubert et al., 2014) ne sont pas tous malades.

Le séquençage haut-débit de l'exome voire du génome offre aujourd'hui la possibilité de séquencer rapidement l'ADN d'un patient dont la maladie n'est pas caractérisée. Des projets sont en cours pour développer des puces à façon ciblant plusieurs centaines de gènes impliqués dans le système immunitaire et ainsi offrir un outil de dépistage rapide dans les déficits immunitaires primitifs (Nijman et al., 2014; Stoddard et al., 2014). Le travail que nous avons entamé a pour but d'identifier la cause moléculaire des DICV sélectionnés mais également éventuellement, d'identifier de nouveaux gènes impliqués d'une manière ou d'une autre dans la réparation de l'ADN.

Les résultats préliminaires exposés ici seront complétés par des études fonctionnelles et moléculaires. Nous disposons de plusieurs outils pour valider l'implication d'un gène : par exemple la production de virus contenant la forme sauvage du gène étudié ou l'inactivation ciblée d'un gène par CRISPR-Cas9. La production d'un virus, type lentivirus, où l'on intègre la forme sauvage du gène étudié, permet de compléter les cellules du patient et de tester les tests fonctionnels anormaux, comme l'hypersensibilité à un agent génotoxique. Si les cellules du patient ainsi transduites par le virus porteur de la forme sauvage du gène ont une réponse restaurée aux tests fonctionnels, on peut en conclure que la mutation identifiée est bien responsable du phénotype. Le système CRISPR-Cas9 est un outil dérivé d'un système de défense bactérien contre les infections par les bactériophages (Deltcheva et al., 2011). Cet outil peut être utilisé pour éditer « chirurgicalement » le génome de n'importe quelle espèce et donc obtenir relativement facilement une lignée cellulaire déficiente pour le gène étudié, permettant ainsi de valider ou invalider une mutation identifiée dans une pathologie humaine en appliquant les tests fonctionnels appropriés (Charpentier, 2015; Deltcheva et al., 2011; Hsu et al., 2014).

Cette étude sera poursuivie avec l'inclusion d'une dizaine de patients par an, selon les mêmes critères, adultes mais également pédiatriques en collaboration avec l'unité d'immunologie et hématologie pédiatrique de l'hôpital Necker (Professeur Stéphane Blanche).

4. Matériels et méthodes

A. Critères d'inclusion

Les patients sont issus d'une cohorte nationale de patients DICV (cohorte DEFI).

Les principaux critères d'inclusions pour cette étude sont :

- Présence d'un déficit immunitaire primitif: déficit sérique en immunoglobuline, éventuellement lymphopénie B et/ou T associée
- Hémopathie maligne ou cancer solide
- Anomalie du développement (microcéphalie, dysmorphie, retard de croissance)

Tous les patients, et les membres de leur famille le cas échéant, ont donné leur consentement éclairé pour une étude génétique et fonctionnelle concernant de leur pathologie.

B. Etablissement d'une banque d'ADN et de cellules

Pour constituer notre banque d'échantillons, nous avons effectué de manière systématique :

- Une extraction d'ADN génomique à partir des prélèvements de sang
- Un isolement des PBL pour immunophénotypage et extraction d'ARN
- Etablissement d'une lignée de fibroblastes à partir d'une biopsie de peau
- Dans certains cas, établissement d'une lignée lymphoïde immortalisée par le virus Epstein-Barr (EBV)

C. Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait du sang total et/ou des fibroblastes des patients par la technique phénol/chloroforme après lyse des globules rouges par un tampon TE 20/5 (20mM de Tris et 5mM d'EDTA) et lyse cellulaire O/N à 56°C par un tampon TE 20/5, SDS (0,5%), protéinase K (100µl/ml).

D. Extraction ARN

Cinq millions de PBL sont lysées dans le tampon TRIzol™ (Invitrogen), l'extraction d'ARN se fait avec le kit Ambion™ (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

E. Isolement des PBL

L'extraction des PBL (« Peripheral Blood Lymphocytes ») se fait à partir d'un échantillon de 5 à 20 ml de sang frais prélevé sur héparine ou EDTA. Le sang est dilué volume à volume dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen®) et déposé sur un milieu de séparation (Lymphoprep™) suivi d'une centrifugation 20 minutes à 2000 tours par minutes. L'anneau contenant les PBL est récupéré, lavé et les cellules sont comptées.

F. Etablissement d'une lignée de fibroblastes

Une biopsie de peau fraîche et stérile est découpée dans un environnement stérile et mise en culture par adhérence dans une boîte de culture avec du milieu RPMI +10% de SVF +1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont cultivées par la suite dans ce même milieu. Les fibroblastes sont immortalisés par transduction avec le vecteur pLAS (antigène SV40).

G. Etablissement d'une lignée B-EBV

Une lignée de lymphocytes B-EBV est établie à partir d'un prélèvement de sang sur citrate au Centre des ressources biologiques (CRB) de Necker.

H. Test de sensibilité aux agents génotoxiques

Les fibroblastes immortalisés avec l'antigène SV40, ou les lignées B-EBV, sont ensemencés dans des plaques de 24 puits, et soumis à des doses croissantes de génotoxiques en triplicats pendant 7 jours. Les cellules sont ensuite récoltées et les cellules vivantes sont comptées par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur™ (BD Biosciences) en utilisant des billes FluoSpheres® (Invitrogen) comme calibre. Les agents testés sont la Mitomycine C (Sigma-Aldrich), le cisplatine (Merck), la phléomycine (Sigma-Aldrich), l'étoposide (VP-16) (Sigma-Aldrich), l'hydroxyurée (Sigma-Aldrich), les UV, les radiations ionisantes. Des contrôles (sains, sensibles) sont testés en parallèle à chaque analyse.

I. Blocage G2/M

Les fibroblastes primaires sont ensemencés dans une plaque 6 puits, au bout de 24 heures on ajoute de la MMC (0, 20, 50 ng/ml en triplicat). Après 48 heures, les cellules sont récoltées, lavées en PBS puis fixées à l'éthanol 70° froid pendant 1 nuit à -20°C. Le lendemain les cellules sont lavées et resuspendues dans du PBS + iodure de propidium 1/20 et triton 0,1%. Le nombre de cellules en phase G1 et G2 est mesuré par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur™ (BD Biosciences).

J. Caryotype sur milieu cassant

Un contrôle est testé en parallèle du patient, 3 tubes sont préparés pour chacun, avec dans chaque tube : 1 ml de sang total prélevé sur héparine mis en culture dans 8 ml de milieu (RPMI+5%SAB+P/S) en présence de PHA 1/400 pour stimuler la prolifération des LT. Après 24 heures, la MMC est rajoutée dans 2 des 3 tubes, à la concentration finale de 30 ng/ml et 60 ng/ml. Les cellules sont laissées en culture encore 48h. La sortie de culture se fait après un blocage des cellules en métaphase par ajout de 80 µl de Colcémid 100x (Sigma-Aldrich) pendant 1h, puis choc hypotonique dans 4ml de KCl à 5,6g/l pendant 20 minutes à 37°C, préfixation avec 1 ml de méthanol/acide acétique (3vol/1vol) et 2 ou 3 fixations avec 5 ml de méthanol/acide acétique. Après 24 heures, les lames sont préparées par étalement des culots cytogénétiques et colorées par le Giemsa (5 minutes). Pour chaque condition (sans MMC, avec

30 ng/ml et 60 ng/ml de MMC, témoin et patient), au moins 30 mitoses sont analysées et le nombre de cassure chromosomique et/ou image tri- quadriradiale sont rapportées.

K. Analyse des télomères

La mesure de la longueur des fragments de restriction télomériques est effectuée par Southern blot (Touzot et al., 2010).

L. Séquençage de l'exome

Les ADN génomique seront extraits par la méthode au phénol/chloroforme puis purifiés sur filtre Amicon YM-30 (Millipore).

L'enrichissement en séquences exoniques est réalisé à partir de 3 µg d'ADN génomique avec le système de capture par hybridation en phase liquide Agilent SureSelect (kit Human All Exons 54Mb) selon les recommandations du fournisseur en utilisant un système de code-barre. Les banques d'exomes multiplexées sont séquencées sur HiSeq2500 (Illumina) en mode « paired-end 134+134 » (134 bases lues sur le brin sens + 134 bases sur le brin antisens). Après démultiplexage, les paires de séquences sont alignées avec BWA sur le génome humain de référence (NCBI build37/hg19 version). La couverture moyenne attendue est supérieure à 90X avec plus de 95% de l'exome couvert à 15X. Les SNP et indels sont détectés avec des outils GATK (SNP & indels Calling). Le filtrage des variants est réalisé avec l'interface web maison PolyWeb (Necker-Imagine).

Le séquençage de l'exome a été réalisé par la Plateforme Génomique Imagine (Institut Imagine des Maladies Génétiques, Paris 15e) et l'analyse des données par la Plateforme Bioinformatique de l'Université Paris-Descartes.

Partie 3: Etude fonctionnelle d'un facteur impliqué dans la réparation de l'ADN

1. Résultats

Manuscrit en cours de soumission en annexe

A. Description clinique et biologique

Cette étude concerne une jeune fille de 14 ans, née prématurément à 36 semaines d'aménorrhée (poids 2400g, taille inconnue). Ses parents sont cousins germains d'origine algérienne, elle a un frère aîné bien portant, en dehors d'une hypothyroïdie substituée (voir figure 29).

La croissance de cette patiente était initialement régulière pour le poids (-2DS) et la taille (entre -2 et -3DS) avec une cassure depuis l'âge de 10 ans (poids <-3DS, taille <-4DS). La patiente a un périmètre crânien normal, un développement neurocognitif normal, mais une surdité de perception d'origine inconnue. Elle a présenté des infections récurrentes dès les premières années de vie (otites, pleuro-pneumopathies, deux fois la varicelle).   l'âge de 3 ans, elle a développé un purpura thrombopénique immunologique (PTI) avec présence d'anticorps anti-GpIIb/IIIa traité par corticothérapie, à 4 ans une lymphoprolifération avec hépato-splénomégalie et adénopathies périphériques et profondes et à 5 ans une anémie hémolytique auto-immune (AIHA) avec un test de Coombs positif (IgG), à nouveau traité par corticothérapie.

Elle a été adressée à l'unité d'immunologie et hématologie pédiatrique (UIH) de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Paris)   l'âge de 7 ans en raison de la persistance du syndrome lymphoprolifératif. Le traitement par mercaptopurine a dû être arrêté à cause des pneumopathies récidivantes. Une splénectomie totale a été effectuée à l'âge de 8 ans suite à la thrombocytopénie et à l'anémie auto-immune réfractaires aux traitements

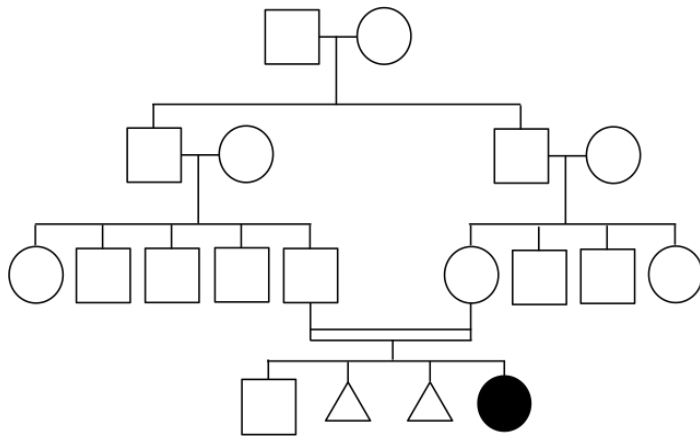


Figure 29 Arbre généalogique de la famille de la patiente

Elle a par la suite développé une hypertension intracrânienne. L'analyse du liquide céphalo-rachidien montre une hyperprotéinorachie (0,56g/L) avec synthèse intrathécale d'IgG, un infiltrat inflammatoire polymorphe à prédominance lymphocytaire, certains lymphocytes d'aspect activé, quelques monocytes et plasmocytes, la recherche de virus par PCR est négative (EBV, CMV, HHV8). Les scanner et IRM cérébraux (figure 30A) ont révélé hypodensité postérieure droite corticale et sous-corticale avec prise de contraste nodulaire. La patiente a été traitée par cyclophosphamide et rituximab et un traitement substitutif par immunoglobulines intraveineuses a été instauré.

Elle souffre également de pneumopathies récidivantes depuis l'âge de 4 ans. Un scanner thoracique effectué à l'âge de 10 ans révèle un syndrome alvéolo-interstitiel et nodulaire (Figure 30B). Le dernier scanner (14 ans) montre l'apparition de micronodules non solides, bilatéraux et diffus. La patiente a été traitée par corticothérapie à forte dose et mycophénolate mofétil.

Depuis l'âge de 8 ans, elle a également présenté une élévation des enzymes hépatiques (figure 31). Un scanner abdominal réalisé à l'âge de 14 ans montre une stéatose focale et une échographie hépatique révèle un foie dysmorphique présentant des structures hyper-échogènes, hétérogènes, sans lésion focale ou nodulaire et sans signes d'hypertension portale. La recherche d'agents infectieux est négative ainsi que la recherche d'auto-anticorps (AAN, anti-muscle lisse, anti-LKM1, anti-mitochondries, anti-ribosomes).

La recherche de virus dans le sang montre quelques épisodes de réplication virale de l'EBV et du CMV (figure 32).

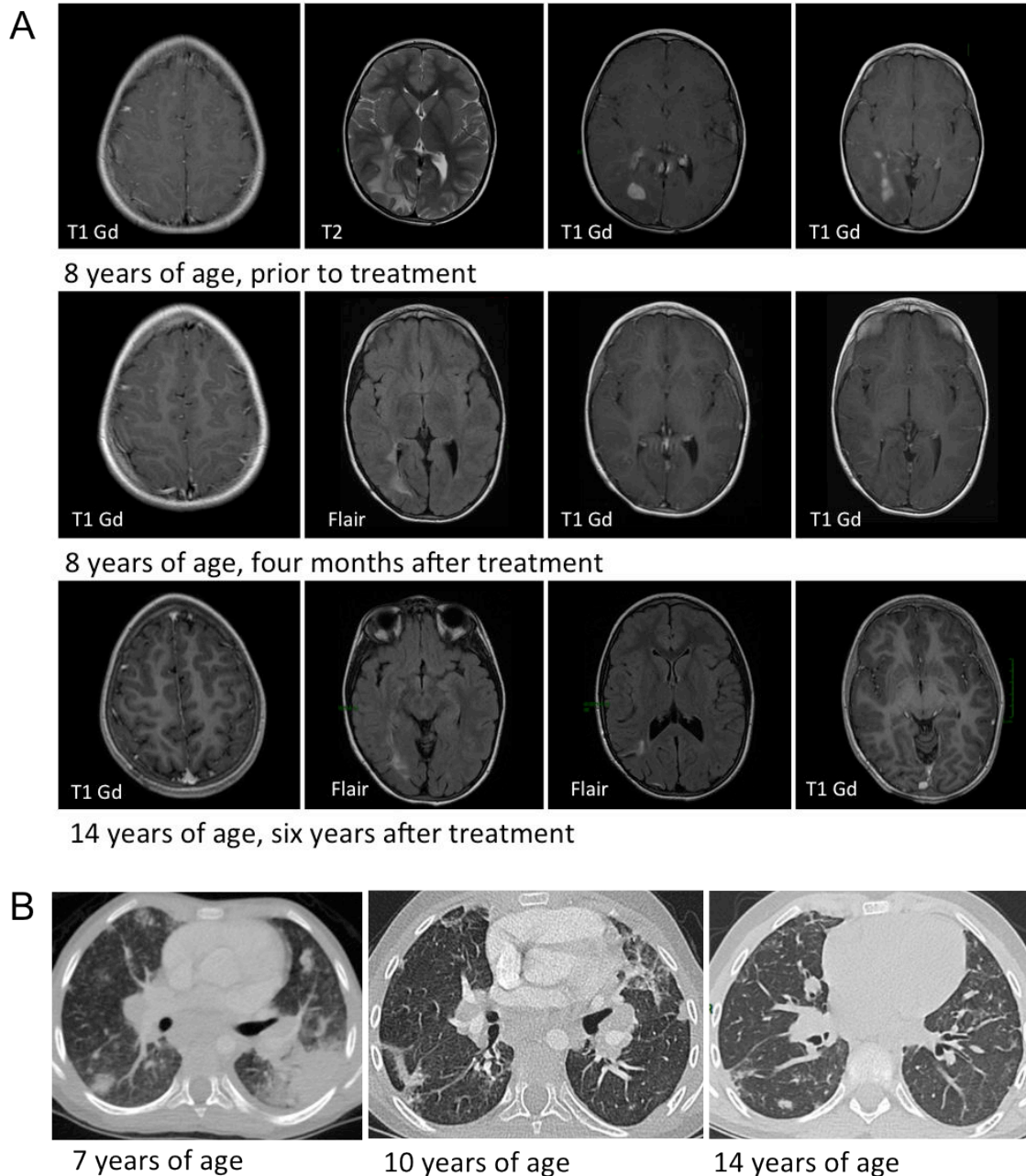


Figure 30 Imagerie, IRM cérébral à différents temps (A) et scanner thoracique (B)

- A. IRM cérébral du patient. A l'âge de 8 ans, on note une hyperintensité sous-corticale et corticale de l'hémisphère cérébelleux droit avec prise de contraste, une très importante hyperintensité corticale et sous-corticale postérieure droite avec prise de contraste ainsi qu'une petite image arrondie hyperintense avec prise de contraste punctiforme frontale droite. Quatre mois plus tard, après traitement, l'IRM montre une régression de l'œdème. Au dernier contrôle à l'âge de 14 ans, l'IRM montre uniquement des images séquellaires stables et discrètes.
- B. Le scanner thoracique montre à l'âge de 7 ans la présence d'adénopathies médiastinales et une pneumopathie parenchymateuse bilatérale diffuse. La pneumopathie est modérément améliorée à l'âge de 10 ans. Le dernier scanner (14 ans) montre des nodules bilatéraux.

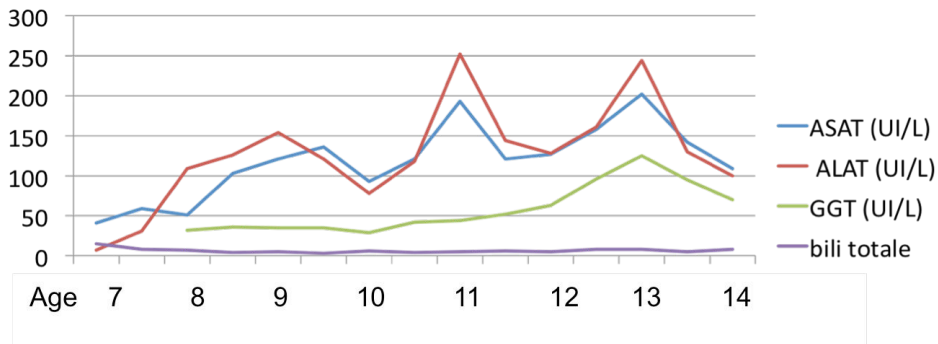


Figure 31 Dosage des enzymes hépatiques au cours du temps

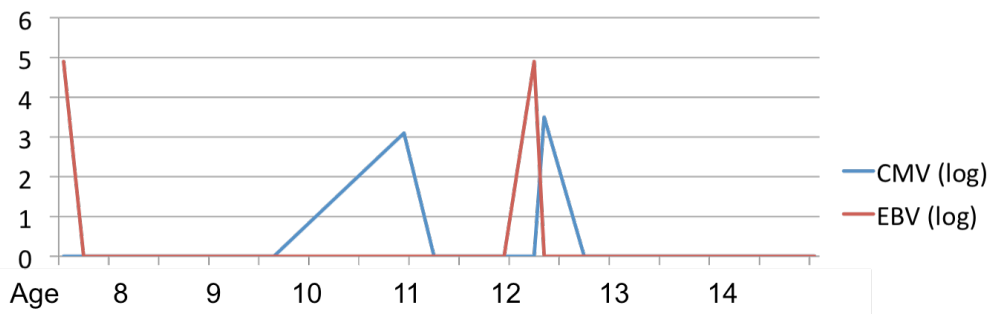


Figure 32 Virémie CMV et EBV au cours du temps

B. Anatomie-pathologie

L'analyse histologique de la rate a montré une hyperplasie de la pulpe blanche composée de multiples follicules lymphoïdes avec centre clair germinatif. L'immunohistochimie révèle de discrètes anomalies de répartition des lymphocytes B en périphérie de la zone du manteau et quelques anomalies du réseau de cellules folliculaires dendritiques sans infiltrats de lymphocytes T. Pas de réarrangements de cellules B ou T clonales ont été détectés dans la rate par biologie moléculaire (figure 33A).

Deux biopsies cérébrales ont montré un discret infiltrat inflammatoire lymphocytaire péri-vasculaire essentiellement composé de lymphocytes CD3+ polyclonaux. La recherche d'agent infectieux sur le tissu cérébral était négative (PCR pour le CMV, EBV, HHSV1-2, HHV6-8), la recherche du virus de l'EBV par hybridation in situ avec la sonde dans EBER était également négative.

La biopsie pulmonaire réalisée à l'âge de 11 ans a révélé des nodules fibro-inflammatoires composé par des fibroblastes, des petits lymphocytes matures, principalement CD3+, des macrophages et des histiocytes. Le marquage par la sonde EBER était négatif (Figure 33B).

La biopsie hépatique réalisée à l'âge de 14 ans montre des lésions inflammatoires et une fibrose septale avec une architecture anormale des vaisseaux portes dans certains espaces portes. L'immunohistochimie montre que les infiltrats sont majoritairement composés de lymphocytes T CD4+ et la persistance de la trame réticulinique exclu un carcinome hépatocellulaire (figure 33C).

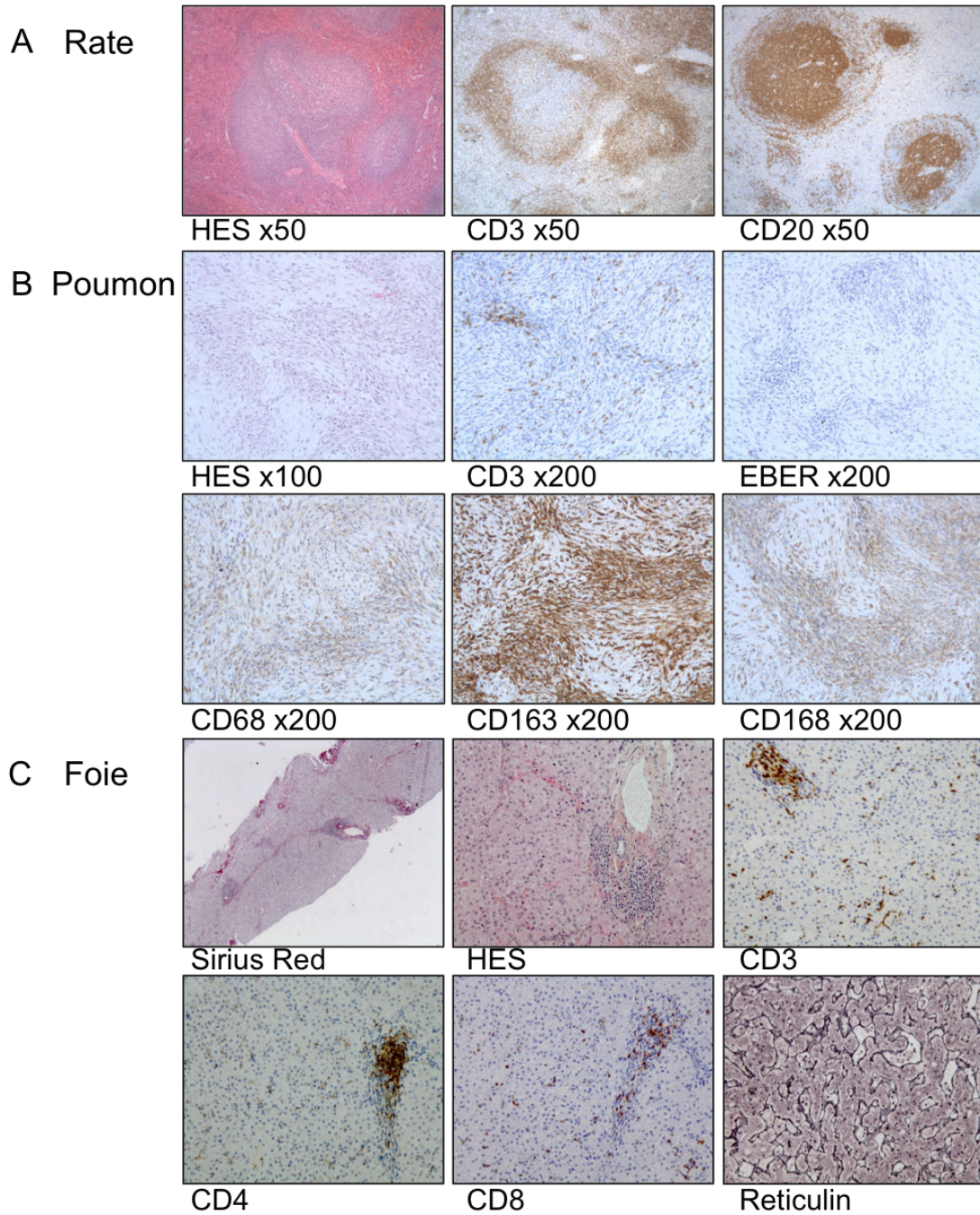


Figure 33 Coupes d'histologie et d'immunohistochimie de la rate (A), du poumon (B) et du foie (C)

- A. L'analyse histologique de la rate montre une hyperplasie de la pulpe blanche composée de multiples follicules lymphoïdes avec un centre germinatif clair. L'immunohistochimie montre une distribution anormale des LB autour de la zone du manteau et un réseau anormal des cellules dendritiques folliculaires. Il n'y a pas d'infiltrat CD3+.
- B. L'analyse histologique des poumons montre des nodules fibro-inflammatoires composés de fibroblastes, de petits lymphocytes matures, de macrophages et d'histiocytes. L'immuno-marquage par le CD3, le CD20 et la sonde EBER est négatifs.
- C. L'histologie du foie montre des lésions fibrotiques et inflammatoires ainsi qu'une architecture anormale des vaisseaux porte dans certains espaces porte. Le marquage positif à la réticuline exclut un processus tumoral. Les infiltrats lymphocytaires sont CD4+.

C. Bilan immunologique

Lors de la première présentation de la patiente dans notre unité à l'âge de 7 ans, le chiffre absolu de lymphocytes était dans les normes avec une distribution normale des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. Cependant les LT naïfs CD4⁺ et CD8⁺ étaient diminués. Le profil sérique des immunoglobulines était en faveur d'une altération de la fonction des lymphocytes B: absence d'IgA et IgG diminuées. Les tests de prolifération des lymphocytes T initialement négatifs étaient normaux après stimulation par PHA et antigènes (Candida, anatoxine tétanique et tuberculine) lorsqu'ils ont été contrôlés après arrêts des corticoïdes et revaccination.

À l'âge de 11 ans, trois ans après la dernière cure de rituximab, une numération faible des LB était associée à une diminution des LB mémoires switchés et non switchés. Des tests fonctionnels sur les LB ont montré *in vitro* une recombinaison isotypique faible en réponse à l'activation CD40L+IL4 avec une prolifération normale. Le séquençage du gène *AID* était normal.

Par ailleurs, les taux de LT CD8⁺ ont considérablement augmenté au cours du temps avec apparition d'une inversion du rapport CD4 / CD8. Lors du dernier bilan, le pourcentage de LT naïfs CD4⁺ et CD8⁺ était faible avec un taux élevé de LT CD8⁺ effecteurs mémoire.

En outre les lymphocytes T régulateurs (CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺) sont faibles chez la patiente (1,56%) par rapport au témoin (3,42%). Les principales caractéristiques immunologiques de la patiente sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 Bilan immunologique à différents âges

Age at evaluation	7 years	9 years	11 years	14 years
Cell count				
Lymphocytes count (cells/mm ³)	2700 (1900-3700)	4500 (1900-3700)	4000 (1900-3700)	3500 (1400-3300)
CD3 ⁺ (cells/mm ³)	2349 (1200-2600)	3420 (1200-2600)	2760 (1200-2600)	3150 (1000-2200)
CD4 ⁺ (cells/mm ³)	1269 (650-1500)	1170 (650-1500)	760 (650-1500)	875 (530-1300)
CD8 ⁺ (cells/mm ³)	972 (370-1100)	2070 (370-1100)	1880 (370-1100)	1995 (330-920)
CD19 ⁺ (cells/mm ³)	216 (270-860)	315 (270-860)	122 (270-860)	315 (110-570)
NK (cells/mm ³)	81 (100-480)	585 (100-480)	800 (100-480)	35 (70-480)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	1,3 (0.9-2.6)	0,6 (0.9-2.6)	0,4 (0.9-2.6)	0,4 (0.9-2.6)
Naïve CD4 ⁺ T cells : CD31 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ (%)	14 (43-55)		24 (43-55)	10 (43-55)
Naïves CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ (%)	24 (52-68)		10 (52-68)	4 (52-68)
Memory CD4 ⁺ T cells : CD45RO ⁺ /CD4 ⁺ (%)			68 (13-30)	62 (18-38)
Central memory CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ /CD8 ⁺ (%)			1 (11-20)	2 (3-4)
Effector memory CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ (%)			25 (16-28)	73 (11-20)
Naïve B cells : CD27 ⁻ IgD ⁺ (%)			94 (67,5-83,4)	95 (67,5-83,4)
Switched Memory B cells : CD27 ⁺ , IgD ⁻ (%)			4 (6,5-14,2)	2 (6,5-14,2)
Non-switched memory B cells : CD27 ⁺ , IgD ⁺ (%)			1 (4,1-9,2)	1 (4,1-9,2)
T- cell proliferation				
<i>Mitogens</i>				
PHA (x10 ⁻³ cpm)	267 (>50)	88 (>50)		
<i>Antigens</i>				
Candida (x10 ⁻³ cpm)	0,8 (>10)	54,5 (>10)		
Tetanus toxoid (x10 ⁻³ cpm)	3 (>10)	145,5 (>10)		
Tuberculin (x10 ⁻³ cpm)	5,5 (>10)	64 (>10)		
Ig dosage				
IgG (g/l)	4 (5,82-11,54)		10,63 (6,55-12,29)	9,4 (6,55-12,29)
IgA (g/l)	<0,15 (0,46-1,57)		0,15 (0,50-2,03)	<0,05 (0,50-2,03)
IgM (g/l)	1,44 (0,54-1,55)		<0,10 (0,53-1,62)	0,19 (0,53-1,62)
Ig replacement therapy	-		+	+

D. Recherche moléculaire

L'autoimmunité hématologique et le syndrome lymphoprolifératif ont dans un premier temps fait suspecter un syndrome ALPS (« Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome ») (Rieux-Laucat et al., 2003). Les principaux tests de dépistage de cette pathologie étaient normaux : absence d'augmentation des LT double négatifs dans le sang et apoptose médiée par FAS et TRAIL normale. De plus le séquençage des gènes impliqués dans ce syndrome était normal (*FAS* et *FAS Ligand*).

Cette présentation clinique, en particulier la lymphoprolifération intracérébrale et le déficit en lymphocytes T régulateur est également évocatrice d'une mutation dans le gène *CTLA4*, syndrome récemment décrit (Kuehn et al., 2014; Schubert et al., 2014). Le séquençage de ce gène est également normal.

Enfin, en raison de l'association du déficit en lymphocytes T naïfs, de l'auto-immunité et du syndrome lymphoprolifératif, les gènes couramment impliqués dans un déficit immunitaire combiné ont été séquencés sans qu'aucune mutation n'est été détectée (*RAG1*, *RAG2*, *ARTEMIS*, *CERNUNNOS*).

E. Etude de la réparation de l'ADN in vitro

Comme les déficits de la réparation de l'ADN peuvent être responsables d'un déficit immunitaire combiné, nous avons effectué différents tests fonctionnels sur les fibroblastes de patients afin de mieux décrire phénotype cellulaire.

Le test de recombinaison V(D)J *in vitro* était normal (données non présentées). Nous avons ensuite évalué la sensibilité des fibroblastes du patient après traitement par différents agents génotoxiques. Il n'a pas été détecté de sensibilité aux rayonnements ionisants (IR), à l'étoposide ou au cisplatine (résultats non présentés). En revanche, les fibroblastes du patient présentent une sensibilité accrue à la Mitomycine C (MMC), un agent pontant de l'ADN, similaire à celle observée pour les fibroblastes de patients Fanconi (FA) (figure 34A). Par ailleurs, les cellules du patient n'ont pas montré d'accumulation en phase G2 après le traitement par la MMC contrairement à ce qui est observé pour les cellules de patients FA (figure 34B) et contrairement aux cas de patients FA, on note une ubiquitination normale de FANCD2 après un traitement de MMC (figure 34C). Enfin, on n'observe pas d'augmentation des cassures chromosomiques après traitement par la MMC. Cette augmentation observée de la sensibilité à MMC dans les fibroblastes de la patiente suggère un défaut dans un facteur impliqué dans les mécanismes de réparation d'ADN.

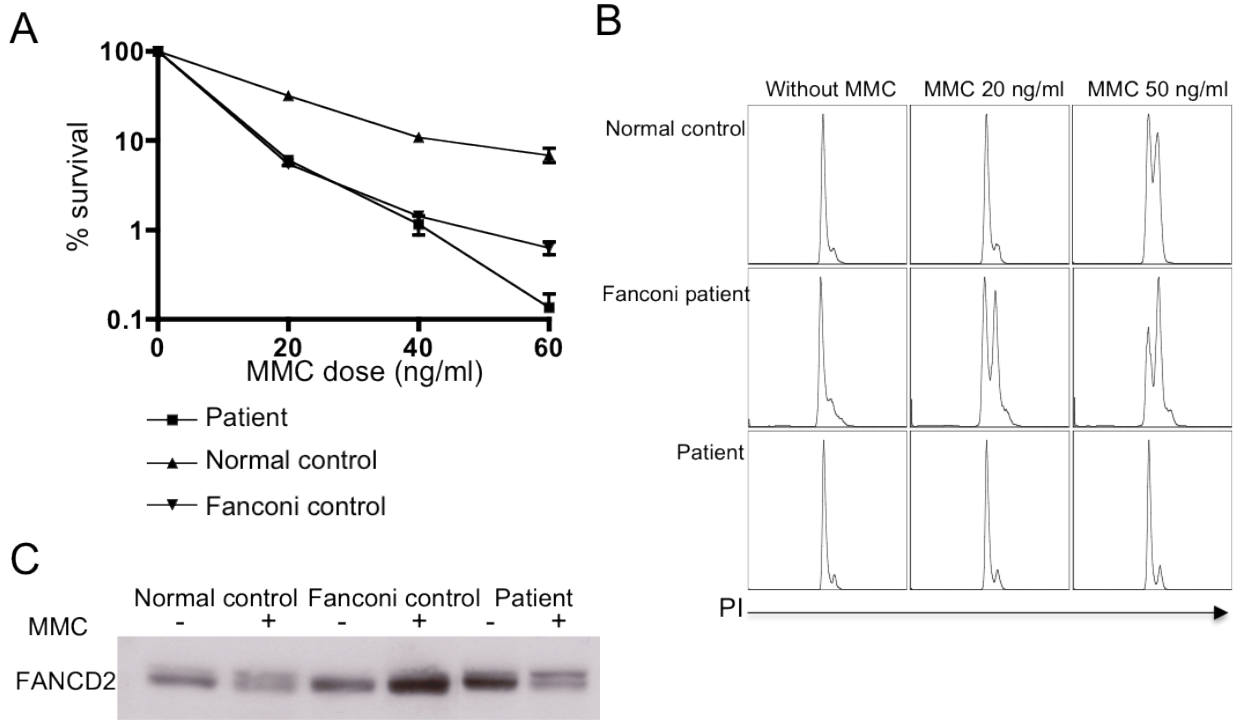


Figure 34 Etude de la réparation de l'ADN *in vitro*

- A. Les fibroblastes de la patiente ont une sensibilité à la MMC similaire à celle observée pour les patients FA.
- B. Les fibroblastes de la patiente ne s'accablent pas en phase G2/M après traitement par la MMC.
- C. Un western-blot après traitement des cellules par la MMC montre une ubiquitination de FANCD2 normale

F. Recherche d'une cause moléculaire au déficit immunitaire

1) Analyse de l'exome

En raison de la consanguinité familiale (figure 35A), nous avons effectué un « tour du génome » par « Genome Wide Homozygosity Mapping » (GWHM) en combinaison avec un séquençage de l'exome (WES) par « Next Generation Sequencing » (NGS) sur l'ADN génomique de la patiente. Nous avons filtré l'analyse par recherche de mutations homozygotes au sein des régions candidates définies par le GWHM (figure 35B).

Parmi les 19 gènes candidats possibles (voir tableau 7), le SNV identifié dans le gène *FANCM* a été exclu car il s'agit d'une mutation synonyme sans altération de l'épissage détecté par PCR sur l'ADNc (données non présentées).

Nous nous sommes ensuite intéressé à un SNV identifié dans le gène *ERCI* (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1) que l'on nommera *ELKS* par la suite. Ce facteur intervient au cours de la réponse au stress génotoxique (Wu et al., 2006b)(Wu et al., 2010). La présence de cette mutation a été confirmée par séquençage de Sanger sur l'ADN génomique de la patiente ainsi que la ségrégation de la mutation dans la famille (figure 35C). La patiente porte une mutation faux-sens homozygote dans l'exon 3: c.759G> T, p.R253S. Ce SNV, rs147755448, est rare avec une fréquence de $1,4 \times 10^{-4}$, et aucune mutation homozygote n'a été décrite à ce jour (60K Genome Project, ExAC Browser). En outre, l'acide aminé muté R253 est hautement conservé parmi les espèces (figure 35D). Cette mutation pourrait être considérée comme éventuellement délétère avec un score PHRED de 14,73 par CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>).

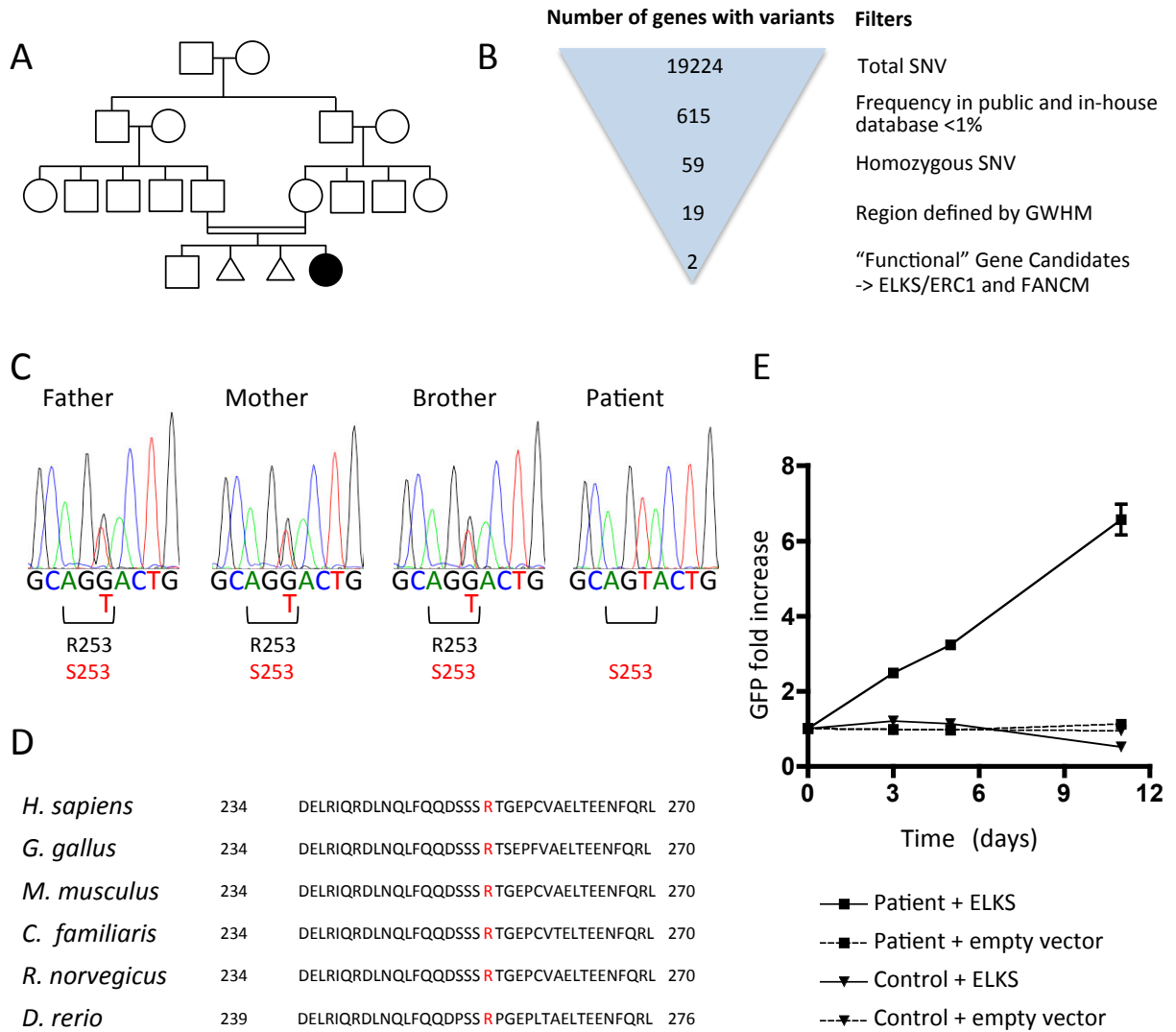


Figure 35 Analyse génétique

A. Arbre généalogique de la famille

B. Approche génétique utilisée pour l'analyse du séquençage de l'exome

C. Confirmation de la mutation c759G>T dans le gène ELKS chez le patient et les membres de la famille

D. Alignement de ELKS chez différentes espèces, acide aminé muté en rouge.

E. Résultat de la complémentation fonctionnelle par la technique de MCA. L'avantage sélectif des cellules GFP+ transduites par la forme sauvage du gène ELKS est mesuré au cours du temps après traitement par la MMC à la dose de 12,5 ng/ml.

**Tableau 7 Gènes identifiés par WES
et GWHM**

Gène	Chromosome
USH2A	1
ADAM23	2
ERC1/ELKS	12
FANCM	14
CHRNA7	15
EMP2	16
OGFOD1	16
KATNB1	16
CNGB1	16
RNF126	19
C19orf24	19
ADAMTSL5	19
TJP3	19
EBI3	19
ZSCAN4	19
MBD3	19
FUT5	19
ACO24592.12	19
NDUFA11	19

2) Etude de ELKS

a) Complémentation fonctionnelle

Afin de valider la mutation identifiée dans ELKS, nous avons effectué des études de complémentation fonctionnelle par « multicolor competition assay » (MCA) après traitement par la MMC (Smogorzewska et al., 2007) (Figure 36). Les fibroblastes de la patiente et d'un contrôle ont été transduits avec un vecteur lentiviral exprimant ELKS-WT ou un vecteur vide, les deux co-exprimant également la GFP. Un mélange de fibroblastes transduits (GFP+) et non transduits (GFP-) ont été soumis à un traitement par la MMC à la dose de 12,5 ng/ml. L'expression de ELKS-WT confère un avantage sélectif aux cellules de la patiente avec une augmentation 6 fois supérieure du nombre de cellules GFP+ après 12 jours de traitement (figure 35E). Ce résultat suggère l'implication de la mutation de ELKS dans la sensibilité à la MMC des fibroblastes de la patiente.

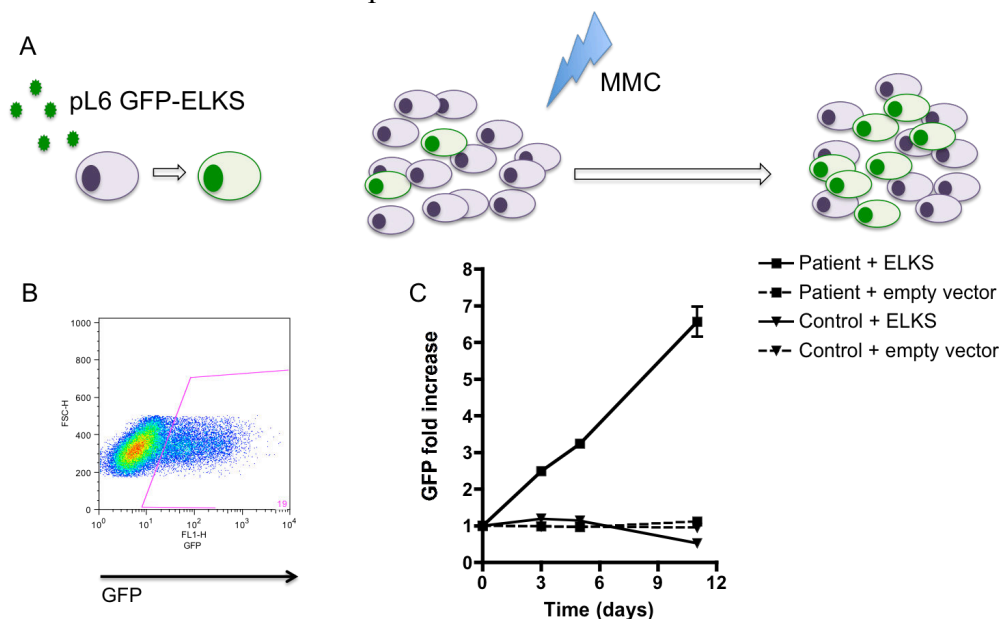


Figure 36 Complémentation fonctionnelle par Multicolor Competition Assay

Principe de la technique : les fibroblastes de la patiente et d'un contrôle sont transduits avec un lentivirus coexprimant la GFP et la forme sauvage de ELKS ou un vecteur exprimant la GFP seule (empty vector) (A). Un mélange de cellules transduites (GFP+) et non-transduites (GFP-) sont soumises pendant plusieurs jours à un traitement par la MMC. Au cours du traitement, le taux de cellules GFP+ est mesuré par cytométrie en flux (B). Seules les cellules de la patientes transduites avec le vecteur GFP-ELKS wt montre un avantage sélectif lorsqu'elles sont traitées par la MMC (C).

b) Etude d'un modèle murin

Pour évaluer le rôle potentiel de ELKS dans le développement du système immunitaire, nous avons analysé un modèle murin d'inactivation conditionnelle de ce gène.

L'inactivation complète de ce gène est létale chez la souris (Liu et al., 2014). Nous avons vérifié cette létalité en croisant deux souris $ELKS^{null/WT}$ ensemble. Parmi les 45 petits nés, 32 avaient un génotype $ELKS^{null/WT}$, 13 $ELKS^{WT/WT}$ et aucun $ELKS^{null/null}$, ce qui est compatible avec la létalité embryonnaire décrite.

Pour élucider la fonction de ELKS au cours du développement et dans l'homéostasie lymphocytaire, nous avons généré des souris KO conditionnelles pour ELKS dans le système hématopoïétique en utilisant une Cre d'expression hématopoïétique (VavCre). La suppression complète de ELKS dans les organes hématopoïétiques a été confirmée par PCR et Western blot sur la rate et le thymus. Comme attendu, l'allèle $ELKS^{loxP}$ n'était pas détectable par PCR dans les organes hématopoïétiques chez les souris $ELKS^{null/loxP}/VavCre+$ et $ELKS^{loxP/loxP}/VavCre+$ (figure 37A) et l'analyse par Western Blot a confirmé l'absence de la protéine ELKS dans les organes hématopoïétiques (figure 37B).

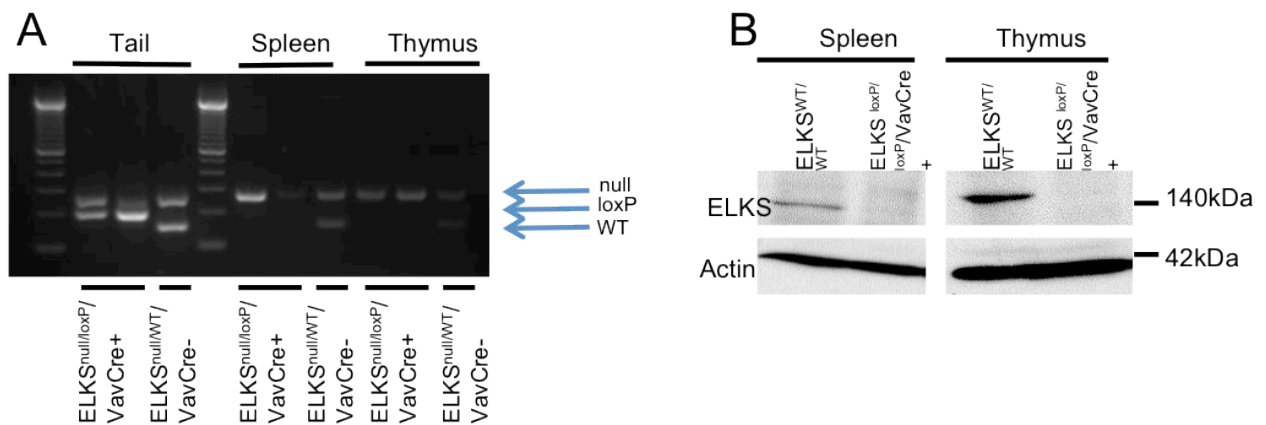


Figure 37 Vérification de l'inactivation de ELKS par biologie moléculaire et Western Blot

- Une PCR triplex permet de distinguer les allèles ELKS wt (150 pb), ELKS loxP (200 pb) et ELKS null (250 pb) sur l'ADN extrait des queues de souris, de la rate et du thymus.
- Un western blot sur les protéines extraites de la rate et du thymus de souris $ELKS^{WT/WT}$ et $ELKS^{loxP/loxP}/VavCre+$ montrant la délétion de ELKS dans les tissus hématopoïétiques des souris $ELKS^{loxP/loxP}/VavCre+$.

Le développement et la maturation des lymphocytes B et T ont été analysés chez les souris adultes âgées de 10 à 12 semaines.

Nous avons évalué la présence d'une splénomégalie. Il n'existe aucune différence significative dans le poids de la rate entre les souris contrôle (114+/-11 mg) et les souris $ELKS^{loxP/loxP}/VavCre+$ (122+/-16 mg), le nombre absolu de splénocytes est légèrement

augmenté pour les souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ (p=0,04) (figure 38A). L'analyse de la rate ne montre aucune différence significative dans la proportion de LT CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ (figures 38B et 38C). Nous avons ensuite analysé la proportion de LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs, mémoires et effecteurs dans la rate (Figure 38D) et les ganglions lymphatiques (données non présentées). On note uniquement une légère diminution des LT CD8⁺ mémoires dans la rate des souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ par rapport aux souris contrôle (p = 0,04). En raison de la diminution en LT régulateurs chez la patiente, nous avons évalué cette population parmi les splénocytes murins par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD25 et anti-FoxP3 mais nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les deux groupes de souris (figure 38E). Nous avons également testé la capacité de prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ après activation des splénocytes par des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Là encore nous ne détectons aucune différence entre les souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ et les souris contrôle (figure 38F).

Nous avons ensuite analysé le thymus des souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ et des souris contrôle. Nous n'avons détecté aucune différence significative dans le nombre absolu de thymocytes (figure 39A), dans le pourcentage de thymocytes doubles positifs (CD4⁺/CD8⁺), double négatifs (CD4⁻/CD8⁻) et simple positifs CD4⁺ ou simple positifs CD8⁺ (figure 39B).

Enfin, nous avons analysé le développement des LB dans la moelle osseuse par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-B220 et anti-IgM (Figure 39C) et la maturation des LB dans la rate avec les anticorps anti-B220, anti-IgM, anti-CD21 et anti-CD23 (figure 39D). Nous n'avons noté aucune différence concernant les LB entre les souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ et les souris contrôle.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'inactivation conditionnelle de ELKS dans le système hématopoïétique murin n'a pas d'impact évident sur le développement et la maturation des lymphocytes B et T, sur le développement des LT régulateurs ni dans l'activation des LT en réponse à une stimulation par le CD3 et le CD28.

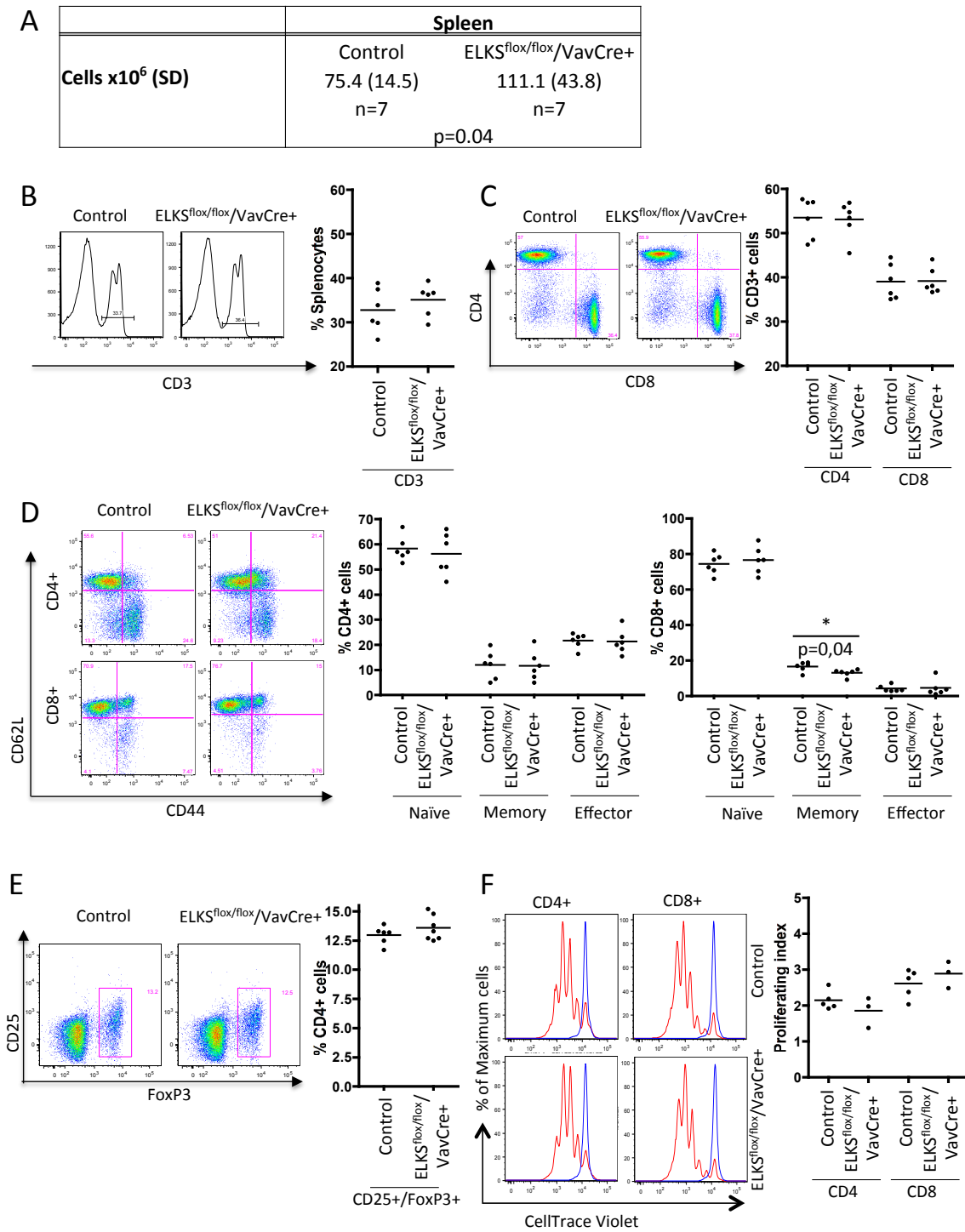


Figure 38 Analyse des LT de la rate chez les souris KO conditionnel pour ELKS

- Numération absolue des splénocytes (moyenne +/- écart type)
- Analyse des LT CD3⁺ dans la rate
- Analyse des splénocytes CD4⁺ et CD8⁺
- Analyse des LT naïfs, mémoires et effecteurs
- Analyse des LT régulateurs : cellules CD25⁺/FoxP3⁺ parmi les LT CD3⁺/CD4⁺ de la rate
- Prolifération des LT après stimulation par des billes CD3/CD28 déterminée par dilution du marqueur CellTrace Violet. Le taux de prolifération des splénocytes CD4⁺ et CD8⁺ est mesuré après 3 jours de stimulation. Le pic bleu correspond aux cellules non stimulées. L'index de prolifération est déterminé par le logiciel FlowJo (nombre total de divisions divisé par la nombre de cellules qui se sont divisées).

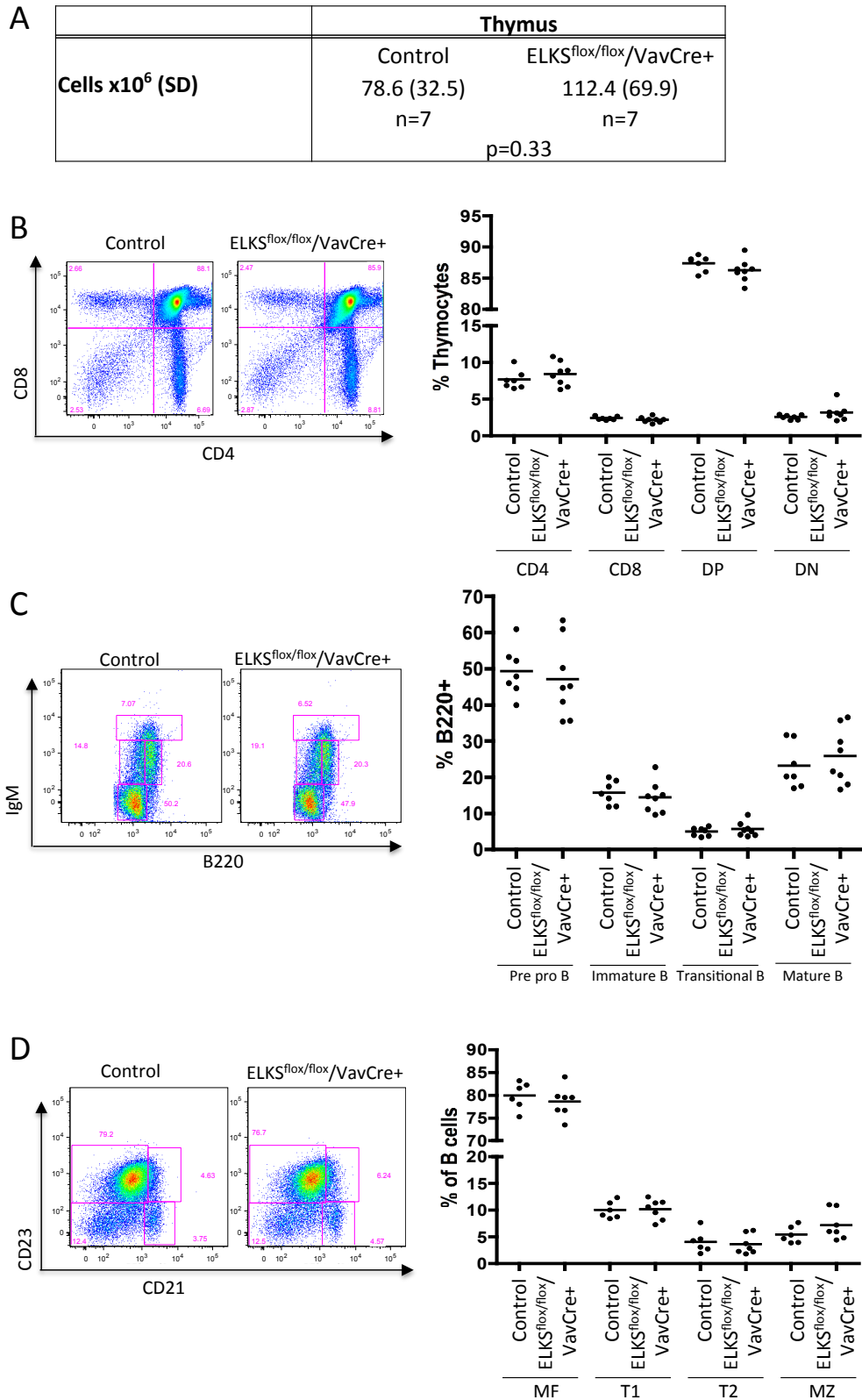


Figure 39 Analyse du thymus et des LB chez les souris KO conditionnel pour ELKS

- A. Nombre absolu de thymocytes (moyenne +/- écart-type)
- B. Analyse des thymocytes avec les marqueurs CD4 et CD8
- C. Analyse du développement des LB dans la moelle osseuse avec les marqueurs B220 et IgM.
- D. Analyse de la maturation des LB dans la rate avec les marqueurs CD21, CD23, parmi les cellules B220+/IgM+

3) Identification et analyse de *BACH2*

a) Analyse génétique

Plusieurs cas ont été décrits de mutations avec pénétrance variable, parfois totalement asymptomatique, chez des porteurs sains. Nous avons donc décidé de réanalyser les données du WES sans filtrer avec les données du GWHM, mais en gardant l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive. De cette manière, l'analyse du séquençage de l'exome de cette patiente a révélé une autre mutation homozygote, potentiellement délétère (score polyphen : 0,621) dans un gène codant pour un facteur de transcription important dans le développement du système immunitaire.

Il s'agit d'une mutation dans le gène *BACH2* situé sur le chromosome 6. La mutation identifiée est dans l'exon 7 de ce gène, c'est une mutation faux-sens : c.1394 G>T, qui transforme une glycine en valine. Cette mutation n'avait pas été relevée lors de l'analyse initiale du WES car elle ne se situe pas dans une région du génome définie par le GWHM. Le séquençage de cette mutation par la technique de Sanger chez les parents, le frère et la patiente montre en effet que les deux parents sont porteurs de la mutation à l'état hétérozygote alors que la patiente ainsi que son frère, bien portant, sont porteurs de la mutation à l'état homozygote (figure 40). L'étude de l'expression du gène sur le cDNA montre qu'elle est conservée chez la patiente.

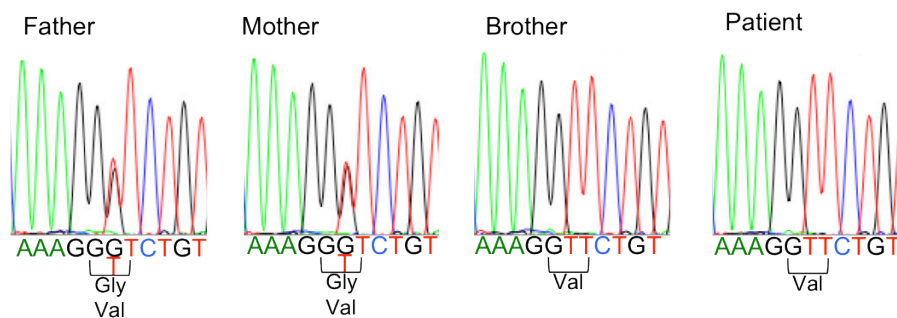


Figure 40 Séquençage de la mutation c.1394 G>T dans l'exon 7 du gène *BACH2*

La mutation est présente à l'état hétérozygote chez les 2 parents et homozygote chez la patiente et chez son frère.

b) Description de la protéine

BACH2 code pour un répresseur transcriptionnel dont la principale cible est Prdm1 (Blimp1). La protéine BACH2 comporte 841 acides aminés, Elle possède un domaine BTB dans la région N-terminale et un domaine bZIP dans la région C-terminale. La mutation identifiée dans cette famille se trouve au niveau d'une toute petite région conservée entre BACH1 et BACH2 (Figure 41, communication personnelle, Isabelle Callebaut).

BACH1 (human) SSDR**S**VERE**V**AEHL**A**KGF**W**SDI
BACH2 (human) YSGV**S**SLDK**D**LSEP**V**PK**G**LW**V**G**A**

Figure 41 Alignement de la région conservée entre BACH1 et BACH2

En gras les acides aminés identiques, en souligné les conservations hydrophobes. La glycine (en rouge), muté dans cette famille, serait en début d'une région susceptible de former un brin beta. L'abondance de serine dans cette région laisse penser à de possibles phosphorylations.

Il a été montré chez la souris que Bach2 est requis pour la différenciation et la fonction des LT périphériques et pour le développement des lymphocytes T régulateurs. En l'absence de Bach2, on observe une augmentation de la différenciation des LT CD4+ en LT effecteurs produisant des niveaux élevés de cytokines (IL-4 et IL-10) (Tsukumo et al., 2013) ainsi qu'une diminution de la production des lymphocytes T régulateurs (Kim et al., 2014; Roychoudhuri et al., 2013). Il est donc probable que Bach2 ait un rôle important dans l'homéostasie des LT.

Bach2 réprime l'expression de Prdm1 avec également pour conséquence une inhibition de la différenciation terminale des LB en plasmocytes. En effet, l'inhibition de Prdm1 permet le maintien d'une fenêtre temporelle pour l'expression de *Aicda* codant pour AID, enzyme indispensable au CSR et aux SHM. Ainsi Bach2 est nécessaire pour le CSR et les SHM lors de l'activation des LB (Igarashi et al., 2014).

Des études de liaison ont montré des associations entre des polymorphismes au niveau du locus BACH2 et certaines pathologies dysimmunitaires (asthme, maladie de Crohn, maladie cœliaque, sclérose en plaque, diabète de type 1) (Cooper et al., 2008; Dubois et al., 2010; Ferreira et al., 2011; Lee et al., 2011; Plagnol et al., 2011) et une étude a rapporté la présence de mutation hétérozygote dans le gène BACH2 chez deux patients pédiatriques atteints de rectocolite hémorragique (Christodoulou et al., 2013). A notre connaissance, aucun cas de mutation homozygote dans ce gène n'a encore été rapporté chez l'homme.

c) Etudes complémentaires chez le patient

Le phénotype des souris déficientes pour Bach2 a beaucoup de similarités avec certaines caractéristiques biologiques de la patiente. En premier lieu, cette patiente a une diminution des lymphocytes T régulateur, analyse faite deux fois chez elle, à l'âge de 9 ans et confirmé à l'âge de 14 ans (Figure 42).

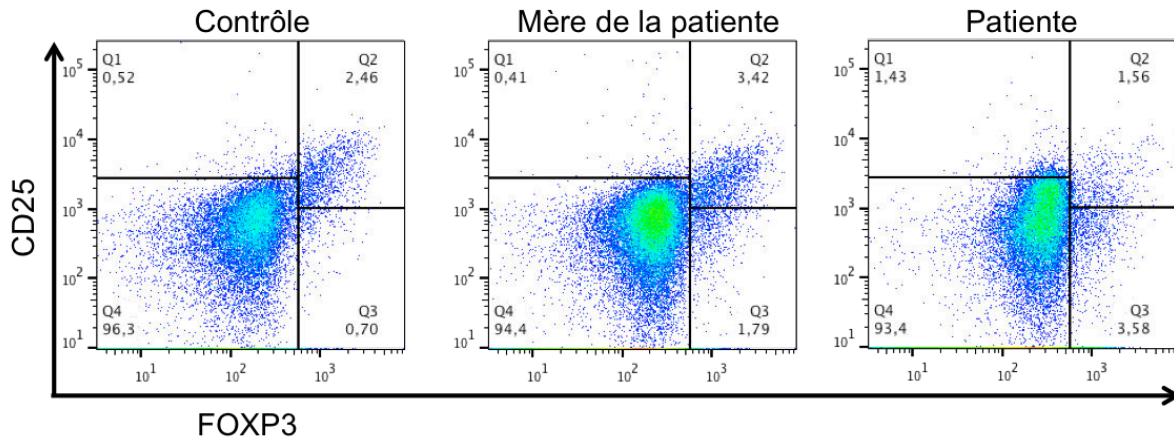


Figure 42 Mesure du taux de lymphocytes T régulateurs chez la patiente, sa mère et un contrôle

Mesure par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs (CD25+/FOXP3+) parmi les lymphocytes T CD3+/CD4+. Analyse faite à l'âge de 14 ans chez la patiente (1,56%), sa mère (3,42%) et un contrôle sain (2,46%).

Par ailleurs l'immunophénotypage complet des LT montre un déficit de LT naïfs avec une accumulation progressive des LT effecteurs (tableau 6). L'immunophénotypage des LB montre une baisse des LB mémoires switchés et non switchés et une analyse du Switch in vitro à l'âge de 11 ans avait montré un défaut de Switch. Nous avons tenté de confirmer ce défaut de Switch sur un nouveau prélèvement de la patiente, mais l'analyse n'a pas pu être interprétée en raison d'une absence de prolifération des LB lors de cette analyse.

L'anomalie du gène BACH2 constitue donc un très bon candidat à ceci près que le frère bien portant porte la même mutation à l'état homozygote. Il est dès lors particulièrement important d'analyser l'immunophénotype de ce frère à la recherche des constantes biologiques limites de la normale qui pourrait renforcer l'hypothèse d'un défaut de BACH2. Nous avons eu accès à un prélèvement du frère, qui vit à l'étranger. Le dosage des Ig sériques montre un déficit en IgG (4,69 g/L), et l'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes T régulateurs ne fut pas concluante en raison d'un prélèvement trop vieux en raison du voyage.

2. Discussion

A. Analyse de la mutation identifiée dans *ELKS*

Nous avons étudié un patient présentant un déficit immunitaire combiné d'origine inconnue. Comme certains déficits immunitaires primitifs sont attribuables à un défaut des voies de réparation des dommages de l'ADN, nous avons exploré cet aspect *in vitro* et avons trouvé une sensibilité accrue des fibroblastes de la patiente à un agent génotoxique, la MMC. La consanguinité de la famille de la patiente étant évocatrice d'une transmission autosomique récessive, nous avons recherché une mutation homozygote dans un gène codant pour un facteur impliqué dans la réparation d'ADN et dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes. L'analyse combinée par GWHM et WES a permis d'identifier des SNV homozygotes dans 19 gènes, dont le gène *ELKS* qui était le candidat le plus prometteur.

Afin de valider l'implication de ce SNV, nous avons cherché à compléter le phénotype cellulaire de sensibilité à la MMC par transduction des fibroblastes avec la forme sauvage de *ELKS*. Les résultats obtenus suggèrent que la mutation R253S identifiée dans le gène *ELKS* est en effet responsable de la sensibilité des fibroblastes de la patiente à la MMC. Cependant, le rôle potentiel de *ELKS* dans le phénotype immunologique de la patiente restait à élucider.

ELKS a été décrit la première fois en 1999 par l'identification dans un carcinome papillaire de la thyroïde du gène de fusion RET-*ELKS*, dû à une translocation t(10;12)(q11;p13) (Nakata et al., 1999). La présence de plusieurs domaines « coil-coiled » dans la protéine *ELKS* suggère la possibilité de former des dimères. Deux isoformes de *ELKS* ont été décrites: *ELKS*delta et *ELKS*epsilon, composés respectivement de 1088 et 1116 acides aminés. Analyse par western blot suggère que l'isoforme *ELKS*delta est abondante dans le cerveau, tandis que *ELKS*epsilon est ubiquitaire (Nakata et al., 2002; Wang et al., 2002b). La fonction de *ELKS* est bien décrite dans les neurones présynaptiques où ce facteur régule la plasticité synaptique, le transport intracellulaire et l'exocytose des neurotransmetteurs (Schoch and Gundelfinger, 2006; Südhof, 2012).

L'isoforme ubiquitaire de *ELKS* a été impliquée dans la voie d'activation de NF- κ B par le TNF α (Ducut Sigala et al., 2004) et au cours d'un dommage de l'ADN (Wu et al., 2006b, 2010). Lorsque surviennent des lésions de l'ADN, *ELKS* serait ubiquitinylé par l'intermédiaire de ATM et de NEMO avec l'intervention de XIAP, *ELKS* ainsi ubiquitinylé permettrait ainsi l'assemblage des complexes TAK1/TAB2/3 et NEMO/IKK nécessaire à l'activation de NF- κ B. L'activation de NF- κ B est probablement nécessaire pour limiter l'apoptose des cellules endommagées tandis que les cassures double brin d'ADN sont réparés. Toutefois, ce processus doit être fortement régulé pour éviter la survie et la prolifération des cellules trop lésées et donc potentiellement dangereuses. Dans le système immunitaire, des cassures double brin programmées surviennent au cours de recombinaison V(D)J au cours du développement des lymphocytes B et T et lors de l'activation des lymphocytes B (CSR). Ces

cassures double brin programmées engagent le NHEJ. Il a été montré que NF- κ B est activé par ces cassures programmées au cours de la différenciation des lymphocytes chez la souris (Bredemeyer et al., 2008).

En outre, des déficits dans certaines protéines impliquées dans la voie d'activation de NF- κ B après lésion de l'ADN sont connues pour être responsables de déficit immunitaire primitif (ATM, NEMO, XIAP). Il n'est pas décrit de déficit immunitaire chez l'homme causé par un défaut de TAK1 mais le rôle crucial de cette protéine au cours du développement des lymphocytes B et T chez la souris a été mis en évidence dans des modèles murins de KO conditionnels. Ces modèles ont montré le rôle central de TAK1 dans la maturation des lymphocytes T par l'activation de NF- κ B et dans la génération de lymphocytes T régulateurs (Liu et al., 2006; Sato et al., 2006). Aussi l'inactivation spécifique de TAK1 dans la lignée B a montré des défauts de maturation des LB et l'absence d'activation de NF- κ B après stimulation du BCR (Schuman et al., 2009).

Le lien entre ELKS et le complexe TAK1/TAB2/3 soutient l'hypothèse qu'un défaut de ELKS dans les cellules hématopoïétiques pourrait conduire à un déficit immunitaire similaire à celui décrit chez la souris avec une inactivation conditionnelle de TAK1.

De façon inattendue, nos résultats dans les souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ montrent qu'il n'y a pas de conséquences évidentes de l'inactivation conditionnelle de ELKS en ce qui concerne le développement des LT, des LB et des lymphocytes T régulateurs.

ELKS n'est donc certainement pas nécessaire au développement du système immunitaire chez la souris, néanmoins on ne peut pas exclure que la mutation R253S identifiée dans ELKS ne soit pas responsable du phénotype immunitaire de la patiente.

L'existence d'une protéine ayant une fonction redondante chez la souris mais pas chez l'homme peut être une explication possible pour l'implication différente de ELKS chez ces deux espèces. Cette divergence a déjà été décrite : par exemple les souris déficientes pour Xiap ne reproduisent pas le déficit immunitaire connu chez l'homme (XLP-2) (Rumble et al., 2009). Les différences observées entre les souris et les hommes concernant le système immunitaire ont déjà été discutées, ce qui est vrai chez la souris peut ne pas toujours être vrai chez l'homme (Mestas and Hughes, 2004). Le fond génétique du modèle murin étudié semble être également très important (Pearson, 2002). Un événement secondaire tel qu'un agent infectieux peut dans certains cas être nécessaire de provoquer un dérèglement immunitaire. Cela pourrait expliquer l'absence d'un phénotype immunologique dans les souris ELKS^{flox/flox}/VavCre⁺ qui ont été élevées dans un environnement contrôlé.

Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure formellement que la mutation R253S identifiée dans ELKS soit uniquement responsable de la sensibilité des fibroblastes de la patiente à la MMC et n'a pas de conséquences pour le phénotype immunitaire.

Le modèle murin que nous avons analysé souligne la difficulté à déterminer la pertinence clinique exacte des modèles animaux, d'autant plus que les modèles animaux sans phénotype clair sont rarement publiés.

B. Analyse de la mutation identifiée dans *BACH2*

Nous avons cependant émis l'hypothèse qu'une mutation délétère dans un autre gène pourrait être responsable du déficit immunitaire chez notre patient, hypothèse renforcée par le degré élevé de consanguinité dans cette famille. Parmi les 19 gènes identifiés lors de l'analyse combinée du WES et du GWHM aucun candidat fort, impliqué dans le système immunitaire, n'est ressorti (voir tableau 7).

En analysant les résultats du WES sans le filtre du GWHM, nous avons identifié une mutation homozygote faux-sens dans le gène *BACH2*. Ce gène, situé sur le bras long du chromosome 6, n'est pas dans une région candidate définie par le GWHM, en effet le reséquençage direct de ce gène a montré la présence de la mutation homozygote aussi bien chez la patiente que chez son frère aîné, a priori bien portant.

Le gène *BACH2* (BTB And CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper Transcription Factor 2) code pour un répresseur transcriptionnel possédant un domaine leucine zipper (Oyake et al., 1996) qui forme des hétérodimères avec les petites protéines MAF pour se lier à l'ADN au niveau de séquences appelées « Maf recognition element » (MARE). L'expression de *BACH2* est limitée aux cellules hématopoïétiques (Muto et al., 1998) et nerveuses (Hoshino and Igarashi, 2002) chez la souris.

Les souris déficientes pour *Bach2* montrent un défaut de CSR et de SHM (Muto et al., 2004), ceci s'explique par une incapacité à induire l'expression de l'enzyme AID. Cependant, le gène *Aicda*, codant AID, n'est pas la cible directe de *Bach2* qui est un répresseur transcriptionnel. Une des cibles principales de *Bach2* est *Prdm1* qui code pour Blimp1 (Ochiai et al., 2006). Dans les souris déficientes pour *Bach2*, on observe une augmentation de l'expression de *Prdm1* (Muto et al., 2004, 2010). Ces deux facteurs de transcription appartiennent à un réseau complexe de régulation de l'expression de AID faisant également intervenir PAX5 et IRF4 (Igarashi et al., 2014; Muto et al., 2010). Il semble que l'expression de *Bach2*, inhibant celle de Blimp1, offre une fenêtre temporelle pour l'expression de AID et donc permet le déroulement du CSR et des SHM dans les LB activés. *Bach2* a également une fonction importante dans le développement des LT. En effet, *Bach2* réprime également un ensemble de gènes nécessaires à la différenciation des LT en lymphocytes effecteurs mémoires (Kim et al., 2014; Roychoudhuri et al., 2013; Tsukumo et al., 2013), dont Blimp1 (Kallies et al., 2006; Martins et al., 2006). Ainsi chez les souris déficientes pour *Bach2*, on observe également une augmentation des LT effecteurs mémoires. Par ailleurs, il semble que l'interaction Menin-*Bach2* coordonne une voie de régulation de la sénescence des LT CD4⁺ (Kuwahara et al., 2014). Enfin, l'absence de *Bach2* chez la souris a aussi pour conséquence une diminution importante de la production de lymphocytes T régulateurs liée à une

diminution de l'expression de Foxp3 et à des programmes aberrants de différenciation des lymphocytes T régulateurs (Kim et al., 2014; Roychoudhuri et al., 2013).

Des études d'association génomique ont montré l'association entre BACH2 et des pathologies dysimmunitaires chez l'homme (Cooper et al., 2008; Dubois et al., 2010; Ferreira et al., 2011; Franke et al., 2010; Jin et al., 2012; Lee et al., 2011; Plagnol et al., 2011) et une étude a rapporté une mutation hétérozygote dans le gène BACH2 chez deux patients pédiatriques atteints de rectocolite hémorragique (Christodoulou et al., 2013). A notre connaissance, aucun cas de mutation homozygote dans ce gène n'a encore été rapporté chez l'homme.

Certains aspects du déficit immunitaire de cette patiente sont très proches du phénotype décrit chez les souris, en particulier le défaut de CSR observé *in vitro*, l'augmentation des LT effecteurs mémoires au détriment des LT naïfs et la diminution des lymphocytes T régulateurs. Le fait que le frère bien portant soit lui aussi porteur de cette mutation à l'état homozygote est cependant troublant. Celui-ci vit à l'étranger, il était donc difficile d'effectuer un bilan immunologique complet chez lui. Nous avons pu effectuer un dosage sérique des immunoglobulines qui a révélé un déficit en IgG mais l'analyse des lymphocytes T régulateurs n'a pu être interprétée. En parallèle, nous avons voulu vérifier *in vitro* sur les LB de la patiente le déficit de CSR tout en analysant les taux d'expression de BACH2, BLIMP1 et AID après stimulation par IL4 et CD40L mais les LB de la patiente n'ont pas proliféré en réponse à la stimulation ce qui nous empêche là encore d'interpréter cette analyse.

Pour compléter ce travail, nous souhaitons donc pouvoir rapidement reprendre ces différentes analyses, aussi bien chez la patiente que chez son frère et également analyser les conséquences de la mutation au niveau protéique.

Discussion et conclusion générales

Le cas exposé dans la dernière partie souligne la difficulté d'interpréter les résultats de WES dans le cas d'un unique patient atteint, même si la consanguinité familiale semble pouvoir aider à filtrer les résultats. Nous avons démontré l'implication de la mutation de *ELKS* dans la sensibilité des cellules à la MMC mais pas dans le déficit immunitaire et la mutation dans *BACH2* semble être un excellent candidat d'après les résultats publiés chez la souris.

Alors que la patiente est malade depuis son plus jeune âge et que cette maladie évolue pour toucher de nombreux organes (rate, cerveau, foie, poumons), le frère est tout à fait bien portant. Si la mutation identifiée dans *BACH2* a une implication dans la maladie, il est difficile d'expliquer l'absence de symptomatologie clinique chez lui. Le développement du WES et du WGS a permis l'identification de plus en plus de gènes impliqués dans des déficits immunitaires (Al-Herz et al., 2014) et l'on s'aperçoit aujourd'hui qu'il existe de nombreux cas de pénétrance variable (Chou et al., 2012; Sancho-Shimizu et al., 2011; Schubert et al., 2014). Un bilan immunologique du frère pourra peut-être nous aider à confirmer le rôle de la mutation dans *BACH2* ainsi que des études fonctionnelles plus poussées de la protéine mutée en utilisant par exemple les outils comme le CRISPR-Cas9 (Charpentier, 2015; Hsu et al., 2014). On peut par exemple imaginer un modèle cellulaire *in vitro* de Switch où l'on inactive *BACH2* par CRISPR-Cas9, suivi d'une transduction du gène *BACH2* avec la mutation identifiée et ainsi confirmer ou non l'implication de cette mutation dans la régulation d'AID.

On peut également émettre l'hypothèse que l'association des deux mutations soit responsable de la gravité de la maladie mais il sera très difficile de le prouver. On peut tout à fait prévoir que ce cas de figure, où plus d'un gène muté est détecté par WES ou WGS, sera de plus en plus rapporté. C'est d'ailleurs ce que nous avons constaté lors de l'analyse des résultats de WES dans notre cohorte de patients DICV dans la partie 2 où pour trois patients différents nous avons identifié des mutations dans 2 ou 3 gènes candidats différents. Les outils dont on dispose pour produire des modèles cellulaires et/ou animaux peuvent faciliter la compréhension d'une mutation dans un seul gène, mais prédire les conséquences cliniques de 2 ou 3 gènes mutés sera probablement plus délicat.

Face à au champ important d'informations fournies par le WES et le WGS, plusieurs auteurs proposent des stratégies de filtrages des données (Casanova et al., 2014; Platt et al., 2014). Platt et collaborateurs proposent par exemple trois stratégies. La première, qualifiée d'éducationnelle, se base sur les connaissances actuelles des fonctions cellulaires et des voies de signalisation et de développement. Elle va donc filtrer la recherche de variant au niveau de gènes qui ont déjà été décrits dans le fonctionnement ou le développement du système immunitaire, et dans notre problématique également dans la réparation de l'ADN. L'avantage de cette approche est qu'elle est efficace et ne nécessite pas d'algorithme sophistiqué de

traitement des données. Cependant, elle ne permettra pas d'identifier de nouveaux gènes dont la fonction n'est pas connue. La deuxième stratégie propose une approche par similarité clinique avec les modèles murins décrits. Cette approche permet d'approcher plus vite la physiopathologie d'une mutation mais elle est limitée par les modèles déjà publiés, or les souris « sans phénotype » sont rarement publiées, par ailleurs comme nous l'avons déjà vu, il peut exister des différences significatives entre l'homme et la souris. Enfin la dernière approche est une approche sans biais, c'est par conséquent l'approche la plus exhaustive, mais elle nécessite de puissantes ressources bioinformatiques. Et la difficulté de cette approche est d'arriver à identifier les variants pathogènes parmi une liste parfois très large.

Plus de 170 gènes impliqués dans des déficits immunitaires primitifs ont été décrits à l'heure actuelle. Des projets de puces ciblées pour l'identification de mutations dans l'un de ces gènes sont en cours de développement, ce qui permettra de considérablement faciliter et accélérer l'identification du gène causal dans ces pathologies (Nijman et al., 2014; Stoddard et al., 2014). Des puces pouvant tester un nombre plus large de gènes sont également en cours d'étude (Itan and Casanova, 2015), suite à l'identification *in silico* de plus de 3000 gènes potentiellement impliqués dans les déficits immunitaires primitifs. Ces puces se basent sur les deux premières stratégies proposées par Platt et collaborateurs.

L'objectif de notre travail au laboratoire est d'identifier des nouveaux gènes selon la troisième stratégie, donc sans biais, avec l'objectif d'approfondir la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN au sein du système immunitaire. Des auteurs proposent des critères de validation d'un variant identifié par cette approche (Casanova et al., 2014). Le premier critère est l'absence du variant parmi les populations saines, ceci peut aujourd'hui facilement être vérifié grâce aux larges banques de données disponibles (1000 génomes, ..). Le second critère est la preuve d'une absence de protéine ou d'une protéine non fonctionnelle. Le dernier critère est l'identification d'un lien de causalité fonctionnel entre le gène muté et le phénotype clinique. Ces trois critères semblent tout à fait pertinents, ce qui signifie un travail encore important et très excitant dans la poursuite de l'étude de notre cohorte.

Nous espérons que le travail de mise au point d'un test de diagnostic développé dans la partie 1 pourra permettre d'identifier de nouveaux cas de déficit immunitaire liés à un problème de réparation de l'ADN. Ce test pourrait alors participer à la démarche diagnostique de certains déficits immunitaires, notamment lors du ciblage des gènes candidats dans les études de WES. Comme nous l'avons vu, ce test ne détecte pas uniquement les défauts de réparation de l'ADN mais toute situation induisant un défaut de survie des thymocytes comme le déficit en RORC, et probablement aussi les cohésinopathies.

Pour compléter l'étude de la pertinence de ce test, l'analyse du Valpha24 et Valpha7.2 est actuellement effectuée sur des prélèvements parvenant au Centre d'étude des Déficits Immunitaires de Necker (CEDI, Pr Capucine Picard) pour des bilans de contrôle ou de diagnostic de tout type de déficits immunitaires. Un résultat obtenu au cours de ces analyses nous semble intéressant : il s'agit d'un patient atteint d'un déficit en ADA (adénosine déaminase), actuellement substitué par du PEG-ADA. L'enzyme ADA catalyse la conversion

de l'adénosine en inosine dans le cycle des purines. Le déficit en ADA entraîne une accumulation de désoxyadénosine et une augmentation de dATP dans les lymphocytes, ce qui finalement empêche la synthèse et la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire. La conséquence clinique est une alymphocytose. Il a été montré que l'inhibition de l'enzyme ADA au cours du développement de thymocytes humains entraîne une forte réduction de l'expansion cellulaire ainsi qu'une altération de la différenciation, affectant principalement les populations de thymocytes matures. La différenciation des thymocytes n'est pas bloquée mais les thymocytes matures sont diminués en raison d'une induction de l'apoptose, confirmée par l'activation des caspases accompagnée d'une accumulation intracellulaire de dATP (Joachims et al., 2008). Chez ce patient substitué par du PEG-ADA, nous observons une diminution du Valpha7.2, suggérant un biais du répertoire Valpha chez ce patient. Cette observation indique que la substitution en PEG-ADA ne permet probablement pas de corriger complètement la mortalité des thymocytes matures et ouvre des perspectives d'études intéressantes sur l'efficacité des traitements de ces patients ADA-/- par PEG-ADA, à comparer au traitement par thérapie génique.

Nous avons également le projet de développer un anticorps dirigé contre un segment proximal du Valpha, ce qui n'existe pas actuellement. Nous supposons qu'une analyse combinée de l'utilisation d'un segment distal et proximal permettra d'obtenir une évaluation plus fine du répertoire Valpha par cytométrie en flux.

En conclusion, ce biomarqueur développé dans la première partie de ce travail semble pouvoir détecter des biais de répertoire Valpha dans certains déficits immunitaires liés à un défaut de réparation de l'ADN (défaut de NHEJ, ATM) mais probablement pas tous (Fanconi, Bloom). Il semble plus généralement détecter les cas de mortalité élevée des thymocytes, quelles qu'en soit l'origine (déficit en RORC, en ADA) et également les cohésinopathies pour lesquelles la mortalité thymocytaire n'est pas augmentée mais l'accessibilité du locus du TCR α sont touchées.

Bibliographie

- Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 400–414.
- Abner, C.W., and McKinnon, P.J. (2004). The DNA double-strand break response in the nervous system. *DNA Repair* *3*, 1141–1147.
- Agrawal, A., and Schatz, D.G. (1997). RAG1 and RAG2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V(D)J recombination. *Cell* *89*, 43–53.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* *124*, 301–313.
- D'Andrea, A., Goux, D., De Lalla, C., Koezuka, Y., Montagna, D., Moretta, A., Dellabona, P., Casorati, G., and Abrignani, S. (2000). Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1544–1550.
- Angulo, I., Vadas, O., Garçon, F., Banham-Hall, E., Plagnol, V., Leahy, T.R., Baxendale, H., Coulter, T., Curtis, J., Wu, C., et al. (2013). Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* *342*, 866–871.
- Ardjmand, A., de Bock, C.E., Shahrokhi, S., Lincz, L.F., Boyd, A.W., Burns, G.F., and Thorne, R.F. (2013). Fat1 cadherin provides a novel minimal residual disease marker in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Amst. Neth.* *18*, 315–322.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J. Exp. Med.* *79*, 137–158.
- Bachrati, C.Z., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (2006). Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2269–2279.
- Badouel, C., Zander, M.A., Liscio, N., Bagherie-Lachidan, M., Sopko, R., Coyaud, E., Raught, B., Miller, F.D., and McNeill, H. (2015). Fat1 interacts with Fat4 to regulate neural tube closure, neural progenitor proliferation and apical constriction during mouse brain development. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 2781–2791.
- Baev, D.V., Peng, X.-H., Song, L., Barnhart, J.R., Crooks, G.M., Weinberg, K.I., and Metelitsa, L.S. (2004). Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* *104*, 4150–4156.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., and Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr. Biol. CB* *8*, 1395–1398.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* *109 Suppl*, S45–S55.

- Beamish, H., and Lavin, M.F. (1994). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int. J. Radiat. Biol.* *65*, 175–184.
- Bee, L., Nasca, A., Zanolini, A., Cendron, F., d'Adamo, P., Costa, R., Lamperti, C., Celotti, L., Ghezzi, D., and Zeviani, M. (2015). A nonsense mutation of human XRCC4 is associated with adult-onset progressive encephalomyopathy. *EMBO Mol. Med.* *7*, 918–929.
- Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D.R., and Schwartz, R.H. (1994). A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* *263*, 1774–1778.
- Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., and Roark, J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 535–562.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* *27*, 20–21.
- Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L., and Joyce, S. (2005). Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4⁺8⁺ stage of thymic ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5114–5119.
- Biedermann, K.A., Sun, J.R., Giaccia, A.J., Tosto, L.M., and Brown, J.M. (1991). scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1394–1397.
- Björkman, A., Qvist, P., Du, L., Bartish, M., Zaravinos, A., Georgiou, K., Børghlum, A.D., Gatti, R.A., Törngren, T., and Pan-Hammarström, Q. (2015). Aberrant recombination and repair during immunoglobulin class switching in BRCA1-deficient human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2157–2162.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegué, E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* *8*, 16–29.
- Bloom, D. (1954). Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* *88*, 754–758.
- de Bock, C.E., Ardjmand, A., Molloy, T.J., Bone, S.M., Johnstone, D., Campbell, D.M., Shipman, K.L., Yeadon, T.M., Holst, J., Spanevello, M.D., et al. (2012). The Fat1 cadherin is overexpressed and an independent prognostic factor for survival in paired diagnosis-relapse samples of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *26*, 918–926.
- Boder, E., and Sedgwick, R.P. (1958). Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* *21*, 526–554.
- Bosma, M.J., and Carroll, A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* *9*, 323–350.
- Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 701–708.
- van Brabant, A.J., Ye, T., Sanz, M., German III, J.L., Ellis, N.A., and Holloman, W.K. (2000). Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 14617–14625.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action

of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4102–4107.

Bredemeyer, A.L., Helmink, B.A., Innes, C.L., Calderon, B., McGinnis, L.M., Mahowald, G.K., Gapud, E.J., Walker, L.M., Collins, J.B., Weaver, B.K., et al. (2008). DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing lymphocytes. *Nature* *456*, 819–823.

Brennan, P.J., Tatituri, R.V.V., Brigl, M., Kim, E.Y., Tuli, A., Sanderson, J.P., Gadola, S.D., Hsu, F.-F., Besra, G.S., and Brenner, M.B. (2011). Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat. Immunol.* *12*, 1202–1211.

Brennan, P.J., Brigl, M., and Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 101–117.

Brooks, J., Ding, J., Simon-Sanchez, J., Paisan-Ruiz, C., Singleton, A.B., and Scholz, S.W. (2009). Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J. Med. Genet.* *46*, 375–381.

de Bruin, C., Mericq, V., Andrew, S.F., van Duyvenvoorde, H.A., Verkaik, N.S., Losekoot, M., Porollo, A., Garcia, H., Kuang, Y., Hanson, D., et al. (2015). An XRCC4 splice mutation associated with severe short stature, gonadal failure, and early-onset metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *100*, E789–E798.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.

Buck, D., Moshous, D., de Chasseval, R., Ma, Y., le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Casanova, J.-L., Lieber, M.R., and de Villartay, J.-P. (2006a). Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur. J. Immunol.* *36*, 224–235.

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J.-L., Hufnagel, M., le Deist, F., et al. (2006b). Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly. *Cell* *124*, 287–299.

Bugreev, D.V., Yu, X., Egelman, E.H., and Mazin, A.V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev.* *21*, 3085–3094.

van der Burg, M., van Dongen, J.J.M., and van Gent, D.C. (2009). DNA-PKcs deficiency in human: long predicted, finally found. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *9*, 503–509.

Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* *93*, 477–486.

Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *J. Mol. Biol.* *425*, 4733–4744.

Casanova, J.-L., Conley, M.E., Seligman, S.J., Abel, L., and Notarangelo, L.D. (2014). Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J. Exp. Med.* *211*, 2137–2149.

Casey, J.P., Nobbs, M., McGettigan, P., Lynch, S., and Ennis, S. (2012). Recessive mutations in MCM4/PRKDC cause a novel syndrome involving a primary immunodeficiency and a

disorder of DNA repair. *J. Med. Genet.* *49*, 242–245.

Castigli, E., Wilson, S.A., Garibyan, L., Rachid, R., Bonilla, F., Schneider, L., and Geha, R.S. (2005). TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat. Genet.* *37*, 829–834.

Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., De Saint Basile, G., Papadopoulo, D., De Villartay, J.P., and Fischer, A. (1993). Increased radiosensitivity of granulocyte macrophage colony-forming units and skin fibroblasts in human autosomal recessive severe combined immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* *91*, 1214–1218.

Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.-S., Pondarre, C., et al. (2012). Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* *11*, 36–49.

Chandra, S., and Kronenberg, M. (2015). Chapter Three - Activation and Function of iNKT and MAIT Cells. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 145–201.

Chandra, V., Bortnick, A., and Murre, C. (2015). AID targeting: old mysteries and new challenges. *Trends Immunol.*

Charpentier, E. (2015). CRISPR-Cas9: how research on a bacterial RNA-guided mechanism opened new perspectives in biotechnology and biomedicine. *EMBO Mol. Med.* *7*, 363–365.

Chaturvedi, P., Eng, W.K., Zhu, Y., Mattern, M.R., Mishra, R., Hurle, M.R., Zhang, X., Annan, R.S., Lu, Q., Faucette, L.F., et al. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* *18*, 4047–4054.

Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* *422*, 726–730.

Chen, Y., and Poon, R.Y.C. (2008). The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 5016–5029.

Chen, K., Coonrod, E.M., Kumánovics, A., Franks, Z.F., Durtschi, J.D., Margraf, R.L., Wu, W., Heikal, N.M., Augustine, N.H., Ridge, P.G., et al. (2013). Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 812–824.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1/waf1}. *Science* *287*, 1804–1808.

Chiruvella, K.K., Liang, Z., and Wilson, T.E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012757.

Cho, Y.-N., Kee, S.-J., Kim, T.-J., Jin, H.M., Kim, M.-J., Jung, H.-J., Park, K.-J., Lee, S.-J., Lee, S.-S., Kwon, Y.-S., et al. (2014). Mucosal-associated invariant T cell deficiency in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 3891–3901.

Chou, J., Hanna-Wakim, R., Tirosh, I., Kane, J., Fraulino, D., Lee, Y.N., Ghanem, S., Mahfouz, I., Mégarbané, A., Lefranc, G., et al. (2012). A novel homozygous mutation in recombination activating gene 2 in 2 relatives with different clinical phenotypes: Omenn syndrome and hyper-IgM syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 1414–1416.

Christodoulou, K., Wiskin, A.E., Gibson, J., Tapper, W., Willis, C., Afzal, N.A., Upstill-Goddard, R., Holloway, J.W., Simpson, M.A., Beattie, R.M., et al. (2013). Next generation

- exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes. *Gut* *62*, 977–984.
- Chun, H.H., and Gatti, R.A. (2004). Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* *3*, 1187–1196.
- Clark, N., Wu, X., and Her, C. (2013). MutS Homologues hMSH4 and hMSH5: Genetic Variations, Functions, and Implications in Human Diseases. *Curr. Genomics* *14*, 81–90.
- Cleaver, J.E. (1968). Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* *218*, 652–656.
- Cooper, J.D., Smyth, D.J., Smiles, A.M., Plagnol, V., Walker, N.M., Allen, J.E., Downes, K., Barrett, J.C., Healy, B.C., Mychaleckyj, J.C., et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat. Genet.* *40*, 1399–1401.
- Cooper, M.D., Peterson, R.D., and Good, R.A. (1965). DELINEATION OF THE THYMIC AND BURSAL LYMPHOID SYSTEMS IN THE CHICKEN. *Nature* *205*, 143–146.
- Cornforth, M.N., and Bedford, J.S. (1985). On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* *227*, 1589–1591.
- Dai, Y., Kysela, B., Hanakahi, L.A., Manolis, K., Riballo, E., Stumm, M., Harville, T.O., West, S.C., Oettinger, M.A., and Jeggo, P.A. (2003). Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2462–2467.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395–402.
- Davis, A.J., Chen, B.P.C., and Chen, D.J. (2014). DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair* *17*, 21–29.
- Deau, M.-C., Heurtier, L., Frange, P., Suarez, F., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Cavazzana, M., Picard, C., Durandy, A., Fischer, A., et al. (2014). A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J. Clin. Invest.* *124*, 3923–3928.
- Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. (1994). An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J. Exp. Med.* *180*, 1171–1176.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* *471*, 602–607.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* *197*, 1291–1296.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* *193*, 1303–1310.
- Diegelmann, J., Czamara, D., Le Bras, E., Zimmermann, E., Olszak, T., Bedynek, A., Göke, B., Franke, A., Glas, J., and Brand, S. (2013). Intestinal DMBT1 expression is modulated by Crohn's disease-associated IL23R variants and by a DMBT1 variant which influences binding of the transcription factors CREB1 and ATF-2. *PloS One* *8*, e77773.
- Du, L., van der Burg, M., Popov, S.W., Kotnis, A., van Dongen, J.J.M., Gennery, A.R., and Pan-Hammarström, Q. (2008). Involvement of Artemis in nonhomologous end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *205*, 3031–3040.

- Du, L., Peng, R., Björkman, A., Filipe de Miranda, N., Rosner, C., Kotnis, A., Berglund, M., Liu, C., Rosenquist, R., Enblad, G., et al. (2012). Cernunnos influences human immunoglobulin class switch recombination and may be associated with B cell lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* *209*, 291–305.
- Dubois, P.C.A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A.R., Adány, R., Aromaa, A., et al. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.* *42*, 295–302.
- Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F., and Verma, I.M. (2004). Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* *304*, 1963–1967.
- Dunne, J., Hanby, A.M., Poulson, R., Jones, T.A., Sheer, D., Chin, W.G., Da, S.M., Zhao, Q., Beverley, P.C., and Owen, M.J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the *Drosophila* fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics* *30*, 207–223.
- Durocher, D., and Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 225–231.
- Eccleston, J., Yan, C., Yuan, K., Alt, F.W., and Selsing, E. (2011). Mismatch repair proteins MSH2, MLH1, and EXO1 are important for class-switch recombination events occurring in B cells that lack nonhomologous end joining. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2336–2343.
- Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., and Littman, D.R. (2005). Genetic Evidence Supporting Selection of the V α 14i NKT Cell Lineage from Double-Positive Thymocyte Precursors. *Immunity* *22*, 705–716.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* *83*, 655–666.
- Envald, E., Du, L., Visnes, T., Björkman, A., Lindgren, E., Wincent, J., Borck, G., Colleaux, L., Cormier-Daire, V., van Gent, D.C., et al. (2013). A regulatory role for the cohesin loader NIPBL in nonhomologous end joining during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *210*, 2503–2513.
- Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P., and Porcelli, S. (1997). Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 109–120.
- Featherstone, C., and Jackson, S.P. (1998). DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr. Biol. CB* *8*, R622–R625.
- Ferreira, M.A.R., Matheson, M.C., Duffy, D.L., Marks, G.B., Hui, J., Le Souëf, P., Danoy, P., Baltic, S., Nyholt, D.R., Jenkins, M., et al. (2011). Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 1006–1014.
- Fladeby, C., Vik, E.S., Laerdahl, J.K., Gran Neurauter, C., Heggelund, J.E., Thorgaard, E., Strøm-Andersen, P., Bjørås, M., Dalhus, B., and Alseth, I. (2012). The human homolog of *Escherichia coli* endonuclease V is a nucleolar protein with affinity for branched DNA structures. *PLoS One* *7*, e47466.
- Fontes, F.L., Pinheiro, D.M.L., Oliveira, A.H.S. de, Oliveira, R.K. de M., Lajus, T.B.P., and Agnez-Lima, L.F. (2015). Role of DNA repair in host immune response and inflammation. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* *763*, 246–257.
- Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., and Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J

recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* *396*, 173–177.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* *42*, 1118–1125.

Fromer, M., Pocklington, A.J., Kavanagh, D.H., Williams, H.J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D.M., et al. (2014). De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* *506*, 179–184.

Fulop, G.M., and Phillips, R.A. (1990). The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* *347*, 479–482.

Furukawa, T., Sakamoto, H., Takeuchi, S., Ameri, M., Kuboki, Y., Yamamoto, T., Hatori, T., Yamamoto, M., Sugiyama, M., Ohike, N., et al. (2015). Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas. *Sci. Rep.* *5*, 8829.

Gao, Y., and Williams, A.P. (2015). Role of Innate T Cells in Anti-Bacterial Immunity. *Front. Immunol.* *6*, 302.

Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J., et al. (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* *95*, 891–902.

Gatz, S.A., Ju, L., Gruber, R., Hoffmann, E., Carr, A.M., Wang, Z.-Q., Liu, C., and Jeggo, P.A. (2011). Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 10088–10100.

Gell, D., and Jackson, S.P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res.* *27*, 3494–3502.

Gerami, P., Yélamos, O., Lee, C.Y., Obregon, R., Yazdan, P., Sholl, L.M., Guitart, G.E., Njauw, C.-N., and Tsao, H. (2015). Multiple Cutaneous Melanomas and Clinically Atypical Moles in a Patient With a Novel Germline BAP1 Mutation. *JAMA Dermatol.*

Gérart, S., Sibénil, S., Martin, E., Lenoir, C., Aguilar, C., Picard, C., Lantz, O., Fischer, A., and Latour, S. (2013). Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* *121*, 614–623.

German, J. (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* *72*, 393–406.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* *261*, 1175–1178.

Gold, M.C., Eid, T., Smyk-Pearson, S., Eberling, Y., Swarbrick, G.M., Langley, S.M., Streeter, P.R., Lewinsohn, D.A., and Lewinsohn, D.M. (2013). Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunol.* *6*, 35–44.

Gold, M.C., McLaren, J.E., Reistetter, J.A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G.M., Yu, Y.Y.L., Hansen, T.H., Lund, O., Nielsen, M., et al. (2014). MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. *J. Exp. Med.* *211*, 1601–1610.

Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint.

Nature 421, 952–956.

Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dräger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schäffer, A.A., Mages, H.W., et al. (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat. Immunol.* 4, 261–268.

Guo, C., Nakazawa, Y., Woodbine, L., Björkman, A., Shimada, M., Fawcett, H., Jia, N., Ohyama, K., Li, T.-S., Nagayama, Y., et al. (2015). XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S.K., Littman, D.R., Krangel, M.S., and He, Y.-W. (2002). Regulation of the TCR α repertoire by the survival window of CD4+CD8+ thymocytes. *Nat. Immunol.* 3, 469–476.

Hackney, J.A., Misaghi, S., Senger, K., Garris, C., Sun, Y., Lorenzo, M.N., and Zarrin, A.A. (2009). DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* 101, 163–189.

Hager, E., Hawwari, A., Matsuda, J.L., Krangel, M.S., and Gapin, L. (2007). Multiple constraints at the level of TCR α rearrangement impact Valpha14i NKT cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2228–2234.

Hartlerode, A.J., and Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J.* 423, 157–168.

Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., and Jackson, S.P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* 82, 849–856.

Hawwari, A., and Krangel, M.S. (2007). Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor alpha recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 903–907.

Hendrickson, E.A., Qin, X.Q., Bump, E.A., Schatz, D.G., Oettinger, M., and Weaver, D.T. (1991). A link between double-strand break-related repair and V(D)J recombination: the scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4061–4065.

Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., Gaspar, H.B., Holland, S.M., et al. (2014). Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front. Immunol.* 5, 162.

Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat. Rev. Cancer* 3, 169–178.

Hinks, T.S.C., Zhou, X., Staples, K.J., Dimitrov, B.D., Manta, A., Petrossian, T., Lum, P.Y., Smith, C.G., Ward, J.A., Howarth, P.H., et al. (2015). Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 323–333.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.

Hoshino, H., and Igarashi, K. (2002). Expression of the oxidative stress-regulated transcription factor bach2 in differentiating neuronal cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 427–431.

- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* *157*, 1262–1278.
- Hu, T., Simmons, A., Yuan, J., Bender, T.P., and Alberola-Ila, J. (2010). The transcription factor c-Myb primes CD4⁺CD8⁺ immature thymocytes for selection into the iNKT lineage. *Nat. Immunol.* *11*, 435–441.
- Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A., and Muto, A. (2014). Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunol. Rev.* *261*, 116–125.
- Ikehata, H., and Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *52*, 115–125.
- Ishino, S., Makita, N., Shiraishi, M., Yamagami, T., and Ishino, Y. (2015). EndoQ and EndoV work individually for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus*. *Biochimie*.
- Ismail, I.H., Davidson, R., Gagné, J.-P., Xu, Z.Z., Poirier, G.G., and Hendzel, M.J. (2014). Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* *74*, 4282–4294.
- Itan, Y., and Casanova, J.-L. (2015). Novel primary immunodeficiency candidate genes predicted by the human gene connectome. *Front. Immunol.* *6*, 142.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* *431*, 997–1002.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 5317–5326.
- Jeggo, P.A., Geuting, V., and Löbrich, M. (2011). The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *101*, 7–12.
- Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., et al. (2012). Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat. Genet.* *44*, 676–680.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 335–346.
- Joachims, M.L., Marble, P.A., Laurent, A.B., Pastuszko, P., Paliotta, M., Blackburn, M.R., and Thompson, L.F. (2008). Restoration of adenosine deaminase-deficient human thymocyte development in vitro by inhibition of deoxynucleoside kinases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8153–8161.
- Kallies, A., Hawkins, E.D., Belz, G.T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat. Immunol.* *7*, 466–474.
- Kannengiesser, C., Borie, R., and Revy, P. (2014). Pulmonary fibrosis associated with TINF2 gene mutation: is somatic reversion required? *Eur. Respir. J.* *44*, 269–270.
- Kannengiesser, C., Borie, R., Ménard, C., Réocreux, M., Nitschké, P., Gazal, S., Mal, H., Taillé, C., Cadranel, J., Nunes, H., et al. (2015). Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* *46*, 474–485.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C., and Hickson, I.D. (2000). The Bloom's

syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6504–6508.

Kim, D.R., Dai, Y., Mundy, C.L., Yang, W., and Oettinger, M.A. (1999). Mutations of acidic residues in RAG1 define the active site of the V(D)J recombinase. *Genes Dev.* *13*, 3070–3080.

Kim, E.H., Gasper, D.J., Lee, S.H., Plisch, E.H., Svaren, J., and Suresh, M. (2014). Bach2 Regulates Homeostasis of Foxp3+ Regulatory T Cells and Protects against Fatal Lung Disease in Mice. *J. Immunol.* *192*, 985–995.

Kitano, K. (2014). Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Front. Genet.* *5*, 366.

Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., et al. (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* *491*, 717–723.

Klebe, S., Driml, J., Nasu, M., Pastorino, S., Zangiabadi, A., Henderson, D., and Carbone, M. (2015). BAP1 hereditary cancer predisposition syndrome: a case report and review of literature. *Biomark. Res.* *3*, 14.

Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H., and Koezuka, Y. (1995). KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* *7*, 529–534.

Kolanczyk, M., Krawitz, P., Hecht, J., Hupalowska, A., Miaczynska, M., Marschner, K., Schlack, C., Emmerich, D., Kobus, K., Kornak, U., et al. (2015). Missense variant in CCDC22 causes X-linked recessive intellectual disability with features of Ritscher-Schinzel/3C syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *23*, 720.

Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F.W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* *261*, 1171–1175.

Kotnis, A., Du, L., Liu, C., Popov, S.W., and Pan-Hammarström, Q. (2009). Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *364*, 653–665.

Krangel, M.S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 133–139.

Krangel, M.S., McMurry, M.T., Hernandez-Munain, C., Zhong, X.P., and Carabana, J. (2000). Accessibility control of T cell receptor gene rearrangement in developing thymocytes. The TCR alpha/delta locus. *Immunol. Res.* *22*, 127–135.

Krangel, M.S., Carabana, J., Abbarategui, I., Schlimgen, R., and Hawwari, A. (2004). Enforcing order within a complex locus: current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor alpha/delta locus. *Immunol. Rev.* *200*, 224–232.

Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E.K., Niemela, J.E., Avery, D.T., Schickel, J.-N., Tran, D.Q., Stoddard, J., Zhang, Y., et al. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* *345*, 1623–1627.

Kuijpers, T.W., Bende, R.J., Baars, P.A., Grummels, A., Derks, I.A.M., Dolman, K.M., Beaumont, T., Tedder, T.F., van Noesel, C.J.M., Eldering, E., et al. (2010). CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J. Clin. Invest.* *120*, 214–222.

Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H., and Auerbach, A.D. (2003). A 20-year perspective on the International

- Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* *101*, 1249–1256.
- Kuwahara, M., Suzuki, J., Tofukuji, S., Yamada, T., Kanoh, M., Matsumoto, A., Maruyama, S., Kometani, K., Kurosaki, T., Ohara, O., et al. (2014). The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* *5*, 3555.
- Landree, M.A., Wibbenmeyer, J.A., and Roth, D.B. (1999). Mutational analysis of RAG1 and RAG2 identifies three catalytic amino acids in RAG1 critical for both cleavage steps of V(D)J recombination. *Genes Dev.* *13*, 3059–3069.
- Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* *180*, 1097–1106.
- Lavin, M.F., Khanna, K.K., Beamish, H., Spring, K., Watters, D., and Shiloh, Y. (1995). Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 382–383.
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., and Youle, R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* *524*, 309–314.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* *112*, 1570–1580.
- Lee, I., Blom, U.M., Wang, P.I., Shim, J.E., and Marcotte, E.M. (2011). Prioritizing candidate disease genes by network-based boosting of genome-wide association data. *Genome Res.* *21*, 1109–1121.
- Lee, Y., Chong, M.J., and McKinnon, P.J. (2001). Ataxia telangiectasia mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 6687–6693.
- Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* *85*, 1161–1173.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* *193*, 1295–1302.
- Li, X., and Zheng, Y. (2015). Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol.* *36*, 344–353.
- Liadaki, K., Sun, J., Hammarström, L., and Pan-Hammarström, Q. (2013). New facets of antibody deficiencies. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 629–638.
- Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11903–11908.
- Liu, J., and Krantz, I.D. (2009). Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin. Genet.* *76*, 303–314.
- Liu, C., Bickford, L.S., Held, R.G., Nyitrai, H., Südhof, T.C., and Kaeser, P.S. (2014). The active zone protein family ELKS supports Ca²⁺ influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 12289–12303.
- Liu, H.-H., Xie, M., Schneider, M.D., and Chen, Z.J. (2006). Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11677–11682.
- Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee,

- J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4, 37–48.
- Loimaranta, V., Hytönen, J., Pulliainen, A.T., Sharma, A., Tenovuoto, J., Strömberg, N., and Finne, J. (2009). Leucine-rich repeats of bacterial surface proteins serve as common pattern recognition motifs of human scavenger receptor gp340. *J. Biol. Chem.* 284, 18614–18623.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287–294.
- Lou, Z., Chini, C.C.S., Minter-Dykhouse, K., and Chen, J. (2003). Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. *J. Biol. Chem.* 278, 13599–13602.
- Lu, H., Shimazaki, N., Raval, P., Gu, J., Watanabe, G., Schwarz, K., Swanson, P.C., and Lieber, M.R. (2008). A biochemically defined system for coding joint formation in V(D)J recombination. *Mol. Cell* 31, 485–497.
- Lucas, C.L., Kuehn, H.S., Zhao, F., Niemela, J.E., Deenick, E.K., Palendira, U., Avery, D.T., Moens, L., Cannons, J.L., Biancalana, M., et al. (2014). Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat. Immunol.* 15, 88–97.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794.
- Ma, Y., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair* 4, 845–851.
- Mak, T.W., Hakem, A., McPherson, J.P., Shehabeldin, A., Zabolocki, E., Migon, E., Duncan, G.S., Bouchard, D., Wakeham, A., Cheung, A., et al. (2000). *Bra1* required for T cell lineage development but not TCR loci rearrangement. *Nat. Immunol.* 1, 77–82.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P.A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today* 13, 315–322.
- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., et al. (2009). Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol.* 7, e54.
- Martins, G.A., Cimmino, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E., and Calame, K. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat. Immunol.* 7, 457–465.
- Matei, I.R., Guidos, C.J., and Danska, J.S. (2006). ATM-dependent DNA damage surveillance in T-cell development and leukemogenesis: the DSB connection. *Immunol. Rev.* 209, 142–158.
- Matei, I.R., Gladly, R.A., Nutter, L.M.J., Canty, A., Guidos, C.J., and Danska, J.S. (2007). ATM deficiency disrupts Tcr α locus integrity and the maturation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Blood* 109, 1887–1896.
- Mathieu, A.-L., Verronese, E., Rice, G.I., Fouyssac, F., Bertrand, Y., Picard, C., Chansel, M., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., Butte, M.J., et al. (2015). PRKDC mutations associated with immunodeficiency, granuloma, and autoimmune regulator-dependent autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1578–1588.e5.

- Matsuura, S., Tauchi, H., Nakamura, A., Kondo, N., Sakamoto, S., Endo, S., Smeets, D., Solder, B., Belohradsky, B.H., Kaloustian, V.M. Der, et al. (1998). Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat. Genet.* *19*, 179–181.
- Mattina, T., Perrotta, C.S., and Grossfeld, P. (2009). Jacobsen syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* *4*, 9.
- Mauvieux, L., Villey, I., and de Villartay, J.P. (2001). T early alpha (TEA) regulates initial TCRVAJA rearrangements and leads to TCRJA coincidence. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2080–2086.
- Mauvieux, L., Villey, I., and de Villartay, J.-P. (2003). TEA regulates local TCR-Jalpha accessibility through histone acetylation. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2216–2222.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 2731–2738.
- Metelitsa, L.S., Weinberg, K.I., Emanuel, P.D., and Seeger, R.C. (2003). Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* *17*, 1068–1077.
- Milyavsky, M., Gan, O.I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., Lechman, E., Hermans, K.G., Eppert, K., Konovalova, Z., et al. (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. *Cell Stem Cell* *7*, 186–197.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2005). Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol. Rev.* *205*, 7–17.
- Misteli, T., and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 243–254.
- Moldovan, G.-L., and D’Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 223–249.
- Moshous, D., Li, L., Chasseval, R., Philippe, N., Jabado, N., Cowan, M.J., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (2000). A new gene involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination is located on human chromosome 10p. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 583–588.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., et al. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* *105*, 177–186.
- Moshous, D., Pannetier, C., Chasseval Rd, R. de, le Deist Fl, F., Cavazzana-Calvo, M., Romana, S., Macintyre, E., Canioni, D., Brousse, N., Fischer, A., et al. (2003). Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J. Clin. Invest.* *111*, 381–387.
- Motomura, K., Mittelbronn, M., Paulus, W., Brokinkel, B., Keyvani, K., Sure, U., Wrede, K., Nakazato, Y., Tanaka, Y., Pierscianek, D., et al. (2012). DMBT1 homozygous deletion in diffuse astrocytomas is associated with unfavorable clinical outcome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *71*, 702–707.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Murray, J.E., Bicknell, L.S., Yigit, G., Duker, A.L., van Kogelenberg, M., Haghayegh, S., Wiczorek, D., Kayserili, H., Albert, M.H., Wise, C.A., et al. (2014). Extreme growth failure is a common presentation of ligase IV deficiency. *Hum. Mutat.* *35*, 76–85.
- Murray, J.E., van der Burg, M., IJspeert, H., Carroll, P., Wu, Q., Ochi, T., Leitch, A., Miller, E.S., Kysela, B., Jawad, A., et al. (2015). Mutations in the NHEJ component XRCC4 cause primordial dwarfism. *Am. J. Hum. Genet.* *96*, 412–424.
- Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M., et al. (1998). Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J.* *17*, 5734–5743.
- Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* *429*, 566–571.
- Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S., and Igarashi, K. (2010). Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J.* *29*, 4048–4061.
- Nagarajan, N.A., and Kronenberg, M. (2007). Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2706–2713.
- Nakata, T., Kitamura, Y., Shimizu, K., Tanaka, S., Fujimori, M., Yokoyama, S., Ito, K., and Emi, M. (1999). Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *25*, 97–103.
- Nakata, T., Yokota, T., Emi, M., and Minami, S. (2002). Differential expression of multiple isoforms of the ELKS mRNAs involved in a papillary thyroid carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *35*, 30–37.
- Nam, E.A., and Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem. J.* *436*, 527–536.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137–2140.
- Neuberger, M.S. (2008). Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 124–132.
- Neumann, M., Vosberg, S., Schlee, C., Heesch, S., Schwartz, S., Gökbuget, N., Hoelzer, D., Graf, A., Krebs, S., Bartram, I., et al. (2015). Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget* *6*, 2754–2766.
- Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D., Isaacs, J.D., and Lechler, R.I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* *98*, 2736–2744.
- Nguyen, T.V., Riou, L., Aoufouchi, S., and Rosselli, F. (2014). Fanca deficiency reduces A/T transitions in somatic hypermutation and alters class switch recombination junctions in mouse B cells. *J. Exp. Med.* *211*, 1011–1018.
- Nicolas, N., Moshous, D., Cavazzana-Calvo, M., Papadopoulo, D., de Chasseval, R., Le

- Deist, F., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (1998). A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J. Exp. Med.* *188*, 627–634.
- Niedernhofer, L.J. (2008). DNA repair is crucial for maintaining hematopoietic stem cell function. *DNA Repair* *7*, 523–529.
- Nijman, I.J., van Montfrans, J.M., Hoogstraat, M., Boes, M.L., van de Corput, L., Renner, E.D., van Zon, P., van Lieshout, S., Elferink, M.G., van der Burg, M., et al. (2014). Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 529–534.
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., et al. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* *447*, 686–690.
- Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V., et al. (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* *347*, 185–188.
- Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 38226–38234.
- Ochs, H.D. (2014). Common variable immunodeficiency (CVID): new genetic insight and unanswered questions. *Clin. Exp. Immunol.* *178*, 5–6.
- O’Driscoll, M., Cerosaletti, K.M., Girard, P.M., Dai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J., et al. (2001). DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* *8*, 1175–1185.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* *248*, 1517–1523.
- Offer, S.M., Pan-Hammarström, Q., Hammarström, L., and Harris, R.S. (2010). Unique DNA repair gene variations and potential associations with the primary antibody deficiency syndromes IgAD and CVID. *PloS One* *5*, e12260.
- Oka, Y., Suzuki, K., Yamauchi, M., Mitsutake, N., and Yamashita, S. (2011). Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and HP1 γ in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *411*, 762–767.
- Okada, S., Markle, J.G., Deenick, E.K., Mele, F., Averbuch, D., Lagos, M., Alzahrani, M., Al-Muhsen, S., Halwani, R., Ma, C.S., et al. (2015). IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* *349*, 606–613.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (1996). Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6083–6095.
- Pan-Hammarström, Q., Jones, A.-M., Lähdesmäki, A., Zhou, W., Gatti, R.A., Hammarström, L., Gennery, A.R., and Ehrenstein, M.R. (2005). Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J. Exp. Med.* *201*, 189–194.

- Pan-Hammarström, Q., Zhao, Y., and Hammarström, L. (2007). Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Adv. Immunol.* *93*, 1–61.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair* *6*, 953–966.
- Pearson, H. (2002). Surviving a knockout blow. *Nature* *415*, 8–9.
- Pergola, F., Zdzienicka, M.Z., and Lieber, M.R. (1993). V(D)J recombination in mammalian cell mutants defective in DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3464–3471.
- Perkins, E.J., Nair, A., Cowley, D.O., Van Dyke, T., Chang, Y., and Ramsden, D.A. (2002). Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev.* *16*, 159–164.
- Peterson, R.D., Kelly, W.D., and Good, R.A. (1964). ATAXIA-TELANGIECTASIA. ITS ASSOCIATION WITH A DEFECTIVE THYMUS, IMMUNOLOGICAL-DEFICIENCY DISEASE, AND MALIGNANCY. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1189–1193.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* *424*, 103–107.
- Pichierri, P., and Rosselli, F. (2004). The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J.* *23*, 1178–1187.
- Plagnol, V., Howson, J.M.M., Smyth, D.J., Walker, N., Hafler, J.P., Wallace, C., Stevens, H., Jackson, L., Simmonds, M.J., Type 1 Diabetes Genetics Consortium, et al. (2011). Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS Genet.* *7*, e1002216.
- Plank, J.L., Wu, J., and Hsieh, T.-S. (2006). Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11118–11123.
- Platt, C., Geha, R.S., and Chou, J. (2014). Gene hunting in the genomic era: approaches to diagnostic dilemmas in patients with primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 262–268.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., and Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1638–1643.
- Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., and Balk, S.P. (1993). Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* *178*, 1–16.
- Qi, L., Strong, M.A., Karim, B.O., Armanios, M., Huso, D.L., and Greider, C.W. (2003). Short telomeres and ataxia-telangiectasia mutated deficiency cooperatively increase telomere dysfunction and suppress tumorigenesis. *Cancer Res.* *63*, 8188–8196.
- Rai, K., Pilarski, R., Cebulla, C.M., and Abdel-Rahman, M.H. (2015). Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin. Genet.*
- Ralf, C., Hickson, I.D., and Wu, L. (2006). The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J. Biol. Chem.* *281*, 22839–22846.
- Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat. Immunol.* *4*, 452–456.

- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J. Biol. Chem.* *281*, 13861–13864.
- Reaban, M.E., and Griffin, J.A. (1990). Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature* *348*, 342–344.
- Reaban, M.E., Lebowitz, J., and Griffin, J.A. (1994). Transcription induces the formation of a stable RNA-DNA hybrid in the immunoglobulin alpha switch region. *J. Biol. Chem.* *269*, 21850–21857.
- Reantragoon, R., Corbett, A.J., Sakala, I.G., Gherardin, N.A., Furness, J.B., Chen, Z., Eckle, S.B.G., Uldrich, A.P., Birkinshaw, R.W., Patel, O., et al. (2013). Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 2305–2320.
- Resnick, E.S., Moshier, E.L., Godbold, J.H., and Cunningham-Rundles, C. (2012). Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* *119*, 1650–1657.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeau, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* *102*, 565–575.
- Van Rhijn, I., Kasmar, A., de Jong, A., Gras, S., Bhati, M., Doorenspleet, M.E., de Vries, N., Godfrey, D.I., Altman, J.D., de Jager, W., et al. (2013). A conserved human T cell population targets mycobacterial antigens presented by CD1b. *Nat. Immunol.* *14*, 706–713.
- Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Doherty, A.J., Priestley, A., Broughton, B., Kysela, B., Beamish, H., Plowman, N., Arlett, C.F., et al. (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.* *9*, 699–702.
- Riballo, E., Woodbine, L., Stiff, T., Walker, S.A., Goodarzi, A.A., and Jeggo, P.A. (2009). XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.* *37*, 482–492.
- Rieux-Laucat, F., Fischer, A., and Deist, F.L. (2003). Cell-death signaling and human disease. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 325–331.
- Rigaud, S., Fondanèche, M.-C., Lambert, N., Pasquier, B., Mateo, V., Soulas, P., Galicier, L., Le Deist, F., Rieux-Laucat, F., Revy, P., et al. (2006). XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* *444*, 110–114.
- Rivera-Munoz, P., Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Abramowski, V., Bruneau, S., Fischer, A., Pâques, F., and de Villartay, J.-P. (2009). Reduced immunoglobulin class switch recombination in the absence of Artemis. *Blood* *114*, 3601–3609.
- Rivoisy, C., Gérard, L., Boutboul, D., Malphettes, M., Fieschi, C., Durieu, I., Tron, F., Masseau, A., Bordigoni, P., Alric, L., et al. (2012). Parental consanguinity is associated with a severe phenotype in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* *32*, 98–105.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* *12*, 440–450.
- Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Márquez, J.A., Piétremont, O., Guerois, R., Callebaut, I., et al. (2011). Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12663–12668.
- Rosenstiel, P., Sina, C., End, C., Renner, M., Lyer, S., Till, A., Hellmig, S., Nikolaus, S.,

- Fölsch, U.R., Helmke, B., et al. (2007). Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *178*, 8203–8211.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* *447*, 725–729.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H.M., and Weissman, I.L. (2008). Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* *132*, 681–696.
- Roth, D.B., Menetski, J.P., Nakajima, P.B., Bosma, M.J., and Gellert, M. (1992). V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* *70*, 983–991.
- Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Bonelli, M., Sciumè, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., et al. (2013). BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature* *498*, 506–510.
- Rumble, J.M., Oetjen, K.A., Stein, P.L., Schwartzberg, P.L., Moore, B.B., and Duckett, C.S. (2009). Phenotypic differences between mice deficient in XIAP and SAP, two factors targeted in X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP). *Cell. Immunol.* *259*, 82–89.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *155*, 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 490–500.
- Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G., and Tonegawa, S. (1979). Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* *280*, 288–294.
- Salio, M., Speak, A.O., Shepherd, D., Polzella, P., Illarionov, P.A., Veerapen, N., Besra, G.S., Platt, F.M., and Cerundolo, V. (2007). Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20490–20495.
- Salzer, U., Chapel, H.M., Webster, A.D.B., Pan-Hammarström, Q., Schmitt-Graeff, A., Schlesier, M., Peter, H.H., Rockstroh, J.K., Schneider, P., Schäffer, A.A., et al. (2005). Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat. Genet.* *37*, 820–828.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian Dna Repair and the Dna Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 39–85.
- Sancho-Shimizu, V., Pérez de Diego, R., Lorenzo, L., Halwani, R., Alangari, A., Israelsson, E., Fabrega, S., Cardon, A., Maluenda, J., Tatematsu, M., et al. (2011). Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J. Clin. Invest.* *121*, 4889–4902.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 229–257.
- Sato, S., Sanjo, H., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006). TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *Int. Immunol.* *18*, 1405–1411.

- van Schaik, B., Klarenbeek, P., Doorenspleet, M., van Kampen, A., Moody, D.B., de Vries, N., and Van Rhijn, I. (2014). Discovery of invariant T cells by next-generation sequencing of the human TCR α -chain repertoire. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 5338–5344.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 251–263.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* *59*, 1035–1048.
- Schoch, S., and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res.* *326*, 379–391.
- Schroeder, T.M., Anschutz, F., and Knopp, A. (1964). [Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy]. *Humangenetik* *1*, 194–196.
- Schubert, D., Bode, C., Kenefack, 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.
- Schuman, J., Chen, Y., Podd, A., Yu, M., Liu, H.-H., Wen, R., Chen, Z.J., and Wang, D. (2009). A critical role of TAK1 in B-cell receptor-mediated nuclear factor kappaB activation. *Blood* *113*, 4566–4574.
- Seach, N., Guerri, L., Le Bourhis, L., Mburu, Y., Cui, Y., Bessoles, S., Soudais, C., and Lantz, O. (2013). Double-positive thymocytes select mucosal-associated invariant T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 6002–6009.
- Seita, J., Rossi, D.J., and Weissman, I.L. (2010). Differential DNA damage response in stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* *7*, 145–147.
- Seitan, V.C., Hao, B., Tachibana-Konwalski, K., Lavagnoli, T., Mira-Bontenbal, H., Brown, K.E., Teng, G., Carroll, T., Terry, A., Horan, K., et al. (2011). A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* *476*, 467–471.
- Sekine, H., Ferreira, R.C., Pan-Hammarström, Q., Graham, R.R., Ziemba, B., de Vries, S.S., Liu, J., Hippen, K., Koeuth, T., Ortmann, W., et al. (2007). Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7193–7198.
- Seppänen, M., Koillinen, H., Mustjoki, S., Tomi, M., and Sullivan, K.E. (2014). Terminal deletion of 11q with significant late-onset combined immune deficiency. *J. Clin. Immunol.* *34*, 114–118.
- Shaheen, R., Faqeih, E., Ansari, S., Abdel-Salam, G., Al-Hassnan, Z.N., Al-Shidi, T., Alomar, R., Sogaty, S., and Alkuraya, F.S. (2014). Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res.* *24*, 291–299.
- Shimamura, M., Ohteki, T., Beutner, U., and MacDonald, H.R. (1997). Lack of directed V alpha 14-J alpha 281 rearrangements in NK1+ T cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1576–1579.
- Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* *4*, 435–441.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3267–3277.
- Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., et al. (2007). Identification of the

- FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* *129*, 289–301.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., and Fishel, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* *15*, 437–451.
- Soudais, C., Samassa, F., Sarkis, M., Le Bourhis, L., Bessoles, S., Blanot, D., Hervé, M., Schmidt, F., Mengin-Lecreux, D., and Lantz, O. (2015). In Vitro and In Vivo Analysis of the Gram-Negative Bacteria-Derived Riboflavin Precursor Derivatives Activating Mouse MAIT Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 4641–4649.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* *26*, 7780–7791.
- Soulier, J. (2011). Fanconi anemia. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* *2011*, 492–497.
- Starokadomskyy, P., Gluck, N., Li, H., Chen, B., Wallis, M., Maine, G.N., Mao, X., Zaidi, I.W., Hein, M.Y., McDonald, F.J., et al. (2013). CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF- κ B signaling. *J. Clin. Invest.* *123*, 2244–2256.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 5370–5378.
- Stoddard, J.L., Niemela, J.E., Fleisher, T.A., and Rosenzweig, S.D. (2014). Targeted NGS: A Cost-Effective Approach to Molecular Diagnosis of PIDs. *Front. Immunol.* *5*, 531.
- Stuart, B.D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., Choi, M., Dharwadkar, P., Torres, F., Girod, C.E., et al. (2015). Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat. Genet.* *47*, 512–517.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* *75*, 11–25.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* *288*, 2369–2373.
- Swift, M., Morrell, D., Cromartie, E., Chamberlin, A.R., Skolnick, M.H., and Bishop, D.T. (1986). The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* *39*, 573–583.
- Taccioli, G.E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P.A., and Alt, F.W. (1993). Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* *260*, 207–210.
- Takahashi, D., Sato, K., Hirayama, E., Takata, M., and Kurumizaka, H. (2015). Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. *J. Biochem. (Tokyo)*.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* *189*, 1907–1921.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.
- Torabi, K., Miró, R., Fernández-Jiménez, N., Quintanilla, I., Ramos, L., Prat, E., Del Rey, J., Pujol, N., Killian, J.K., Meltzer, P.S., et al. (2015). Patterns of somatic uniparental disomy identify novel tumor suppressor genes in colorectal cancer. *Carcinogenesis*.

- Touzot, F., Callebaut, I., Soulier, J., Gaillard, L., Azerrad, C., Durandy, A., Fischer, A., de Villartay, J.-P., and Revy, P. (2010). Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 10097–10102.
- Travis, J. (2009). On the Origin of The Immune System. *Science* *324*, 580–582.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* *422*, 164–169.
- Trujillo, J.P., Mina, L.B., Pujol, R., Bogliolo, M., Andrieux, J., Holder, M., Schuster, B., Schindler, D., and Surrallés, J. (2012). On the role of FAN1 in Fanconi anemia. *Blood* *120*, 86–89.
- Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., Igarashi, K., and Saito, T. (2013). Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10735–10740.
- Unoki, M., and Nakamura, Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* *20*, 4457–4465.
- Vacchio, M.S., Olaru, A., Livak, F., and Hodes, R.J. (2007). ATM deficiency impairs thymocyte maturation because of defective resolution of T cell receptor alpha locus coding end breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6323–6328.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 329–341.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanová, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., et al. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* *93*, 467–476.
- Venkataswamy, M.M., and Porcelli, S.A. (2010). Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin. Immunol.* *22*, 68–78.
- Vera, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Malivert, L., Lim, A., Bole-Feysot, C., Martin, C., Florin, B., Latour, S., Revy, P., et al. (2013). Cernunnos Deficiency Reduces Thymocyte Life Span and Alters the T Cell Repertoire in Mice and Humans. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 701–711.
- Vijayanand, P., Seumois, G., Pickard, C., Powell, R.M., Angco, G., Sammut, D., Gadola, S.D., Friedmann, P.S., and Djukanovic, R. (2007). Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* *356*, 1410–1422.
- de Villartay, J.-P. (2015). When natural mutants do not fit our expectations: the intriguing case of patients with XRCC4 mutations revealed by whole-exome sequencing. *EMBO Mol. Med.* *7*, 862–864.
- de Villartay, J.-P., Poinsignon, C., de Chasseval, R., Buck, D., Le Guyader, G., and Villey, I. (2003). Human and animal models of V(D)J recombination deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 592–598.
- Villey, I., Caillol, D., Selz, F., Ferrier, P., and de Villartay, J.P. (1996). Defect in rearrangement of the most 5' TCR-J alpha following targeted deletion of T early alpha (TEA): implications for TCR alpha locus accessibility. *Immunity* *5*, 331–342.

- Vorechovský, I., Zetterquist, H., Paganelli, R., Koskinen, S., Webster, A.D., Björkander, J., Smith, C.I., and Hammarström, L. (1995). Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *77*, 185–192.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* *412*, 607–614.
- Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F.B., Huntscha, S., Sobotta, M.C., Moehrle, B., Brocks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., et al. (2015). Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature* *520*, 549–552.
- Wang, H.-Y., and Jain, A. (2011). Novel sequencing-based strategies for high-throughput discovery of genetic mutations underlying inherited antibody deficiency disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *11*, 352–360.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002a). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* *298*, 1435–1438.
- Wang, R., Xie, H., Huang, Z., Ma, J., Fang, X., Ding, Y., and Sun, Z. (2011). Transcription factor network regulating CD(+)CD8(+) thymocyte survival. *Crit. Rev. Immunol.* *31*, 447–458.
- Wang, Y., Liu, X., Biederer, T., and Südhof, T.C. (2002b). A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14464–14469.
- Warnatz, K., Salzer, U., Rizzi, M., Fischer, B., Gutenberger, S., Böhm, J., Kienzler, A.-K., Pan-Hammarström, Q., Hammarström, L., Rakhmanov, M., et al. (2009). B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13945–13950.
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Soumelis, V., Yuan, W., Ho, S., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y.-J. (2004). Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol.* *5*, 426–434.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* *436*, 1181–1185.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953a). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* *171*, 964–967.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953b). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737–738.
- Weemaes, C.M., Hustinx, T.W., Scheres, J.M., van Munster, P.J., Bakkeren, J.A., and Taalman, R.D. (1981). A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* *70*, 557–564.
- Whitney, M.A., Saito, H., Jakobs, P.M., Gibson, R.A., Moses, R.E., and Grompe, M. (1993). A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet.* *4*, 202–205.
- Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* *8*, 277–284.
- de Winter, J.P., and Joenje, H. (2009). The genetic and molecular basis of Fanconi anemia.

Mutat. Res. 668, 11–19.

Woodbine, L., Neal, J.A., Sasi, N.-K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G., et al. (2013). PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J. Clin. Invest.* 123, 2969–2980.

Woods, C.G., and Taylor, A.M. (1992). Ataxia telangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. *Q. J. Med.* 82, 169–179.

Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426, 870–874.

Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D. (2006a). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4068–4073.

Wu, Z.-H., Shi, Y., Tibbetts, R.S., and Miyamoto, S. (2006b). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311, 1141–1146.

Wu, Z.-H., Wong, E.T., Shi, Y., Niu, J., Chen, Z., Miyamoto, S., and Tergaonkar, V. (2010). ATM- and NEMO-Dependent ELKS Ubiquitination Coordinates TAK1-Mediated IKK Activation in Response to Genotoxic Stress. *Mol. Cell* 40, 75–86.

Wuerffel, R.A., Du, J., Thompson, R.J., and Kenter, A.L. (1997). Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 4139–4144.

Xing, M., Yang, M., Huo, W., Feng, F., Wei, L., Jiang, W., Ning, S., Yan, Z., Li, W., Wang, Q., et al. (2015). Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nat. Commun.* 6, 6233.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482.

Yu, H., Pak, H., Hammond-Martel, I., Ghram, M., Rodrigue, A., Daou, S., Barbour, H., Corbeil, L., Hébert, J., Drobetsky, E., et al. (2014). Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 285–290.

van Zelm, M.C., Reisli, I., van der Burg, M., Castaño, D., van Noesel, C.J.M., van Tol, M.J.D., Woellner, C., Grimbacher, B., Patiño, P.J., van Dongen, J.J.M., et al. (2006). An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N. Engl. J. Med.* 354, 1901–1912.

Zha, S., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Brush, J.W., and Li, G. (2007). Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4518–4523.

Zhang, X., Sejas, D.P., Qiu, Y., Williams, D.A., and Pang, Q. (2007). Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. *J. Cell Sci.* 120, 1572–1583.

Zhou, W., Otto, E.A., Cluckey, A., Airik, R., Hurd, T.W., Chaki, M., Diaz, K., Lach, F.P., Bennett, G.R., Gee, H.Y., et al. (2012). FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat. Genet.* 44, 910–915.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557–1569.

Annexe

Manuscrit en cours de soumission

1

2

**ELKS/ERC1, mutated in a patient with combined immune deficiency and
genotoxic sensitivity, is dispensable for lymphoid development in mice**

3

4

5

6

7

Sophie Kaltenbach¹, Marie-Louise Fremond^{2,3}, Danielle Canioni⁴, Louise Galmiche⁴,

8

Stéphanie Luzi⁵, Nizar Mahlaoui^{2,3}, Capucine Picard^{2,6}, Wassila Carpentier⁷, Jacek Majewski⁸,

9

Jeremy Schwartztruber⁸, Patrick Nitschke⁹, Stéphane Blanche^{2,3}, Patrick Revy¹, Alain

10

Fischer^{2,3,10}, Nada Jabado⁸, Despina Moshous^{1,3*} and Jean-Pierre de Villartay^{1*}

11

12

1. INSERM UMR 1163, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Paris,
France; Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris,
France.

13

14

15

2. INSERM UMR 1163, Paris, France; Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University,
Imagine Institute, Paris, France.

16

17

3. AP-HP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Service d'Immunologie et d'Hématologie
Pédiatrique, Paris, France.

18

19

4. AP-HP, Necker Hospital, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Paris, France.

20

5. AP-HP, Necker Hospital, Service de Radiologie, Paris, France.

21

6. AP-HP, Necker Hospital, Study Center of Primary Immunodeficiencies, Paris, France.

22

7. Plateforme Post-Génomique P3S, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, Paris, France.

23

8. McGill University and the Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec,
Canada.

24

9. Service de Bioinformatique, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Paris,
France.

25

26

10. Collège de France, Paris, France

27

28

29

*: equal contribution

30

Correspondence:

31

Jean-Pierre de Villartay or Despina Moshous, DGSI-INSERM1163, Equipe
labellisée La LIGUE, Institut Imagine

32

33

24 bd du Montparnasse, 75015 Paris, France.

34

devillartay@gmail.com ; despina.moshous@inserm.fr

35

36

37 **ABSTRACT**

38 **Background:** Some inborn immune deficiencies are caused by a defect in DNA damage
39 repair pathways. We evaluate a young patient with history of combined immune deficiency
40 associated with autoimmune features and lymphoproliferative syndrome. Patient's cells show
41 increased sensitivity to mitomycin C (MMC).

42 **Objective:** We sought to characterize the underlying genetic cause of this syndrome.

43 **Methods:** We performed genome-wide homozygosity mapping, followed by whole-exome
44 sequencing and analyzed a conditional KO mouse model.

45 **Results:** We identified a homozygous inherited missense mutation in the gene encoding
46 ELKS (ERC1), involved in DNA repair signaling. WT ELKS complemented the increased
47 cellular sensitivity to MMC of patient's cells. However, the hematopoietic conditional ELKS
48 gene inactivation didn't result in impaired immune development in KO mice.

49 **Conclusions:** Although ELKS was a good candidate gene to explain the patient immune
50 deficiency and increased sensitivity to MMC, a conditional KO mouse model couldn't
51 confirm the implication of this protein in immune development. Our results emphasize the
52 difficult analysis of next generation sequencing in unique case and the hazards of mouse
53 model.

54

55

56

57 **Abbreviations used**

58

CID	Combined Immune Deficiency
CSR	Class Switch Recombination
DSB	Double Strand Break
GFP	Green Fluorescent Protein
GWHM	Genome-Wide Homozygosity Mapping
HR	Homologous Recombination
Ig	Immunoglobulin
IV	Intravenous
KO	Knockout
MCA	Multicolor Competition Assay
MMC	Mitomycine C
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NHEJ	Non-Homologous End Joining
SD	Standard Deviation
SHM	Somatic Hyper Mutation
SNV	Single Nucleotide Variant
WES	Whole-Exome Sequencing

59

60 INTRODUCTION

61 The immune system undergoes important genetic modifications during lymphoid
62 differentiation: V(D)J recombination during B and T lymphocyte development¹, class switch
63 recombination (CSR) and somatic hypermutations (SHM) in the immunoglobulin genes
64 during B cell maturation^{2,3}. Furthermore, lymphocytes encounter different phases of intense
65 cell proliferation predisposing them to "accidental" DNA lesions. Finally, inflammation
66 during the immune response leads to the production of reactive oxygen species known to
67 represent main genotoxic agents. This important genetic plasticity requires efficient DNA
68 repair mechanisms. Two main pathways exist to repair DNA double strand breaks (DSB), the
69 homologous recombination (HR)⁴ and the non-homologous end joining (NHEJ)⁵. NHEJ is
70 involved in the repair of programmed genetic modifications occurring in lymphoid cells
71 during V(D)J recombination and CSR. The crucial role of a competent DNA damage repair
72 machinery in the immune system has been highlighted in animal models and in human
73 conditions where DNA repair defects are responsible for various immune deficiencies and/or
74 hematopoietic disorders⁶. Defective NHEJ can lead to various degrees of immune deficiency
75 ranging from the most severe defect, the radiosensitive severe combined immune deficiency
76 (RS-SCID) with complete absence of B and T cells due to mutations in *ARTEMIS*⁷ or more
77 rarely in *DNA-Pkcs*⁸, to « milder » combined immune deficiency (CID) with increased
78 sensitivity to radiations due e.g. to hypomorphic mutations in *DNA Ligase IV*⁹. Constitutive
79 defects in the Fanconi pathway are responsible for cancer prone diseases (mutations in
80 *BRCA1* and *BRCA2*) and hematopoietic defects (mutations in the different Fanconi anemia
81 genes)¹⁰. Interestingly, *BRCA1* is also involved in T cell lineage development. In fact,
82 thymocyte development in *Brca1*^{-/-} mice is impaired not as a result of defective V(D)J
83 recombination, but because of increased thymocytes apoptosis and defective peripheral T
84 cells proliferation¹¹. More recently, a probably important role of *BRCA1* has been highlighted
85 in CSR where it seems to promote the classical NHEJ pathway and to participate in
86 maintaining genome stability during B cell activation¹². Following these observations, when
87 facing a patient with an unexplained CID associated with developmental disorders and/or
88 lymphoproliferative syndrome, it is legitimate to search for a potential defect in the various
89 DNA damage repair pathways.

90 Here, we describe a patient born to consanguineous parents with combined immune
91 deficiency associated with autoimmune features and lymphoproliferative syndrome, a
92 condition suggestive for a potential autosomal recessive DNA repair deficiency. Increased

93 sensitivity to mitomycine C (MMC) of patient's cells supported this hypothesis. Genome-
94 Wide Homozygosity Mapping (GWHM) combined with Whole-Exome Sequencing (WES)
95 unraveled a homozygous mutation in *ELKS/ERC1* gene. We analyzed the role of this factor in
96 an inducible KO mouse model.

97

98 **MATERIALS AND METHODS**

99 **Study Subjects**

100 We investigated a female patient with combined immune deficiency associated with
101 autoimmunity and lymphoproliferative syndrome. This study was approved by the
102 Institutional Review Boards of the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale"
103 (INSERM) and Necker-Enfants Malades Hospital.

104

105 **Genetic Analyses.**

106 Informed consent for genetic and functional investigations was obtained from the
107 parents and the investigated family members in accordance with the Helsinki Declaration.
108 GWHM and WES were performed as previously described¹³. We searched for non-
109 synonymous Single Nucleotide Variants (SNV) in order to distinguish potentially disease-
110 causing mutations from non-pathogenic variants and focused on rare and previously
111 unidentified variants. We took into consideration variants with a frequency <1% in existing
112 databases: the Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)
113 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) and the The Exome Aggregation Consortium
114 (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>). The patient being born to consanguineous parents,
115 we focused the analysis to homozygous mutations compatible with the regions defined by
116 GWHM.

117

118 **Mitomycine C sensitivity assay**

119 Survival assays were performed by seeding fibroblasts in 24-well plates with
120 increasing concentrations of Mitomycine C (MMC) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
121 during 7 days. Cells were then harvested, and viable cells were numerated by flow cytometry
122 with FACSCaliburTM (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) using FluoSpheres®
123 (Invitrogen) as calibrator. Other genotoxic agents such as ionizing radiations, etoposide, and
124 cisplatin were also tested. G2 accumulation, FANCD2 ubiquitination, Western Blotting, and
125 Chromosomal Breakage on fibroblasts after MMC treatment were performed as previously

126 described¹⁴.

127

128 **Complementation assay**

129 *ELKS*-coding region was subcloned through PCR based strategies using Q5® High-
130 Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) into pLenti6/V5
131 Directional TOPO® vector (Invitrogen) downstream of a GFP cassette and a P2A sequence
132 and with C-terminal V5 epitope under the regulation of the CMV promoter (GFP-P2A-
133 *ELKS*). Empty vector (GFP) was used as control. Viral supernatants were produced in 293T
134 cells through transient transfection with pLenti6/V5 constructs, containing GFP-P2A-*ELKS*
135 or GFP only, and were used to transduce patient's and control cells as previously described¹⁵.
136 Detailed procedures of materials and methods are available in the online Supplementary
137 Methods (see the Online Repository).

138

139 **RESULTS**

140 **Patient's and disease characteristics**

141 We describe a 14-year old girl, born prematurely at 36 weeks of gestation (weight
142 2400g, unknown length). Her parents are first-degree cousins of Algerian ancestry; she has
143 one healthy elder brother. Growth was regular at -2 Standard Deviations (SD) for the weight
144 and between -2 and -3 SD for the height; she further declined growth since the age of 10 years
145 (actual weight <-3 SD, height <-4 SD). The patient has a normal cranial circumference,
146 normal neurocognitive development but a perceptive deafness of unknown origin. She
147 presented recurrent infections starting in the first years of life (otitis, pleuro-pneumonitis, and
148 chicken pox twice). At the age of 3 years she developed auto-immune thrombocytopenic
149 purpura with positive antiGpIIb/IIIa antibodies treated by corticotherapy, at 4 years
150 hepatosplenomegaly and enlarged lymph nodes, and at 5 years autoimmune hemolytic anemia
151 (AIHA) as evidenced by a positive Coombs test (IgG), again treated with corticotherapy. She
152 was addressed to our hospital at the age of 7 with persisting lymphoproliferative syndrome.
153 Treatment with mercaptopurine had to be stopped because of recurrent pneumopathies. Due
154 to therapy-refractory autoimmune thrombocytopenia and anemia, total splenectomy was
155 performed at the age of 8. Histological analysis of the spleen showed hyperplasia of the white
156 pulp composed by multiple lymphoid follicles with light germinal center, discrete abnormal
157 distribution of B cells around the mantle zone, but no abnormal T cell infiltrates (Figure 1A).
158 No clonal B or T cell rearrangements were detected in the spleen by molecular biology. Some

159 months later, she developed intracranial hypertension. MRI of the brain revealed cerebral
160 edema and nodular hyperintensity (Figure 2A). High protein levels and intrathecal IgG
161 synthesis were detected in the cerebrospinal fluid. Cytospin smear showed polymorphic
162 inflammatory cells, predominantly lymphocytes with an activated phenotype, some
163 monocytes and plasma cells. Two brain biopsies showed a discrete perivascular lymphoid
164 infiltrate mostly composed of polyclonal CD3⁺ cells (not shown). There was an oligoclonal
165 profile of TCRgamma and IgH. Large infectious work-up on brain tissue was negative,
166 including PCR for CMV, HHV8. Especially, there was no evidence for EBV neither by PCR
167 nor by *in situ* hybridization with the EBER probe. The patient was treated with
168 cyclophosphamide and rituximab and received immunoglobulin substitutive therapy since
169 then. At the age of 10 years, she developed interstitial pneumonia, a lung CT scan showed a
170 diffuse alveolo-interstitial pattern associated with a bronchial syndrome and mediastinal
171 adenopathies (Figure 2B). Lung biopsy performed at the age of 11 revealed fibro-
172 inflammatory nodules composed by fibroblasts, small mature lymphocytes, mainly CD3⁺,
173 macrophages, and histiocytes (Figure 1B). EBER probe was negative. The patient was treated
174 with high dose steroids and long-course mycophenolate mofetil. Since the age of 8 years, she
175 also presented elevated liver enzymes. Exploration of the liver at the age of 14 found focal
176 steatosis in the abdominal CT-scan (data not shown). Hepatic biopsy showed fibrotic and
177 inflammatory lesions and an abnormal architecture of the portal vessels in some portal triads
178 (Figure 1C).

179

180 **Immunological Findings**

181 At the first presentation in our unit, at the age of 7 years, absolute lymphocyte counts
182 were in the normal range with normal distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Table1). Naïve
183 CD4⁺ and CD8⁺ T cells were decreased. The serum Ig profile suggested impaired B cell
184 function: absent IgA and decreased IgG levels (analysis prior to any administration of anti
185 CD20 antibodies or Ig IV substitution). T cell proliferation was normal upon PHA and
186 antigens like Candida, Tetanus toxoid, and Tuberculin when controlled at the age of 9 years
187 after withdrawal of steroids and revaccination. At the age of 11 years, three years after the last
188 Rituximab, a low absolute count of B cells was associated with low frequency of memory and
189 switched B cells. Interestingly, CD8⁺ cells increased significantly over time with an inversion
190 of the CD4/CD8 ratio. At the last follow-up, she had a low percentage of naïve CD4⁺ and
191 CD8⁺ T cells and a high level of effector memory CD8⁺ T cells. Furthermore,
192 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells were low in the patient (1.56%) compared to the

7

193 control (3.42%).

194

195 **Standard genetic testing**

196 Because of the association of naïve T cell deficiency, autoimmunity, and
197 lymphoproliferation, genes commonly involved in combined immune deficiency were
198 excluded in a diagnostic laboratory (*RAG1*, *RAG2*, *ARTEMIS*, *CERNUNNOS* and *FAS*).

199

200 **Defective DNA repair**

201 As DNA repair deficiencies have been described as underlying cause for combined
202 immunodeficiency, we sought to better describe the patient's cellular phenotype and
203 performed different functional assays in patient's fibroblasts. *In vitro* V(D)J recombination
204 was normal (data not shown). We then evaluated the survival of patient's fibroblasts upon
205 treatment with several genotoxic agents. No sensitivity to ionizing radiations, etoposide or
206 cisplatin was found (data not shown). However, patient's fibroblasts exhibited an increased
207 sensitivity to MMC, a DNA interstrand crosslinker, similar to Fanconi anemia (FA) (Figure
208 3A). Yet, patient's cells did not undergo the G2/M accumulation following MMC treatment
209 typical of FA cells (Figure 3B). Moreover, in contrast to classical "core" FA defective cells,
210 FANCD2 ubiquitination was similarly induced in control and patient's cells after MMC
211 treatment (Figure 3C). Lastly, no increased chromosome breakage was observed in patient's
212 fibroblasts after MMC treatment, excluding FA syndrome (data not shown). The observed
213 increased sensitivity to MMC nevertheless suggested a molecular defect in a gene involved in
214 DNA repair mechanisms.

215

216 **Mutation detection**

217 We took advantage of the consanguineous status of the family (Figure 4A) to perform
218 WGHM in combination with WES by Next Generation sequencing (NGS) on genomic DNA.
219 We restricted the analysis of the WES data to homozygous mutations inside the candidate
220 regions defined by the WGHM (Figure 4B). Among the 19 possible candidate genes (see
221 Table S1), we excluded *FANCM* because the identified SNV leads to a synonymous mutation
222 with no alteration of the splice as tested on cDNA (data not shown). We then focused our
223 attention to a SNV in the *ERC1* gene (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1,
224 hereafter called *ELKS*) because of its known implication in the response to genotoxic
225 stress^{16,17} (see below). The presence of the mutation in the patient and its segregation in the
226 family were confirmed by direct sequencing (Figure 4C). The patient carries a homozygous

8

227 missense mutation in exon 3: c.759G>T, p.R253S. This variant, rs147755448, is rare with a
228 frequency of 1.4×10^{-4} , and no homozygous mutations have been described so far (The
229 Exome Aggregation Consortium; ExAC). Also, the mutated amino acid R253 is highly
230 conserved among species (Figure 4D). This variant could be considered as possibly
231 deleterious with a PHRED Score of 14.73 by CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>).

232

233 **Functional complementation**

234 In order to validate the identified *ELKS* mutation, we performed functional
235 complementation studies through multicolor competition assay (MCA) following MMC
236 treatment¹⁸. Patient's and control fibroblasts were transduced with a lentiviral vector
237 expressing wt-*ELKS* or an empty vector, both of them co-expressing GFP. A mix of
238 transduced (GFP+) and non-transduced (GFP-) fibroblasts was submitted to MMC treatment
239 at 12.5 ng/ml. A selective advantage was conferred by the expression of wt-*ELKS* in the
240 patient's cells as evidenced by a 6-fold increase of GFP expression after 12 days of MMC
241 treatment (Figure 4E). This result suggested the implication of the *ELKS* mutation in the
242 MMC sensitivity of the patient's fibroblasts.

243

244 **Conditional knockout of *ELKS* in hematopoietic cells in mice**

245 To better understand the putative role of *ELKS* in the hematopoietic system and the
246 pathogenicity of the identified mutation, we analyzed a KO mouse model. We first verified
247 the previously described lethality of *ELKS*^{null/null} mice¹⁹ by crossing two *ELKS*^{null/WT} mice
248 together. Among 45 pups, 32 were *ELKS*^{null/WT}, 13 *ELKS*^{WT/WT}, but none were *ELKS*^{null/null}
249 consistent with the already observed embryonic lethality of *ELKS*^{null/null} mice. To elucidate
250 the function of *ELKS* in lymphoid development and homeostasis, we generated mice with a
251 conditional knockout of *ELKS* in the hematopoietic system and confirmed the complete
252 deletion of *ELKS* in hematopoietic organs by genomic PCR and western blot on spleen and
253 thymus. The *ELKS*^{flox} allele was absent in hematopoietic organs for *ELKS*^{null/flox}/*iVavCre*+
254 mice and *ELKS*^{flox/flox}/*iVavCre*+ mice as expected (figure S1A). The western blot analysis
255 confirmed the correct deletion of the *ELKS* protein in hematopoietic organs (figure S1B).

256

257 ***ELKS* deficiency has no consequences on lymphoid development in mice**

258 B and T cell development and homeostasis were analyzed in 10 to 12 weeks old adult
259 mice. No significant difference in the weight of the spleen was noticed between control (mean
260 114 mg, SD 11) and *ELKS*^{flox/flox}/*iVavCre*+ mice (mean 122 mg, SD 16), the absolute number

9

261 of splenocytes was slightly increased in $ELKS^{flox/flox}/iVavCre+$ ($p=0.04$, Figure 5A). We
262 reported no significant differences in the spleen in the proportion of $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T
263 cells (Figure 5B and 5C). We then analyzed the proportion of naïve, memory, and effector
264 $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in spleen (Figure 5D) and lymph nodes (data not shown). We only
265 found a slight decrease of memory $CD8^+$ T cells in the spleen of $ELKS^{flox/flox}/iVavCre+$ mice
266 as compared to controls ($p=0.04$). Because of the observed deficiency of regulatory T cells in
267 the patient, we analyzed this subset in murine splenocytes by FACS using anti-FoxP3 and
268 anti-CD25 antibodies and found no significant differences between the two groups of mice
269 (Figure 5E). We also tested CD3/CD28 activation in $ELKS$ deficient T cells, and again we
270 didn't detect any differences in the proliferative capacity of $CD4^+$ and $CD8^+$ T splenocytes
271 (Figure 5F). When analyzing the thymus of $ELKS^{flox/flox}/iVavCre+$ and control mice, we
272 found no significant differences in the absolute number of thymocytes (Figure 6A), or in the
273 number of double positive ($CD4^+CD8^+$), double negative ($CD4^-CD8^-$), and single positive
274 $CD4^+$ or $CD8^+$ thymocytes (Figure 6B). We also analyzed B cell development in murine bone
275 marrow by FACS analysis with anti-B220 and anti-IgM antibodies (Figure 6C) and B cell
276 maturation in the spleen with anti-B220, anti-IgM, anti-CD21, and anti-CD23 antibodies
277 (Figure 6D). We noticed no differences in the B cell compartment between
278 $ELKS^{flox/flox}/iVavCre+$ and control mice. Overall, these results suggest that specific deletion
279 of $ELKS$ in the murine hematopoietic system has no evident impact on lymphocyte
280 development and maturation or T cell activation in response to CD3/CD28 stimulation.

281

282 DISCUSSION

283 We investigated a patient with a severe unknown combined immunodeficiency. As
284 some primary immunodeficiencies are attributable to monogenic defects in DNA damage
285 repair pathways, we explored this aspect *in vitro* and found increased sensitivity of patient's
286 fibroblasts to MMC, a genotoxic agent. The consanguinity of the patient's family was
287 suggestive of an autosomal recessive transmission leading us to search a homozygous
288 mutation in a gene coding for a factor involved in DNA repair and in lymphocyte
289 development and homeostasis. The combined WGHM and WES analysis allowed us to
290 identify homozygous SNV in 19 genes, out of which the *ELKS* gene was the most promising
291 candidate. In order to validate the causative role of this SNV, we sought to complement the
292 cellular phenotype of sensitivity to MMC through transduction with the wild type form of
293 *ELKS*. The results obtained with the complementation experiments suggest that the R253S

294 mutation in ELKS is indeed responsible for the sensitivity of patient's fibroblasts to MMC.
 295 However, the pathophysiological mechanism leading to the patient's immunological
 296 phenotype had to be elucidated.

297

298 ELKS was first described in 1999 in papillary thyroid carcinoma, in a fusion gene
 299 (*RET-ELKS*) due to the translocation $t(10;12)(q11;p13)^{20}$. The presence of multiple coiled-
 300 coil domains in the ELKS product suggests that the ELKS protein forms dimers. Two coding
 301 isoforms of ELKS have been described: ELKSdelta and ELKSepsilon consisting of 1088 and
 302 1116 amino acid residues respectively. Western blotting analysis suggested that ELKSdelta is
 303 abundant in the brain, whereas ELKSepsilon is ubiquitous^{21,22}. The function of ELKS is well
 304 described in presynaptic neurons where it regulates synaptic plasticity, intracellular transport,
 305 and exocytosis^{23,24}. The ubiquitous isoform of ELKS has been implicated in NF- κ B activation
 306 through TNF α signaling²⁵ and after DNA-damage signaling^{16,17}. ATM- and NEMO-
 307 dependent ubiquitination of ELKS with the help of XIAP leads to the ubiquitin-dependent
 308 assembly of TAK1/TAB2/3 and NEMO/IKK complexes, resulting in IKK and NF- κ B
 309 activation following genotoxic stimuli. The activation of NF- κ B is probably necessary to
 310 protect damaged cells from apoptotic cell death while the DNA double strand breaks are
 311 repaired. However, this process should be highly regulated to avoid the survival and
 312 proliferation of deleteriously damaged cells. In the immune system, programmed DSBs are
 313 arising during V(D)J recombination in B and T cell development and during B cell activation
 314 (CSR). These programmed DSBs engage the NHEJ DNA repair pathway. Interestingly, NF-
 315 κ B has been shown to be activated by endogenous DSBs that are formed during lymphocyte
 316 differentiation in mice²⁶. Moreover, defects in some proteins involved in NF- κ B activation
 317 pathway after DSBs are known to be responsible of specific immunodeficiencies (ATM,
 318 NEMO, XIAP). TAK1 is not known so far to be involved in human immunodeficiency, but
 319 the crucial role of TAK1 in murine B and T cell development and maturation has been
 320 highlighted^{27,28,29}. Murine conditional knockout models of TAK1 showed its central role in
 321 the maturation of T cells through activation of NF- κ B²⁷ and in the generation of regulatory T
 322 cells²⁸. Also specific inactivation of TAK1 in the B cell lineage showed defective B cell
 323 maturation and failure to activate NF- κ B after BCR stimulation²⁹. The link between ELKS
 324 and the ubiquitin-dependent assembly of TAK1/TAB2/3 complex supports the hypothesis that
 325 a defect of ELKS in hematopoietic cells may lead to an immune deficiency similar to the one
 326 described in mice with conditional TAK1 deletion. Unfortunately, our results in

327 ELKS^{flox/flox}/iVavCre+ mice do not show any evident consequences of the conditional ELKS
328 deletion with regard to T- and B- cell development and maturation and the frequency of
329 regulatory T cells. The R253S ELKS mutation may be nonetheless responsible for the
330 patient's immune phenotype, as ELKS may be dispensable in mice for immune development.
331 The existence of a redundant protein in mouse but not in human may be a possible
332 explanation for the discordant role of ELKS in these two species. Such divergence has already
333 been described; e.g. the Xiap deficient mice does not reproduce the human X-linked
334 lymphoproliferative syndrome³⁰. The possible differences between mice and men concerning
335 the immune system have been intensely discussed³¹, suggesting that what is true in mice
336 might not always be true in humans. The genetic background of mice seems to be also very
337 important³². Alternatively, a secondary event such as an infectious trigger could be necessary
338 to provoke immune dysregulation. This could explain the absence of an immunological
339 phenotype in the ELKS^{flox/flox}/iVavCre+ mice, which have been raised in a controlled
340 environment.

341 Therefore, we cannot formally exclude that the R253S ELKS mutation is solely
342 responsible for the sensitivity of patient's fibroblasts to MMC and has no consequences for
343 the immune phenotype. In that case, a not yet identified deleterious mutation in an additional
344 gene may be responsible for the immune deficiency in our patient. However, the high degree
345 of consanguinity in this family strongly suggests an autosomal recessive transmission, and we
346 did not identify any homozygous mutation in another immune related candidate gene (see
347 table S1).

348 Our observation clearly do not only show the limitations of highly innovative genetic
349 methods like WES to unravel the pathophysiology of molecular defects in single cases, but
350 also the continuing challenge to determine the accurate clinical relevance of animal models,
351 which is particularly difficult to assess as negative results often go unpublished.

352

353 ACKNOWLEDGMENTS

354 We thank the family for their continuous cooperation. This work was supported by
355 institutional grants from INSERM, and by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer
356 (Equipe Labelisée La Ligue), the Agence National de La Recherche (ANR/PRTS
357 ImmuneRep), the Institut National du Cancer (INCa PLBIO11-151), and ERC PID-IMMUN
358 (N° 249816). No potential conflict of interest relevant to this article was reported. We thank
359 Nathalie Lambert, Corinne Jacques, Stéphanie N'daga, and Aminata Diabate for technical
360 assistance; Marie-Claude Stolzenberg for the regulatory T cell staining; Aude Queixalos and

12

361 Karelia Lipson of SEAT mice facility.

362

363 **REFERENCES**

- 364 1. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575–81.
- 365 2. Durandy A, Revy P, Fischer A. Human models of inherited immunoglobulin class
366 switch recombination and somatic hypermutation defects (hyper-IgM syndromes). *Adv*
367 *Immunol* 2004;82:295–330.
- 368 3. Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P,
369 et al. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the
370 regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 2007;26:7780–91.
- 371 4. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous Recombination and Human
372 Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harb*
373 *Perspect Biol* 2015;7:a016600.
- 374 5. Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE. Repair of double-strand breaks by end joining.
375 *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a012757.
- 376 6. Revy P, Buck D, le Deist F, de Villartay J-P. The repair of DNA damages/modifications
377 during the maturation of the immune system: lessons from human primary
378 immunodeficiency disorders and animal models. *Adv Immunol* 2005;87:237–95.
- 379 7. Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, et
380 al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is
381 mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 2001;105:177–86.
- 382 8. van der Burg M, Ijspeert H, Verkaik NS, Turul T, Wiegant WW, Morotomi-Yano K, et
383 al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis
384 activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest* 2009;119:91–8.
- 385 9. Buck D, Moshous D, de Chasseval R, Ma Y, le Deist F, Cavazzana-Calvo M, et al.
386 Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic
387 mutations in DNA ligase IV. *Eur J Immunol* 2006;36:224–35.
- 388 10. Kim H, D’Andrea AD. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi
389 anemia/BRCA pathway. *Genes Dev* 2012;26:1393–408.
- 390 11. Mak TW, Hakem A, McPherson JP, Shehabeldin A, Zablocki E, Migon E, et al. *Brcal*
391 required for T cell lineage development but not TCR loci rearrangement. *Nat Immunol*
392 2000;1:77–82.
- 393 12. Björkman A, Qvist P, Du L, Bartish M, Zaravinos A, Georgiou K, et al. Aberrant
394 recombination and repair during immunoglobulin class switching in BRCA1-deficient

- 395 human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:2157–62.
- 396 13. Moshous D, Martin E, Carpentier W, Lim A, Callebaut I, Canioni D, et al. Whole-
397 exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with
398 immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation. *J Allergy Clin*
399 *Immunol* 2013;131:1594–603.
- 400 14. Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, Vasquez N, Dubois d’Enghien C, Chamousset D, et al.
401 Spontaneous abrogation of the G₂DNA damage checkpoint has clinical benefits but
402 promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest* 2011;121:184–94.
- 403 15. Malivert L, Callebaut I, Rivera-Munoz P, Fischer A, Mornon J-P, Revy P, et al. The C-
404 terminal domain of Cernunnos/XLF is dispensable for DNA repair in vivo. *Mol Cell*
405 *Biol* 2009;29:1116–22.
- 406 16. Wu Z-H, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM
407 and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 2006;311:1141–6.
- 408 17. Wu Z-H, Wong ET, Shi Y, Niu J, Chen Z, Miyamoto S, et al. ATM- and NEMO-
409 Dependent ELKS Ubiquitination Coordinates TAK1-Mediated IKK Activation in
410 Response to Genotoxic Stress. *Mol Cell* 2010;40:75–86.
- 411 18. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, et al.
412 Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required
413 for DNA repair. *Cell* 2007;129:289–301.
- 414 19. Liu C, Bickford LS, Held RG, Nyitrai H, Südhof TC, Kaeser PS. The active zone
415 protein family ELKS supports Ca²⁺ influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal
416 neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2014;34:12289–303.
- 417 20. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, et al. Fusion of
418 a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary
419 thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:97–103.
- 420 21. Wang Y, Liu X, Biederer T, Südhof TC. A family of RIM-binding proteins regulated by
421 alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc Natl*
422 *Acad Sci U S A* 2002;99:14464–9.
- 423 22. Nakata T, Yokota T, Emi M, Minami S. Differential expression of multiple isoforms of
424 the ELKS mRNAs involved in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes*
425 *Cancer* 2002;35:30–7.
- 426 23. Südhof TC. The presynaptic active zone. *Neuron* 2012;75:11–25.
- 427 24. Schoch S, Gundelfinger ED. Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell*
428 *Tissue Res* 2006;326:379–91.

- 429 25. Ducut Sigala JL, Bottero V, Young DB, Shevchenko A, Mercurio F, Verma IM.
430 Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase
431 regulatory subunit. *Science* 2004;304:1963–7.
- 432 26. Bredemeyer AL, Helmink BA, Innes CL, Calderon B, McGinnis LM, Mahowald GK, et
433 al. DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing
434 lymphocytes. *Nature* 2008;456:819–23.
- 435 27. Liu H-H, Xie M, Schneider MD, Chen ZJ. Essential role of TAK1 in thymocyte
436 development and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11677–82.
- 437 28. Sato S, Sanjo H, Tsujimura T, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. TAK1
438 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation
439 of regulatory T cells. *Int Immunol* 2006;18:1405–11.
- 440 29. Schuman J, Chen Y, Podd A, Yu M, Liu H-H, Wen R, et al. A critical role of TAK1 in
441 B-cell receptor-mediated nuclear factor kappaB activation. *Blood* 2009;113:4566–74.
- 442 30. Rumble JM, Oetjen KA, Stein PL, Schwartzberg PL, Moore BB, Duckett CS.
443 Phenotypic differences between mice deficient in XIAP and SAP, two factors targeted
444 in X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP). *Cell Immunol* 2009;259:82–9.
- 445 31. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human
446 immunology. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:2731–8.
- 447 32. Pearson H. Surviving a knockout blow. *Nature* 2002;415:8–9.
- 448 33. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, et al.
449 Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the
450 Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol*
451 2003;112:973–80.
- 452
- 453

454 **TABLE AND FIGURES LEGENDS**455 **Table 1**

456 Immunological assessment of the patient. In brackets are age-matched normal values for
457 lymphocyte counts, naïve T cell and memory B cell counts, proliferation assays, and
458 immunoglobulin levels (according to Shearer et al.³³ and as established by the performing
459 laboratories). Proliferation assays included the patient's cells without stimulation, as well as
460 positive control cells from healthy donors.

461

462 **Figure 1:** (A) Histologic analysis of the spleen showed hyperplasia of the white pulp
463 composed by multiple lymphoid follicles with light germinal center. Immunostaining with
464 CD20 shows abnormal distribution of the B cells around the mantle zone and abnormality of
465 dendritic follicular cells network. Immunostaining with CD3 shows no T cell infiltrates. (B)
466 Histology of the lung found fibro-inflammatory nodules composed by fibroblasts, small
467 mature lymphocytes, macrophages and histiocytes. Immunostaining with CD3, CD20 and
468 EBER probe were negative. (C) Histology of the liver showed fibrotic and inflammatory
469 lesions and an abnormal architecture of the portal vessels in some portal triads. Positive
470 reticulin staining excluded a tumoral process. Immunostaining showed CD4+ infiltrates.

471

472 **Figure 2: Radiological examination.** (A) MRI brain scan of the patient. At the age of 8, the
473 scan shows right posterior cortical and subcortical hypodensity with nodular contrast. Four
474 months after treatment, the scan shows a regression of the edema. The last control at the age
475 of 14 years shows only discrete and stable gliotic changes. (B) Chest computed tomographic
476 scans in the patient. At the age of 7, the scan shows mediastinal lymph nodes enlargement and
477 bilateral diffuse parenchymal pneumopathy. The parenchymal lung disease moderately
478 improved at the age of 10. The last scan reveals bilateral nodules.

479

480 **Figure 3: DNA damage response in patient's fibroblasts.** (A) MMC sensitivity test in
481 patient's and control fibroblasts. Patient's fibroblasts are as sensitive as Fanconi patient's
482 fibroblasts when treated with MMC. (B) G2M blockage on primary fibroblasts after treatment
483 with increasing doses of MMC. (C) Western blot showing FANCD2 ubiquitination after
484 overnight treatment with MMC

485

486 **Figure 4: Identification of ELKS mutation in the patient.** (A) Pedigree of the

487 consanguineous family (showing two miscarriages). **(B)** Genetic approach used to identify the
488 disease-causing mutation as explained in the text. **(C)** ELKS mutation c759G>T on patient's
489 and family genomic DNA. **(D)** Multiple sequence alignment of ELKS from different species.
490 **(E)** Functional complementation: The selective advantage of transduced GFP-positive cells
491 upon MMC treatment at 12.5 ng/ml was assessed over time. Only patient's cells
492 complemented with ELKS wt show an increase in GFP.

493

494 **Figure 5: T cell analysis in the spleen of control and ELKS^{flox/flox}/iVavCre+ mice. (A)**
495 Absolute count of cells in the spleen (mean +/- standard deviation). **(B)** Percentage of CD3⁺
496 cells in the spleen. **(C)** Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells. **(D)** Analysis of naïve, memory
497 and effector T cells. **(E)** Regulatory T cell analysis in control and ELKS^{flox/flox}/iVavCre+
498 mice. CD25⁺/FoxP3⁺ cells gated on CD3⁺/CD4⁺ in spleen were analyzed by FACS. **(F)** T cell
499 proliferation profile after CD3/CD28 stimulation as determined by dilution of CellTrace
500 Violet. CD4⁺ gated and CD8⁺ gated splenocytes from control and ELKS^{flox/flox}/iVavCre+
501 mice 3 days after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads. Blue peak indicated
502 CellTrace labeling of non-stimulated cells. Proliferation index after FlowJo analysis (total
503 number of divisions divided by the number of cells that went into division).

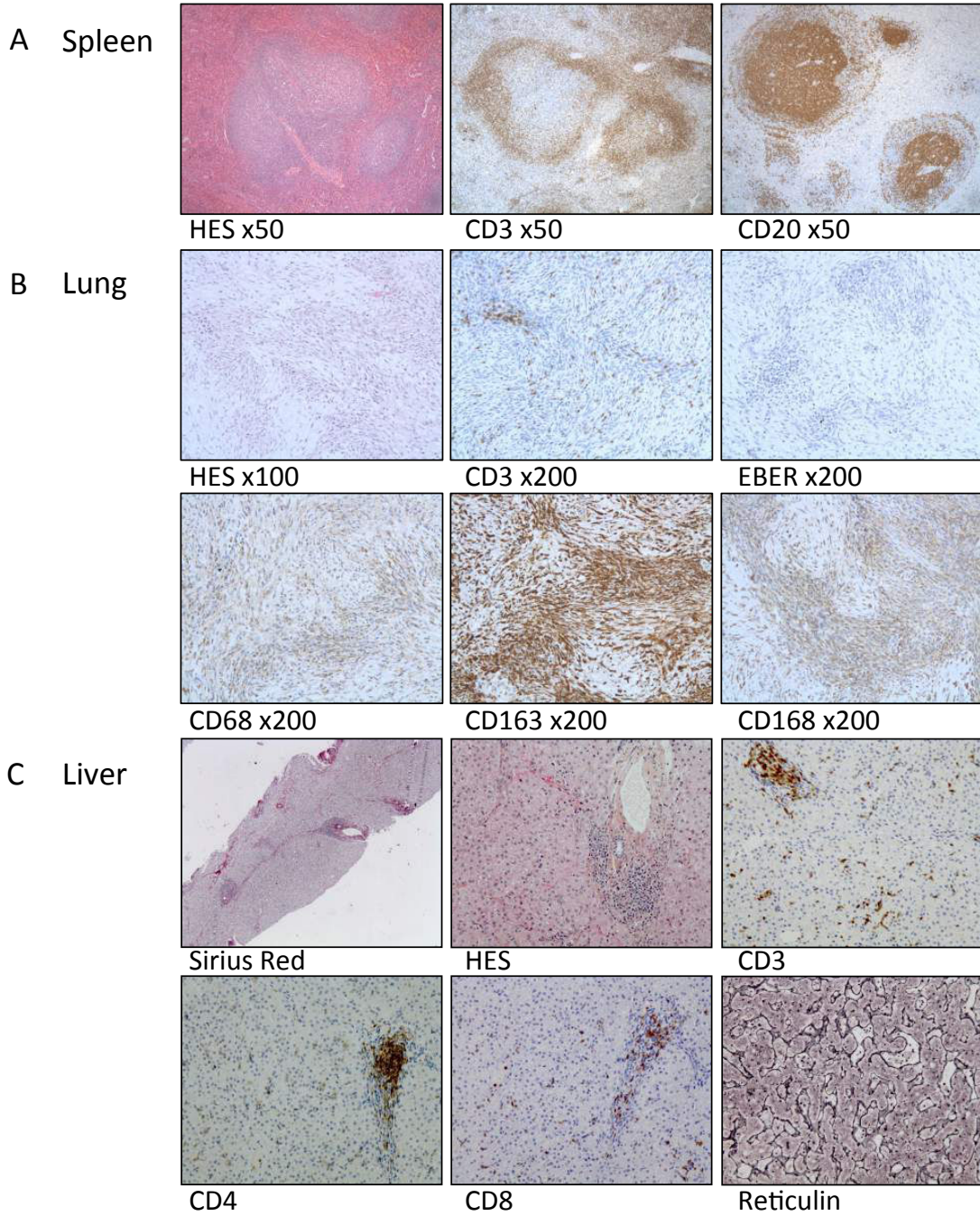
504

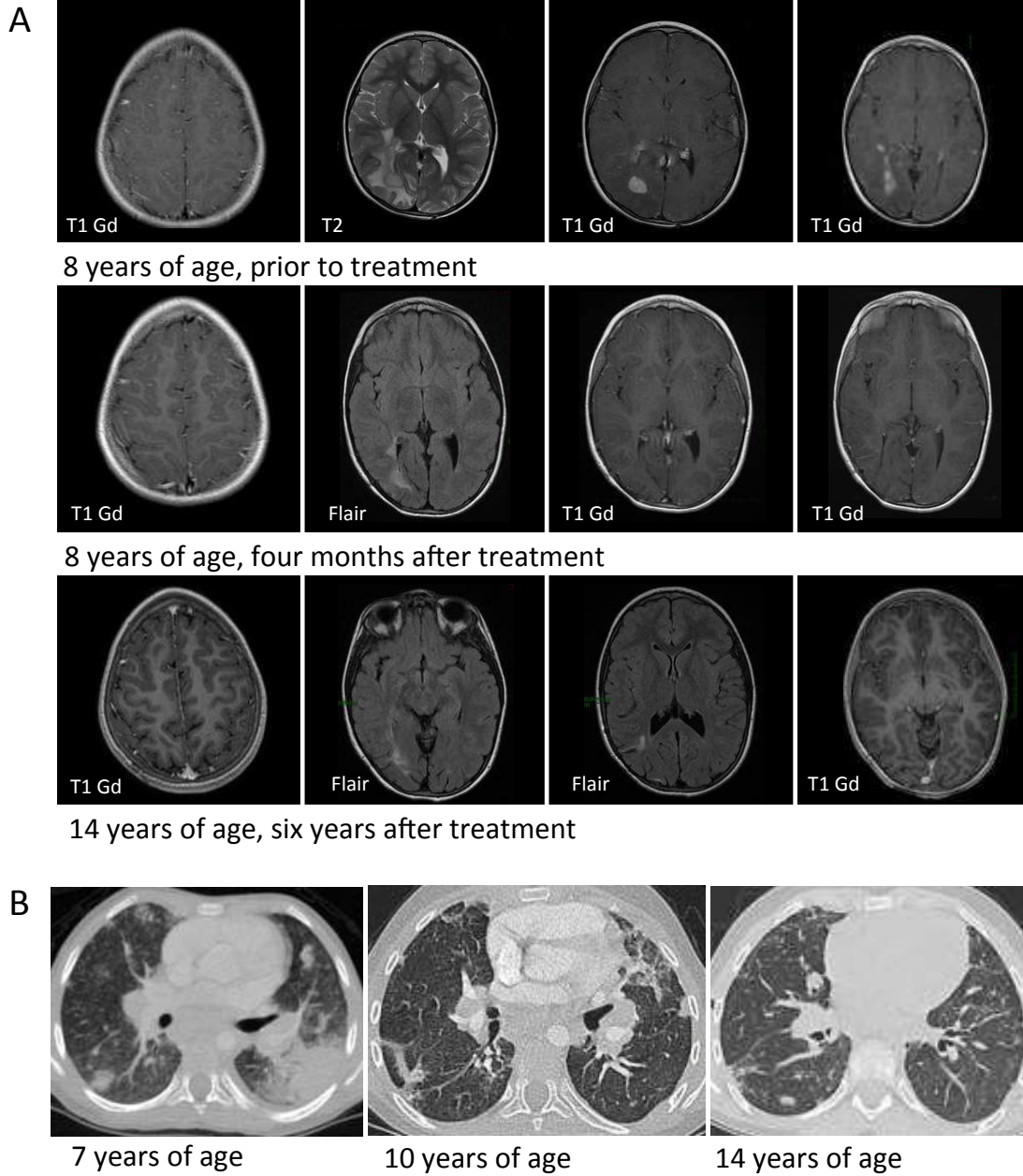
505 **Figure 6: Thymocyte and B cell analysis of control and ELKS^{flox/flox}/iVavCre+ mice. (A)**
506 Absolute count of cells in the thymus (mean +/- standard deviation). **(B)** Thymocytes from
507 control and ELKS^{flox/flox}/iVavCre+ mice were analyzed by FACS using anti-CD4 and anti-
508 CD8 antibodies. **(C)** B cell development in the bone marrow was analyzed by FACS with
509 anti-B220 and anti-IgM antibodies. **(D)** B cell maturation in spleen was analyzed by FACS
510 with anti-CD21 and anti-CD23 antibodies, gated on B220+/IgM+ cells.

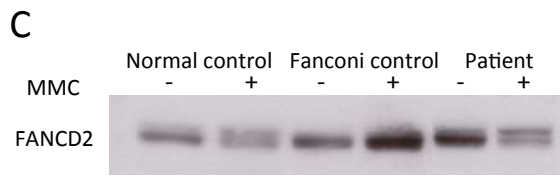
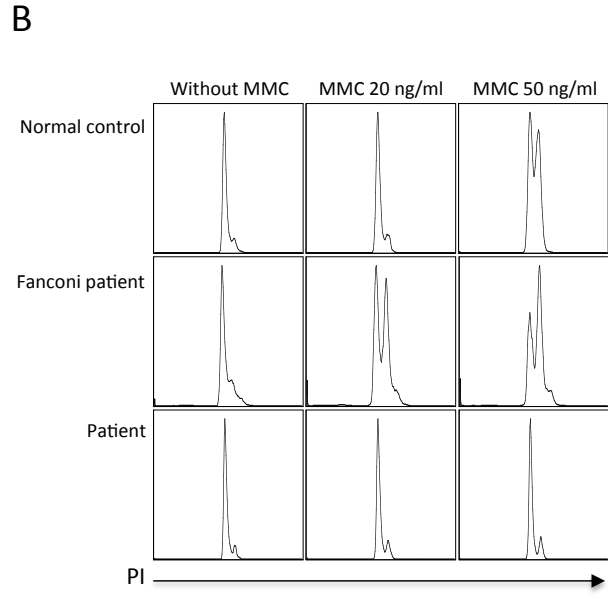
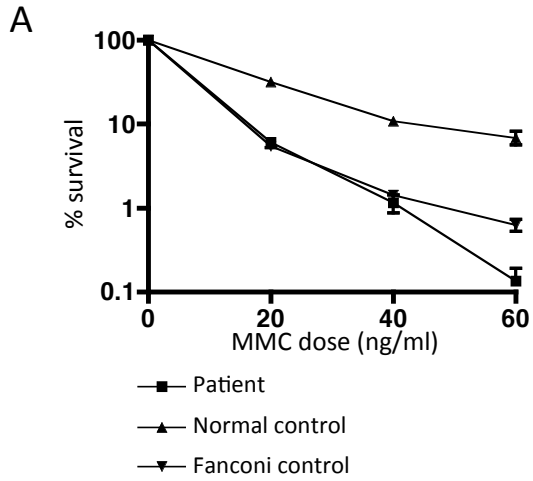
511

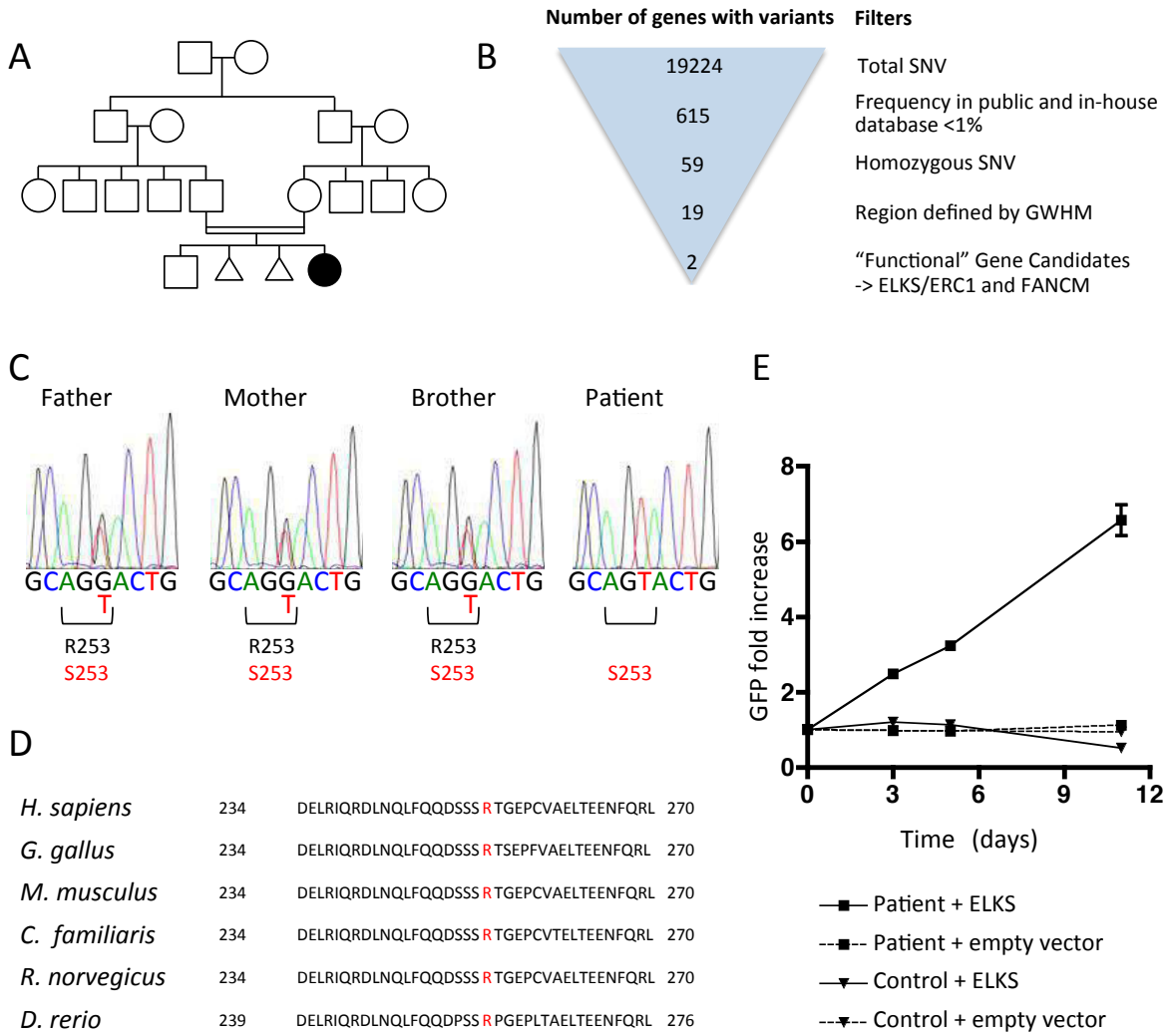
512

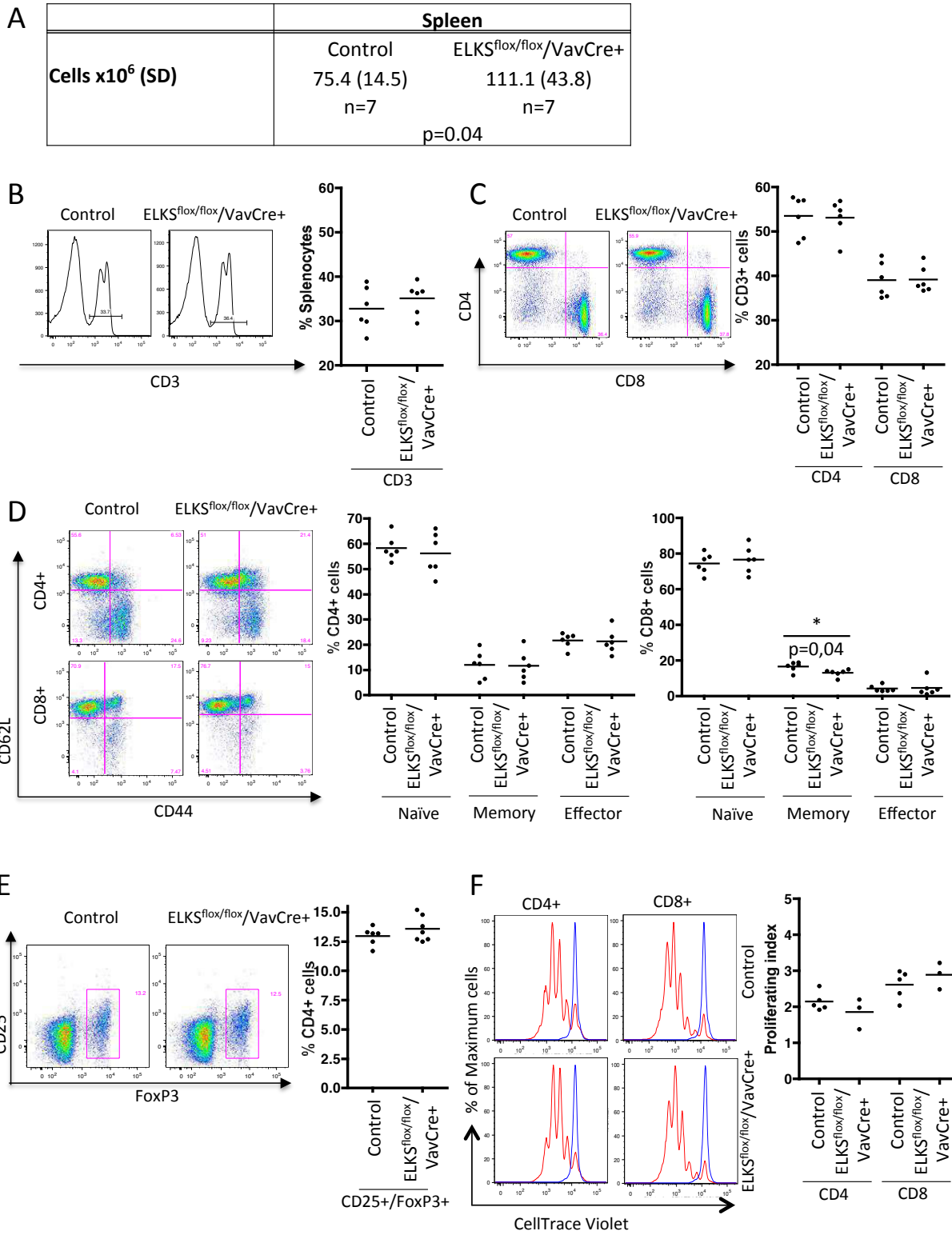
Age at evaluation	7 years	9 years	11 years	14 years
Cell count				
Lymphocytes count (cells/mm ³)	2700 (1900-3700)	4500 (1900-3700)	4000 (1900-3700)	3500 (1400-3300)
CD3 ⁺ (cells/mm ³)	2349 (1200-2600)	3420 (1200-2600)	2760 (1200-2600)	3150 (1000-2200)
CD4 ⁺ (cells/mm ³)	1269 (650-1500)	1170 (650-1500)	760 (650-1500)	875 (530-1300)
CD8 ⁺ (cells/mm ³)	972 (370-1100)	2070 (370-1100)	1880 (370-1100)	1995 (330-920)
CD19 ⁺ (cells/mm ³)	216 (270-860)	315 (270-860)	122 (270-860)	315 (110-570)
NK (cells/mm ³)	81 (100-480)	585 (100-480)	800 (100-480)	35 (70-480)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	1,3 (0.9-2.6)	0,6 (0.9-2.6)	0,4 (0.9-2.6)	0,4 (0.9-2.6)
Naïve CD4 ⁺ T cells : CD31 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ (%)	14 (43-55)		24 (43-55)	10 (43-55)
Naïves CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ (%)	24 (52-68)		10 (52-68)	4 (52-68)
Memory CD4 ⁺ T cells : CD45RO ⁺ /CD4 ⁺ (%)			68 (13-30)	62 (18-38)
Central memory CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ /CD8 ⁺ (%)			1 (11-20)	2 (3-4)
Effector memory CD8 ⁺ T cells : CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ (%)			25 (16-28)	73 (11-20)
Naïve B cells : CD27 ⁺ IgD ⁺ (%)			94 (67,5-83,4)	95 (67,5-83,4)
Switched Memory B cells : CD27 ⁻ , IgD ⁻ (%)			4 (6,5-14,2)	2 (6,5-14,2)
Non-switched memory B cells : CD27 ⁺ , IgD ⁻ (%)			1 (4,1-9,2)	1 (4,1-9,2)
T- cell proliferation				
<i>Mitogens</i>				
PHA (x10 ⁻³ cpm)	267 (>50)	88 (>50)		
<i>Antigens</i>				
Candida (x10 ⁻³ cpm)	0,8 (>10)	54,5 (>10)		
Tetanus toxoid (x10 ⁻³ cpm)	3 (>10)	145,5 (>10)		
Tuberculin (x10 ⁻³ cpm)	5,5 (>10)	64 (>10)		
Ig dosage				
IgG (g/l)	4 (5,82-11,54)		10,63 (6,55-12,29)	9,4 (6,55-12,29)
IgA (g/l)	<0,15 (0,46-1,57)		0,15 (0,50-2,03)	<0,05 (0,50-2,03)
IgM (g/l)	1,44 (0,54-1,55)		<0,10 (0,53-1,62)	0,19 (0,53-1,62)
Ig replacement therapy	-		+	+

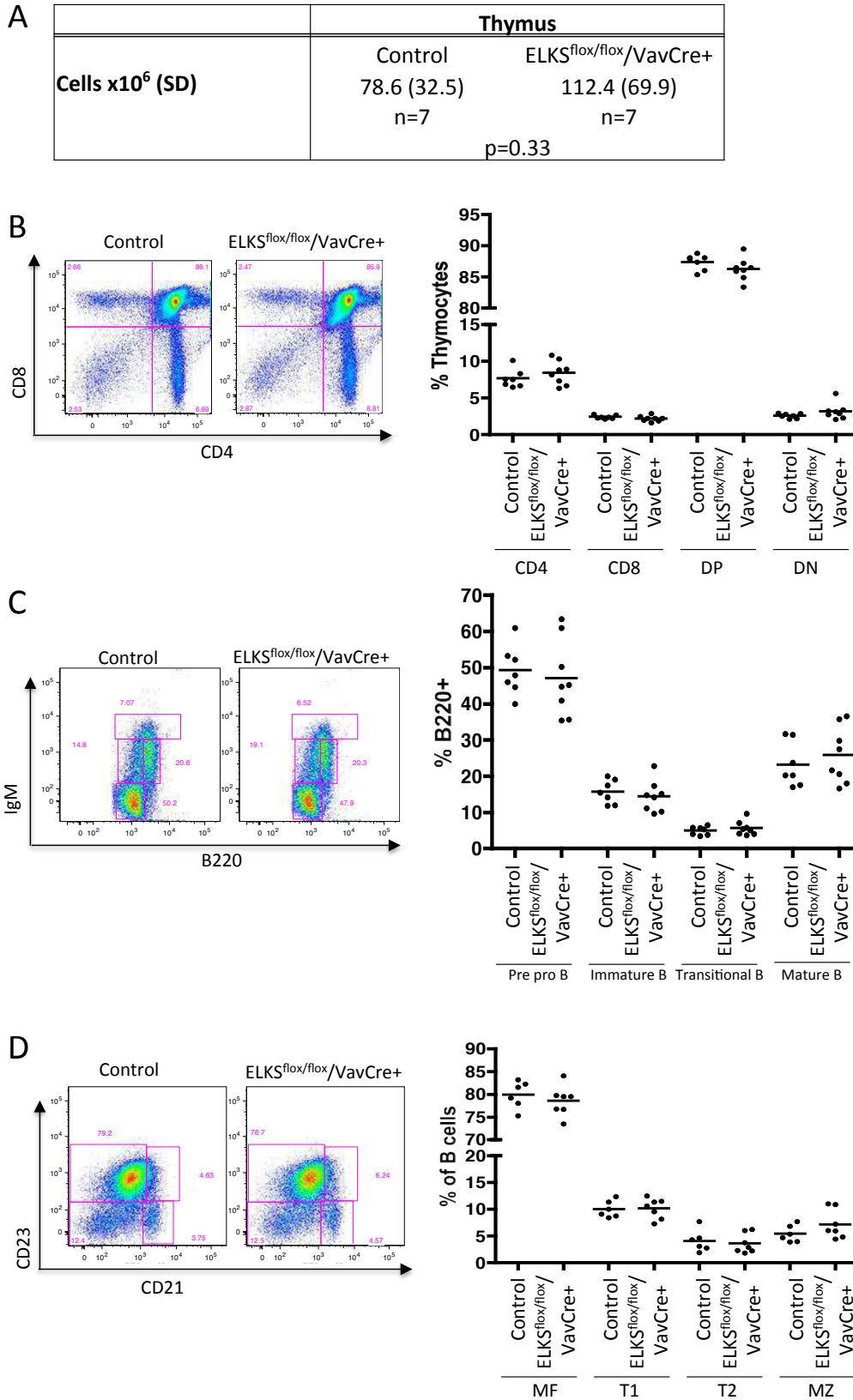












Supplementary Informations

Table S1: Genes with an homozygous SNV identify by WES and GWHM

Figure S1 : Molecular and biochemical analysis of ELKS in mice. (A) A three-primer PCR assay distinguished the alleles ELKS WT (150 pb), ELKS loxP (200 pb) and ELKS null (250 pb) on tail, spleen and thymus for two ELKS null/loxP/VavCre⁺ mice and one ELKS null/WT/ VavCre⁻. (B) Western Blotting on spleen and thymus protein extracts for one ELKS WT/WT mouse and one ELKS loxP/loxP/VavCre⁺ mouse.

Supplementary Methods

Mutation screening.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells of the patient, her parents and her brother. The following oligonucleotide primers flanking the exon 3 of *ELKS* were used to amplify genomic DNA : ELKS-ex3-F (gcacatgcagatgacaatcc) and ELKS-ex3-R (atcccagacatttaggtct) (Eurogentec, Seraing, Belgium). PCR products were amplified with the use of Platinum® Taq DNA Polymerase high-fidelity (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's recommendations and sequenced using the ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations.

Histology.

Biopsy specimens were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained according to standard hematoxylin-eosin staining protocols. *In situ* hybridization with an EBV early RNA (EBER) probe was carried out according to standard methods. Immunohistochemical analysis was performed with the following murine monoclonal Antibodies (mAbs): anti-CD3 anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, (Dako, Glostrup, Denmark).

Cell culture

Patient's and control fibroblasts were immortalized by transfection with pLAS plasmid (SV40 antigen) and hTERT (telomerase) as described^{1,2}. Cells were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

Mice generation and genotyping

Erc1tm2.1Sud/J mice, stock number 015830, were obtained from the Jackson Laboratory (donating investigator : Dr Thomas C. Sudhof, Stanford University School of Medicine, USA). They have been described previously³. To constitutively inactivate one *ELKS* allele, *ELKS*^{lox/+} mice were bred with *MeuCre* transgenic mice⁴. To delete the second *ELKS* allele specifically in hematopoietic cells, we crossed *ELKS*^{lox/lox} or *ELKS*^{null/loxP} mice with *VavCre* transgenic mice which express the Cre recombinase under the *Vav* promoter⁵. Mice were sacrificed and analysed at the age of 8 to 12 weeks. The genotyping of the mice was performed on DNA extracted from tails with DNA lysis direct tail buffer (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and Proteinase K (Euromedex) following standard procedures. *ELKS*^{lox} mice were genotyped with the primers *ELKS* flox F (gaacaagtttcaggacagccaagg) and *ELKS* flox R (caggtgatgacaatctgaaggc). *ELKS*^{null} phenotype was genotyped with a triplex PCR with the primers *ELKS* KO F (tgcaattattgccatgtatgtctg), *ELKS* WT R (ccaggatcaacacctgaggc) and *ELKS* flox R (see above). *MeuCre* and *VavCre* transgenic mice were genotyped using the following primers, *MeuCre*-F (cctggaaaatgcttctgtccg), *MeuCre*-R (cagggtgtataagcaatccc), *VavCre*-F (acggctggatgagatagtg) and *VavCre*-R (cacagtcagcaggttgaga).

Western Blotting

Murine splenocytes and thymocytes were lysed in buffer containing 50mM Tris pH8, 1% Nonidet-P40 (Calbiochem, La Jolla, California, USA), 4mM EDTA-pH8 (Sigma-Aldrich), and cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto a Polyvinylidene difluoride membrane (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The following antibodies were used: monoclonal anti-*ELKS* antibody (clone *ELKS*-30, Sigma-Aldrich) and anti-Actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). As second antibody, anti-mouse-IgG-HRP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used for the Mouse Anti-*ELKS*, Anti-Goat-IgG-HRP (Santa Cruz) for the control with Actin. Revelation was performed by ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) and autoradiography with Amersham Hyperfilm (GE Healthcare).

Flow cytometry analysis of lymphocyte populations

Immune phenotype was performed on lymph node, thymic, splenic, and bone marrow lymphoid populations by fluorescence analysis using a BD LSRFortessaTM cell analyzer (BD Biosciences) according to standard protocols. The following antibodies were used:

anti-mouse B220 PerCP-Cy5.5, CD62L PerCP-Cy5.5, CD44 BV510, CD8 PE, CD4 PE-Cy7 (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA), anti-mouse CD3 FITC, CD25-PerCP-Cy5.5, IgM APC, CD23 PE, CD21 FITC (BD Pharmigen), anti-mouse FoxP3 PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), intracellular staining with FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, California, USA). Data was analyzed with FlowJo software (v9.5.3).

T cell proliferation assays

Splenocyte proliferation was monitored by labelling cells with the CellTrace™ Violet dye (CellTrace™ Violet proliferation kit, Invitrogen) before stimulation, according to the manufacturer's instructions. Cells were stimulated with Dynabeads® Mouse T-activator CD3/CD28 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 3 days of culture, cells were collected and CellTrace™ Violet dilution was assessed by flow cytometry on a BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences). Cells were co-stained with anti-mouse CD4 and anti-mouse CD8 antibody, and dead cells were excluded by Sytox® Red Dead Cell incorporation (Invitrogen). The division index of proliferation was calculated using FlowJo software and corresponds to the average number of cell divisions per cell including the undivided peak.

Statistical analysis

The Mann-Whitney non parametric test was used for statistical analysis.

Supplementary references

1. Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulo D, de Chasseval R, Le Deist F, et al. A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med* 1998;188:627–34.
2. Poinsignon C, de Chasseval R, Soubeyrand S, Moshous D, Fischer A, Haché RJG, et al. Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur J Immunol* 2004;34:3146–55.
3. Liu C, Bickford LS, Held RG, Nyitrai H, Südhof TC, Kaeser PS. The active zone protein family ELKS supports Ca²⁺ influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal

neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2014;34:12289–303.

4. Leneuve P, Colnot S, Hamard G, Francis F, Niwa-Kawakita M, Giovannini M, et al. Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e21.
5. Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK, et al. VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genes N Y N* 2000 2002;34:251–6.

513 **Supplementary Informations**

514 **Table S1: Genes with an homozygous SNV identify by WES and GWHM**

515

516 **Figure S1 : Molecular and biochemical analysis of ELKS in mice.** (A) A three-primer PCR
517 assay distinguished the alleles ELKS WT (150 pb), ELKS loxP (200 pb) and ELKS null (250
518 pb) on tail, spleen and thymus for two ELKS null/loxP/iVavCre+ mice and one ELKS
519 null/WT/ VavCre-. (B) Western Blotting on spleen and thymus protein extracts for one ELKS
520 WT/WT mouse and one ELKS loxP/loxP/iVavCre+ mouse.

521

522 **Supplementary Methods**

523

524 **Mutation screening.**

525 Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells of the patient, her parents and her
526 brother. The following oligonucleotide primers flanking the exon 3 of *ELKS* were used to
527 amplify genomic DNA : ELKS-ex3-F (gcacatgcagatgacaatcc) and ELKS-ex3-
528 R (atcccagcatttaggtct) (Eurogentec, Seraing, Belgium). PCR products were amplified with
529 the use of Platinum® Taq DNA Polymerase high-fidelity (Invitrogen, Carlsbad, California,
530 USA) according to the manufacturer's recommendations and sequenced using the ABI
531 PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PerkinElmer,
532 Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations.

533

534 **Histology.**

535 Biopsy specimens were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained according to
536 standard hematoxylin-eosin staining protocols. *In situ* hybridization with an EBV early RNA
537 (EBER) probe was carried out according to standard methods. Immunohistochemical analysis
538 was performed with the following murine monoclonal Antibodies (mAbs): anti-CD3 anti-
539 CD4, anti-CD8, anti-CD20, (Dako, Glostrup, Denmark).

540

541 **Cell culture**

542 Patient's and control fibroblasts were immortalized by transfection with pLAS plasmid (SV40
543 antigen) and hTERT (telomerase) as described^{1,2}. Cells were cultured in RPMI supplemented
544 with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

545

546 **Mice generation and genotyping**

18

547 Erc1tm2.1Sud/J mice, stock number 015830, were obtained from the Jackson Laboratory
 548 (donating investigator : Dr Thomas C. Sudhof, Stanford University School of Medicine,
 549 USA). They have been described previously³. To constitutively inactivate one *ELKS* allele,
 550 *ELKS*^{flox/+} mice were bred with *MeuCre* transgenic mice⁴. To delete the second *ELKS* allele
 551 specifically in hematopoietic cells, we crossed *ELKS*^{flox/flox} or *ELKS*^{null/loxP} mice with *VavCre*
 552 transgenic mice which express the Cre recombinase under the *Vav* promoter⁵. Mice were
 553 sacrificed and analysed at the age of 8 to 12 weeks. The genotyping of the mice was performed
 554 on DNA extracted from tails with DNA lysis direct tail buffer (Euromedex,
 555 Souffelweyersheim, France) and Proteinase K (Euromedex) following standard procedures.
 556 *ELKS*^{flox} mice were genotyped with the primers *ELKS* flox F (gaacaagtttcaggacagccaagg) and
 557 *ELKS* flox R (caggtgatgacaatctgaaggc). *ELKS*^{null} phenotype was genotyped with a triplex
 558 PCR with the primers *ELKS* KO F (tgcaattattgccatgtatgtgctg), *ELKS* WT R
 559 (ccagatcaacacctgaggc) and *ELKS* flox R (see above). *MeuCre* and *VavCre* transgenic mice
 560 were genotyped using the following primers, *MeuCre*-F (cctggaaaatgcttctgtccg), *MeuCre*-R
 561 (cagggtgtataagcaatccc), *VavCre*-F (acggctggatgagatagtg) and *VavCre*-
 562 R (cacagtcagcaggttgaga).

563

564 **Western Blotting**

565 Murine splenocytes and thymocytes were lysed in buffer containing 50mM Tris pH8, 1%
 566 Nonidet-P40 (Calbiochem, La Jolla, California, USA), 4mM EDTA-pH8 (Sigma-Aldrich),
 567 and cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN,
 568 USA). Lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto a Polyvinylidene difluoride
 569 membrane (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The following antibodies were used:
 570 monoclonal anti-*ELKS* antibody (clone *ELKS*-30, Sigma-Aldrich) and anti-Actin antibody
 571 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). As second antibody, anti-mouse-IgG-HRP
 572 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used for the Mouse Anti-*ELKS*, Anti-Goat-IgG-
 573 HRP (Santa Cruz) for the control with Actin. Revelation was performed by ECLTM Western
 574 Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) and autoradiography with Amersham Hyperfilm
 575 (GE Healthcare).

576

577 **Flow cytometry analysis of lymphocyte populations**

578 Immune phenotype was performed on lymph node, thymic, splenic, and bone marrow
 579 lymphoid populations by fluorescence analysis using a BD LSRFortessaTM cell analyzer (BD
 580 Biosciences) according to standard protocols. The following antibodies were used:

581 anti-mouse B220 PerCP-CY5.5, CD62L PerCP-Cy5.5, CD44 BV510, CD8 PE, CD4 PE-Cy7
 582 (Sony Biotechnology, San Jose, California, USA), anti-mouse CD3 FITC, CD25-PerCP-
 583 Cy5.5, IgM APC, CD23 PE, CD21 FITC (BD Pharmigen), anti-mouse FoxP3 PE (Miltenyi
 584 Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), intracellular staining with FoxP3/Transcription Factor
 585 Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, California, USA). Data was analyzed with
 586 FlowJo software (v9.5.3).

587

588 **T cell proliferation assays**

589 Splenocyte proliferation was monitored by labelling cells with the CellTrace™ Violet dye
 590 (CellTrace™ Violet proliferation kit, Invitrogen) before stimulation, according to the
 591 manufacturer's instructions. Cells were stimulated with Dynabeads® Mouse T-activator
 592 CD3/CD28 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 3 days of culture,
 593 cells were collected and CellTrace™ Violet dilution was assessed by flow cytometry on a BD
 594 LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences). Cells were co-stained with anti-mouse CD4
 595 and anti-mouse CD8 antibody, and dead cells were excluded by Sytox® Red Dead Cell
 596 incorporation (Invitrogen). The division index of proliferation was calculated using FlowJo
 597 software and corresponds to the average number of cell divisions per cell including the
 598 undivided peak.

599

600 **Statistical analysis**

601 The Mann-Whitney non parametric test was used for statistical analysis.

602

603 **Supplementary references**

- 604 1. Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulo D, de Chasseval R, Le Deist
 605 F, et al. A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased
 606 sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new
 607 DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med* 1998;188:627–34.
- 608 2. Poinsignon C, de Chasseval R, Soubeyrand S, Moshous D, Fischer A, Haché RJG, et al.
 609 Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur J Immunol*
 610 2004;34:3146–55.
- 611 3. Liu C, Bickford LS, Held RG, Nyitrai H, Südhof TC, Kaeser PS. The active zone protein
 612 family ELKS supports Ca²⁺ influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal

- 613 neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2014;34:12289–303.
- 614 4. Leneuve P, Colnot S, Hamard G, Francis F, Niwa-Kawakita M, Giovannini M, et al.
615 Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of
616 residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e21.
- 617 5. Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK, et al.
618 VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial
619 lineages. *Genes N Y N* 2000 2002;34:251–6.
- 620

Table S1

Gene	Chromosome
USH2A	1
ADAM23	2
ERC1/ELKS	12
FANCM	14
CHRNA7	15
EMP2	16
OGFOD1	16
KATNB1	16
CNGB1	16
RNF126	19
C19orf24	19
ADAMTSL5	19
TJP3	19
EBI3	19
ZSCAN4	19
MBD3	19
FUT5	19
ACO24592.12	19
NDUFA11	19

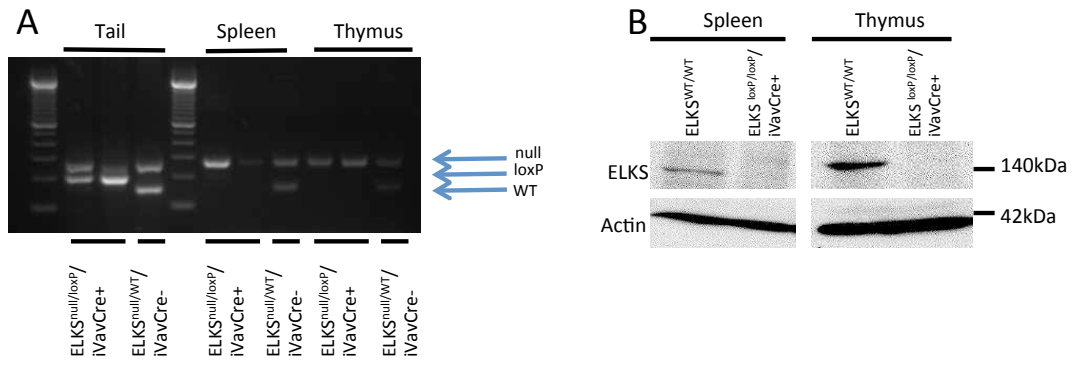


Figure S1

