Université de Paris

École doctorale Bio-SPC ED562

Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses

Unité INSERM 1163, Institut Imagine, Paris

Identification et caractérisation d'une nouvelle forme de défaut partiel récessif héréditaire en JAK1 chez l'homme

Par Valentine Delin ép. Jeanne-Julien

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Jacinta Bustamante

Présentée et soutenue publiquement le 04 Octobre 2019

Devant un jury composé de :

Guy Gorochov	PU-PH	Université Paris 6	Rapporteur
Marlène Pasquet	PH-HDR	CHU de Toulouse	Rapporteur
Jean-François Emile	PU-PH	Université Paris-Saclay	Membre du jury
Léa Rémy-Tourneur	MCU-HDR	Université Paris Descartes	Membre du jury
Jean-Laurent Casanova	PU-PH	Université Paris Descartes	Membre du jury
Jacinta Bustamante	MCU-PH HDR	Université Paris Descartes	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Je souhaite en premier lieu remercier chaleureusement le Dr. Marlène Pasquet et le Pr. Guy Gorochov pour avoir consacré du temps afin de faire le rapport de ce manuscrit, ainsi que le Pr. Jean-François Emile et le Dr. Léa Rémy-Tourneur pour avoir accepté de juger mon travail en participant à mon jury de thèse.

Un grand merci également au Pr. Jean-Laurent Casanova, directeur du Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son domaine.

Je tiens bien évidemment à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Jacinta Bustamante, qui m'a accueillie au sein de son équipe et accompagnée au long de ces trois années. Je garderai de toi quelques phrases marquantes, comme la boule de cristal ou les pommes et les oranges.

Je voudrais également remercier toute l'équipe. Merci à Anne, Emmanuelle et Vivien pour les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de cette thèse. Merci aux ingénieurs pour toute l'aide technique qu'ils m'ont apportée. Merci Lazaro, Mélanie et Maya pour votre gentillesse et pour avoir toujours eu une oreille attentive à me prêter en pièce de culture, lorsque j'avais besoin de raconter mes déboires. Merci Paul pour toute l'aide que tu m'as apportée. Je n'aurais jamais pu finir ces fichus WB JAK1 sans toi !

Un grand merci également à toute l'équipe MSMD. Je ne sais pas ce que j'aurai fait sans vous ! Merci à Jérémie pour tous ces FACS qui ont duré des heures. Tu as été d'une aide précieuse. Merci Manon pour ta bonne humeur constante, et tes gros câlins qui ont toujours su me remonter le moral. Anna-Lena, danke schön für all die Ritter Schokoladen und die Haribos, und anke für deine Begeisterung für die Wissenschaft. You reminded me on my bad days that science is actually fun. You truly are one happy penguin ! (and I really hope that I didn't mangle the German language too much. Would you believe that I used to have a B2 level in German ?)

Cecilia, Cécile, Joëlle, Carmen, on en a vécu des choses ensemble dans ce labo ! Merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les moments de joie comme dans les moments plus difficiles ! Cecilia, gracias para me hablar en español, and making me feel part of the « Latin America's greatness » family in the lab, even though I still can't speak a word of Spanish after 3 years around you. I don't know if Argentina truly is the best, but you are without a doubt its best ambassador ! Cécile, ma petite geek préférée, te voir faire le tour du labo dans tes jolies robes tous les matins était le rayon de soleil de mes matinées. Je ne désespère pas de réussir à reprendre Pandémie et à faire un jeu de rôle ensemble un jour ! Joëlle, merci pour tous les fous rires que tu m'as donnés avec tes histoires de douche ! Je te souhaite tout le bonheur possible

pour ta nouvelle vie en dehors du labo. Carmen, mi hermana del laboratorio, what is there to say ? You taught me nearly every single experiment, you've been my guide, my role model, my confident. I miss you dearly. I know that you will be the greatest mom, and I look forward to exchanging tips and anecdoctes on motherhood with you.

Merci à Astrid, mon bébé chou, pour son timing impeccable…

Et enfin un immense merci à Louis, sans qui je n'aurai jamais réussi à tenir jusqu'au bout de ces trois ans. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de t'être transformé en chauffeur le week-end, d'avoir épongé mes crises de larmes, subi mes sautes d'humeur et fait les frais de mes frustrations pendant ces trois années. Merci surtout d'avoir toujours cru en moi, en particulier lorsque j'étais à deux doigts de tout laisser tomber. Tu es mon roc.

Table des matières

Résumé 6

Summary 7

Liste des tableaux 8

Liste des figures 9

Abréviations 10

Introduction 13

A. Syndrome de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes 13

a. Définition 13

b. Défauts de réponse à l'IFN-γ 17

i. Déficit en IFN-γR1 17

ii. Déficit en IFN-γR2 21

iii. Déficit en STAT1 24

iv. Phénotypes cliniques de patients présentant un défaut IFN-γR1/IFN-γR2/STAT1 et défaut de réponse à l'IFN-γ 27

B. JAK1 29

a. Activation de JAK1 en réponse aux IFN et autres cytokines 29

b. Modulation de l'activation et désactivation de JAK1 35

i. Inhibition et activation du domaine kinase JH1 par le domaine pseudo-kinase JH2 35

ii. Inhibition par les protéines tyrosine phosphatases 37

iii. Inhibition par les suppresseurs de signalisation des cytokines 37

c. Souris *Jak1*-/- : phénotype cellulaire de la souris KO et phénotype infectieux 38

d. Déficience de JAK1 chez l'homme (mutation germinale perte de fonction « LOF ») : phénotype clinique et cellulaire 39

e. Mutation germinale *JAK1* GOF : phénotype clinique et cellulaire 41

Hypothèses et objectifs 43

Matériel et méthodes 44

Résultats : Nouveau défaut génétique AR de JAK1 48

A. Phénotype clinique 48

B. Identification des mutations par criblage génétique : WES 53
C. Caractérisation des allèles et comparaison avec les allèles existants 55
a. Conséquences des mutations sur l'ARNm et la protéine 55
b. Les mutations d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées dans un modèle de transfection transitoire 59
c. Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite aux IFN dans un système de transfection transitoire 61
d. Les allèles *JAK1* mutés ont un impact sur la réponse aux IFN plus sévère dans un système de rétrotransduction 64
D. Phénotype cellulaire de fibroblastes et lignée B-EBV 70
a. La réponse à l'IFN-γ est diminuée dans les lignées B-EBV de la patiente 70
b. Les lignées B-EBV de la patiente répondent normalement à l'IFN-α 71
c. La réponse aux IFN des fibroblastes de la patiente est similaire à celle des contrôles sains 74
E. Activation sur sang (évaluation de l'axe IFN-γ) 79
Conclusions et perspectives 81
Bibliographie 85
Annexes (articles et posters) 99

Résumé

Chez l'homme, JAK1 est impliquée dans les voies de réponse à de multiples cytokines, notamment les voies de signalisation des IFN de type I et II. Une mutation hypomorphe germinale rare de JAK1 à l'état homozygote a été précédemment décrite chez un patient pakistanais de 22 ans souffrant d'infections mycobactériennes et virales, ainsi que d'un carcinome de la vessie. Nous avons étudié une patiente algérienne de 6 ans, souffrant d'infections mycobactériennes imitant une histiocytose à cellules de Langerhans. Par séquençage de l'exome, nous avons déterminé que la patiente était hétérozygote composite pour une mutation faux-sens (p.C657S) et pour une mutation d'épissage (c.2108_2115+15del) dans le gène *JAK1*. L'allèle muté sur le site d'épissage codait trois transcrits alternatifs (c.1756_2115del, c.1900_2115del et c.1988_2115del). En système de surexpression, la protéine codée par l'allèle faux-sens diminuait mais n'abolissait pas la réponse à l'IFN-γ, et n'impactait pas la réponse à l'IFN-α2b. Les produits des trois variants d'épissage étaient quant à eux perte de fonction pour les stimulations par l'IFN-γ et l'IFN-α. De plus, les cellules B-EBV de la patiente présentaient une réponse à l'IFN-γ très impactée et ce phénotype pouvait être sauvé par rétrotransduction avec un ADNc *JAK1* WT. En revanche, les fibroblastes de la patiente répondaient normalement aux IFN-γ et IFN-α. Nous avons ainsi décrit un second patient avec une nouvelle forme partielle de défaut autosomique récessif de JAK1, se manifestant par un MSMD isolé du fait de la diminution apparemment sélective de la voie de réponse à l'IFN-γ.

Mots-clés :

IFN, ostéite, mycobactérie, histiocytose, JAK1

Summary

Human JAK1 is involved in multiple cytokine responsive pathways, including type I and II IFN signaling pathways. Homozygosity for a rare germline hypomorphic mutation in *JAK1* was previously described in a 22-year-old Pakistani patient with mycobacterial and viral infections, as well as early onset bladder malignancy. We investigated a 6-year-old Algerian patient with mycobacterial infections mimicking Langerhans histiocytiosis. By whole-exome sequencing, we determined that the patient is compound heterozygous for a missense (p.C657S) and a splice mutation (c.2108_2115+15del) in *JAK1*. The splice mutant allele encodes three alternative transcripts (c.1756_2115del, c.1900_2115del, and c.1988_2115del). Upon overexpression, the missense protein impairs but does not abolish responses to IFN-γ, while it does not impair responses to IFN-α2b. In contrast, the products of the three splice variants are loss-of-function for both IFN-γ and IFN-α stimulation. Moreover, EBV-B cells from the patient respond poorly to IFN-γ, a phenotype that is rescued by retrotransduction with a WT *JAK1* cDNA. In contrast, the patient's fibroblasts respond normally to both IFN-γ and IFN-α. We thus describe a second patient with a novel partial form of autosomal recessive JAK1 deficiency, manifesting as isolated MSMD due to an apparently selective impairment of the IFN-γ responsive pathway.

Key words: IFN, osteitis, mycobacterium, histiocytosis, JAK1

Liste des tableaux

Tableau 1 – Tableau récapitulatif des défauts en IFN-γR1 20
Tableau 2 – Récapitulatif des différents défauts en IFN-γR2 23
Tableau 3 – Récapitulatif des défauts en STAT1 26
Tableau 4 – Liste des cytokines de classe I et II signalant via JAK1 31
Tableau 5 – Liste des mutations somatiques de *JAK1* 40
Tableau 6 – Immunophénotype du sang périphérique de la patiente à 7 ans 50
Tableau 7 – Taux d'immunoglobulines de la patiente à 7 ans 51
Tableau 8 – Anticorps contre les virus communs évalués chez la patiente à 7 ans 51
Tableau 9 – Résultats du Virscan 52
Tableau 10 – Récapitulatif de l'impact des différents allèles en système de surexpression 69
Tableau 11 – Récapitulatif du phénotype cellulaire des B-EBV des patients 73
Tableau 12 – Récapitulatif du phénotype cellulaire des fibroblastes des patients 78
Tableau 13 – Récapitulatif de l'impact des allèles des différents patients sur la réponse aux IFN 82
Tableau 14 – Récapitulatif des réponses aux IFN dans les différentes lignées cellulaires des patients 82

Liste des figures

Figure 1 – Les gènes responsables de MSMD et leur implication cellulaire dans la production de/ ou la réponse à l'IFN-γ 16
Figure 2 – Structure de JAK1 chez l'homme 29
Figure 3 – Schématisation de l'activation et la régulation de JAK1 32
Figure 4 – Voie de signalisation de l'IFN-γ. 33
Figure 5 – Voie de signalisation de l'IFN-α 34
Figure 6 – Modèles *cis* et *trans* pour la régulation de l'activité catalytique du domaine kinase par le domaine pseudokinase. 36
Figure 7 – Evolution clinique de manifestations cutanées. 49
Figure 8 – Identification de variants hétérozygotes composites de *JAK1* 54
Figure 9 – PCR d'un fragment de *JAK1* couvrant les exons 12 à 21 sur l'ADNc de B-EBV de la patiente et du patient publié. 55
Figure 10 – Schéma représentant les transcrits retrouvés chez la patiente 56
Figure 11 – Niveaux d'expression de JAK1 dans les cellules de la patiente 58
Figure 12 – Les mutants d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées 60
Figure 13 – Les mutants induisent un défaut d'autophosphorylation de JAK1 61
Figure 14 – Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite à l'IFN-γ 62
Figure 15 – Les allèles *JAK1* mutés d'épissage ont une réponse réduite à l'IFN-α 63
Figure 16 – Les mutants d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées en système de surexpression stable 64
Figure 17 – Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite à l'IFN-γ en système de surexpression stable 65
Figure 18 – Les allèles *JAK1* d'épissage mutés ont une réponse abolie à l'IFN-α en système de surexpression stable 66
Figure 19 – Les mutants d'épissage ont une réponse tardive abolie aux IFN en système de surexpression stable 68
Figure 20 – La réponse à l'IFN-γ est diminuée dans les lignées B-EBV de la patiente 71
Figure 21 – Les lignées B-EBV de la patiente répondent normalement à l'IFN-α 72
Figure 22 – Les fibroblastes de la patiente ont une réponse normale à l'IFN-γ 75
Figure 23 – Les fibroblastes de la patiente ont une réponse normale à l'IFN-α 77
Figure 24 – La patiente n'a pas de défaut de sécrétion d'IFN-γ ni d'IL-12 sur sang complet. 80

Abréviations

AD	Autosomique dominant
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique correspondant
AR	Autosomique récessif
ARNm	Acide RiboNucléique messager
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
CADD	Combined Annotation-Dependent Depletion
CMC	Candidose mucocutanée chronique
CMV	CytoMégaloVirus
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor
CT-1	Cardiotrophin 1
EBV	Epstein-Barr virus/ virus d'Epstein-Barr
EV	Empty vector/ vecteur vide
FACS	Fluorescence activated cell sorting (cytométrie en flux)
FERM	4.1 Ezrin-Radixin-Moesin
GAF	Gamma Activating Factor
GAS	Gamma Activated Sequence
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GOF	Gain of Function/ gain de fonction
HEK	Human Embryonic Kidney
HLA	Human leukocyte antigen/ antigène des leucocytes humains
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interféron
IFN-γR1	Interferon gamma receptor 1
IFN-γR2	Interferon gamma receptor 2
IFN-αR1	Interferon alpha receptor 1
IFN-αR2	Interferon alpha receptor 2
IL	Interleukine
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cell/ cellule souche pluripotente induite
ISGF	Interferon-stimulated gene factor
ISRE	Interferon-stimulated response element

JAK	Just another kinase/ Janus kinase
JH1/2	Janus Homology ½
KIR	Kinase Inhibitory Region
LAL	Leucémie Aigüe Lymphoblastique
LAM	Leucémie Aigüe Myéloblastique
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LOE	Loss of Expression/ perte d'expression
LOF	Loss of Function/ perte de fonction
MDDC	Monocyte Derived Dendritic Cell/ Cellule Dendritique Dérivée de Monocyte
MDM	Macrophage Dérivé de Monocyte
ME	Mycobactérie environnementale
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast/ fibroblaste embryonnaire murin
MSC	Mutation significance cut-off
MSMD	Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease/ Prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes
MW	Molecular Weight/ Poids moléculaire
NK	Natural Killer
NS	Non Stimulé
NT	Non Transfecté ou Non Transduit
OSM	Oncostatin M
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells/ cellules mononucléées du sang périphérique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PID	Primary immunodeficiency/ immunodéficience primaire
PR	Partiel récessif
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SH2	Src Homology 2
SHP1/2	Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase ½
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SV-40	Virus simien 40
TB	Tuberculose

TCPTP	T-cell Protein Tyrosine Phosphatase
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire
WB	Western Blot
WES	Whole exome sequencing
WT	Wild-type/ sauvage

Introduction

A. Syndrome de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes

a. Définition

Le syndrome de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes (ou MSMD de l'anglais Mendelian susceptibility to mycobacterial disease) (MIM 209950) est un groupe de maladies caractérisées par une prédisposition au développement d'infections causées par des mycobactéries peu virulentes comme la souche vaccinale du bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou les mycobactéries environnementales (ME)[1–5]. Il en existe deux formes : le MSMD dit « isolé » car ne prédisposant qu'aux infections mycobactériennes, et le MSMD syndromique, qui est associé à des phénotypes plus complexes. Dans les deux cas, les infections mycobactériennes peuvent être dues à des mycobactéries à croissance lente (comme *Mycobacterium kansasii*, *M. avium*, *M. szulgai*…) ou bien rapide (*M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*…). Les individus souffrant de MSMD sont également vulnérables aux formes sévères de tuberculose (TB), dans les régions endémiques. Dans 50% des cas, les patients souffrent également de salmonellose, le plus souvent non typhique et de localisation extradigestive. Un tiers des patients présente également une infection mucocutanée à *Candida*[1–5]. Ces infections mises à part, la plupart des patients sont résistants à la majorité des autres infections microbiennes, bien que des cas isolés de nocardiose, listeriose, paracocciodiodomycose, histoplamose, leishmaniose, klebsiellose et de sarcome de Kaposi aient été rapportés[1–4]. La maladie infectieuse apparaît généralement au cours de l'enfance, mais des cas ont aussi pu être observés chez des adolescents et des adultes. Les manifestations cliniques chez ces patients sont très hétérogènes : les infections peuvent être disséminées, engageant alors le pronostic vital, ou bien être locales ou régionales, parfois récurrentes et avec des conséquences beaucoup moins sévères[1–3,5]. Toutefois, aucun défaut immunologique ou hématologique manifeste n'est observable dans le criblage fait pour un déficit immunitaire héréditaire dit « classique » [1–3,6].

La première étiologie génétique du MSMD a été découverte en 1996, avec la description de mutations bi-alléliques nulles dans le gène *IFNGR1*[7,8]. Depuis, plusieurs mutations responsables de MSMD isolé ont été répertoriées, dans pas moins de 12 gènes (*IL12B*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL23R*, *TYK2*, *IRF8*, *SPPL2A*, *CYBB*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *NEMO*)

[1–3,9–13]. L'hétérogénéité allélique de plusieurs de ces loci définit en tout 21 étiologies génétiques. Celles-ci diffèrent de par leur mode de transmission (dominant ou récessif), par l'expression de la protéine codée par le gène en cause ou son absence, et par le mécanisme de perte de fonction. Tous ces gènes et leurs produits (**Figure 1**) sont impliqués à différents niveaux de la voie de signalisation de l'interféron (IFN) γ[1–3,9–13] :

- dans la production d'IFN-γ (IL-12p40, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IL-23R, TYK2)
- dans la réponse à l'IFN-γ (IFN-γR1, IFN-γR2, STAT1, IRF8 et gp91^{phox})
- ou les deux (NEMO, IRF-8 et SPPL2a)

Les formes de MSMD syndromiques sont quant à elles des défauts héréditaires causés par des mutations dans l'un des trois gènes suivants :

- *RORC*, dont le phénotype clinique associe des infections mycobactériennes et fongiques, avec un défaut de l'immunité liée à l'interleukine (IL)-17)[14]
- *ISG15*, dont le phénotype clinique est caractérisé par des infections mycobactériennes associées à des calcifications cérébrales et des interféronopathies[1,2]
- *JAK1*, dont le phénotype clinique se caractérise par des infections mycobactériennes associées à des infections virales, avec une réponse diminuée aux IFN de classe I, II et III[10,15,16].

Certains gènes peuvent en outre être responsables de MSMD isolé ou de MSMD syndromique, selon la mutation les affectant (STAT1, TYK2, IRF8) (**Figure 1**)[1,2,9,17–24].

Dans tous les cas, c'est l'immunité médiée par l'IFN-γ qui est en jeu. La réponse immunitaire aux mycobactéries peut alors se schématiser ainsi (**Figure 1**) :

➔ la phagocytose de la mycobactérie par les cellules phagocytaires entraîne la production et la sécrétion d'IL-12 (composée de deux sous-unités : IL12p35 et IL12p40), d'IL-23 et ISG15.

➔ Ces cytokines se fixent alors sur leurs récepteurs respectifs, également composés de deux sous-unités : IL-12Rβ1 et IL-12Rβ2 pour l'un et IL-12Rβ1 et IL-23R pour l'autre. Ces récepteurs sont localisés à la surface des lymphocytes T et NK (Natural Killer). Récemment, le récepteur de l'ISG15 a été identifié[25].

➔ Cette fixation permet l'activation de deux kinases, JAK2 et TYK2, qui vont permettre la phosphorylation du facteur de transcription.

- ➔ STAT4 peut alors se transloquer dans le noyau et induire la transcription de gènes cibles, comme l'IFN-γ.
- ➔ Les lymphocytes T et NK produisent alors de l'IFN-γ en grande quantité, en réponse à l'IL-12.
- ➔ L'IFN-γ se fixe à son récepteur, composé des deux sous unités IFN-γR1 et IFN-γR2, ce qui induit l'activation de deux kinases, JAK1 et JAK2.
- ➔ Ces dernières permettent l'activation de STAT1, un autre facteur de transcription, qui se transloquent alors dans le noyau et induit la transcription de gènes cibles, et entre autres la production d'IL-12 et/ou IL-23 [1–3,9–13].

La réponse immunitaire aux mycobactéries est donc une boucle de signalisation centrée sur la production d'IFN-γ en réponse à l'IL-12/IL-23/ISG15 et la production d'IL-12/IL-23/ISG15 en réponse à l'IFN-γ. Il est alors aisé de voir comment une mutation causant un défaut de réponse à l'IFN-γ impacte toute la voie de signalisation.

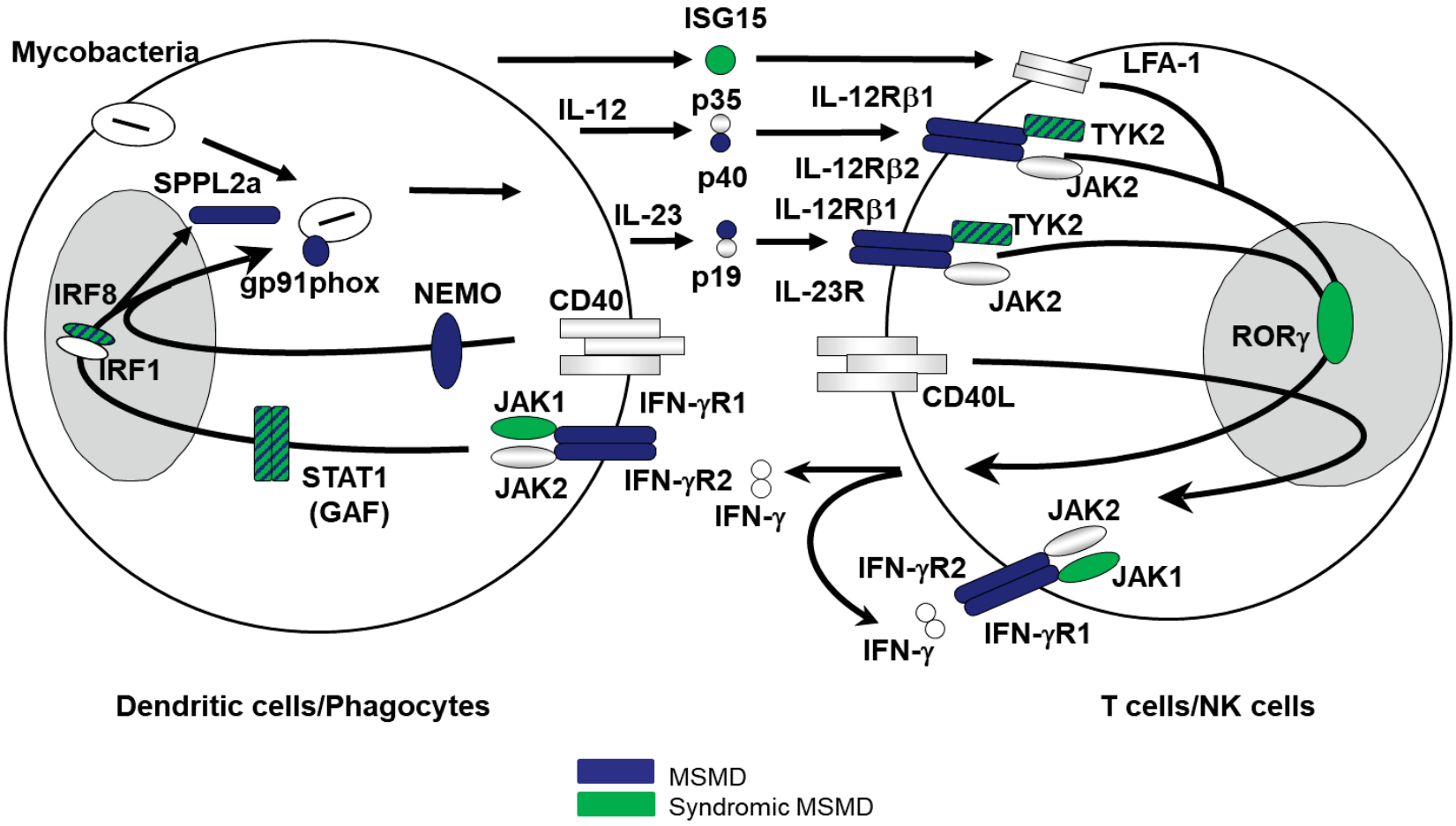


Figure 1 – Les gènes responsables de MSMD et leur implication cellulaire dans la production de/ ou la réponse à l'IFN-γ.

Les défauts protéiques responsables de MSMD sont représentés en bleu, ceux responsables d'infections mycobactériennes ainsi que d'autres types d'infections sont représentés en vert et ceux qui peuvent être responsables des deux sont représentés rayés bleu et vert (Adapté de Rosain, 2018[1]).

b. Défauts de réponse à l'IFN-γ

Ce manuscrit se focalisera par la suite sur les défauts de réponse directe à l'IFN-γ, c'est-à-dire les défauts liés aux récepteurs de l'IFN-γ et à STAT1. Les défauts liés à JAK1, également impliquée dans la réponse à l'IFN-γ, seront détaillés dans un second temps.

i. Déficit en IFN-γR1

La première étiologie génétique de MSMD jamais identifiée le fut en 1996, avec la découverte d'une mutation bi-allélique nulle sur le gène *IFNGR1* chez des enfants souffrant d'une infection disséminée au BCG ou à ME[7,8]. Depuis, de nombreuses mutations de ce gène ont été découvertes, définissant six étiologies génétiques différentes : deux formes de défaut complet autosomique récessif (AR) [7,8,26-42], deux formes de défaut partiel récessif (PR)[34,43–46] et une forme partielle autosomique dominante (AD)[31,42,47–56].

Les deux formes de défaut complet AR se différencient par la présence ou non du récepteur de l'IFN-γ à la surface cellulaire. Dans les deux cas, la réponse à l'IFN-γ est abolie *in vitro*, ce qui se traduit par[2,7,8,26,40,45,46]:

- Une abolition de la fixation des homodimères STAT1 (aussi appelés GAF de l'anglais Gamma Activating Factor) à l'ADN dans les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (B-EBV).
- Une absence d'induction de HLA-DR dans les fibroblastes.
- Une production d'IL12-p70 par les leucocytes abolie.

Ces défauts ont été décrits chez une quarantaine de patients. Ceux-ci présentent des phénotypes cliniques sévères, souffrant d'infections disséminées au BCG ou à ME (*M. chelonae, M. fortuitum, M. mageritense, M. peregrinum, M. smegmatis, M. scrofulaceum*) dans la petite enfance[7,8,26–42], et à tuberculose dans de rares cas[31,40,57]. Le plasma des patients contient des niveaux élevés d'IFN-γ[58]. Les mutations responsables du défaut complet en IFN-γR1 avec perte d'expression sont souvent des mutations non-sens, des petites délétions ou des insertions dans les régions codantes du domaine extracellulaire d'*IFNGR1*, qui provoquent des décalages de lecture et l'apparition de codons-stop prématurés[7,8,29,30,32,36–40,42]. Une large délétion comprenant le locus IFNGR1 a également été publiée[39]. La protéine IFN-γR1 n'est alors pas détectable à la surface des cellules, ce qui est probablement dû à la dégradation de l'ARNm correspondant, par le système de surveillance des ARNm non-sens[46]. Les mutations qui ont été

identifiées pour le défaut complet en IFN-γR1 avec expression à la surface cellulaire sont des mutations faux-sens ou des délétions ne décalant pas le cadre de lecture[7,34,35,40]. L'ARNm est transcrit en une protéine mature qui peut être transportée à la surface cellulaire, mais qui est incapable d'assurer la fixation de l'IFN-γ[26,46]. Le traitement agressif avec des antibiotiques contre les mycobactéries est fortement conseillé mais le traitement définitif de ce groupe de maladies est la greffe de moelle osseuse.

Les défauts partiels, quant à eux, sont caractérisés par une réponse à l'IFN-γ diminuée mais non abolie[34,43–46], qu'ils soient dominants ou récessifs.

Un panel d'une quinzaine de patients a permis de référencer dans la littérature trois mutations faux-sens homozygotes pouvant causer un défaut récessif : I87T, V63G et M1K[34,43–46]. Les mutations I87T et V63G causent une première forme de défaut PR : elles permettent l'expression du récepteur à la surface cellulaire, quoiqu'à un niveau réduit, et provoquent une diminution de la réponse à l'IFN-γ présent à forte dose[34,43–45]. Des effets fondateurs expliquent la récurrence de ces deux mutations : les ancêtres communs les plus récents portant ces mutations auraient probablement vécus il y a 1600 ans pour la mutation I87T et il y a 500 ans pour la mutation V63G[45]. Le phénotype clinique des patients est moins sévère que pour les patients ayant un défaut complet. Ils présentent une prédisposition modérée aux infections à BCG ou ME (*M. avium, M. avium complex, M. abcessus, M. szulgai*). Quelques cas de tuberculose ont également été recensés. Ces infections se traitent bien avec des antibiotiques ou de l'IFN-γ[2,34,43–46].

La deuxième forme de défaut PR a été reportée chez un unique patient, et est causée par la troisième mutation, M1K. Celle-ci implique le codon initial et a un impact différent en fonction du type cellulaire étudié[46]. L'expression du récepteur IFN-γR1 est fortement diminuée dans les B-EBV, et abolie dans les fibroblastes transformés avec l'antigène LT du virus SV-40 (fibroblastes SV-40). Le phénotype cellulaire résultant de cette mutation se caractérise par une forte diminution de la phosphorylation de STAT1, par de très faibles niveaux de protéines se liant aux motifs GAS (de l'anglais Gamma Activated Sequence) dans les B-EBV, et par une absence totale de ces mêmes protéines dans les fibroblastes, après activation par de l'IFN-γ. Le phénotype clinique associé est plus sévère que pour les autres patients souffrant d'un défaut partiel récessif, mais moins sévère que celui des patients souffrant d'un défaut complet[2,46]. Le patient porteur de cette mutation a reçu une greffe de moelle osseuse comme traitement définitif de sa maladie génétique[46].

Le défaut partiel AD est quant à lui dû à des mutations hétérozygotes ou mono-alléliques affectant principalement l'exon 6 d'*IFNGR1*, notamment une petite délétion autour de la position 818, 818del4, un point chaud de petites délétions[40,50–52,55,56]. Ces mutations ont pour conséquence l'apparition de codons stop dans le domaine intracellulaire proximal, ce qui induit la production de protéines tronquées. Ces protéines atteignent la surface cellulaire et se lient avec une affinité normale à l'IFN-γ, mais ne transmettent pas le signal, puisqu'elles ne possèdent pas les sites de liaison intra-cellulaires des molécules cytosoliques (JAK1 et STAT1) impliquées dans la cascade réactionnelle. De plus, ne possédant pas de domaine de recyclage, ces protéines s'accumulent à la surface cellulaire et empêchent la transduction normale du signal par effet de dominance négative[51]. Le phénotype cellulaire de ce défaut est donc caractérisé par une diminution de la réponse à l'IFN-γ[40,51]. Au niveau clinique, les patients, comme pour ceux souffrant d'un défaut partiel récessif, sont sensibles aux infections à BCG et ME (et tuberculose[40,50,51]) et ont un phénotype moins sévère que pour les patients souffrant d'un défaut complet[2,40,45,46,50–52,55,56]. Le traitement est ciblé à l'infection mycobactérienne avec l'utilisation d'IFN-γ et de plusieurs antibiotiques (3-4 selon la sensibilité de l'antibiogramme).

Hérédité	Défaut	Protéine	Phénotype	Mutations	Références
AR	Complet	Exprimée	Sévère	p.Y66C p.C77Y c.295del2 c.652del3	[26,40]
AR	Complet	Absente	Sévère	c.22delC c.107ins4 c.105insT c.114_135del c.131delC c.166del c.168delC c.200+1G>A r .201_302del r.201_373del c.561_565delACTC p.C77F p.Y113X c.395C>A c.453del c.523del p.W224X c.726delC del exon1-7 p.C85Y p.V61E c.201-1G>T	[7,8,27-33,36-42,48]
AR	Partiel	Exprimée faiblement	Modéré	p.I87T p.V63G	[35,43]S
AR	Partiel	Exprimée très faiblement/Abolie	Sévère	p.M1K	[46]
AD	Partiel		Modéré	c.818del4 c.774del4 c.794delT c.805delT c.811del4 c.817insA c.818delT p.E278X	[34,40,47,50–56]

Tableau 1 – Tableau récapitulatif des défauts en IFN-γR1

ii. Déficit en IFN-γR2

Comme pour IFN-γR1, cinq formes de défaut en IFN-γR2 vont causer un MSMD : deux formes de défaut AR complet, selon si la protéine est présente ou non à la surface cellulaire, et caractérisés par une perte totale de fonction[59–67] ; et trois formes de défaut partiel : deux AR[12,63,68,69] et un AD[70].

Le défaut complet avec perte d'expression du récepteur à la surface cellulaire, dont dix cas issus de sept familles ont été décrits dans la littérature, est dû à la présence d'un codon stop prématuré[59,60,62–65] (**Tableau 2**). Le défaut complet avec expression à la surface cellulaire d'une protéine non fonctionnelle (répertorié chez sept patients de six familles) a des causes plus variées. Trois patients porteurs de la mutation faux-sens T168N ont été décrits. Cette mutation crée un nouveau site de N-glycosylation et abolit la réponse cellulaire à l'IFN-γ[67]. Un autre patient présentait une duplication, c.382_387dup, qui résulte en une protéine mal repliée. Bien que cette mutation ne crée pas de gain de glycosylation, la fonction de la protéine peut étonnamment être restaurée en utilisant des inhibiteurs de glycosylation[66] . Un autre patient présentant une mutation décalant le cadre de lecture présentait une expression résiduelle d'IFN-γR2, bien que la spécificité de l'anticorps utilisé pour sa détection n'ait pas été démontrée[61]. Dans tous les cas, comme pour le défaut AR complet en IFN-γR1, la réponse à l'IFN-γ est abolie dans tous les types cellulaires, et les patients présentent des phénotypes cliniques sévères, souffrant d'infections disséminées au BCG ou à des ME (*M. abscessus*, *M. avium*, *M fortuitum*, *M. porcinum* et *M. simiae*) avant cinq ans. Six patients sont décédés, et six autres ont reçu une greffe de cellules souches. Le taux d'IFN-γ présent dans leurs plasmas est également élevé[2,12,31,59–61,63–66,70]. La greffe de moelle osseuse est le traitement de choix pour ces patients[71].

Plusieurs mutations homozygotes, majoritairement des mutations faux-sens, ont été rapportées comme définissant un défaut partiel AR d'IFN-γR2 : R114C, G227R, S124F, G141R, c.958insT, c.1A>G/M1V et c.4delC[12,62,63,68,69]. Ces mutations ont été décrites chez six patients, tous issus de familles différentes. Comme pour les défauts AR partiels en IFN-γR1, l'impact de ces mutations dépend de leur position. Ainsi, les cinq premières mutations, décrites chez six patients, sont hypomorphes et non perte de fonction (LOF). Elles causent une diminution de la réponse cellulaire à l'IFN-γ, du fait de l'expression en faible quantité de protéines mutées à la surface cellulaire. Il a été montré que quatre de ces allèles (R114C, G227R, S124F, G141R) codent pour des protéines mal repliées et anormalement N-glycosylées, qui restent majoritairement dans le réticulum endoplasmique[69]. Les réponses à l'IFN-γ suivantes, observées dans différents types cellulaires, sont toutes diminuées :

- La liaison du GAF au GAS dans les B-EBV et l'induction de gènes cibles qui en découlent
- L'induction de HLA-DR dans les fibroblastes
- La production d'IL-12p70 dans le sang complet

Elles peuvent cependant être restaurées par l'utilisation d'un inhibiteur de N-glycosylation, comme pour certains défauts complets[69]. Le phénotype clinique associé à ces mutations est moins sévère que celui des patients souffrant d'un défaut complet. Les patients souffrent d'infections bénignes au BCG ou aux ME (notamment *M. abscessus*, *M. bovis*, *M. elephantis*, *M. fortuitum*, et *M. simiae*), dont la première apparition se fait dans les neuf premiers mois de vie. Leurs niveaux plasmatiques d'IFN-γ sont élevés[69]. Deux des six patients ont présenté des ostéomyélites. Un traitement antibiotique anti-mycobactérien, complémenté ou non par de l'IFN-γ recombinant peut suffire dans la plupart des cas, bien que deux patients soient décédés[2,69].

En comparaison, les deux dernières mutations, c.1A>G et c.4delC, présentes chez trois patients de deux familles, et qui affectent respectivement le premier et le deuxième codon, ont un impact cellulaire complètement différent et purement quantitatif : les chaînes des récepteurs exprimées sont parfaitement normales, mais exprimées en de très petites quantités[12]. Cela cause une réponse à l'IFN-γ fortement diminuée dans tous les types cellulaires qui ont été étudiés (B-EBV, fibroblastes SV-40, lymphocytes T CD4+, et macrophages dérivés de monocytes)[12]. Les phénotypes cellulaires et cliniques observés sont intermédiaires entre ceux des défauts complets et partiels précédemment décrits[12,63,69]. Les trois patients ont souffert de complications après vaccination par le BCG. L'un des patients a en outre développé des ostéomyélites au BCG à cinq et sept ans, qui ont été traitées par un traitement antibiotique complémenté par de l'IFN-γ, tandis qu'une autre a développé une infection à *M. cheloniae*, des suites desquelles elle est décédée, le traitement antibiotique seul n'ayant pas réussi à contrôler l'infection. Le traitement antibiotique accompagné par de l'IFN-γ donne globalement de bons résultats, cependant la greffe de cellules souches est tout de même recommandée[12].

La dernière forme de défaut en IFN-γR2 décrite est le défaut partiel AD. Ce défaut a été observé chez un seul patient et est causé par la mutation hétérozygote c.186delC, qui décale le cadre de lecture et induit un codon stop prématuré avant le segment codant le domaine transmembranaire[70]. Le niveau d'IFN-γR2 exprimé à la surface cellulaire est diminué et les B-EBV et les lymphocytes T du patient ont des réponses diminuées à l'IFN-γ dues à une haploinsuffisance[70]. Le patient souffrait d'une infection localisée au BCG bénigne, qui est

passée sans traitement antimycobactérien[70]. La pénétrance clinique de ce défaut est très faible[70]. Une autre mutation hétérozygote dominante négative au niveau cellulaire a également été identifiée chez un porteur sain[64].

Hérédité	**Défaut**	**Protéine**	**Phénotype**	**Mutations**	**Références**
AR	Complet	Exprimée	Sévère	p.T168N c.663del27 c.382_387dup c.798delT c.949delTG	61,65-67
AR	Complet	Absente	Sévère	p.Y179X c.218delAA p.Y235X c.791delG c.278delAG c.74_216del c.503delCC	59,60,62–65,71
AR	Partiel	Faible quantité	Modéré	R114C G227R S124F G141R c.958insT	62,63,68,69
AR	Partiel	Faible quantité	Modéré	c.1A>G/M1V c.4delC	12
AD	Partiel	Quantité diminuée	Léger	c.186delC	70

Tableau 2 – Récapitulatif des différents défauts en IFN-γR2

iii. Déficit en STAT1

STAT1 est un facteur de transcription impliqué dans les réponses cellulaires à de nombreuses cytokines, notamment les IFN de type I et III (IFN-α/β et IFN-λ), en plus d'intervenir dans la réponse à l'IFN-γ (IFN de type II)[18]. De ce fait, les conséquences d'un défaut en STAT1 sont plus variées que celles des défauts au récepteur de l'IFN-γ[18]. On distingue six types de défauts en STAT1 : deux défauts AR complets[18,20,22,72], un défaut AR partiel[17,18,21,24,73] et trois défauts AD partiels[18,19,23,74–78]. Des mutations mono-alléliques ou à l'état hétérozygote entrainant un gain de fonction (GOF) ont également été décrites chez des patients souffrant de candidose mucocutanée chronique (CMC). Les mutations responsables sont GOF en termes de phosphorylation et de liaison à l'ADN de STAT1 en réponse à l'IFN-γ, l'IFN-α et l'IL-27[18,79–81]. Cette étiologie ne sera pas détaillée dans ce manuscrit, en raison de la rareté des cas d'infections mycobactériennes rapportés chez des patients porteurs de mutations GOF[81].

Le défaut AR complet en STAT1 a été décrit chez six patients issus de quatre familles. Il est causé par des mutations bi-alléliques perte d'expression (LOE) et perte de fonction (LOF). Ces mutations induisent une absence totale de protéine WT, et l'abolition des réponses cellulaires à l'IFN-γ, les IFN-α/β et l'IFN-λ en termes de liaison à l'ADN et induction de gènes cibles[18,20,22,72]. De plus, les lignées B-EBV et fibroblastes des patients s'avèrent être incapables de contrôler la réplication de virus, notamment le virus de l'herpès, et ce même après traitement par de l'IFN-α[18,20,22,72]. Ce phénotype cellulaire est à la base du phénotype clinique de MSMD syndromique dont souffrent ces patients[18,20,22,72]. En effet, les patients sont non seulement sensibles aux infections à ME (*M. kansasii*) et au BCG, à cause du défaut de réponse à l'IFN-γ, mais du fait du défaut de réponse à l'IFN-α, ils sont également plus sensibles aux infections virales, notamment aux virus herpétiques (plusieurs cas d'encéphalites herpétiques ont été rapportés)[18,20,22,72]. La présentation clinique est précoce, à l'âge de nourrisson, et la pénétrance clinique des infections mycobactériennes est complète. Contrairement aux patients avec un déficit immunitaire combiné sévère (SCID), les patients avec un déficit complet AR STAT1-/- ont des lymphocytes T, B et NK. Malheureusement, le pronostic de vie est faible et les patients décèdent en l'absence de greffe de moelle osseuse : cinq des six patients sont décédés avant leurs deux ans, le sixième a reçu une greffe.

Les patients souffrant d'un défaut partiel AR en STAT1 ont également un phénotype clinique de MSMD syndromique, avec une sensibilité aux infections aux ME (*M. avium*) et BCG et aux infections virales, mais ce phénotype est moins sévère que chez les patients

présentant un défaut complet[17,18,24]. Ce défaut a été décrit chez cinq patients, de trois familles. Les patients présentent alors des mutations bi-alléliques faux-sens hypomorphes (et non LOF comme dans le défaut complet), responsables d'une diminution de la production de STAT1. Par conséquent, les cellules des patients présentent une diminution mais non une abolition de la réponse aux IFN-γ et IFN-α en termes d'activité de liaison à l'ADN. La réponse des cellules à l'IL-27 et à l'IFN-λ est également affaiblie. Leur capacité à contrôler la réplication virale après traitement par l'IFN-α varie en fonction de la mutation en cause, et dépend probablement du taux d'activité résiduelle de STAT1 après activation[17,18,24]. Cliniquement, les patients souffrent d'infections disséminées ou régionales aux mycobactéries et d'infections virales (les encéphalites herpétiques n'ont pas été rapportées chez ces patients). Le traitement de ces patients est centré autour d'antiviraux et d'antibiotiques anti-mycobactériens et d'IFN-γ, la greffe de moelle osseuse n'étant alors pas un choix de première intention[17,18,21,24,73].

En revanche, les défauts partiels AD, tout comme les défauts partiels en IFN-γR1 et IFN-γR2, causent un MSMD isolé plutôt modéré, sans infection virale particulière[18,23,76,77]. Les patients présentent tous des mutations hétérozygotes ou mono-alléliques faux-sens, hypomorphes ou perte de fonction. Ces mutations ont été reportées chez vingt-deux individus, issus de dix familles. Elles peuvent affecter la phosphorylation de STAT1[18,23,74], sa capacité à se lier à l'ADN[18,23,74–78], ou bien les deux[18,75,77,78]. L'étude de ces mutations en système de surexpression montre que les allèles mutés induisent une déficience de la réponse à l'IFN-γ[18,19,23,74–78]. Les cellules des patients hétérozygotes, quant à elles, ne présentent qu'un défaut en réponse à l'IFN-γ, tandis que leur réponse à l'IFN-α est normale. Cette différence s'explique par le fait que les protéines STAT1 mutées peuvent se dimériser et former un complexe GAF non fonctionnel, mais qu'elles ne peuvent s'hétérodimériser avec STAT2. Ainsi les hétérodimères STAT1/STAT2 ne contiennent que des protéines STAT1 WT, et leur fonction reste intacte. Cette dichotomie explique pourquoi le phénotype clinique est différent de celui du défaut partiel AR en STAT1[18,19,23]. Les patients contractent des infections mycobactériennes à BCG ou ME *(M. avium*) à localisation osseuse ou cutanée[18,19,23,74–78]. Ainsi, plusieurs patients ont des ostéomyélites multifocales, sans préférence du type d'os puisque les os plats ou longs sont affectés indifféremment. Les infections cutanées ne sont pas limitées au site de la vaccination. Un cas de tuberculose a également été recensé. De façon comparable au défaut AD IFN-γR1, la pénétrance est incomplète : un tiers des individus porteurs d'une de ces mutations est asymptomatique[18,19,23,74–78].

Hérédité	Défaut	Protéine	Phénotype	Mutations	Références
AR	Complet	E+	Infections mycobactériennes et virales sévères	p.Q123H	18,72
AR	Complet	E-	Infections mycobactériennes et virales sévères	c.1757_1758delAG p.L600P c.1928insA	18,20,22
AR	Partiel	E+-	Infections mycobactériennes et virales modérées	p.P696S p.A46T/p.K211R p.K201N	17,18,21,24,73
AD	Partiel	E+P-	Infections mycobactériennes	p.L706S p.Y701C p.K673R p.M654K p.G250A	18,75,76,78
AD	Partiel	E+L-	Infections mycobactériennes	p.E320Q p.Q463H	18,23
AD	Partiel	E+P-L-	Infections mycobactériennes	p.K637E p.K637N	18,74,77

Tableau 3 – Récapitulatif des défauts en STAT1

E+ : exprimée, E- : non exprimée, E+- : exprimée en faible quantité, P- : non phosphorylée, L- : incapable de se lier à l'ADN, les mutations hétérozygotes composites sont séparées par un /

iv. Phénotypes cliniques de patients présentant un défaut IFN-γR1/IFN-γR2/STAT1 et défaut de réponse à l'IFN-γ

Ainsi, les défauts en IFN-γR1, IFN-γR2 et le défaut partiel AD en STAT1 causent un MSMD isolé, tandis que les défauts AR en STAT1 sont responsables de MSMD syndromique. Les défauts AR complets en IFN-γR1 et IFN-γR2 causent tous deux des infections disséminées au BCG ou à des ME graves, avec des lésions granulomateuses multi-bacillaires mal définies. Ces infections se développent dans la petite enfance (avant 5 ans) et sont souvent fatales en absence de greffe de moelle osseuse, moins de 50% des patients ayant survécus. Les traitements antibiotiques ne doivent pas être stoppés, mais un traitement à base d'IFN-γ est déconseillé, du fait de l'absence de récepteurs fonctionnels. A ce jour, la greffe de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement efficace, malgré un fort taux de rejet[37,71,82,83].

En comparaison, le phénotype clinique des patients souffrant de défauts partiels en IFN-γR1 et IFN-γR2 est plus léger. Ils souffrent également d'infections au BCG ou à des ME, mais un traitement antibiotique prolongé supplémenté ou non par de l'IFN-γ suffit en général à contenir et contrôler ces infections (excepté dans le cas des mutations affectant les tout premiers codons pour les défauts AR, pour lesquels la greffe de cellules souches hématopoïétiques reste conseillée). De très nombreux patients (un tiers des patients souffrant de défaut partiel AR en IFN-γR2, deux tiers des patients souffrant d'un défaut partiel AR en IFN-γR1 et plus de deux tiers des patients ayant un défaut partiel AD en IFN-γR1) développent des ostéomyélites. Il est intéressant de noter que certains de ces patients (avec un défaut partiel en IFN-γR1) ont reçu un mauvais diagnostic d'histiocytose à cellules de Langerhans et ont reçu une chimiothérapie au lieu d'être traité pour une ostéomyélite mycobactérienne[44,45,49,84].

Un autre diagnostic différentiel est la maladie de surcharge. Le patient ayant reçu ce diagnostic est issu d'une famille colombienne consanguine (ses grands-parents étaient cousins). Il a reçu le vaccin du BCG à la naissance, sans complications. A 20 mois, il a développé une hypotonie et une hépatosplénomégalie. Il avait également une déformation de la colonne vertébrale et de la difficulté à marcher. Son taux de phosphate sérique était très bas, son taux de calcium normal, et son taux de parathormone était élevé. *M. tuberculosis complex* a été détecté par PCR. Un diagnostic d'infection mycobactérienne avec probable maladie de surcharge est alors posé. Cependant, l'exome n'a pas révélé de mutations dans les gènes des maladies de surcharge, mais a révélé qu'il était porteur d'une mutation homozygote sur le gène IFNGR1, p.I87T, qui est une mutation récurrente du défaut AR partiel en IFN-γR1. Les bilans altérés se sont normalisés

après traitement de l'infection mycobactérienne (cas non publié, communication orale du Dr. Jacinta Bustamante).

Les patients souffrant d'un défaut partiel AD en STAT1 ont un phénotype clinique similaire, et 50% d'entre eux développent également des ostéomyélites[18,23,76,77]. En revanche, les défauts AR en STAT1 causent des MSMD syndromiques, avec des infections mycobactériennes au BCG et à des ME, mais aussi à des infections virales, notamment au virus de l'herpès Herpes simplex virus-1 (HSV-1) et au cytomégalovirus (CMV). Celles-ci se développent dans la très petite enfance chez les patients atteint d'un défaut complet, et leur taux de survie est bas, la plupart des patients décédant avant 2 ans. La greffe de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement possible. En comparaison, le défaut partiel AR en STAT1 est bien plus léger, la plupart des infections pouvant être soignées par des traitements antibactériens ou antiviraux. De manière générale, la sévérité de la maladie est corrélée à la sévérité du défaut de réponse à l'IFN-γ.

B. JAK1

a. Activation de JAK1 en réponse aux IFN et autres cytokines

JAK1 a été découverte en 1989, et a été décrite pour la première fois en 1991. Elle fait partie de la famille des JAK (pour Janus kinase ou Just another kinase), tout comme JAK2, JAK3 et TYK2[85–87]. Les JAK sont des protéines tyrosine kinase intracellulaires de grande taille (entre 120 et 140kDa, JAK1 est à 120kDa), qui sont constitutivement associées à leurs récepteurs apparentés[88,89]. Elles sont nommées d'après le dieu romain Janus, qui avait deux visages, car elles possèdent deux domaines kinase, ce qui fait leur spécificité. Chez l'homme, JAK1 est exprimée de manière ubiquitaire, et est constituée de 25 exons qui définissent quatre domaines : un domaine FERM (4.1 ezrin, radixin, moesin) N-terminal, un domaine « SH2-like » (Src homology 2- like), un domaine pseudokinase (JAK homology 2, JH2) et un domaine kinase (JH1) catalytiquement actif (**Figure 2**). Les domaines FERM et SH2-like interagissent intimement entre eux et assurent l'interaction de JAK1 avec ses récepteurs[90–93]. Le domaine pseudokinase JH2 n'est pas catalytiquement actif mais joue un rôle de régulation crucial, et est nécessaire tant pour la suppression que pour l'activation totale de l'activité du domaine kinase JH1[16,94–96].

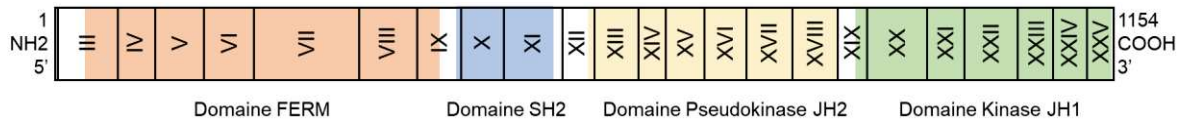


Figure 2 – Structure de JAK1 chez l'homme. Le dessin situe les différents domaines (FERM, SH2, Pseudokinase JH2, Kinase JH1) de la protéine avec les exons correspondants

JAK1 est impliquée dans la signalisation de nombreuses cytokines (Erreur ! Source du renvoi introuvable.), ainsi que dans celles d'hormones et de facteurs de croissance[89]. JAK1 se lie aux récepteurs des cytokines de classe II, en particulier aux récepteurs des interférons de type I (à la chaîne IFN-αR2, avec TYK2 en JAK complémentaire), de type II (à la chaîne IFN-γR1, avec JAK2 en JAK complémentaire), et de type III (à la chaîne IFN-λR1), ainsi qu'aux récepteurs des cytokines de classe I de la famille gp130 et de la chaîne commune γ_c (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

		Cytokines	Receptors	Activated JAKs **JAK1**	Activated STATs	References
Cytokines à récepteurs de classe II	IFN type I/II	IFNα	IFNαβ-R1 IFNαβ-R2	TYK2	STAT1+STAT2+STAT3+STAT4 (+STAT5+STAT6)	97
		IFNβ	IFNαβ-R1 IFNαβ-R2	TYK2	STAT1+STAT2+STAT3+ (STAT4+STAT5+STAT6)	98
		IFNγ	IFNγ-R1/CD119 IFNγ-R2	JAK2	STAT1+STAT2+STAT3+ STAT5+STAT6	97,99,100
	IL10 family	IL10	IL10-Rα IL10-Rβ	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	91
		IL19	IL20-Rα IL20-Rβ	JAK2	STAT3	91
		IL20	IL20-Rα IL20-Rβ IL22-Rα1	JAK2	STAT3+STAT5	91
		IL22	IL22-Rα1 IL10-Rβ	TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	91
		IL24	IL20-Rα IL20-Rβ IL22-Rα1		STAT1+STAT3	91
		IL26/ AK155	IL20-Rα IL10-Rβ		STAT1+STAT3	91
		IL28A /IFN-λ2	IL10-Rβ IL28-Rα/IFN-λR1	JAK2	STAT1+STAT2+STAT3	91
		IL28B/ IFN-λ3	IL10-Rβ IL28-Rα/IFN-λR1	JAK2	STAT1+STAT2	91
		IL29/ IFN-λ1	IL10-Rβ IL28-Rα/IFN-λR1	TYK2	STAT1+STAT2+ STAT3+ STAT4+STAT5	91
Cytokines à récepteurs de classe I	gp130 (IL6) family	CT-1	CT-1Rα LIF-Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	101
		CLF/CLC	CNTF-Rα LIF-Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3	102
		CNTF	CNTF-Rα LIF-Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3	100,103
		G-CSF	G-CSF R/CD114	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	104
		IL6	IL6Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3	100,103
		IL11	IL11Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3	100
		IL31	IL31Rα OSM-Rβ	JAK2	STAT1+ STAT3+STAT5	105
		LIF	LIF-Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	100,103
		OSM	OSM-Rβ LIF-Rα gp130	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+ STAT5+STAT6	100,103
	Common gamma chain receptor family γ_c (IL2)	IL2	IL2-Rα/CD25 IL2-Rβ γc/IL2-Rγ	JAK2+JAK3	STAT1+STAT3+ STAT4+STAT5+STAT6	106,107
		IL4	IL4-Rα γc/IL2-Rγ IL13-Rα1	JAK2 + JAK3 + TYK2	STAT1+STAT3+ STAT4+STAT5+STAT6	107,108
		IL7	IL7-Rα/CD127 γc/IL2-Rγ	JAK3	STAT1+STAT2+ STAT3+STAT5+STAT6	107
		IL9	IL9-Rα γc/IL2-Rγ	JAK3 + TYK2	STAT1+ STAT3+STAT5	107
		IL13	IL13-Rα1 IL4-Rα	JAK2 + JAK3 + TYK2	STAT1+ STAT3+ STAT5+STAT6	107

		IL15	IL15-Rα	JAK2 + JAK3 + TYK2	STAT1+STAT2+STAT3+ STAT4+STAT5+STAT6	[107]
			IL2-Rβ			
			γc/IL2-Rγ			
		IL21	IL21-R	JAK3	STAT1+STAT3+ STAT4+STAT5	[107]
			γc/IL2-Rγ			
		TSLP	IL7-Rα/CD127	JAK2	STAT1+ STAT3+STAT5	[109]
			TSLP R			
	β_c family	IL3	IL3-Rα/CD123	JAK2 + TYK2	STAT1+ STAT3+ STAT5+STAT6	[110]
			βc			
	IL12 family	IL27	IL27-Rα/WSX-1/TCCR	JAK2 + TYK2	STAT1+STAT3+STAT5	[111,112]
			gp130			

Tableau 4 – Liste des cytokines de classe I et II signalant via JAK1, avec les JAK et STAT associées

Les récepteurs des cytokines ne possédant pas de domaines kinase intrinsèques, la signalisation repose sur l'activité catalytique des JAK qui leur sont constitutivement associées[94]. En effet, ces récepteurs sont constitués de deux sous-unités ou plus, chacune associée à un monomère JAK. Lorsque la partie extracellulaire de ces récepteurs se lie à leur ligand apparenté, les sous-unités du récepteur subissent un changement conformationnel ou s'oligomérisent. Cela amène les JAK qui leur sont associées dans des positions qui facilitent la trans-autophosphorylation de tyrosines clés (Y1034 et 1035 pour JAK1) dans la boucle d'activation de leur domaine kinase, et leur subséquente activation. Par la suite, les JAK activées phosphorylent les résidus tyrosine des régions cytoplasmiques du récepteur, formant ainsi des sites d'accueil pour des protéines adaptatrices et effectrices possédant des domaines de reconnaissance de phosphotyrosine (typiquement des domaines SH2), et notamment les protéines STAT. Une fois recrutées par leur domaine SH2, les STAT1 sont phosphorylées par les JAK sur une tyrosine particulière localisée sur leur queue C-terminale, ce qui permet leur dimérisation et leur subséquent transfert dans le noyau, où elles agissent comme facteurs de transcription[89,94,113] (**Figure 3**).

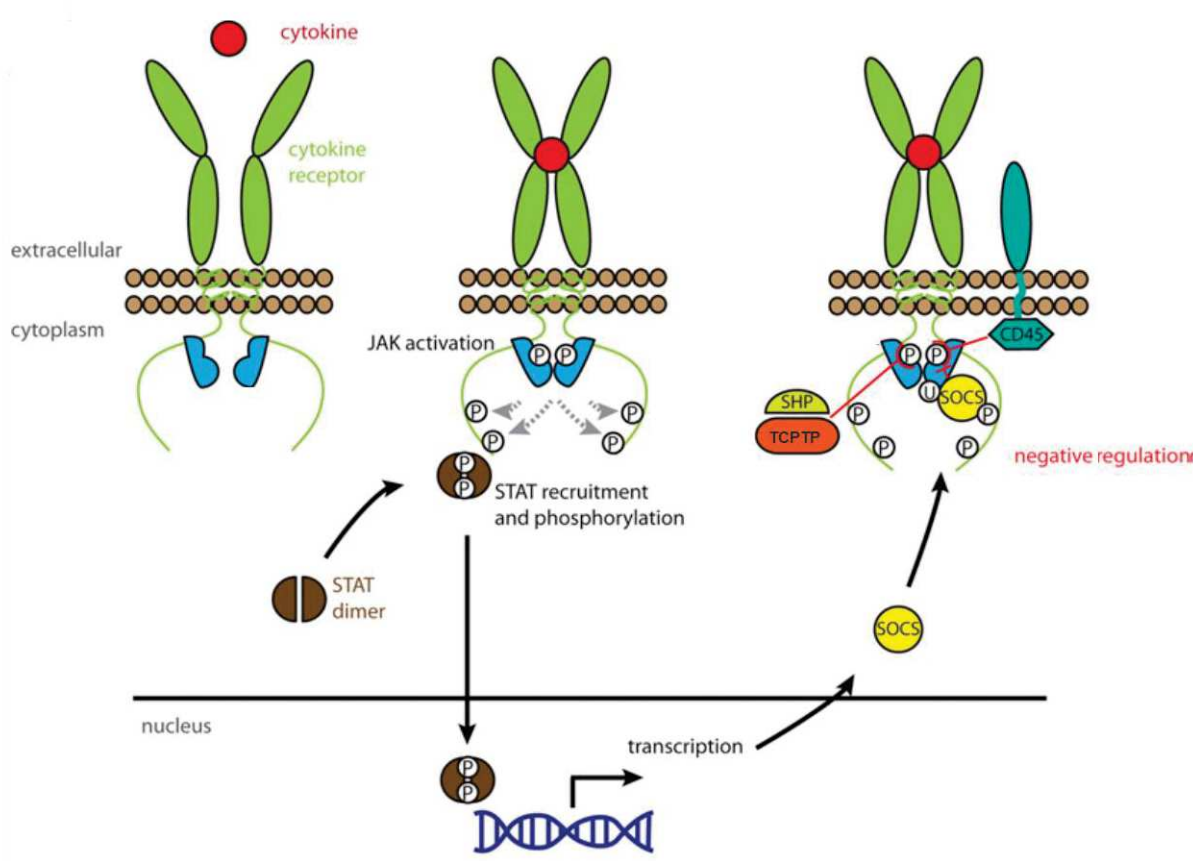


Figure 3 – Schématisation de l'activation et la régulation de JAK1

La liaison d'une cytokine à son récepteur mène à la transition des JAK associées d'un état inactif (à gauche) à l'état actif (au milieu). Les JAK activées sont caractérisées par la phosphorylation de la boucle d'activation de leur domaine kinase (P entouré, au milieu). Les JAK activées phosphorylent les résidus tyrosine de la région intracellulaire des récepteurs ce qui permet le recrutement et la phosphorylation des STAT. A droite sont représentées plusieurs protéines régulant négativement l'activité kinase des JAK, dont des phosphatases (CD45, TCPTP, SHP1 et SHP2) et les SOCS. Les SOCS inhibent la signalisation des JAK en inhibant l'activité kinase et en causant l'ubiquitylation (U entouré), ce qui mène à la dégradation protéosomale. Adaptée de Babon, 2014[94].

La signalisation de l'IFN-γ se fait en suivant ce modèle (**Figure 4**). Son récepteur est un complexe composé de deux chaînes IFN-γR1 et deux chaînes IFN-γR2. JAK1, essentielle pour la cohésion du complexe[114], est constitutivement associée à l'IFN-γR1, tandis que JAK2 est associée à l'IFN-γR2. L'IFN-γ se fixe à IFN-γR1, ce qui provoque l'autophosphorylation de JAK2, qui elle-même provoque la trans-phosphorylation de JAK1[115]. JAK1 phosphoryle alors l'IFN-γR1, ce qui induit le recrutement de STAT1. STAT1 est ensuite phosphorylée,

probablement par JAK2, et subit une homo-dimérisation pour former le complexe GAF. Le GAF migre alors vers le noyau, où il se fixe au GAS, et induit la transcription de gènes cibles.

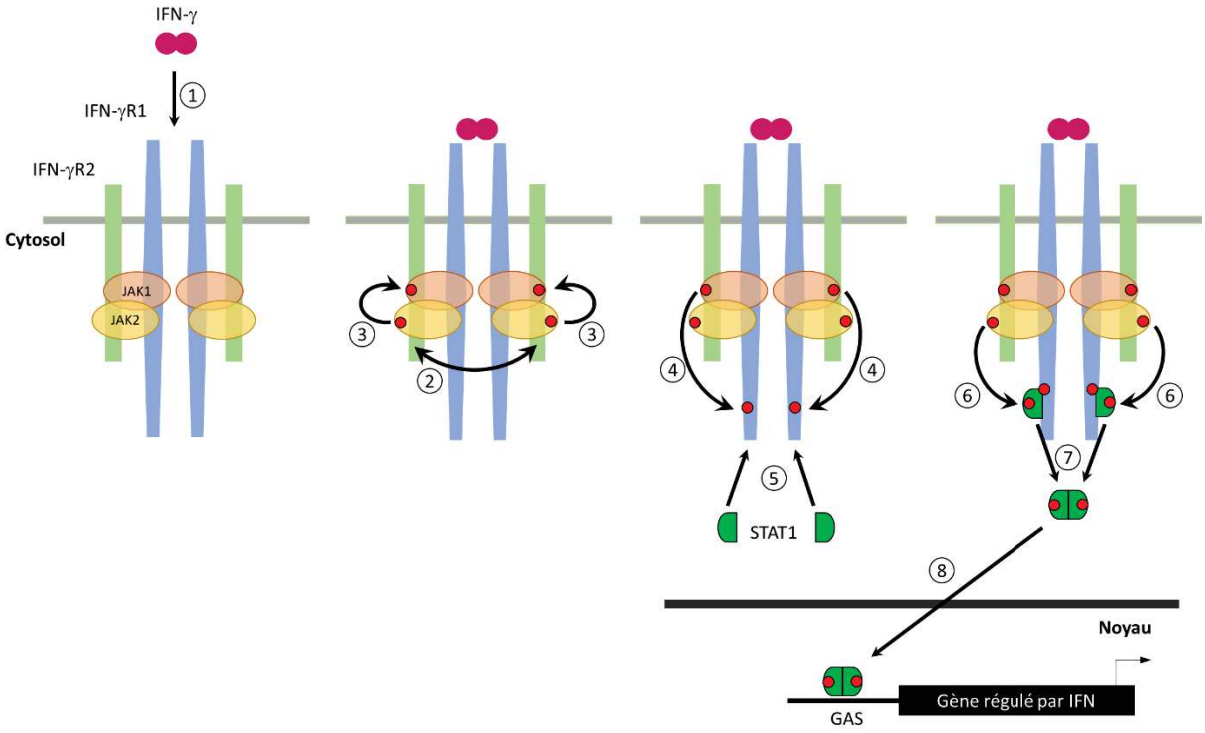


Figure 4 – Voie de signalisation de l'IFN-γ

Les points rouges indiquent les évènements de phosphorylation. **1** : Fixation de l'IFN-γ à son récepteur. **2** : Trans-autophosphorylation de JAK2. **3** : Trans-phosphorylation de JAK1 par JAK2. **4** : Phosphorylation de l'IFN-γ par JAK1. **5** : Recrutement de STAT1. **6** : Phosphorylation de STAT1 par JAK2. **7** : Homo-dimérisation de STAT1. **8** : Trans-location de GAF dans le noyau.

La signalisation de l'IFN-a se fait également sur un modèle similaire (**Figure 5**). Son récepteur est un complexe composé de deux chaînes : IFN-αR1 et IFN-αR2. JAK1 est constitutivement associée à l'IFN-αR2, tandis que TYK2 est associée à l'IFN-αR1. L'IFN-α se fixe à son récepteur, ce qui provoque la transphosphorylation de JAK1 et TYK2, qui elles-mêmes provoquent la phosphorylation des chaînes du récepteur, ce qui induit le recrutement de STAT2. STAT2 est à son tour phosphorylée par les JAK, et STAT1 est recrutée. Elle est également phosphorylée par les JAK. Le rôle spécifique de chacune des JAK dans la phosphorylation des STAT et des chaînes du récepteur n'a pas encore été élucidé. STAT1 et STAT2 se détachent ensuite du récepteur pour former le trimère ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3), avec IRF9. L'ISGF3 migre dans le noyau, où il se fixe à l'ISRE (Interferon-stimulated response element) et induit la transcription de gènes cibles.

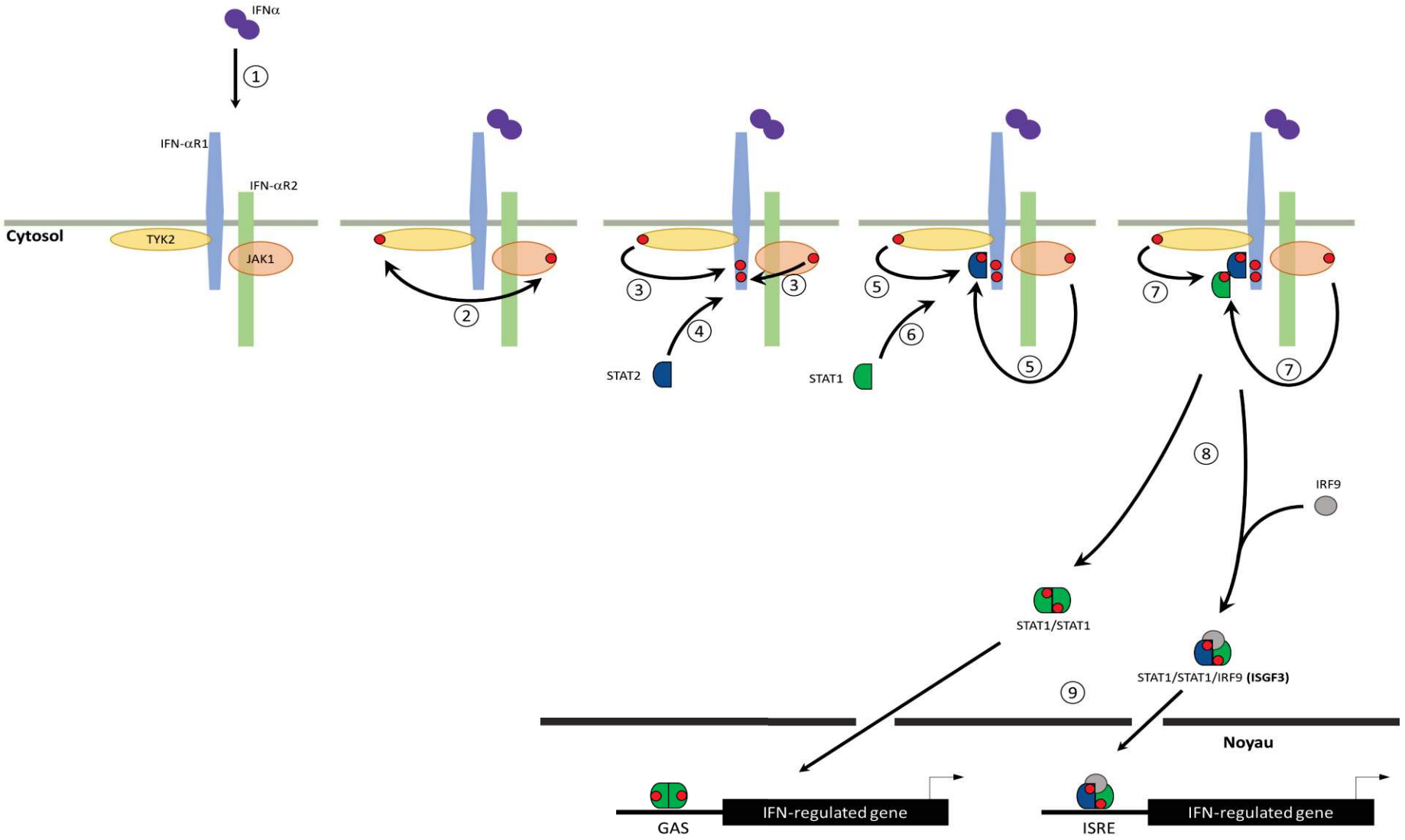


Figure 5 – Voie de signalisation de l'IFN-α

Les points rouges indiquent les évènements de phosphorylation. **1** : Fixation de l'IFN-α à son récepteur. **2** : Trans-phosphorylation de TYK2 et JAK1. **3** : Phosphorylation d'IFN-αR1. **4** : Recrutement de STAT2. **5** : Phosphorylation de STAT2. **6** : Recrutement de STAT1. **7** : Phosphorylation de STAT1. **8** : Formation des complexes GAF ISGF3. **9** : Trans-location de GAF / ISGF3 dans le noyau.

b. Modulation de l'activation et désactivation de JAK1

L'activité de la voie de signalisation JAK-STAT est fortement régulée à de multiples niveaux pour assurer la suppression de la signalisation en absence de stimulation par des cytokines mais aussi pour permettre une activation transitoire rapide lorsqu'il y a stimulation (**Figure 3**). La régulation repose majoritairement sur le contrôle de l'activité tyrosine kinase du domaine JH1 par des mécanismes intra et intermoléculaires, mais aussi sur le contrôle de la disponibilité de certains éléments de la machine signalétique[89]. Beaucoup de ces niveaux de régulation sont initiés ou modulés par la phosphorylation de résidus régulateurs sur les JAK, les récepteurs, ou les STAT.

i. Inhibition et activation du domaine kinase JH1 par le domaine pseudo-kinase JH2

Le domaine pseudo-kinase JH2 est un domaine régulateur qui a deux rôles : il permet d'inhiber l'activité kinase du domaine JH1 en l'absence de stimulation, et il permet la médiation du signal d'activation du récepteur des cytokines au domaine JH1[116]. Malheureusement, il existe peu de données sur les mécanismes d'activation et désactivation de JAK1. Toutefois, on peut supposer que ceux-ci sont similaires à ceux employés pour les autres JAK. Il est donc possible de proposer les mécanismes ci-dessous, par extrapolation des données recueillies pour les autres JAK.

Deux modèles différents ont été proposés : l'un dans lequel le domaine pseudo-kinase se lie et inhibe le domaine kinase en *cis* (**Figure 6**), et l'autre dans lequel cette liaison se fait en *trans*[89,94] (**Figure 6**). Dans le modèle intramoléculaire *cis*, le lobe N-terminal du domaine pseudokinase interagit avec le lobe N-terminal du domaine kinase. Le mécanisme d'inhibition n'est pas complètement élucidé mais implique probablement la séquestration physique du domaine kinase ou bien des contraintes sur les mouvements des lobes de JH1 nécessaires à l'activité de transfert de phosphoryle[89,94,117,118] (**Figure 6**). Ce modèle est basé sur une étude de la structure cristalline des domaines kinase et pseudokinase de TYK2[89,94,117,118].

En revanche, des études sur les domaines kinase et pseudokinase de JAK2 favorise un modèle d'inhibition en *trans*[89,94,95]. Dans ce modèle, le domaine pseudokinase d'une molécule JAK inhibe l'activité du domaine kinase de la seconde molécule JAK[89,94,95] (**Figure 6**). Dans les deux cas, l'activation des JAK nécessite leur réorientation, afin de faciliter une mutuelle transphosphorylation, par mise en contact de leurs domaines kinases respectifs. Il est à ce jour impossible de prévoir quel modèle JAK1 favorise. Une possibilité est que les différentes JAK

nécessitent différents mécanismes d'inhibition/activation ; une autre est que le mode d'inhibition/activation soit décidé par le récepteur auquel les JAK sont attachées[94].

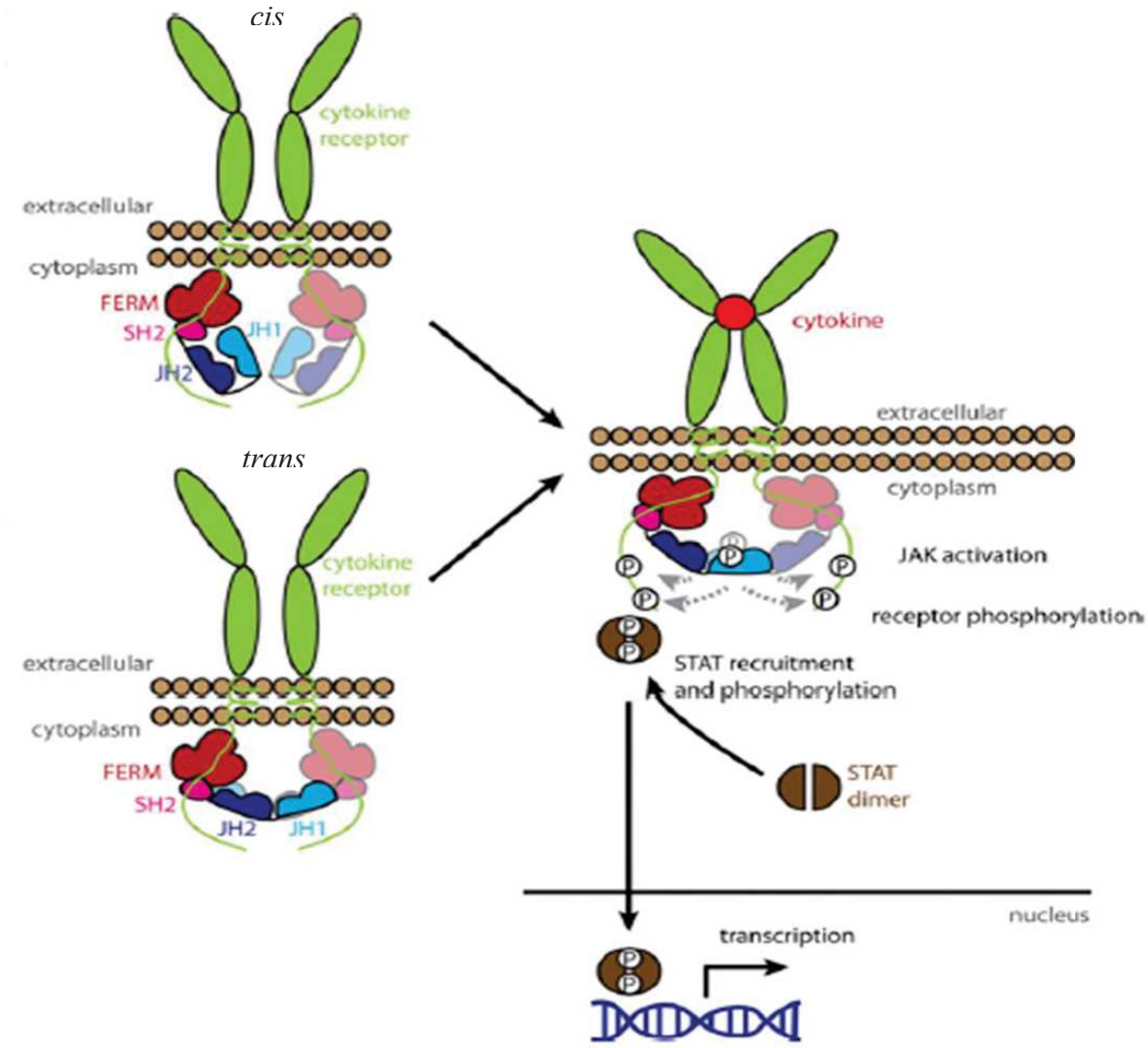


Figure 6 – Modèles *cis* et *trans* pour la régulation de l'activité catalytique du domaine kinase par le domaine pseudokinase

Dans le modèle *cis,* le domaine pseudokinase se lie au domaine kinase au sein du même monomère de JAK, ce qui cause la suppression de l'activité kinase. Dans le modèle *trans*, le domaine pseudokinase d'une JAK se lie au domaine kinase de la JAK complémentaire pour supprimer l'activité catalytique. Dans les deux cas, l'activation des JAK nécessite la réorientation des JAK pour qu'elles puissent se transphosphoryler, ce qui permet ensuite la phosphorylation des récepteurs et le recrutement et l'activation des STAT. Adaptée de Babon, 2014[94].

ii. Inhibition par les protéines tyrosine phosphatases

La régulation de la voie de signalisation JAK-STAT est majoritairement contrôlé par phosphorylation[89,94,113]. Après activation du récepteur par une cytokine, les JAK sont activées par transphosphorylation de la boucle d'activation du domaine JH1[89,94,113]. De ce fait, la déphosphorylation des JAK et des tyrosines activant les récepteurs joue un rôle prépondérant dans la régulation de la signalisation, et est induite par de multiples protéines tyrosine phosphatases (PTP), notamment SHP1, SHP2, TCPTP et CD45 (**Figure 3**).

Il a été montré que chez la souris, SHP1 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1) interagit directement avec JAK1 dans les macrophages et les fibroblastes embryonnaires murins (MEF)[119,120] et permet en particulier la régulation de la signalisation d'IFN-α[119] et des cytokines des familles IL-2 et gp130, par déphosphorylation de JAK1[120,121]. Dans les MEF, SHP2 déphosphoryle également JAK1 et permet ainsi la régulation de la signalisation d'IFN-α et d'IFN-γ[122]. Simoncic a étudié TCPTP (T-cell protein tyrosine phosphatase) chez la souris et a établi qu'elle déphosphoryle JAK1, et est impliquée dans la régulation des voies de signalisation d'IFN-α, d'IFN-γ et d'IL-2 dans des cellules T, des macrophages ainsi qu'*in vivo*[123]. Enfin, il a été montré que dans des lymphocytes B humains, CD45 déphosphoryle JAK1 et régule négativement la voie de signalisation d'IL-4[124].

iii. Inhibition par les suppresseurs de signalisation des cytokines

En plus de la déphosphorylation de son domaine kinase, l'activité de JAK1 peut également être régulée par des protéines inhibitrices : les suppresseurs de signalisation de cytokines ou SOCS[89,94]. Il y a huit SOCS, nommés SOCS1 à SOCS8. La plupart d'entre eux sont induits par la signalisation JAK-STAT, et inhibent la cascade signalétique, formant une boucle de rétroaction négative. Cette inhibition se fait par l'induction de la dégradation des récepteurs des cytokines liés aux JAK. Cependant, SOCS1 et SOCS3 sont capables d'inhiber l'activité catalytique des JAK (et entre autres JAK1) directement. Lorsqu'ils se lient aux JAK, une région dite inhibitrice de kinase (KIR) se déploie et bloque partiellement le site de liaison des substrats présent dans le domaine kinase des JAK, ce qui empêche l'interaction avec ces derniers et donc bloque la cascade réactionnelle[125]. SOCS3 inhibe spécifiquement les voies de signalisation des cytokines de la famille d'IL-6, de G-CSF, et de la leptine. Les récepteurs de ces cytokines contiennent tous des sites de liaison pour le domaine SH2 de SOCS3, ce qui lui permet de se lier à eux ainsi qu'aux JAK associées (JAK1, JAK2 et TYK2)

simultanément[94,126,127]. SOCS1, quant à lui, est un puissant inhibiteur des voies de signalisation des IFN[128] et des cytokines de la famille d'IL-2[129].

Toutes ces protéines permettent donc la régulation de l'activité de JAK1 et des voies de signalisation des cytokines auxquelles elle est indispensable.

c. Souris *Jak1*-/- : phénotype cellulaire de la souris KO et phénotype infectieux

JAK1 est également indispensable au développement et à la survie, comme l'a montré l'étude de la souris *Jak1*$^{-/-}$, qui a été réalisée par Rodig en 1998[130]. En effet, les souris *Jak1*$^{-/-}$, bien que viables, meurent toutes dans les 24h suivant leur naissance, malgré une absence d'anomalies développementales majeures. De plus, ces souris sont plus petites que leurs congénères *Jak1*$^{+/-}$ ou WT (qui sont de tailles similaires) et ne sont pas capables de se nourrir[130]. Leurs cœurs, leurs poumons, leurs reins et leurs cerveaux ne présentent pas d'anomalies importantes, cependant leur thymus est nettement plus petit que celui des souris WT, malgré une architecture épithéliale thymique normale[130]. Rodig ne précise pas la taille du thymus des souris hétérozygotes. De plus, la production de thymocytes des souris *Jak1*$^{-/-}$ est fortement réduite, bien que la répartition entre cellules CD4+ et CD8+ soit normale. A l'inverse, les souris *Jak1*$^{-/-}$ produisent un nombre de splénocytes normal mais souffrent d'un blocage de la différenciation des lymphocytes au stade de transition des cellules pro-B à pré-B, ce qui résulte en un profond défaut de production de lymphocytes B matures[130]. Le phénotype lymphocytaire des souris Jak1$^{+/-}$ n'a pas été détaillé. Le défaut total en *Jak1* conduit également à l'abolition de la lymphopoïèse dans le foie fœtal, en réponse aux cytokines à récepteurs à chaîne commune γ_c, notamment IL-2, IL-4 et IL-7[130]. Cette lymphopoïèse est également diminuée (mais non abolie) en réponse à l'IL-3[130]. La souris hétérozygote présente quant à elle une diminution de la prolifération lymphocytaire en réponse à l'IL-2 et l'IL-4, mais a une réponse à l'IL-7 et à l'IL-3 comparable à celle des souris WT[130]. De plus, les fibroblastes embryonnaires et les macrophages des souris *Jak1*$^{-/-}$ ont une réponse abolie aux IFN-α et -γ. La réponse aux IFN type III n'a pas été étudiée chez les souris *Jak1*$^{-/-}$. Les souris *Jak1*$^{-/-}$ n'ont pas non plus pu être infectées du fait de leur courte vie. Leurs macrophages présentent également une réponse abolie à l'IL-10[130]. Les fibroblastes, macrophages et cardiomyocytes présentent une réponse diminuée mais non abolie aux cytokines de la famille gp130 (IL-6 et LIF) [130]. Les souris *Jak1*$^{-/-}$ ont également un nombre de neurones réduits, et ces neurones sont incapables de survivre en

présence de cytokines de la famille gp130 (IL-6, LIF, OSM, CNTF, CT-1)[130]. Bien qu'il montre que les fibroblastes de la souris hétérozygote ont une expression réduite de Jak comparée aux cellules WT, Rodig décrit les cellules de ces souris comme étant « suffisantes en Jak1 », et les utilise en tant que contrôles positifs dans les expériences portant sur les macrophages, cardiomyocytes et neurones sans plus détailler leurs phénotypes. Ainsi JAK1 joue non seulement un rôle clé dans le système immunitaire, mais elle est également nécessaire à la survie et au développement des neurones.

d. Déficience de JAK1 chez l'homme (mutation germinale perte de fonction « LOF ») : phénotype clinique et cellulaire

De nombreuses mutations somatiques de *JAK1,* associées à des cancers (majoritairement des cancers gynécologiques) ou des leucémies, ont été répertoriées (**Tableau 5**). Cependant, récemment, des mutations germinales ont également été mises en évidence chez des patients présentant des troubles du système immunitaire : une mutation LOF chez un patient atteint de MSMD syndromique[16], et une mutation GOF chez une famille présentant des troubles de l'auto-immunité[131], décrites ci-dessous.

Exon	Domaine	Mutation	Activité kinase	Effet	Maladie associée	Référence
3	FERM	I62V		Non décrit	LAL B, LAL T	132
3	FERM	S71C		Non décrit	ETP-LAL	133
4	FERM	D82A		Association au récepteur diminuée (avec JAK1 Y81A)	Tumeurs gynécologiques	134,135
5	FERM	K142fs		LOF par décalage du cadre de lecture	Tumeurs gynécologiques	134
6	FERM	K204M		Non décrit	LAL B	134
8	FERM	N339fs		LOF par décalage du cadre de lecture	Tumeurs gynécologiques	134
8	FERM	R360W		Non décrit	LAL T	132
8	FERM	I377K		Non décrit	ETP-LAL	133
9	Lieur	V427M		Non décrit	LAL T pédiatrique	136
9	Lieur	N451S	+	pSTAT3/5 augmentées	Carcinome hépatocellulaire (xénogreffe)	137
9	Lieur	P430fs		LOF par décalage du cadre de lecture	Tumeurs gynécologiques	134
10	SH2	W467*		Non décrit	Cancer du sein (Triple Neg)	138
10	SH2	T478S	+	pSTAT1/3/5 augmentées	LAM	118
10	SH2	E483D	+	pSTAT3/5 augmentées	Carcinome hépatocellulaire (xénogreffe)	137
11	SH2	G511D		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	134
11	SH2	S512L		Surexpression des gènes liés à LAL (et JAK)	LAL T	132
12	Lieur	R577Q		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	134
13	JH2	T593M		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	134
13	JH2	D604Y		Non décrit	LAL T	139
13	JH2	V623A	+	pSTAT1/3/5 augmentées	LAM	118
13	JH2	L624-629W		Non décrit	LAL	140

13	JH2	I631R/G/I		Non décrit	LAL	[141]
14	JH2	A634D	+	Non décrit	LAL B, LAL T	[132]
14	JH2	E637K		Non décrit	Cancer du sein (HER2+)	[138]
14	JH2	Q644H		Non décrit	Carcinome hépatocellulaire	[142]
14	JH2	V645F	+	pJAK1/STAT5 constitutives	Carcinome hépatocellulaire	[142]
14	JH2	S646F/P	+	pJAK1/STAT5 augmentées	LAL	[140,143]
14	JH2	H647Y		Non décrit	Carcinome canalaire invasif	[144]
14	JH2	K648N		Non décrit	LAL T	[145]
14	JH2	V651M		Non décrit	LAL T	[118]
14	JH2	Y652H	+	Activité STAT5 constitutive	LAL T	[118,143]
14	JH2	L653F	+	Non décrit	LAL pédiatrique	[132]
14	JH2	C657R		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	[134]
14	JH2	V658F/L	+	Activité STAT5 constitutive	LAL	[140,143,144,146]
15	JH2	E668Q	+	Non décrit	LAL T pédiatrique	[136]
15	JH2	S703I	+	pSTAT3/5 basales hautes	LAL, carcinome hépatocellulaire	[137,141,143]
16	JH2	R724H/Q/S	+	Activité STAT1 augmentée	LAL B, LAL T	[132]
16	JH2	S729C	+	pSTAT3/5 augmentées	Carcinome hépatocellulaire (xénogreffe)	[137]
16	JH2	F734L		Non décrit	LAL T	[143]
17	JH2	T782M		Non décrit	Adénocarcinome	[144]
17	JH2	L783F	+	Activité STAT5 augmentée	LAL T	[143,144]
17	JH2	L799P		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	[134]
19	Lieur	K860fs	-	LOF par décalage du cadre de lecture	Tumeurs gynécologiques	[134]
19	Lieur	G871E		Non décrit	Lignée tumorale SKN	[147]
19	JH1	R879S/C/H	+	Activité STAT1 augmentée	LAL T	[132]
19	JH1	G882E		Perte de JH1	Lignée tumorale SKN	[147]
20	JH1	T901G	+	Non décrit	LAL T	[136]
20	JH1	K908T		Non décrit	LAL T pédiatrique	[136]
20	JH1	K924fs		LOF par décalage du cadre de lecture	Tumeurs gynécologiques	[134]
22	JH1	G990_splice		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	[134]
23	JH1	E1051Q/P		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	[134]
24	JH1	A1086S	+	pSTAT3/5 augmentée	Carcinome hépatocellulaire (xénogreffe)	[137]
24	JH1	R1113H		Non décrit	Tumeurs gynécologiques	[134]

Tableau 5 – Liste des mutations somatiques de *JAK1*.
L'activité kinase est mesurée en termes de phosphorylation basale de JAK1, de phosphorylation ou d'activité transcriptionnelle des STAT : + représente une augmentation d'activité basale, - représente une diminution d'activité après stimulation. Tableau adapté de Hammaren, 2019[89].

Un défaut AR partiel en JAK1 a été décrit chez un patient pakistanais de 22 ans, issu d'une famille consanguine[16]. Il a reçu le vaccin du BCG à la naissance. Ce patient a souffert de diverses infections virales au cours des premières années de sa vie. A 3 ans, il développe une ostéomyélite multifocale à *M. tuberculosis*, *M. malmoense* et *M. scrofulaceum*. Il reçoit un traitement antimycobactérien à base d'isonazide, d'ethambutol et de ciprofloxacine et son état s'améliore. Il reste en relative bonne santé jusqu'à 16 ans, âge auquel il développe des fibroses pulmonaires (possiblement dues à *M. gordonae*). Il reçoit une quadrithérapie contre les infections mycobactériennes (rifampicine, ethambutol, clarithromycine et ciprofloxacine) auquel il répond correctement. Il garde alors un traitement prophylactique de clarithromycine et ciprofloxacine et ne contracte plus d'infections mycobactériennes. Il a cependant souffert

d'un certain nombre d'infections virales (verrues), fongiques (non documentées) et parasitiques (gale) de la peau. A 21 ans, il développe un carcinome sur la vessie, pour lequel il reçoit une chimiothérapie mais des suites duquel il meurt à 23 ans[16].

Un séquençage de l'exome (WES, de l'anglais Whole Exome Sequencing) a mis en évidence deux variants homozygotes dans le domaine pseudokinase de JAK1 : p.P733L et p.P832S[16]. La première variation s'est avérée hypomorphe en termes de phosphorylation de JAK1, STAT1 et STAT2 après stimulation par de l'IFN-γ et de l'IFN-α dans un système de surexpression, tandis que la seconde variation est neutre[16]. Les fibroblastes primaires du patient présentent une réponse diminuée aux IFN, avec un défaut de réponse plus marqué pour l'IFN-α, au niveau de la phosphorylation de JAK1, STAT1, STAT2, TYK2 (pour l'IFN-α) et JAK2 (pour l'IFN-γ)[16]. Les lymphocytes présentent également une diminution de la phosphorylation des STAT après stimulation par diverses cytokines[16] :

- de STAT1 après stimulation par de l'IFN-γ, IFN-α et IL-27,
- de STAT3 après stimulation par de l'IL-10,
- de STAT4 après activation par de l'IFN-α,
- de STAT5 après activation par de l'IL-2
- de STAT6 après activation par de l'IL-4.

Tous ces résultats démontrent qu'un défaut AR partiel en JAK1 cause un MSMD syndromique, caractérisé par différentes infections mycobactériennes et virales dues à un défaut de réponse aux IFN.

e. Mutation germinale *JAK1* GOF : phénotype clinique et cellulaire

Une mutation AD GOF de JAK1 a également été décrite chez une mère et ses deux garçons souffrant de maladies auto-immunes et d'infections virales[131]. Les patients présentaient une dermatite atopique sévère, une éosinophilie profonde, une hépatosplénomégalie massive, une maladie auto-immune de la thyroïde, un retard de croissance et des infections virales récurrentes. La mère présentait également des allergies environnementales et de l'asthme[131]. La dermatite et l'éosinophilie n'ont pas répondu au traitement habituel de corticostéroïdes. Cependant, un traitement au ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2, permit une amélioration de l'éosinophilie ainsi que la résolution de la dermatite et de l'hépatosplénomégalie[131].

Un séquençage de l'exome a identifié la présence d'une mutation hétérozygote dans le domaine pseudokinase de JAK1 chez la mère et ses deux enfants : p.A634D[131]. Cette mutation se révèle être GOF en système de surexpression, amplifiant la phosphorylation de JAK1 et STAT1 au niveau basal ainsi qu'après stimulation par de l'IFN-α[131]. La phosphorylation de STAT1 au niveau basal et après stimulation est également amplifiée dans les B-EBV des patients par rapport à celle de contrôles sains, et cette hausse d'activité est moins bien inhibée par traitement au ruxolitinib[131]. Les lymphocytes T des patients présentaient également une réponse à l'IL-6 augmentée, avec une hausse de la phosphorylation de STAT3[131]. Ainsi, des mutations GOF de JAK1 peuvent causer des maladies auto-immunes et une prédisposition aux infections virales, par disruption des voies de signalisation d'IL-6 et de l'IFN-α respectivement[131].

Ce manuscrit va décrire de nouvelles mutations germinales de *JAK1* qui ont été identifiées et caractérisées chez une patiente souffrant d'infections mycobactériennes, et définissant une nouvelle forme de défaut AR partiel.

Hypothèses et objectifs

Le diagnostic génétique des patients souffrant d'infections mycobactériennes à ME ou BCG peut s'établir en suivant deux stratégies : l'approche immunologique et l'approche génomique.

L'approche immunologique consiste à réaliser des tests fonctionnels standardisés et à séquencer un gène candidat (qui est connu en tant que cause de prédisposition aux infections mycobactériennes) sur la base d'une suspicion clinique. Cette suspicion est basée sur le phénotype clinique distinctif de patients porteurs de mutations sur certains gènes. Elle est ensuite renforcée par les tests fonctionnels. Ces derniers comprennent entre autres l'évaluation de l'axe de l'IFN-γ[148] par activation sur sang total (et détaillée dans la partie Matériel et méthodes), qui peut pointer vers un défaut de production de l'IFN-γ, ou vers un défaut de réponse à celui-ci. Les différents tests réalisés peuvent faire soupçonner un gène candidat, qui sera alors séquencé par séquençage de Sanger, à la recherche d'une mutation.

Dans les cas où il n'y a pas de gène candidat, l'approche génomique est utilisée. Celle-ci consiste à réaliser un séquençage de nouvelle génération afin identifier le gène responsable de la maladie. L'hypothèse de travail est alors qu'il existe de nouvelles mutations sur des gènes non répertoriés, qui seraient responsables de la prédisposition aux infections mycobactériennes.

Ce travail de thèse s'est focalisé sur le cas d'une patiente souffrant d'infections mycobactériennes, qui sera décrit plus en détail dans la partie Résultats. Dans le cas de cette patiente, c'est l'approche génomique qui a été employée. Elle a permis d'identifier deux variations hétérozygotes rares sur le gène *JAK1*. Etant donné qu'un patient atteint d'un défaut AR partiel en JAK1, et souffrant entre autres d'infections mycobactériennes, a déjà été décrit dans la littérature, l'hypothèse de travail est que ces variants seraient responsables de la prédisposition de la patiente aux infections mycobactériennes. L'hypothèse sous-jacente est que ces variants seraient délétères et causeraient un défaut de réponse à l'IFN-γ.

L'objectif de cette thèse a été de caractériser ces variants en système de surexpression ainsi que dans les cellules de la patiente, afin de valider ou non ces hypothèses. L'objectif secondaire est de déterminer s'il s'agit d'une nouvelle forme de défaut en JAK1, en comparant les résultats obtenus avec ceux du premier patient souffrant d'un défaut AR en JAK1 publié.

Matériel et méthodes

Recherche impliquant des participants humains

La recherche a été approuvée et réalisée suivant les prérequis des comités d'éthique institutionnels de l'Hôpital Necker des Enfants Malades, Paris, France, et de l'Hôpital de l'Université de Rockefeller, New-York, Etats-Unis. Un consentement éclairé a été obtenu pour tous les patients et contrôles sains volontaires décrits dans cette étude.

Virscan

Le sérum de la patiente a été analysé par Virscan[149,150]. Succinctement, une bibliothèque d'oligonucléotides, encodant pour des peptides de 56 acides aminés recouvrant le génome de 206 espèces virales, a été synthétisée sur une puce à ADN. Ces oligonucléotides ont ensuite été clonés dans des phages T7 afin de produire les peptides. Le sérum de la patiente a été ajouté à la bibliothèque de phages. Puis une immunoprécipitation a été réalisée avec des billes à protéines A et G. Les peptides enrichis ont été identifiés par amplification par PCR et séquençage de la cassette de peptides, grâce à une plateforme Illumina.

Séquençage de l'exome, PCR et séquençage

L'ADN génomique a été extrait du sang total de la patiente, de ses parents, de son frère et d'un contrôle sain avec le kit iPrep PureLink gDNA Blood kit et les instruments iPrep de Thermo Fisher Scientific, en suivant les instructions du fournisseur. Le WES a été réalisé pour la patiente avec 3 µg d'ADN. Le kit SureSelect Human All Exon 50Mb (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a été utilisé pour la capture de l'exome et un séquenceur HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA), générant des lectures de 100 paires de bases, a été utilisé pour un séquençage à partir des deux extrémités (paired-end). Brièvement, les séquences ont été alignées à la référence GRCh37 du génome humain grâce au BWA aligner[151]. Les PCR ont été faites sur de l'ADN génomique avec la Taq polymerase (Invitrogen), en utilisant un thermocycleur GeneAmp PCR (9700; Applied Biosystems). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur des gels à 1% d'agarose, purifiés par centrifugation à travers de la résine Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare) et séquencés avec le kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). La purification des produits de séquençage a été faite par centrifugation à travers de la résine Sephadex G-50 Superfine et les séquences ont été analysées avec un appareil ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). Les séquences ont été alignées sur la séquence génomique de *JAK1* (NM_002227.3) avec le logiciel Genealysis.

Extraction d'ARN, qPCR et clonage TOPO-TA

Les PBMC ont été extraits de sang total traité par héparine de la patiente et d'un contrôle sain, par séparation par centrifugation à travers un gradient de Ficoll et lavés avec du RPMI 1640. L'ARN total a été extrait des PBMC grâce au kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004), et l'ARN de B-EBV, de fibroblastes SV-40 et de fibroblastes primaires avec le kit RNeasy Mini kit (Qiagen, 74104). La transcription inverse a été réalisée avec l'Oligo(dT) et la transcriptase inverse Superscript (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. L'ADNc en résultant a été utilisé pour des qPCR, avec une sonde *JAK1* couvrant les exons 3 et 4 (Hs01026997_m1, Thermo Fisher) et une sonde *GAPDH* (4326317E, Applied Biosystems) comme gène de ménage. Le TaqMan Fast Universal PCR Master Mix a été utilisé comme tampon et la réaction a été faite avec un système 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). L'amplification des exons 12 à 21 de l'ADNc de *JAK1* a été faite par PCR avec de la Taq polymerase (Invitrogen). Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). La réaction de TOPO TA a été faite avec le kit de TOPO-TA avec le vecteur pCR™4-TOPO™ (Invitrogen, K457502) et les produits ont été transformés dans les cellules compétentes TOP 10 (Invitrogen, C404006) et étalés sur des plaques de LB Agar complémentées avec de l'ampicilline. 50 colonies du contrôle sain et de la patiente ont été amplifiées avec de la Taq polymerase (Invitrogen), analysées par électrophorèse sur des gels d'agarose à 1%, purifiées par centrifugation sur de la résine Sephadex G-50 Superfine resin (GE Healthcare) et séquencées avec le kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Les produits de séquençage ont été purifiés par centrifugation sur Sephadex et les séquences ont été analysées avec l'appareil ABI Prism 3700 apparatus (Applied Biosystems), puis alignées sur l'ADNc de *JAK1* (NM_002227.3) avec le logiciel Genealysis.

Clonage de plasmide, mutagenèse, transfection transitoire et rétrotransduction

Les plasmides *p*Rc/CMV, *p*Rc/CMV-*JAK1* WT-VSVG et *p*Rc/CMV-*JAK1* K908E-VSVG ont été donnés par le Pr. Sandra Pellegrini et transformés dans des cellules compétentes TOP 10 (Invitrogen, C404006). L'extraction des plasmides multipliés a été réalisée avec le kit HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12663). Les plasmides mutés (p.C657S, p.P733L/P832S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) ont été générés par mutagenèse dirigée (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase: Agilent #6006672) selon les instructions du fournisseur, et digérés avec de la DpnI (New England Biolabs, R0176). Ces plasmides ont ensuite servi à transfecter des cellules HEK293T et U4C avec le réactif de transfection X-treme

GENE9 (Sigma Aldrich, 06 365 809 001), selon les instructions du fournisseur. La production de virus et la rétrotransduction des U4C ont été réalisées comme précédemment décrit[152]. Brièvement, les ADNc de *JAK1* WT ou mutés ont été sous-clonés dans le plasmide rétroviral pLZRS-IRES-ΔNGFR. Ces plasmides ont ensuite été transfectés dans des cellules Phoenix A avec de l'Xtreme GENE9 et les particules rétrovirales en résultant ont été collectées et concentrées avec du Retro-X concentrator (Takara Bio, 631455). Les solutions virales ainsi obtenues ont été utilisées pour transduire les cellules U4C. Les cellules rétrotransduites ont ensuite été purifiées par tri sur colonne MACS (Miltenyi Biotech, 130-042-401).

Culture cellulaire et stimulation

Les B-EBV ont été cultivées dans du RPMI complémenté avec 10% de FBS à 37°C et 5% de CO_2. Les fibroblastes SV-40, les fibroblastes primaires, les HEK293T et les U4C ont été cultivées dans du DMEM complémenté avec 10% de FBS, à 37°C et 5% de CO_2. Les B-EBV, fibroblastes SV-40, fibroblastes primaires et U4C ont été stimulés avec de l'IFN-γ (Imukin, Boehringer Ingelheim), de l'IFN-α2b (IntronA, Schering Plough) et de l'IL-27 (2526-IL, R&D) selon les doses et les durées indiquées.

Lyse cellulaire et Western Blots

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA modifié (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA) complémenté avec du Complete proteinase inhibitor cocktail mix 1X (Roche), du phosSTOP 1X (Roche), 100µM de DTT, 1 mM de PMSF et 1 mM de Na_3VO_4. Après incubation avec du tampon Laemmli et du NuPage (Invitrogen), les échantillons protéiques ont été soumis au SDS-PAGE sur des gels à 10% en polyacrylamide (Biorad) et transférés sur des membranes de PVDF (Biorad) grâce au système Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad). Les anticorps anti-phospho-JAK1 (3331S, Cell Signaling), anti-JAK1 N-ter (sc-376996, Santa Cruz), anti-JAK1 Cter (3332S, Cell Signaling), anti-VSVG Tag (#903901, Biolegend), anti-phospho-STAT1 (612133, BD Biosciences), anti-STAT1 (610116, BD Biosciences), anti-phospho-STAT2 (sc-21689-R, Santa Cruz), anti-STAT2 (sc-514193, Santa Cruz), anti-phospho-TYK2 (#9321, Cell Signalling), anti-TYK2 (s-5271, Santa Cruz), anti-GAPDH (14C10, Cell Signaling) et anti-α-tubulin (sc-23948, Santa Cruz) ont été utilisés. Les réactifs ECL western blotting detection reagents (Biorad) et SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) ont été utilisés pour révéler les anticorps liés.

Cytométrie en flux

Pour déterminer la phosphorylation de STAT1 dans les B-EBV, les cellules ont été marquées avec le kit Aqua Live/Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific), activées avec de l'IFN-α, de l'IFN-γ ou de l'IL-27 pendant 30 minutes, perméabilisées avec les tampons BD Phosflow, lavées avec du PBS froid et incubées 1h à 4°C avec un anticorps anti-phospho-STAT1 couplé à un fluorochrome (612597, BD Biosciences) ou l'isotype correspondant (565357, BD Biosciences). Après trois lavages, les échantillons ont été passés sur un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter) et les résultats ont été analysés avec FlowJo[12]. Pour déterminer l'expression d'HLA classe I et HLA classe II dans les U4C et fibroblastes SV-40, les cellules ont été activées le temps indiqué, avec les doses indiquées de d'IFN-γ, d'IFN-α ou de TNF-α. Elles ont ensuite été lavées dans du PBS froid et incubées 45 min à 4°C avec des anticorps anti-HLA classe I (311406, Biolegend), anti-HLA-DR (560944, BD Pharmingen) ou avec les isotypes correspondants (400214, Biolegend /555573, BD Pharmingen). Après trois lavages, les échantillons ont été passés sur le cytomètre en flux, et les résultats ont été analysés avec FlowJo.

Activation sur sang total

L'activation sur sang total a été faite sur des échantillons sanguins collectés sur héparine de contrôles sains et de la patiente. Ils ont été activés avec du BCG ou avec du BCG plus de l'IFN-γ ou de l'IL-12 (R&D). Après 48h de stimulation, les surnageants ont été collectés et utilisés pour réaliser des ELISA contre l'IFN-γ, l'IL-12p70, ou l'IL-12p40. Ces tests ont été réalisés avec des kits Quantikine HS pour l'IL-12p70 et l'IL-12p40 de R&D Systems et le kit human Pelipair IFN-γ de Sanquin, en suivant les instructions des fournisseurs.

Résultats : Nouveau défaut génétique AR de JAK1

A. Phénotype clinique

La patiente étudiée est une fille née en 2010 dans une famille algérienne non consanguine, qui vit en France. Elle reçoit le vaccin du BCG à la naissance. A 3 mois, elle développe une protubérance sur le front, qui s'avère normal par suivi échographique. A 1 an, elle développe un gonflement sur le fronto-pariétal gauche. Suite à une biopsie, un diagnostic d'histiocytose langerhansienne est posé. Elle est alors traitée avec des stéroïdes pendant un an mais fait une rechute six mois après la fin du traitement, à 31 mois. Elle reçoit alors un traitement de vinblastine et purinethol, qui s'avère plutôt efficace malgré l'apparition de nouvelles lésions au cours du traitement. A 5 ans, elle développe des adénopathies cervicales, accompagnées d'une hypertrophie du septum nasal, avec un petit gonflement, dues à une infection non documentée. Cependant, une infection mycobactérienne est suspectée. Elle développe ensuite une lésion sur le bout du nez (**Figure 7**). Le test du QuantiFERON (test de dépistage de la tuberculose) est négatif, mais le test Mantoux (ou Intradermo-réaction à la tuberculine, test de dépistage de mycobactéries) est très positif. Elle reçoit une quadrithérapie anti-mycobactérienne (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et claritromycine) et son état s'améliore (**Figure 7**). Un diagnostic d'immunodéficience primaire (PID) est envisagé. Le phénotypage des lymphocytes montre une lymphocytose des lymphocytes B, ainsi qu'une lymphocytose modérée des lymphocytes T CD4+, accompagnée d'un pourcentage réduit de T CD8+ naïfs au profit d'un excès de T CD8+ effecteur-mémoire. Le nombre de lymphocytes NK est normal (**Tableau 6**). Les taux d'immunoglobulines sont tous dans la norme (**Tableau 7**). Les sérologies pour le EBV, le CMV, les poliovirus de type 1 et 3, le virus de la rougeole et le parvovirus B19 reviennent positives (**Tableau 8**). Un Virscan confirme ces résultats et détecte également que la patiente possèdent des anticorps contre les adénovirus humains B et C, le virus de la varicelle (VZV), le virus respiratoire syncytial, le virus de la grippe A et de la grippe C, les entérovirus B et D, le virus des oreillons, le virus Norwalk, les rhinovirus A et B, et pour *Streptococcus pneumoniae* (**Tableau 9**). Les sérologies virales ainsi que le VirScan montrent que la patiente n'a pas eu d'infections virales sévères. Elle a maintenant 8 ans et se porte bien. Elle a un frère qui est en bonne santé, et n'a jamais souffert d'infections invasives.

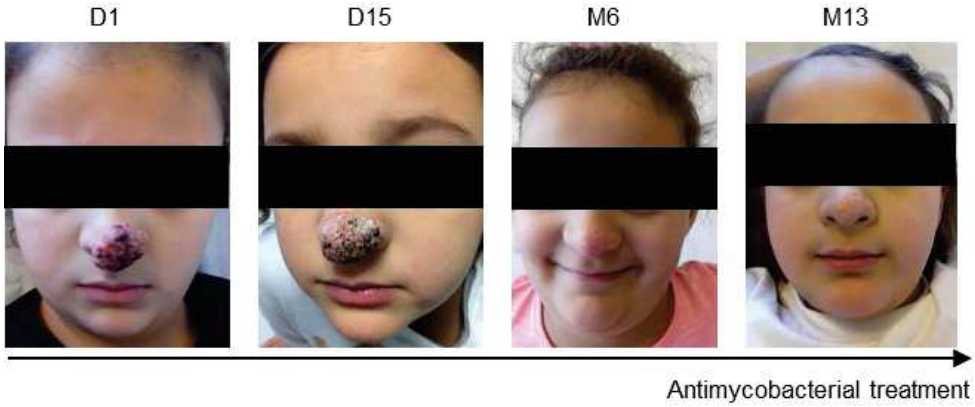


Figure 7 – Evolution clinique de manifestations cutanées. Probable infection mycobactérienne de la peau traitée par antibiotiques contre les mycobactéries (D= jour ; M= mois).

Sous-population de lymphocytes	Patiente	Valeurs normales selon l'âge de la patiente
CD3+ (/µL)	2510	1200-2600
CD3+ (%)	62	60-76
αβ+/CD3+ (%)	91.5	
γδ+/CD3+ (%)	8,5	
CD3+CD4+ (/µL)	**1619**	**650-1500**
CD3+CD4+ (%)	40	31-47
CD45RO+/CD4+ (%)	30	
CD45RA+/CD4+ (%)	70	58-70
CD31+CD45RA+/CD4+ (%) *T CD4 émigrants thymiques*	48	43-55
CD3+CD8+ (/µL)	688	370-1100
CD3+CD8+ (%)	**17**	**18-35**
CCR7+CD45RA+/CD8+ (%) *T CD8 naïfs*	**31**	**52-68**
CCR7+CD45RA-/CD8+ (%) *T CD8 mémoires centraux*	**5**	**3-4**
CCR7-CD45RA-/CD8+ (%) *T CD8 mémoires effecteurs*	**53**	**11-20**
CCR7-CD45RA+/CD8+ (%) *CD8 TEMRA*	**11**	**16-28**
CD19+ (/µL)	**1336**	**273-860**
CD19+ (%)	**33**	**6.1-25.2**
CD27+ (%)	15	8.1-33.3
IgD+CD27- (%)	78	59.7-88.4
IgD+CD27+ (%)	4	3.1-18
IgD-CD27+ (%)	11	2.9-17.4
CD24++CD38++ (%) *B transitionnels*	2	
CD21++CD24+ (%) *B matures*	83	
CD24-CD38++ (%) *Plasmablastes*	0.2	
CD21lowCD38dim (%) *B Autoréactifs*	3	
CD3-CD16+CD56+ (/µL)	202	100-480
CD3-CD16+CD56+ (%)	5	4-17

Tableau 6 – Immunophénotype du sang périphérique de la patiente à 7 ans

	Patiente	Valeurs normales selon l'âge de la patiente
IgG	9.84 g/l	5.98-11.11
IgA	0.51 g/l	0.49-1.53
IgM	1	0.56-1.59

Tableau 7 – Taux d'immunoglobulines de la patiente à 7 ans

Paramètres	**Résultats**	**Valeur seuil**
IgG anti-HSV-1	<1.1	>1.1
IgG anti-HSV-2	<1.1	>1.1
IgG anti-VZV	NR	>135
IgG anti-EBV	>750	>20
IgG anti-CMV	173	>14
IgG anti-HAV	NR	>1
IgG anti-Parvovirus B19	42	>1.1
IgG anti-Measles	>300	>16
IgG anti-Mumps	NR	>11
IgG anti-Rubella	NR	>10
IgG anti-Poliovirus 1	5	>5
IgG anti-Poliovirus 3	30	>5

Tableau 8 – Anticorps contre les virus communs évalués chez la patiente à 7 ans
NR : Non réalisés

	Patiente
Human adenovirus A	0
Human adenovirus B	9
Human adenovirus C	16
Human adenovirus D	0
Human adenovirus E	0
Human herpesvirus 1	0
Human herpesvirus 3	8
Human herpesvirus 4	42
Human herpesvirus 5	107
Human herpesvirus 6A	0
Human herpesvirus 6B	0
Human herpesvirus 7	4
Human metapneumovirus	0
Human respiratory syncitial virus	7
Influenza A virus	10
Influenza C virus	4
Human parainfluenza virus 3	0
Human parainfluenza virus 4	0
Human parvovirus B19	4
Human parechovirus	0
Aichivirus A	0
Alphapapillomatovirus 9	0
Cowpox virus	0
Cosavirus A	0
Enterovirus A	0
Enterovirus B	11
Enterovirus C	0
Enterovirus D	4
Hepatitis C virus	0
Mamastrovirus 1	0
Molluscum contagiosum virus	0
Mumps virus	4
Norwalk virus	7
Pegavirus A	0
Rhinovirus A	12
Rhinovirus B	6
Torque teno virus	0
Rotavirus A	0
Rubella virus	0
Saimiriine herpesvirus 2	0
Sapporo virus	0
Vaccinia virus	0
WU Polyomavirus	0
Borrelia burgdorferi	0
Haemophylus influenzae	0
Helycobacter pylori	0
Mycoplasma pneumoniae	0
Porphyromonas gingivalis	0
Streptococcus pneumoniae	11
Staphylococcus aureus	0
Toxoplasma gondii	0

Légende

60	Score
50	
40	
30	
20	
10	
8	
6	
4	
2	
1	
0	

Tableau 9 – Résultats du Virscan

B. Identification des mutations par criblage génétique : WES

Une PID étant suspectée, mais les tests sanguins habituels n'ayant rien décelé, un WES a été réalisé pour cette patiente. L'analyse s'est portée sur la recherche de variants rares dans la séquence codante (de fréquence inférieure à 1% dans la population générale), homozygotes ou hétérozygotes composites potentiels, et de préférence sur des gènes connus pour être impliqués dans le MSMD syndromique ou isolé. C'est ainsi que deux variations hétérozygotes ont été trouvées sur le gène *JAK1* : une substitution dans l'exon 14, c.1970C>G, menant au remplacement d'une cystéine par une sérine au niveau protéique p.C657S, ainsi qu'une délétion à la fin de l'exon 15, empiétant sur l'intron 15, et dont l'impact prédit *in silico* serait l'apparition d'un codon stop prématuré à la fin de l'exon 15 (**Figure 8**). Ces deux variations sont des variations privées et se situent dans le domaine pseudokinase de JAK1. Elles possèdent également toutes deux un score CADD[153] bien supérieur à la valeur seuil d'importance de mutation (Mutation significance cut-off MSC de 3,13) de *JAK1*[154]. Elles ont été confirmées par séquençage de Sanger. La mère de la patiente est hétérozygote pour la variation faux-sens, et son père pour la délétion, ce qui confirme que la patiente est bien hétérozygote composite. Son frère ne possède que l'allèle wild-type (WT) ou sauvage. Toutes ces données permettent de poser l'hypothèse que ces variations causeraient un défaut AR en JAK1.

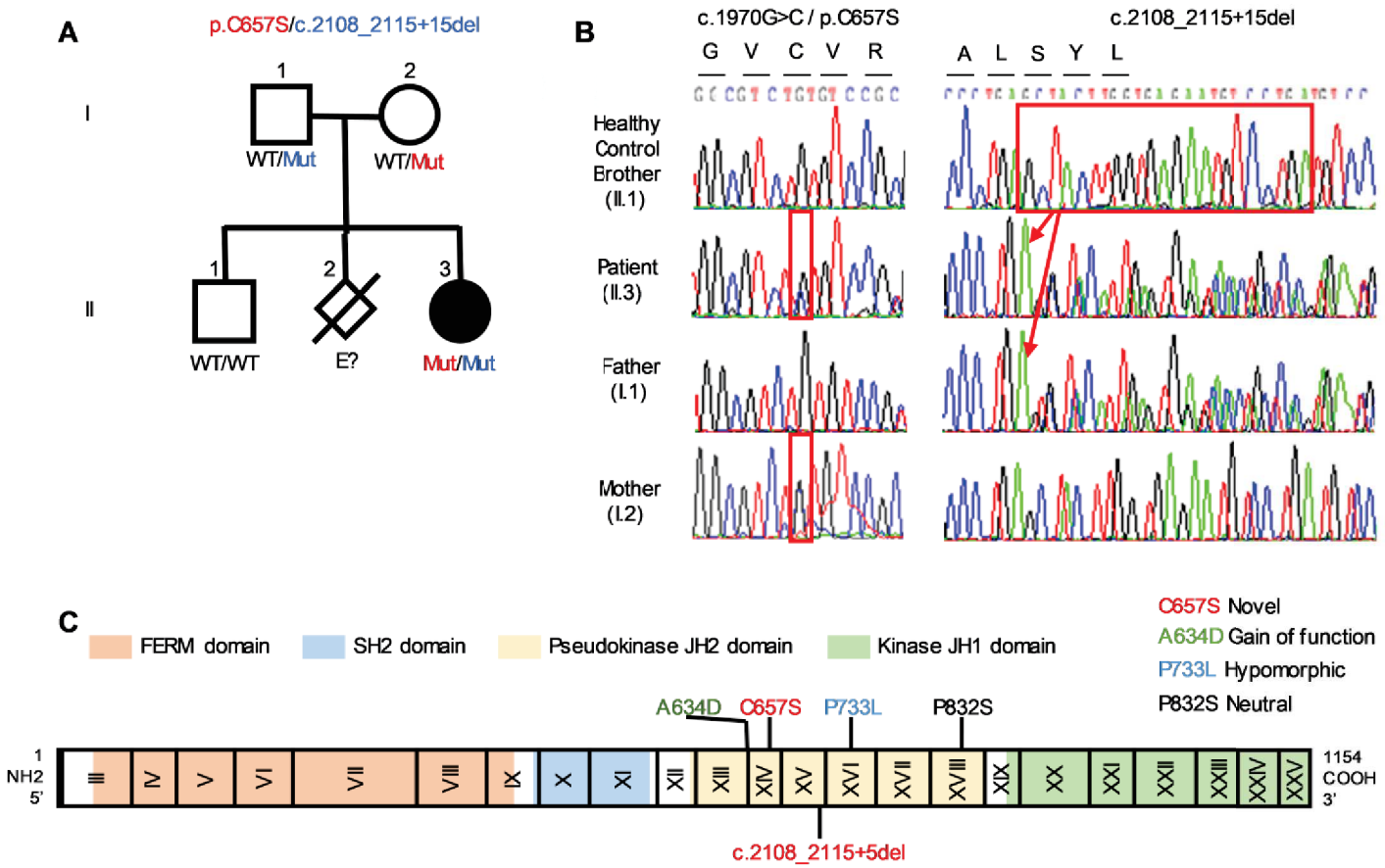


Figure 8 – Identification de variants hétérozygotes composites de *JAK1*

(A) Ségrégation familiale des variants p.C657S et c.2108_2115+15del. E? signifie non génotypé. Les individus sains sont représentés en blanc. Les formes pleines noires indiquent un patient souffrant d'infections mycobactériennes. Chaque génération est désignée par un chiffre romain (I-II) et chaque individu par un chiffre arabe. **(B)** Electrophérogramme montrant les variants p.C657S et c.208_2115+15del chez la patiente. (**C**) Schéma du gène JAK1 avec toutes les mutations germinales décrites ainsi que les deux variants décrits ici (en rouge). Les exons codants sont numérotés avec des chiffres romains et délimités par des barres verticales. Les régions correspondant aux domaine FERM, SH2, pseudokinase et kinase sont indiquées. Les variants en rouge sont à caractériser. La mutation en vert est GOF. La mutation en bleu est hypomorphe. La mutation en noir est neutre.

C. Caractérisation des allèles et comparaison avec les allèles existants

a. Conséquences des mutations sur l'ARNm et la protéine

La délétion c.2108_2115+15del se situe sur la partie terminale de l'exon 15 et est à cheval sur la partie flanquante proximale de l'intron 15 : cette variation pourrait donc produire un transcrit aberrant. Pour vérifier son impact, une fraction du gène de *JAK1* (couvrant les exons 12 à 21) a été amplifiée par réaction en chaine par polymérase (PCR de l'anglais Polymerase Chain Reaction) sur de l'ADNc issu de la lignée B-EBV (**Figure 9**), de fibroblastes et de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC de l'anglais Peripheral Blood Mononuclear Cells) de la patiente (non montré). La PCR a également été réalisée sur les cellules de contrôles sains, ainsi que sur celle du premier patient publié porteur d'un défaut AR en JAK1[16], à titre de comparaison. Les cellules de la patiente produisent un transcrit de poids moléculaire (MW de l'anglais Molecular Weight) attendu, mais également plusieurs transcrits de MW inférieur, et qui ne sont pas présents dans les cellules des contrôles sains, ni dans celles du patient publié[16] (**Figure 9**). Cela suggère l'apparition d'un épissage alternatif.

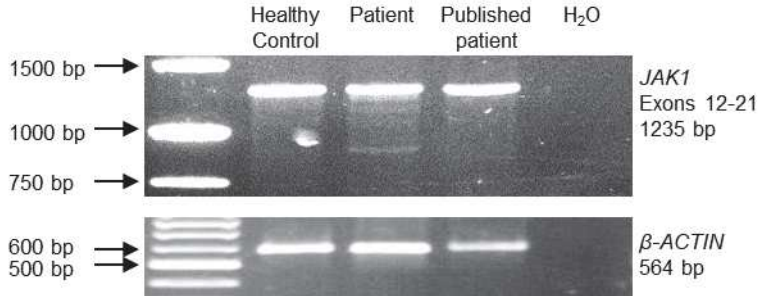


Figure 9 – PCR d'un fragment de *JAK1* couvrant les exons 12 à 21 sur l'ADNc de B-EBV de la patiente et du patient publié comparé à un contrôle sain (healthy control).
Un fragment de β-actin a été amplié pour servir de gène de ménage.

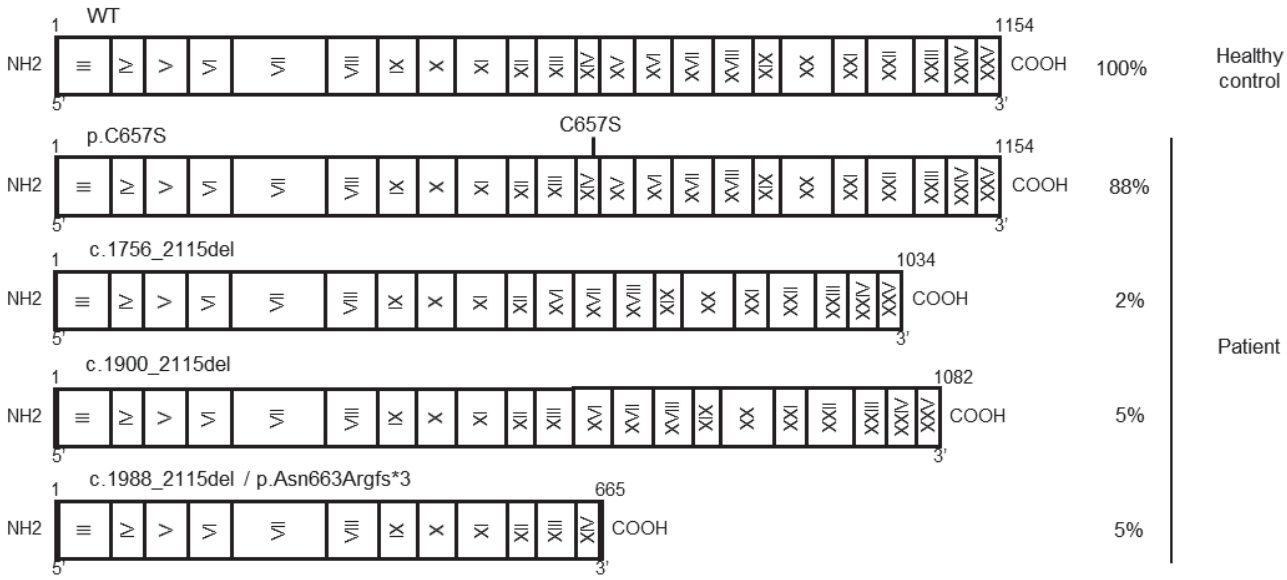
Pour confirmer ces résultats, un clonage TOPO-TA a été réalisé sur PBMC, B-EBV et fibroblastes SV-40, qui montre que le variant faux-sens p.C657S est exprimé de manière prédominante :

- 88% des transcrits dans les PBMC
- 94% dans les fibroblastes SV-40
- 86% dans les B-EBV.

La délétion c.2108_2115del cause, elle, l'apparition de trois variants d'épissage alternatif en proportions moindres : deux délétions ne décalant pas le cadre de lecture et n'introduisant pas de codon-stop prématuré (c.1756_2115del qui cause la suppression des

exons 13 à 15, et c.1900_2115del qui cause celle des exons 14 et 15) et une délétion décalant le cadre de lecture et causant l'apparition d'un codon-stop prématuré à la fin de l'exon 14 (c.1988_2115del). La répartition de ces transcrits dans les différentes lignées est donnée dans la

Figure 10.



	B-EBV		Fibroblastes SV-40		PBMC	
	Contrôle N=50	Patiente N=50	Contrôle N=50	Patiente N=50	Contrôle N=50	Patiente N=50
WT	100% N=50	-	100% N=50	-	100% N=50	-
C657S G>S	-	86% N=43	-	94% N=47	-	88% N=44
c.1756_2115del	-	-	-	-	-	2% N=1
c.1900_2115del	-	-	-	2% N=1	-	5% N=2
c.1988_2115del / p.Asn663Argfs	-	14% N=7	-	4% N=2	-	5% N=3

Figure 10 – Schéma représentant les transcrits retrouvés chez la patiente, comparés à un contrôle sain dans les cellules primaires (PBMC) et leur distribution dans les différentes lignées testées (B-EBV et fibroblastes SV-40) et les cellules primaires (PBMC)

Le niveau d'expression des transcrits de *JAK1* a été mesuré par PCR quantitative (qPCR) dans la lignée B-EBV, les fibroblastes SV-40 et les fibroblastes primaires de la patiente, et a été comparé à ceux de contrôles sains et du premier patient publié souffrant d'un défaut AR partiel en JAK1[16]. Dans toutes les lignées cellulaires, le niveau d'expression des transcrits de *JAK1* de la patiente était dans la gamme de celui des contrôles sains, tout comme celui du patient publié (**Figure 11**). De plus, les Western Blots (WB) réalisés pour estimer l'expression de la protéine JAK1 dans toutes ces lignées ne montrent qu'une seule bande à 130kDa, d'intensité comparable aux contrôles sains pour les deux patients (**Figure 11**). Globalement, ces résultats montrent que les cellules de la patiente ne présentent pas de défaut d'expression d'ARNm ni de protéine de JAK1.

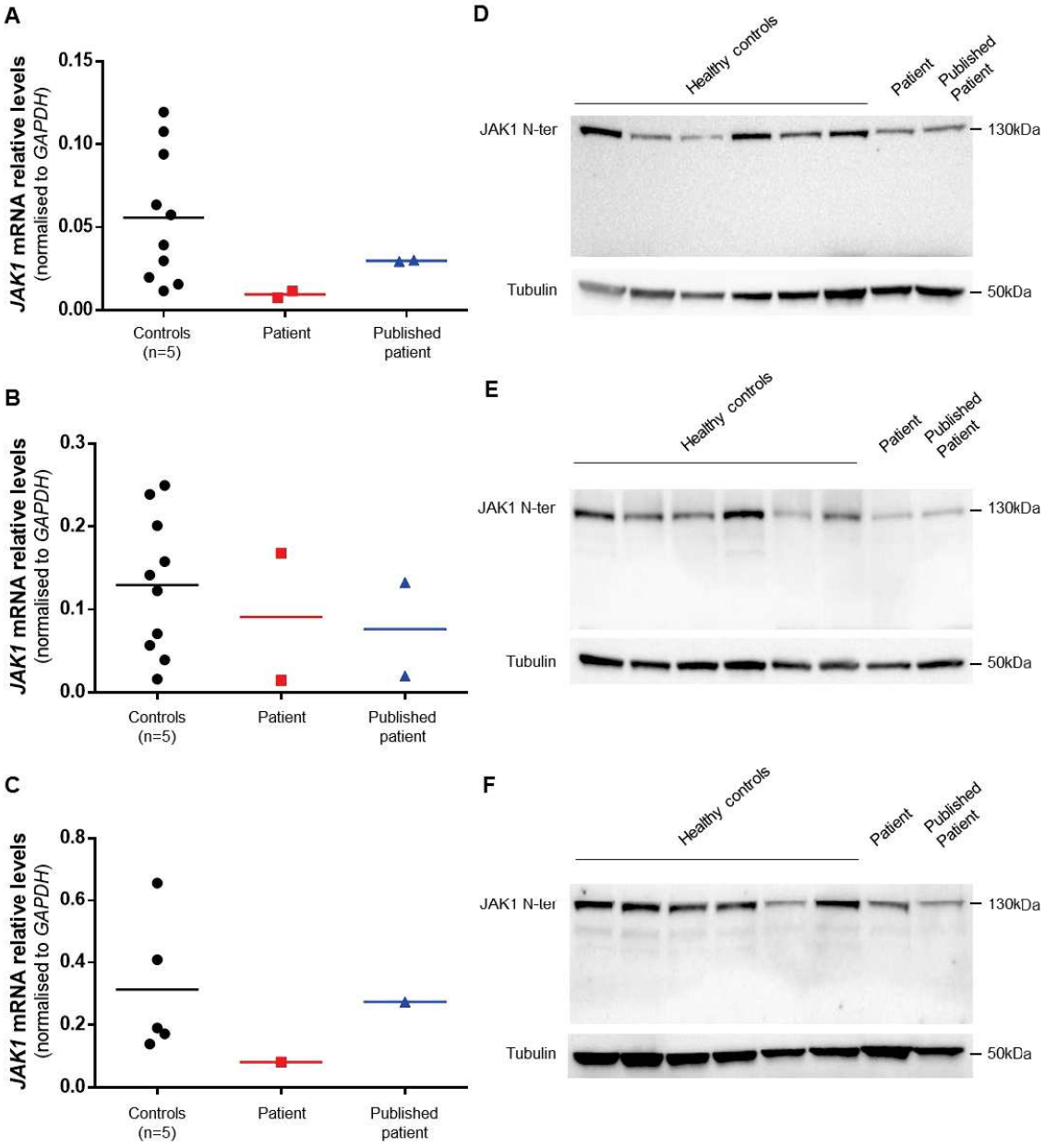


Figure 11 – Niveaux d'expression de JAK1 dans les cellules de la patiente

(**A-C**) qPCR de l'ADNc de *JAK1* de B-EBV (**A**), de fibroblastes SV-40 (**B**) et de fibroblastes primaires (**C**) de la patiente et du patient publié comparés aux contrôles sains. Les données montrent les résultats de 2 expériences différentes. Les résultats ont été normalisés au gène GAPDH. (**D-F**) Les protéines ont été extraites de B-EBV (**D**), de fibroblastes SV-40 (**E**) et de fibroblastes primaires (**F**) de contrôles sains, de la patiente et du patient publié et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-JAK1 N-ter et anti-Tubuline (en contrôle de charge).

b. Les mutations d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées dans un modèle de transfection transitoire

L'hypothèse à tester est que tous les allèles de la patiente (faux-sens ou délétions), créant des modifications dans le domaine pseudokinase, sont délétères (hypomorphes ou LOF). Pour déterminer si c'est bien le cas, les allèles ont d'abord été étudiés *in vitro* dans un système de surexpression: les différents allèles *JAK1* mutés (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del), l'allèle *JAK1* WT ou un vecteur vide (EV de l'anglais Empty Vector) ont été transfectés de manière transitoire dans des cellules de fibrosarcome U4C (des cellules déficientes en JAK1 ou JAK1$^{-/-}$)[155,156] (**Figure 12**) ou dans des cellules embryonnaires humaines du rein 293T (HEK-293T de l'anglais human embryonic kidney 293T) (non montré). L'allèle *JAK1* p.P733L/P832S, qui est le premier allèle *JAK1* germinal hypomorphe à avoir été décrit chez un patient[16], et l'allèle *JAK1* p.K908E, une mutation "kinase-negative"[115], ont été inclus à titre de comparaison. Par détection par WB et dans les deux lignées cellulaires, le plasmide JAK1 WT produit une protéine unique de 130kDa et le vecteur vide n'en produit pas, comme il était attendu (**Figure 12**). L'allèle faux-sens p.C657S conduit à la production d'une protéine unique de 130kDA, en quantité similaire à l'allèle WT, tout comme les autres allèles faux-sens p.P733L/P832S et p.K908E. Les délétions ne décalant pas le cadre de lecture, c.1756_2115del et c.1900_2115del, produisent des protéines de poids moléculaire réduit par rapport au WT, aux tailles attendues d'environ 115kDA et 120kDA respectivement, mais en quantité comparable au WT. La délétion décalant le cadre de lecture, c.1988_2115del, entraîne la production d'une protéine tronquée à la taille attendue d'environ 75kDa, et en quantité très faible par rapport au WT (**Figure 12**). Ainsi, tous les allèles permettent la production d'une protéine JAK1, bien que les variants d'épissage en produisent une forme tronquée.

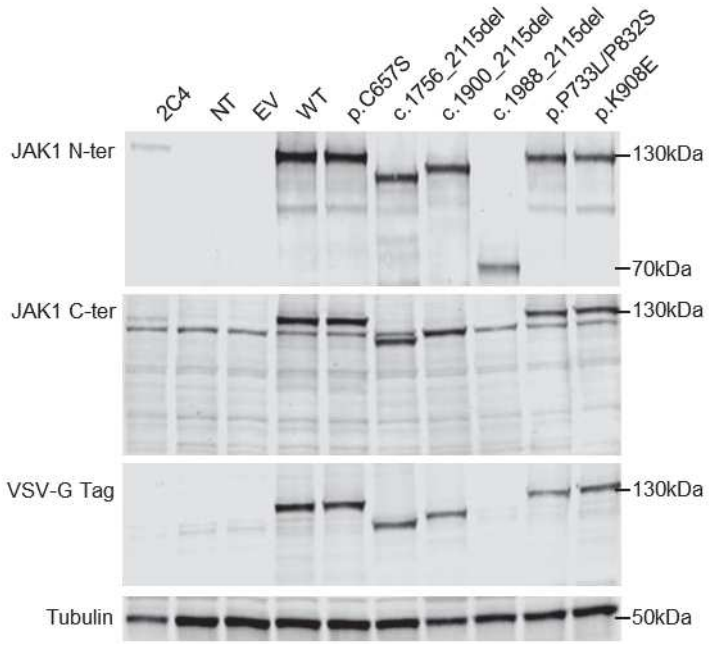


Figure 12 – Les mutants d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées

Les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-JAK1 N-ter, anti-JAK1 C-ter et anti-VSVtag avec la tubuline en contrôle de charge.

c. Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite aux IFN dans un système de transfection transitoire

Un système de surexpression a ensuite été utilisé pour déterminer les conséquences des différents allèles mutés sur la fonction de la protéine, et tout d'abord au niveau de l'autophosphorylation de JAK1. Comme attendu, la transfection du plasmide WT dans les cellules U4C tout comme dans les HEK-T conduit à l'autophosphorylation de JAK1, tandis que celle-ci est abolie pour l'allèle kinase-negative et pour l'allèle du patient publié. Le mutant faux-sens p.C657S cause quant à lui une réduction de la phosphorylation comparée à l'allèle WT, tandis que les trois délétions ne produisent aucune phosphorylation au niveau basal (**Figure 13**).

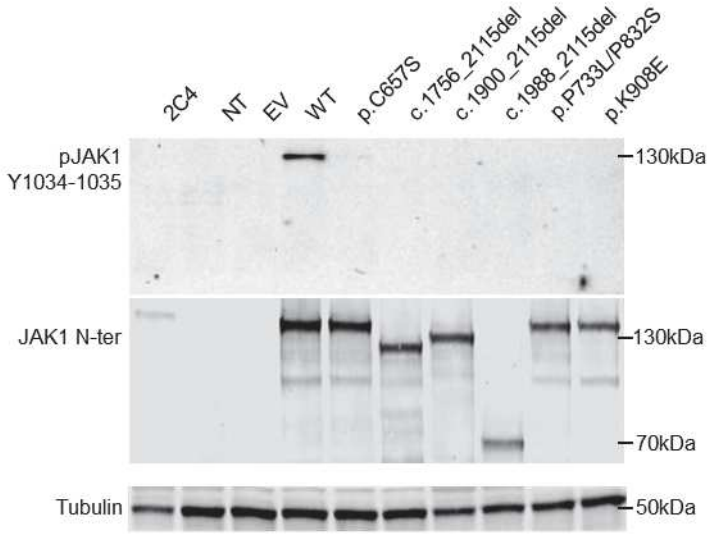


Figure 13 – Les mutants induisent un défaut d'autophosphorylation de JAK1
Les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-JAK1 et anti-JAK1 N-ter avec la tubuline en contrôle de charge.

L'impact des mutations sur la réponse aux IFN a ensuite été étudié dans des U4C transfectées de façon transitoire. La stimulation par l'IFN-γ induit la phosphorylation de JAK1 et STAT1 pour l'allèle WT, mais n'est pas détectable pas pour le mutant kinase-négatif. La phosphorylation de JAK1 est faiblement détectable pour le mutant p.C657S, et elle est complètement absente pour le mutant P733L/P832S (**Figure 14**). Toutefois, la phosphorylation de STAT1 est détectable pour ces deux mutants, bien que réduite par rapport à l'allèle WT. Aucune des délétions ne présente de phosphorylation de STAT1 après stimulation par l'IFN-γ, bien que les deux délétions conservant le cadre de lecture produisent une très faible induction de la phosphorylation de JAK1 (**Figure 14**). Ces résultats suggèrent que tous les allèles ont une réponse à l'IFN-γ défectueuse en termes de phosphorylation de STAT1.

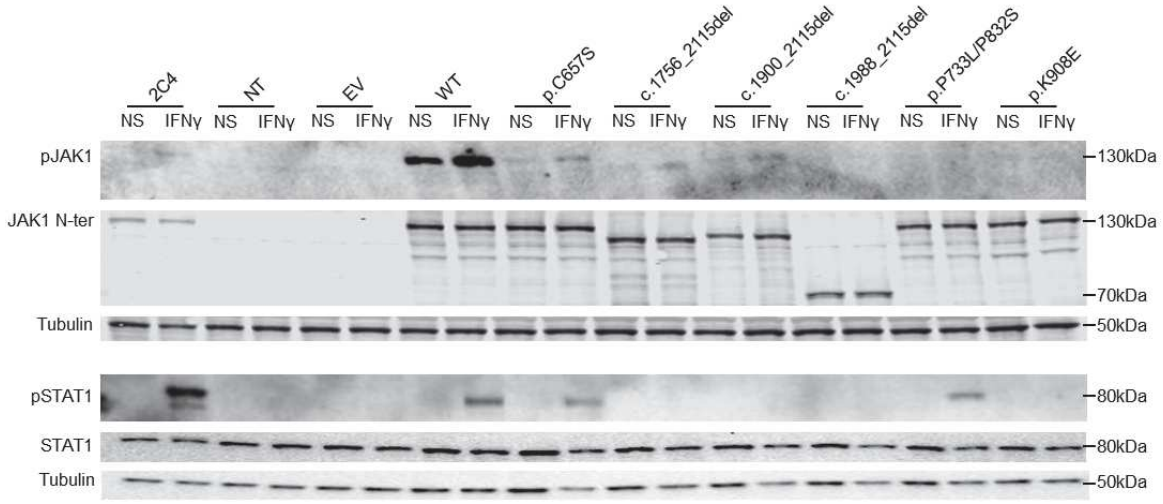


Figure 14 – Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite à l'IFN-γ

Les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 15 minutes avec 10^3 UI/mL d'IFN-γ. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-JAK1, anti-JAK1 N-ter, anti-p-STAT1 et anti-STAT1 avec la tubuline en contrôle de charge.

Après stimulation par de l'IFN-α, l'allèle WT produit une phosphorylation de JAK1 et STAT1, contrairement à l'allèle kinase-négatif. L'allèle p.P733L/P832S montre un niveau de phosphorylation diminué pour les deux protéines (JAK1 et STAT1), comparé à l'allèle WT, tandis l'allèle p.C657S a des niveaux comparables à ceux du vecteur WT (**Figure 15**). Les allèles c.1756_2115del et c.1900_2115del induisent également la phosphorylation de JAK1 et STAT1 après stimulation par de l'IFN-α, bien que la réponse soit fortement diminuée, tandis que la réponse à l'IFN-α est abolie pour l'allèle c.1988_2115del (**Figure 15**). Ainsi, en système de surexpression transitoire, tous les allèles de la patiente présentent une réponse diminuée à l'IFN-γ, (l'allèle faux-sens étant hypomorphe et les délétions LOF), tandis que leur réponse à l'IFN-α est impactée de façon moins sévère (l'allèle faux-sens étant neutre, les délétions dans le cadre de lecture hypomorphes et la délétion décalant le cadre de lecture LOF).

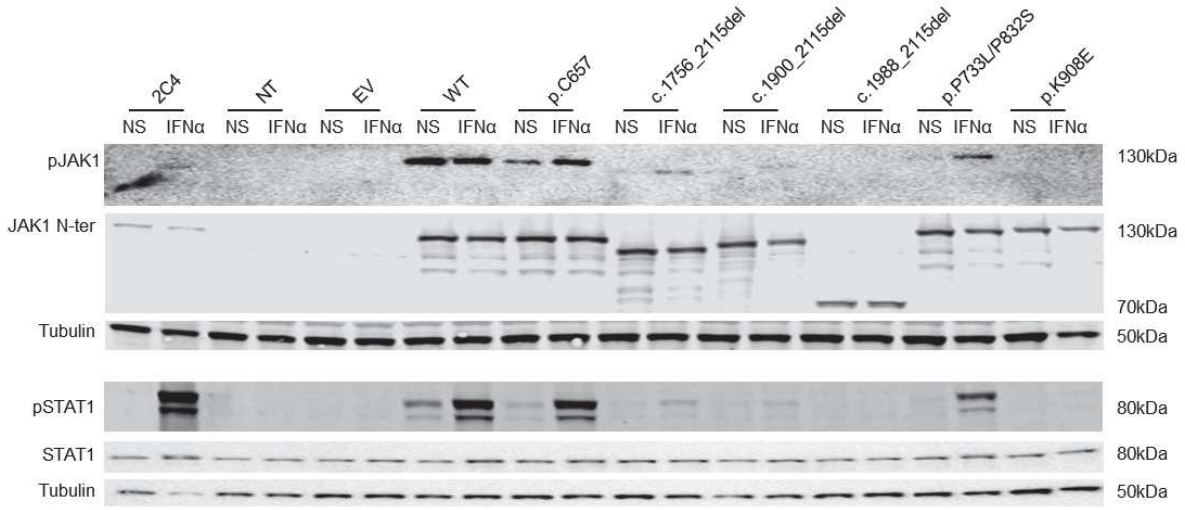


Figure 15 – Les allèles *JAK1* mutés d'épissage ont une réponse réduite à l'IFN-α

Les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 15 minutes avec 10^3 UI/mL d'IFN-α. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-JAK1, anti-JAK1 N-ter, anti-p-STAT1 et anti-STAT1 avec la tubuline en contrôle de charge.

d. Les allèles *JAK1* mutés ont un impact sur la réponse aux IFN plus sévère dans un système de rétrotransduction

Afin de s'assurer que les résultats précédemment observés n'étaient pas des artéfacts dus à la surexpression ou à la transfection transitoire, les mêmes expériences ont été réalisées sur des cellules U4C stablement rétro transduites avec les différents allèles (**Figure 16**). Cette expérience fournit des résultats similaires à ceux observés précédemment (**Figure 16**):

- aucune protéine JAK1 n'est détectée pour l'EV
- l'allèle WT code pour une protéine unique de 130kDa,
- les mutants p.C657S et p.P733L/P832S codent également pour une protéine unique de 130kDa
- les délétions dans le cadre de lecture c.1756_2115del et c.1900_2115del produisent des protéines à des niveaux comparables au WT, mais de MW réduits
- la taille de ces protéines correspondent aux prévisions, soit approximativement 115kDa et 120kDa

Cependant, aucune protéine n'a pu être détectée pour la délétion décalant le cadre de lecture c.1988_2115del (**Figure 16**). Ces résultats suggèrent que le variant faux-sens conduit à la formation d'une protéine de même taille que la protéine WT, que les délétions dans le cadre de lecture conduisent à des molécules tronquées, et que la délétion décalant le cadre de lecture est perte d'expression.

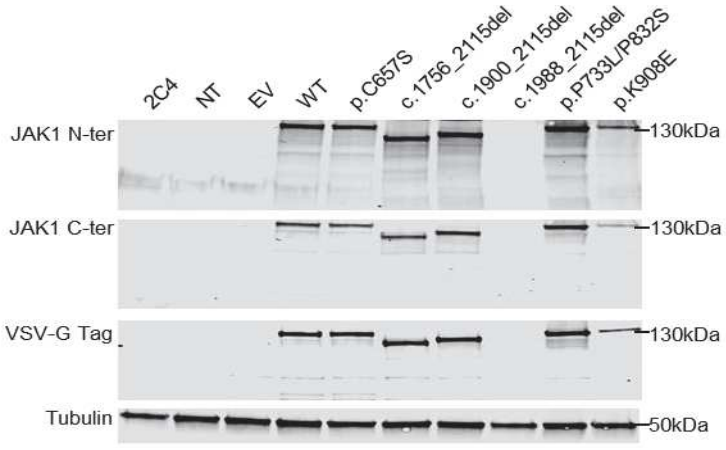


Figure 16 – Les mutants d'épissage expriment des protéines JAK1 tronquées en système de surexpression stable

Les cellules 2C4 ont été laissées telles quelles et les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-JAK1 N-ter, anti-JAK1 C-ter et anti-VSVtag avec la tubuline en contrôle de

charge.

L'autophosphorylation de JAK1 n'étant pas détectable dans ce modèle, seules les réponses aux IFN ont été étudiées dans les cellules U4C rétrotransduites. Après stimulation par l'IFN-γ, l'allèle WT induit la phosphorylation de JAK1 et STAT1, tandis que rien ne se passe pour l'EV (**Figure 17**). Le mutant p.K908E induit une très faible phosphorylation de STAT1. La phosphorylation de JAK1 est réduite pour l'allèle p.P733L/P832S, mais pas celle de STAT1 après activation par l'IFN-γ. Toutefois, les phosphorylations de JAK1 et de STAT1 induites par l'allèle p.C657S sont toutes deux réduites par rapport au WT. Aucune des délétions ne présentent de phosphorylation de JAK1 ou de STAT1 après stimulation par l'IFN-γ (**Figure 17**).

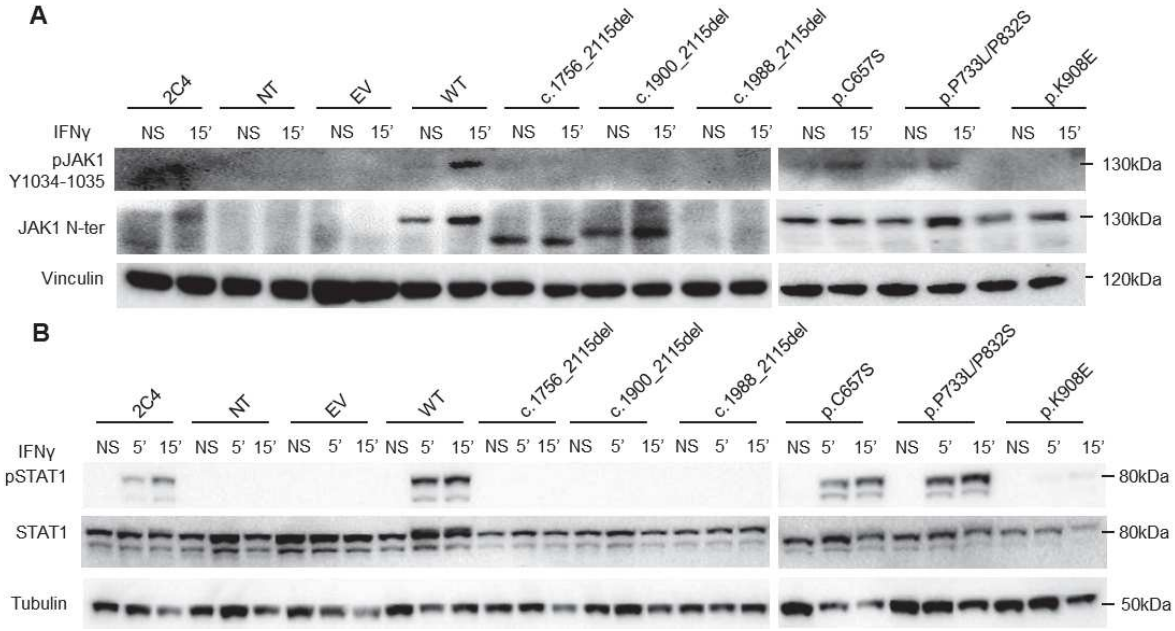


Figure 17 – Les allèles *JAK1* mutés ont une réponse réduite à l'IFN-γ en système de surexpression stable

(**A-B**) Les cellules 2C4 ont été laissées telles quelles et les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV (vecteur vide), ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 5 minutes et 15 minutes avec 10^3 UI/mL d'IFN-γ. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-JAK1 et anti-JAK1 N-ter (**A**), anti-p-STAT1 et anti-STAT1 (**B**) avec la tubuline en contrôle de charge.

Après stimulation par l'IFN-α, l'allèle WT induit également la phosphorylation de JAK1 et STAT1, à l'inverse de l'EV et du mutant kinase-négatif. (**Figure 18**). L'allèle p.P733L/P832S induit des phosphorylations de JAK1 et STAT1 diminuées par rapport au WT. L'allèle p.C657S quant à lui montrent des taux de phosphorylation de JAK1 et STAT1 similaires au WT après stimulation par l'IFN-α, alors qu'aucune des délétions ne montrent de réponse à la stimulation (**Figure 18**).

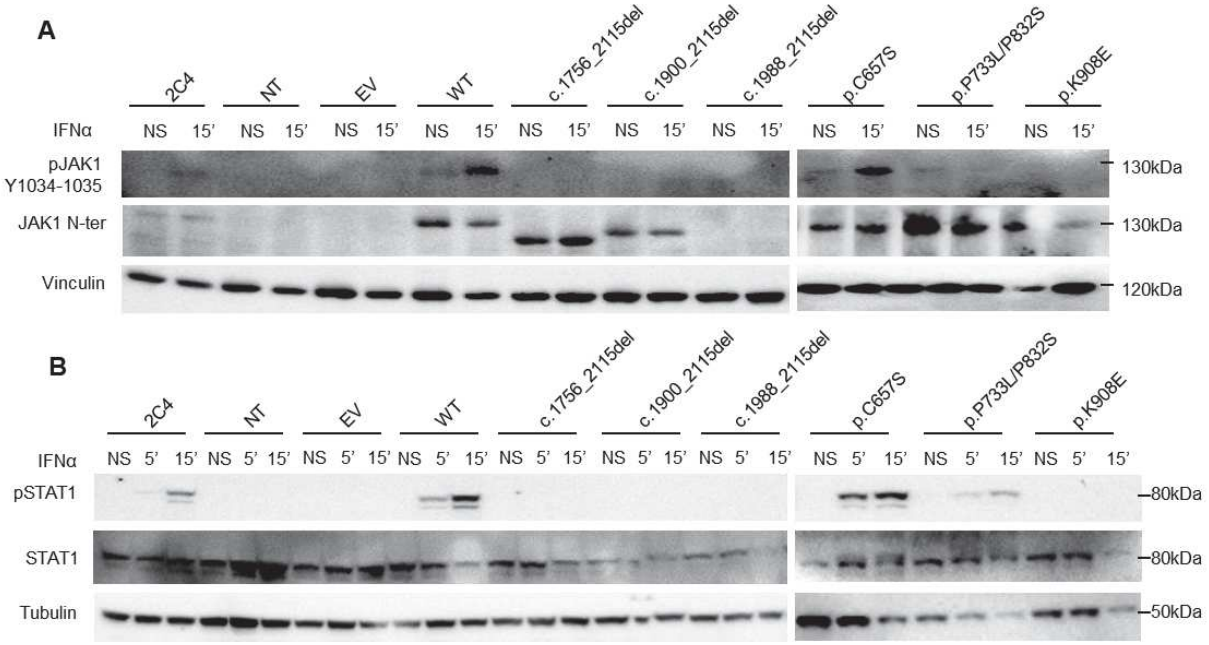


Figure 18 – Les allèles *JAK1* d'épissage mutés ont une réponse abolie à l'IFN-α en système de surexpression stable

(**A-B**) Les cellules 2C4 ont été laissées telles quelles et les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plasmides EV, ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 5 minutes et 15 minutes avec 10^3 UI/mL d'IFN-α. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-JAK1 et anti-JAK1 N-ter (**A**), anti-p-STAT1 et anti-STAT1 (**B**) avec la tubuline en contrôle de charge.

La réponse tardive aux IFN a également été évaluée dans les lignées U4C rétrotransduites, afin de tester les conséquences des allèles identifiés chez la patiente sur celle-ci. En effet, chez la souris *Jak1*$^{-/-}$, l'induction de CMH-I en réponse aux IFN dans les MEF a été publiée, montrant que ces cellules ont un défaut de réponse tardive aux IFN et prouvant ainsi que celle-ci est dépendante de JAK1. Afin de tester la réponse tardive dans les lignées U4C, l'induction d'HLA de classe I a été mesurée par marquage au FACS après stimulation par l'IFN-γ (**Figure 19A**) ou l'IFN-α (**Figure 19B**) pendant 72h. L'allèle WT induit une forte induction d'HLA de classe I après les deux stimulations, tandis que l'EV n'y répond pas. Le mutant kinase-négatif p.K908E montre une réponse à l'IFN-γ, mais pas à l'IFN-α. Les allèles p.C657S et p.P733L/P832S ont des réponses comparables au WT pour les deux stimulations, tandis qu'aucune des délétions n'y répond. L'induction d'HLA de classe II après stimulation par trois doses d'IFN-γ a également été testée (**Figure 19C**). Aucun des mutants n'a répondu à la dose la plus faible (10 UI/mL). Cependant, les allèles WT et faux-sens ont tous induits une forte induction d'HLA de classe II pour les deux autres doses (100 UI/mL et 1000UI/mL), tandis que l'EV et les délétions n'y ont pas été sensibles.

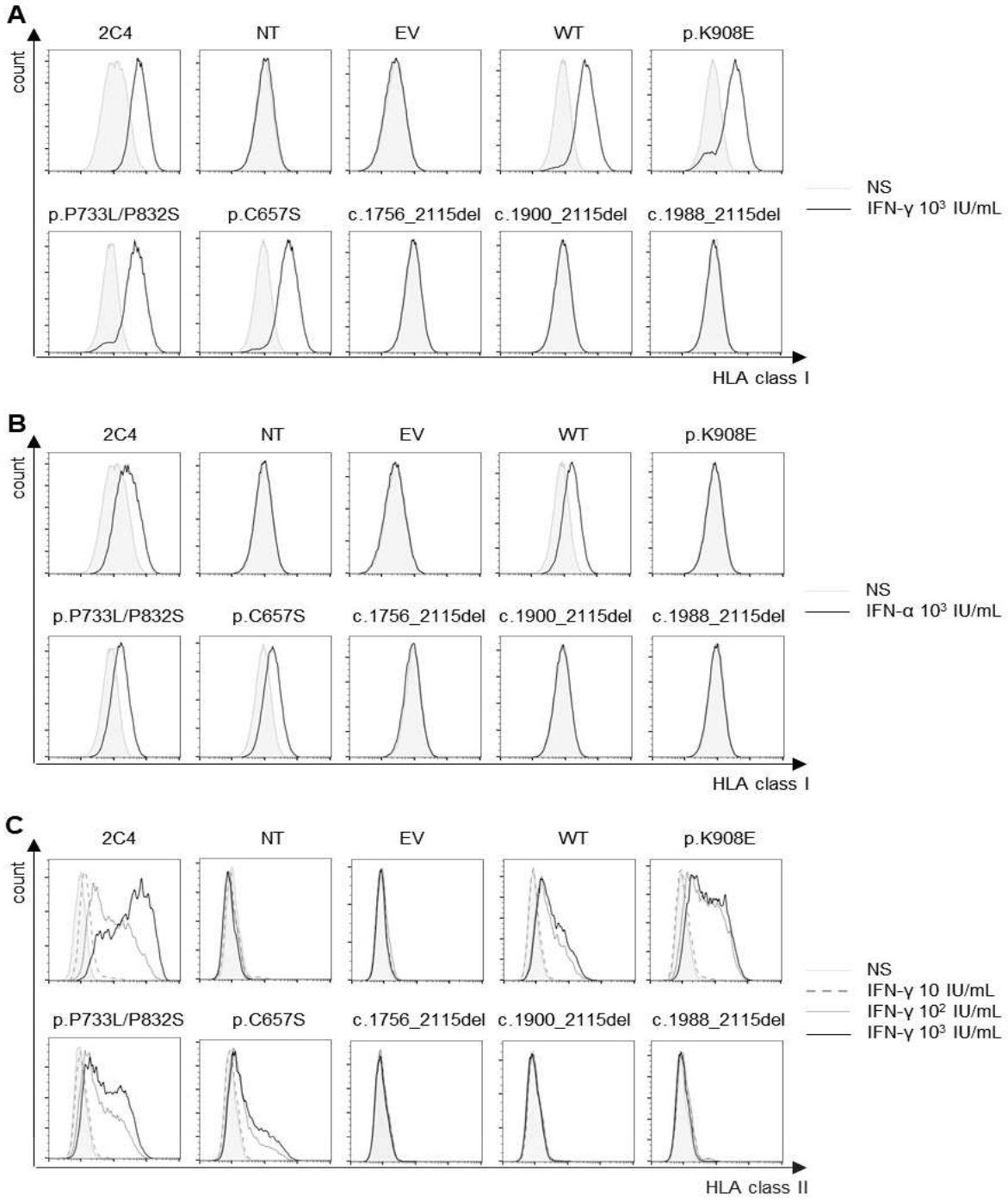


Figure 19 – Les mutants d'épissage ont une réponse tardive abolie aux IFN en système de surexpression stable

(**A-B**) Les cellules 2C4 ont été laissées telles quelles et les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plamides EV, ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 72h avec 10^3 UI/mL d'IFN-γ (**A**) ou 10^3 UI/mL d'IFN-α (**B**). Les niveaux d'HLA classe I ont été évalués par cytométrie en flux. Ligne gris clair: isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne noire continue: cellules stimulées. (**C**) Les cellules 2C4 ont été laissées telles quelles et les cellules U4C ont été transfectées transitoirement ou non (NT) avec des plamides EV, ou *JAK1* WT, ou *JAK1* muté par p.C657S, c1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del et p.K908E (contrôle LOF). Elles ont ensuite été stimulées 72h avec 10, 10^2 ou 10^3 UI/mL d'IFN-γ. Les niveaux d'HLA classe II ont été évalués par cytométrie en flux. Ligne gris clair: isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne gris intermédiaire à tirets: cellules stimulées avec 10 UI/mL d'IFN-γ, ligne gris foncé en pointillés: cellules stimulées avec 10^2 UI/mL d'IFN-γ, ligne noire continue: cellules stimulées avec 10^3 UI/mL d'IFN-γ.

Ainsi, tous les allèles de la patiente présentent une perturbation de la réponse rapide à l'IFN-γ, le mutant faux-sens étant hypomorphe et les délétions LOF, tandis que seules les délétions présentent un défaut de réponse rapide à l'IFN-α. De plus, toutes les délétions présentent une abolition de la réponse tardive aux deux IFN, tandis que celle du mutant faux-sens est normale. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que ces allèles de *JAK1* sont bien impliqués dans le phénotype de MSMD chez la patiente.

	Contrôle sain	**Patiente**				**Patient publié**
Allèle	WT	p.C657S	c.1756_2115del	c.1900_2115del	c.1988_2115del	p.P733L/P832S
Taux d'expression	+++	+++	+++*	+++*	-	+++
Réponse à l'IFN-γ :						
pJAK1	+++	+	-	-	-	+
pSTAT1	+++	++	-	-	-	+++
HLA de classe I	+++	+++	-	-	-	+++
HLA de classe II	+++	+++	-	-	-	+++
Réponse à l'IFN-α						
pJAK1	+++	+++	-	-	-	+
pSTAT1	+++	+++	-	-	-	+
HLA de classe I	+++	+++	-	-	-	+++

Tableau 10 – Récapitulatif de l'impact des différents allèles en système de surexpression

* : protéine tronquée, +++ : normal, ++ : diminution, + : forte diminution, +- : très forte diminution, - : non détection

D. Phénotype cellulaire de fibroblastes et lignée B-EBV

a. La réponse à l'IFN-γ est diminuée dans les lignées B-EBV de la patiente

Après avoir étudié l'impact des différents allèles sur la réponse aux IFN en système de surexpression, la dernière étape a été de tester leur impact dans les lignées cellulaires de la patiente. La réponse rapide à l'IFN-γ a été évaluée dans les B-EBV de deux contrôles sains, de la patiente, du patient AR JAK1 précédemment publié[16], d'un patient à défaut AR complet en STAT1[22] et d'un patient à défaut AR complet en IFN-γR1[7] (**Figure 20A**). La capacité de ces lignées B-EBV à phosphoryler STAT1 (p-STAT1) après stimulation par l'IFN-γ a été évaluée par WB. Chez les contrôles sains, la phosphorylation de STAT1 est induite après stimulation, tandis que les lignées de patients avec un défaut complet en STAT1 ou IFN-γR1 ne répondent pas à la stimulation. La réponse des cellules de la patiente à l'IFN-γ est fortement diminuée comparée à celle des contrôles sains. Les cellules du patient précédemment publié ont également une réponse diminuée à l'IFN-γ, bien que le défaut de réponse soit moins marqué que celui de la patiente. Les niveaux de STAT1 phosphorylée (p-STAT1) ont également été étudiés par cytométrie en flux (marquage intracellulaire). Les lignées B-EBV ont été marquées pour p-STAT1, après avoir été stimulées avec de l'IFN-γ (**Figure 20B**). Le contrôle sain montre une augmentation du niveau de p-STAT1 après stimulation, à l'inverse du contrôle négatif STAT1$^{-/-}$ qui ne répond pas à l'activation par l'IFN-γ (**Figure 20B**). De même, le contrôle IFNγR1$^{-/-}$ ne répond pas à la stimulation par l'IFN-γ (**Figure 20B**). Après stimulation, le patient publié montre une induction du niveau de p-STAT1 diminuée par rapport à celle du contrôle sain, et la réponse de la patiente est à peine détectable. Pour confirmer que ce défaut de réponse est bien dû aux mutations de *JAK1*, les lignées B-EBV d'un contrôle sain, d'un patient à défaut AR complet en STAT1, de la patiente et du patient publié ont été rétrotransduites soit avec un vecteur vide EV, soit avec un plasmide contenant un ADNc *JAK1*-WT, ou bien ont été laissées telles quelles (NT). La capacité de ces différentes cellules à phosphoryler STAT1 après stimulation par l'IFN-γ a ensuite été évaluée par cytométrie en flux (**Figure 20C**). Chez le contrôle sain, les cellules NT, EV ou WT ont toutes des niveaux de p-STAT1 similaires après activation par l'IFN-γ, tandis qu'elle n'est visible pour aucune des cellules STAT1$^{-/-}$. Pour les lignées de la patiente et celles du patient publié, la rétrotransduction avec l'EV n'a aucun effet sur la réponse à l'IFN-γ, tandis que la rétrotransduction avec l'allèle WT permet de restaurer la phosphorylation de STAT1 à des niveaux comparables à ceux du contrôle sain après stimulation par l'IFN-γ. Ainsi, il est possible de conclure que la diminution de la réponse à l'IFN-γ dans les

lignées B-EBV de la patiente est due à la production d'une protéine JAK1 qui n'est que partiellement fonctionnelle.

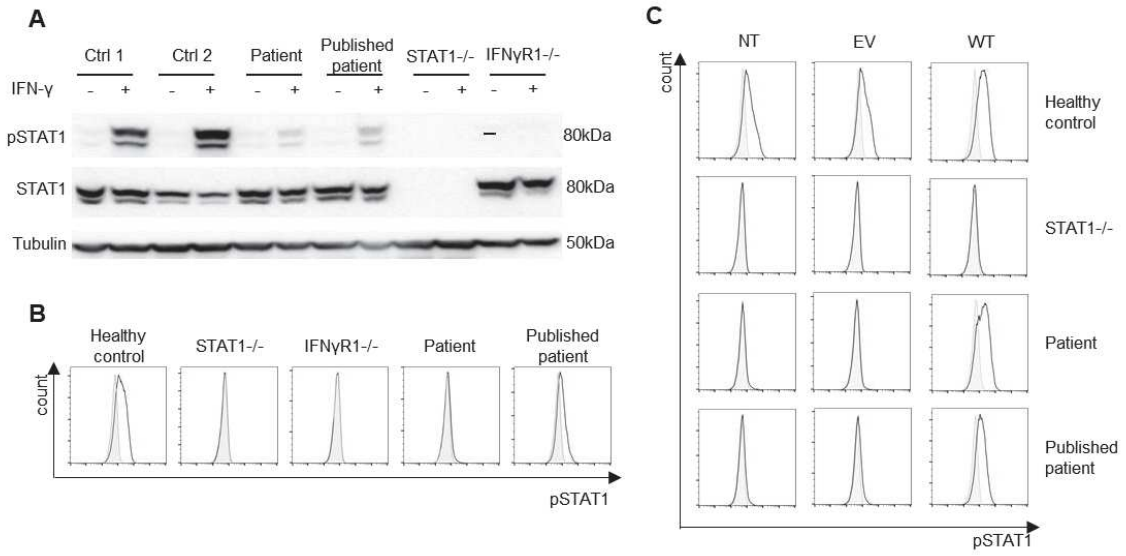


Figure 20 – La réponse à l'IFN-γ est diminuée dans les lignées B-EBV de la patiente
(**A**) Les B-EBV de contrôles sains, de la patiente du patient publié, d'un patient STAT1$^{-/-}$ et d'un patient IFN-γR1$^{-/-}$ ont été stimulés avec 10^5 UI/mL d'IFN-γ pendant 20 minutes. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-STAT1 et anti-STAT1 avec la tubuline en contrôle de charge. (**B**) Les niveaux de phosphorylation de STAT1 ont été mesurés par cytométrie en flux sur ces mêmes cellules stimulées ou non avec 10^5 UI/mL d'IFN-γ pendant 30 minutes. Ligne grise : isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne noire continue : cellules stimulées. (**C**) Les B-EBV d'un contrôle sain, de la patiente du patient publié et d'un patient STAT1$^{-/-}$ ont été rétrotransduits avec un plasmide *JAK1* WT et stimulés avec 10^5 UI/mL d'IFN-γ pendant 30 minutes. Les niveaux de phosphorylation de STAT1 ont été mesurés par cytométrie en flux. Ligne grise : isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne noire continue : cellules stimulées.

b. Les lignées B-EBV de la patiente répondent normalement à l'IFN-α

La réponse rapide à l'IFN-α a été évaluée dans les lignées B-EBV de deux contrôles sains, de la patiente, du patient publié[16], d'un patient avec un défaut AR complet en STAT1[22], d'un patient à défaut AR complet en STAT2[157], d'un patient à défaut AR complet en TYK2[15] et d'un patient à défaut AR complet en IFN-αR1[158] (**Figure 21A**). La capacité de ces cellules à phosphoryler STAT1 et STAT2 après stimulation par l'IFN-α a été déterminée par WB. Phospho-STAT2 a été détectée après stimulation dans les contrôles sains et le patient STAT1$^{-/-}$, tandis que les patients IFN-αR1$^{-/-}$, STAT2$^{-/-}$ et TYK2$^{-/-}$ n'ont pas montré de réponse. La patiente et le patient publié pour des mutations dans JAK1 montrent tous deux des niveaux de phosphorylation de STAT2 comparables aux contrôles sains. De même, la p-STAT1 a été détectée chez les contrôles sains et le patient STAT2$^{-/-}$, mais non chez les patients STAT1$^{-/-}$, IFN-αR1$^{-/-}$ et TYK2$^{-/-}$. La patiente montre un niveau de p- STAT1 comparable aux contrôles

sains après stimulation, toutefois, le patient publié a un niveau de phosphorylation légèrement diminué. La p-TYK2 est également normale chez la patiente et le patient publié (**Figure 21B**). Le niveau de p-STAT1 a également été vérifié par cytométrie de flux chez un contrôle sain, la patiente, le patient publié, un patient à défaut AR complet en STAT1 et un patient à défaut AR complet en IFNαR1. Les cellules ont été marquées pour p-STAT1 après stimulation par de l'IFN-α ou de l'IL-27 (**Figure 21C**). Le contrôle sain induit une augmentation du niveau en p-STAT1 après les deux stimulations, tandis que le contrôle négatif STAT1$^{-/-}$ ne montre aucune réponse (**Figure 21C**). Comme attendu, le contrôle IFNαR1$^{-/-}$ ne répond pas à l'IFN-α tout en continuant à répondre aux autres cytokines (**Figure 21C**). La patiente induit un niveau de phosphorylation de STAT1 comparable au contrôle sain après activation par l'IFN-α, tandis que la réponse du patient publié est très légèrement diminuée (**Figure 21C**). En revanche, la patiente a une réponse diminuée à l'IL-27, tandis que la réponse du patient publié est comparable à celle du contrôle sain. Ainsi, ces expériences différentes, soit WB ou cytométrie en flux, montrent que bien que les lignées B-EBV de la patiente présentent une réponse fortement diminuée à l'IFN-γ, leur réponse à l'IFN-α n'étant pas affectée.

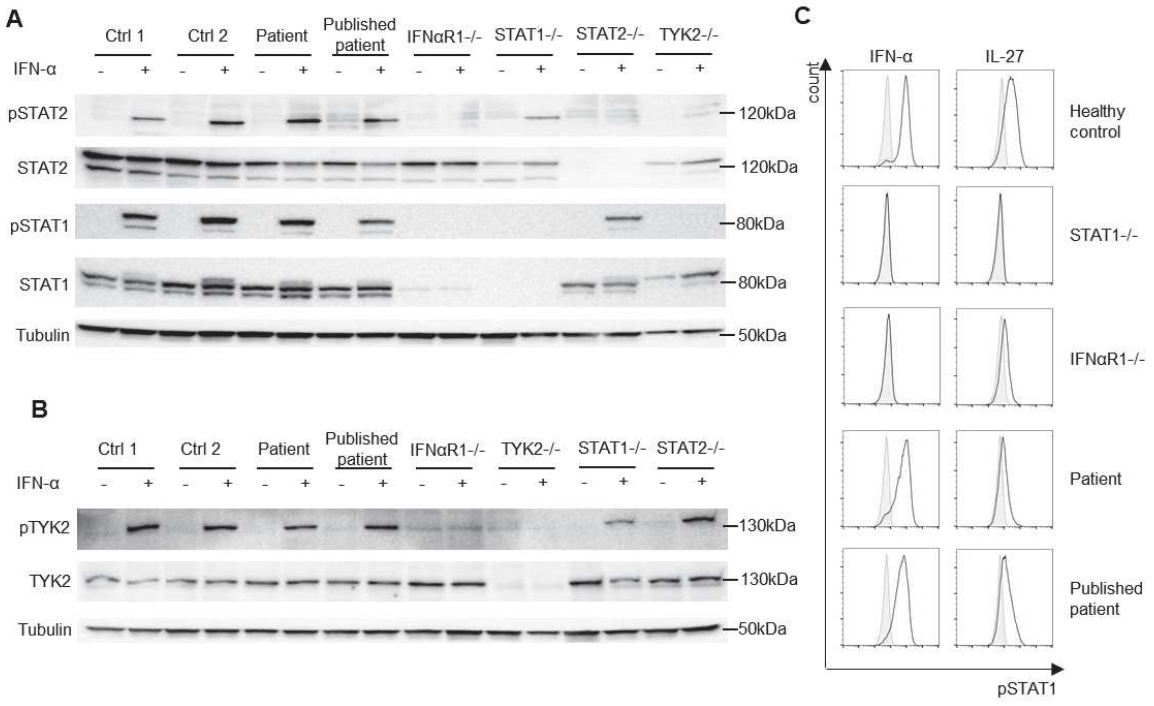


Figure 21 – Les lignées B-EBV de la patiente répondent normalement à l'IFN-α

(**A-B**) Les B-EBV de contrôles sains, de la patiente du patient publié, d'un patient IFNαR1$^{-/-}$, d'un patient STAT1$^{-/-}$, d'un patient STAT2$^{-/-}$ et d'un patient TYK2$^{-/-}$ ont été stimulés avec 10^5 UI/mL d'IFN-α pendant 20 minutes. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-STAT2, anti-STAT2, anti-p-STAT1 et anti-STAT1 (**A**) et avec des anticorps anti-p-TYK2 et anti-TYK2 (**B**) avec la tubuline en contrôle de charge. (**C**) Les niveaux de phosphorylation de STAT1 ont été mesurés par cytométrie en flux sur ces mêmes cellules stimulées ou non avec 10^5 UI/mL d'IFN-α et 100ng/mL d'IL-27 pendant 30 minutes. Ligne grise : isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne noire continue : cellules stimulées

Sujet	Contrôle sain	Patiente	Patient publié
Expression	+++	+++	+++
Réponse à l'IFN-γ :			
pSTAT1	+++	+-	+
Réponse à l'IFN-α			
pSTAT1	+++	+++	++
pSTAT2	+++	+++	+++
pTYK2	+++	+++	+++

Tableau 11 – Récapitulatif du phénotype cellulaire des B-EBV des patients
+++ : normal, ++ : diminution, + : forte diminution, +- : très forte diminution, - : non détection

c. La réponse aux IFN des fibroblastes de la patiente est similaire à celle des contrôles sains

Dans le but d'étudier l'impact de la réponse aux IFN dans les différentes lignées de la patiente, nous avons étudié les fibroblastes SV-40 et primaires. Ainsi, la réponse rapide à l'IFN-γ a également été étudiée dans les fibroblastes SV-40 et fibroblastes primaires de deux contrôles sains, de la patiente, du patient publié[16], d'un patient avec un défaut complet AR en STAT1[22] et d'un patient avec un défaut complet AR en IFN-γR1[7]. La capacité de ces cellules à phosphoryler STAT1 après stimulation par l'IFN-γ a été évaluée par WB (**Figure 22A-B**). Les fibroblastes des contrôles sains induisent une phosphorylation de STAT1 après stimulation, tout comme ceux du patient publié, tandis que les contrôles négatifs $STAT1^{-/-}$ et $IFN\gamma R1^{-/-}$ ne présentent pas de réponse. La patiente présente une réponse à la stimulation par l'IFN-γ qui est comparable à celles des contrôles sains dans les deux lignées. La réponse tardive à l'IFN-γ a également été contrôlée dans les fibroblastes SV-40 de deux contrôles sains, de la patiente, du patient publié[16] et d'un patient $STAT1^{-/-}$[22]. L'induction d'HLA-DR ou HLA-II après stimulation par diverses doses d'IFN-γ pendant 48h a été mesurée par marquage intracellulaire en cytométrie en flux (**Figure 22C**). Les contrôles sains induisent une production d'HLA-DR proportionnelle à toutes les doses, tandis que le contrôle $STAT1^{-/-}$ ne montre aucune réponse. La patiente induit également la production d'HLA-DR pour toutes les doses d'IFN-γ, et ce de manière comparable aux contrôles sains, tout comme le patient publié. Ainsi, toutes ces expériences démontrent que les fibroblastes de la patiente ne présentent pas de défaut en réponse à l'IFN-γ.

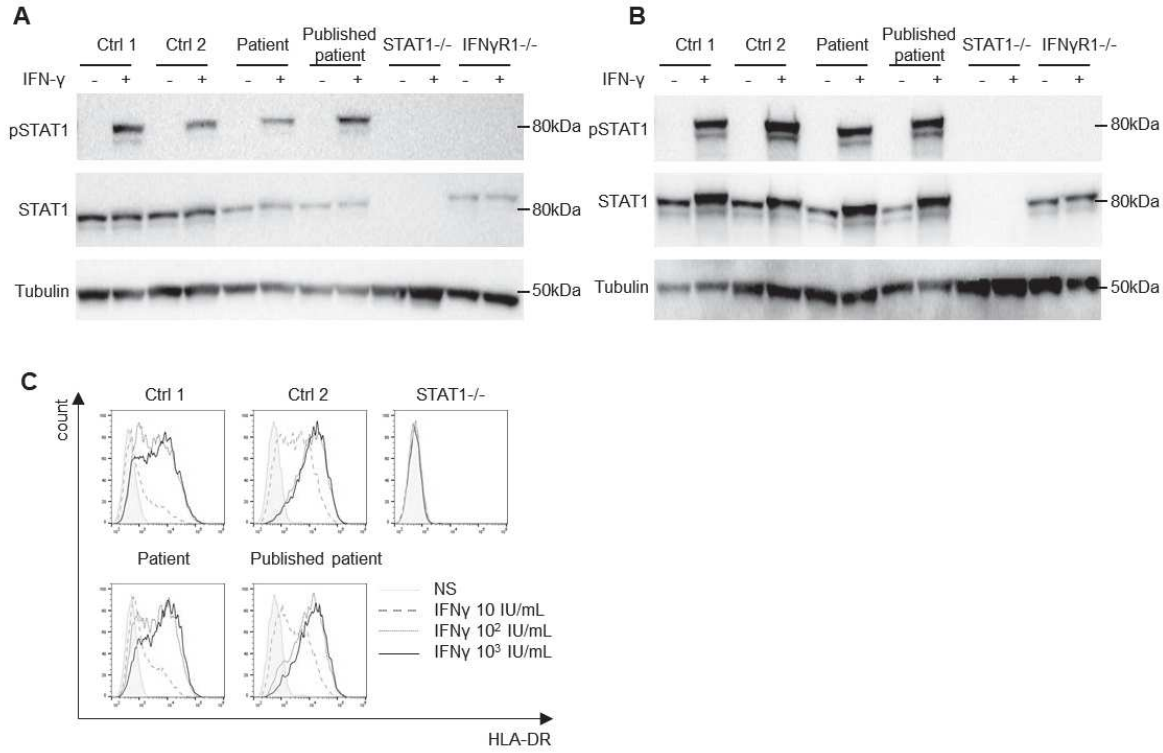


Figure 22 – Les fibroblastes de la patiente ont une réponse normale à l'IFN-γ

(**A-B**) Les fibroblastes SV-40 (**A**) et les fibroblastes primaires (**B**) de contrôles sains, de la patiente, du patient publié, d'un patient STAT1-/- et d'un patient IFN-γR1-/- ont été stimulés avec 10^5 UI/mL d'IFN-γ pendant 20 minutes. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps anti-p-STAT1 et anti-STAT1 avec la tubuline en contrôle de charge. (**C**) Ces même cellules ont été stimulées 72h avec 10, 10^2 ou 10^3 UI/mL d'IFN-γ. Les niveaux d'HLA de classe II ont été évalués par cytométrie en flux. Ligne gris clair: isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne gris intermédiaire à tirets: cellules stimulées avec 10 UI/mL d'IFN-γ, ligne gris foncé en pointillés: cellules stimulées avec 10^2 UI/mL d'IFN-γ, ligne noire continue: cellules stimulées avec 10^3 UI/mL d'IFN-γ.

La réponse rapide à l'IFN-α a également été étudiée dans les fibroblastes SV-40 et fibroblastes primaires de deux contrôles sains, de la patiente, du patient publié[16], d'un patient avec un défaut complet AR IFN-αR1[158], d'un patient avec un défaut complet AR STAT1[22] et d'un patient avec un défaut complet AR STAT2[157]. La capacité de ces cellules à phosphoryler STAT1 et STAT2 après stimulation par l'IFN-α a été évaluée par WB (**Figure 23A-B**). Dans les fibroblastes SV-40, les contrôles sains induisent la phosphorylation de STAT2 après stimulation, tandis que les patients présentant un défaut complet en $STAT1^{-/-}$, $STAT2^{-/-}$ ou IFN-$\alpha R1^{-/-}$ ne répondent pas à la stimulation. La patiente et le patient publié présentent tous deux une p-STAT2 comparable à celles des contrôles sains après stimulation (**Figure 23A-B**). De plus, dans les deux lignées cellulaires, les contrôles sains (et le contrôle $STAT2^{-/-}$ dans les fibroblastes SV-40) induisent p-STAT1 après stimulation par l'IFN-α, tandis que le patient publié présente une réponse diminuée et les contrôles $STAT1^{-/-}$ et IFN-$\alpha R1^{-/-}$ n'en présentent

aucune. La patiente, quant à elle, induit p- STAT1 de façon similaire à celle des contrôles sains après stimulation (**Figure 23A-B**). Ainsi, dans les deux lignées cellulaires, la patiente présente une réponse rapide à l'IFN-α normale. La réponse tardive à l'IFN-α a également été étudiée dans les fibroblastes SV-40 d'un contrôle sain, de la patiente, du patient publié[16], d'un patient IFN-αR1$^{-/-}$[158], d'un patient STAT1$^{-/-}$[22] et d'un patient STAT2$^{-/-}$[157] (tous les trois avec un défaut complet AR). L'induction d'HLA de classe I après stimulation par différentes doses d'IFN-α ou par du TNF-α pendant 72h a été déterminée par marquage intracellulaire par cytométrie en flux (**Figure 23C**). Tous les individus répondent au TNF-α. Le contrôle sain induit également une production d'HLA de classe I proportionnelle à toutes les doses d'IFN-α tandis que le patient IFNαR1$^{-/-}$ ne montre aucune réponse et que les patients STAT1$^{-/-}$ et STAT2$^{-/-}$ présentent des réponses diminuées. La patiente, tout comme le patient publié, présente une induction d'HLA de classe I comparable à celle du contrôle sain pour toutes les doses d'IFN-α. Ainsi, ces expériences montrent que les fibroblastes de la patiente ne présentent pas de défaut en réponse à l'IFN-α non plus.

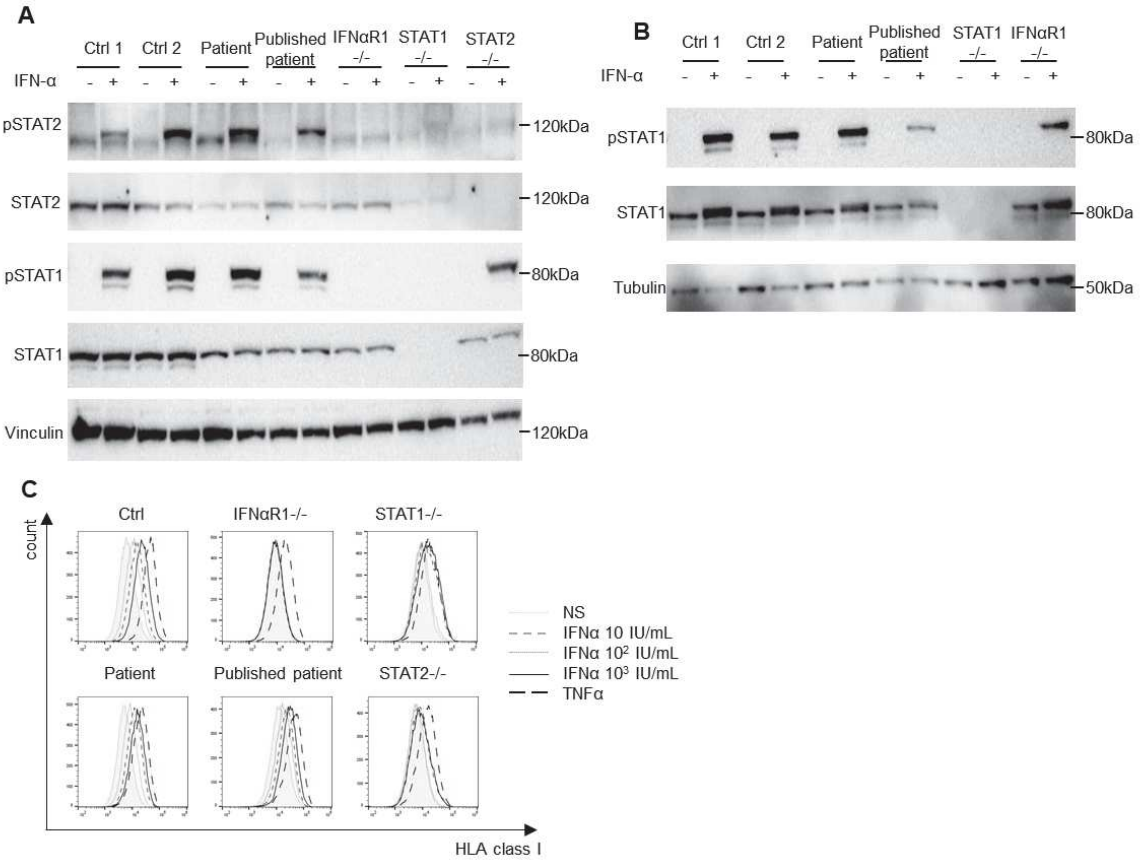


Figure 23 – Les fibroblastes de la patiente ont une réponse normale à l'IFN-α

(**A-B**) Les fibroblastes SV-40 (**A**) et les fibroblastes primaires (**B**) de contrôles sains, de la patiente, du patient publié, d'un patient IFN-αR1$^{-/-}$, d'un patient STAT1$^{-/-}$ et d'un patient STAT2$^{-/-}$ ont été stimulés avec 10^5 UI/mL d'IFN-α pendant 20 minutes. Une lyse totale des extraits cellulaires a été effectuée et des WB ont été réalisés avec des anticorps aanti-p-STAT2, anti-STAT2 (**A**), anti-p-STAT1 et anti-STAT1 (**A-B)** avec la tubuline en contrôle de charge. (**C**) Ces même cellules ont été stimulées 72h avec 10, 10^2 ou 10^3 UI/mL d'IFN-α ou 100ng/mL de TNF-α. Les niveaux d'HLA de classe II ont été évalués par cytométrie en flux. Ligne gris clair : isotype ou cellules non stimulées (NS), ligne gris intermédiaire à tirets : cellules stimulées avec 10 UI/mL d'IFN-α, ligne gris foncé en pointillés: cellules stimulées avec 10^2 UI/mL d'IFN-α, ligne noire continue: cellules stimulées avec 10^3 UI/mL d'IFN-α, ligne noire à tirets: cellules stimulées par du TNF-α.

	Fibroblastes SV-40			Fibroblastes primaires		
Sujet	Contrôle sain	Patiente	Patient publié	Contrôle sain	Patiente	Patient publié
Expression	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Réponse à l'IFN-γ :						
pSTAT1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HLA de classe II	+++	+++	+++	ND	ND	ND
Réponse à l'IFN-α						
pSTAT1	+++	+++	++	+++	+++	+
pSTAT2	+++	+++	+++	ND	ND	ND
HLA de classe I	+++	+++	+++	ND	ND	ND

Tableau 12 – Récapitulatif du phénotype cellulaire des fibroblastes des patients
+++ : normal, ++ : diminution, + : forte diminution, +- : très forte diminution, - : non détection, ND : non déterminé

E. **Activation sur sang (évaluation de l'axe IFN-γ)**

Finalement, la répercussion du défaut génétique au niveau de l'activation sur sang a été évaluée. Le test décrit en 2004 par Jacqueline Feinberg permet d'évaluer la sécrétion d'IFN-γ, d'IL-12p40 et d'IL-12p70 en réponse au BCG seul ou combiné avec de l'IFN-γ ou de l'IL-12[148]. Des 30 défauts génétiques associés au MSMD (isolé ou syndromique), seuls les défauts complets IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IFN-γR1, IFN-γR2 et IL-12p40 sont dépistés ainsi que les défauts partiels récessifs IFN-γR1 et IFN-γR2[2,6]. Les taux de production d'IFN-γ, d'IL-12p40 et d'IL-12p70 ont été mesurés sur sang total de la patiente et de contrôles sains au bout de 48h de stimulation avec du BCG vivant, avec ou sans IFN-γ ou IL-12. (**Figure 24**). La patiente présente des niveaux de sécrétion d'IFN-γ similaires aux contrôles sains après stimulation par du BCG, et après stimulation par du BCG et de l'IL-12 (**Figure 24A**). La patiente et les contrôles ont également des niveaux d'IL-12p40 comparables après stimulation par du BCG, et présentent une augmentation de production comparable après stimulation par du BCG et de l'IFN-γ (**Figure 24B**). L'IL-12p70 n'a pu être détectée dans aucun échantillon après stimulation par du BCG, mais après stimulation par du BCG et de l'IFN-γ, les contrôles sains et la patiente présentent tous des niveaux similaires de production d'IL-12p70 (**Figure 24C**). Enfin, il n'y a pas de détection d'IFN-γ dans le plasma. Il est possible de conclure que ce test ne permet pas de mettre en évidence le défaut fonctionnel. Il sera nécessaire de compléter l'étude soit par des travaux sur PBMC, soit en utilisant des populations cellulaires spécifiques, comme des monocytes, des macrophages dérivés de monocytes (MDM), des cellules dendritiques dérivés de monocytes (MDDM) ou encore des cellules myéloïdes dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC).

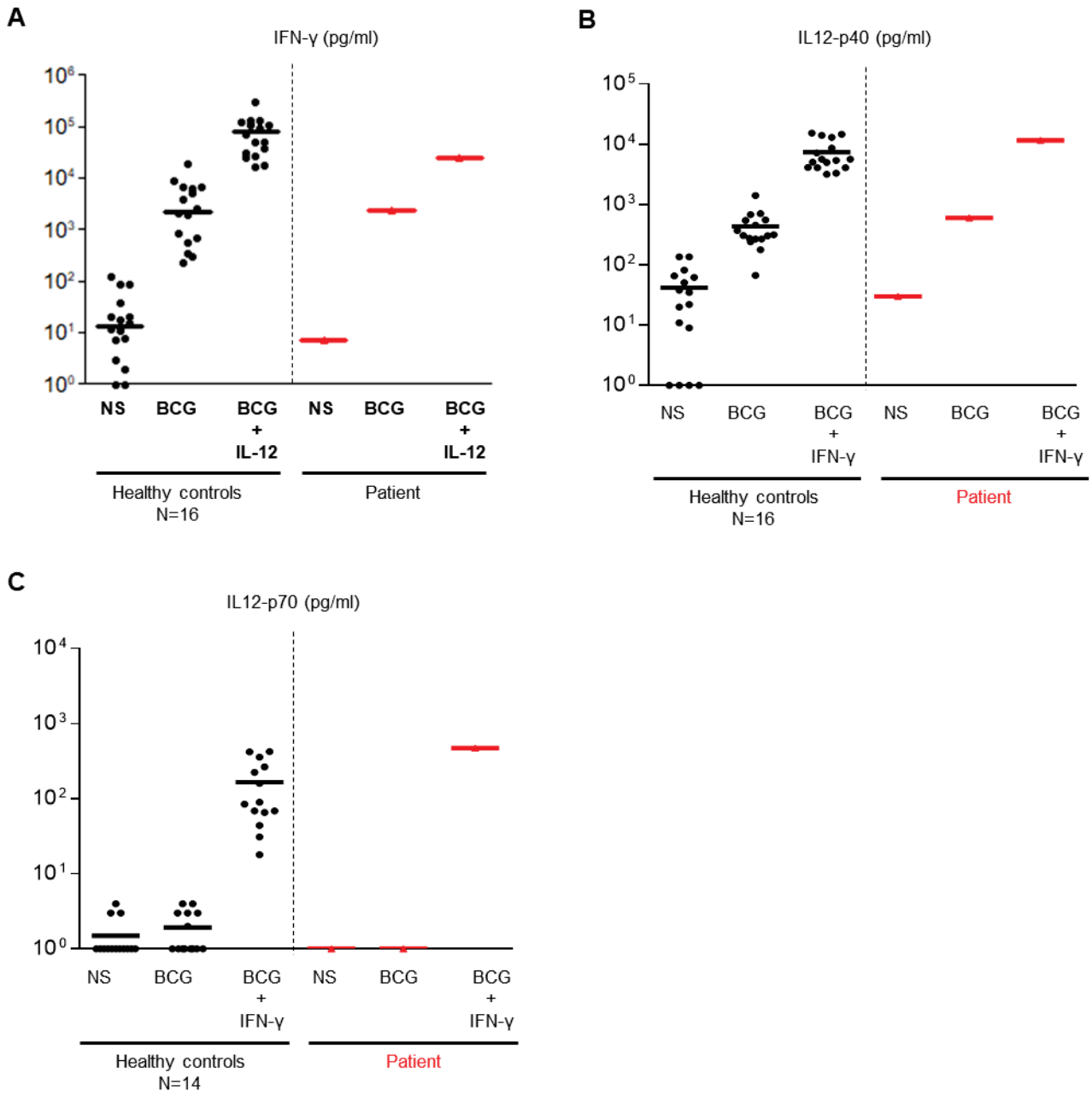


Figure 24 – La patiente n'a pas de défaut de sécrétion d'IFN-γ ni d'IL-12 sur sang complet
(A) Les niveaux d'IFN-γ dans le sang de contrôles sains (n=16) et de la patiente après stimulation ou non (NS) par du BCG vivant ou du BCG et de l'IL-12 pendant 48h ont été déterminés par ELISA. (**B**) Les niveaux d'IL-12p40 dans le sang de contrôles sains (n=16) et de la patiente après stimulation ou non (NS) par du BCG vivant ou du BCG et de l'IFN-γ pendant 48h ont été déterminés par ELISA. (**C**) Les niveaux d'IL-12p70 dans le sang de contrôles sains (n=14) et de la patiente après stimulation ou non (NS) par du BCG vivant ou du BCG et de l'IFN-γ pendant 48h ont été déterminés par ELISA. Chaque point représente une valeur d'une expérience indépendante. Les barres horizontales représentent les moyennes.

Conclusions et perspectives

Ce manuscrit décrit l'identification et la caractérisation de deux mutations hétérozygotes composites et germinales de *JAK1,* c.1970C>G/p.C657S et c.2108_2115+15del, chez une patiente d'origine algérienne. Ces mutations définissent une nouvelle forme de défaut AR partiel en JAK1 et une forme génétique de MSMD. Ce défaut est responsable d'un phénotype de MSMD isolé, contrairement au premier défaut AR publié, qui correspondait à un phénotype de MSMD syndromique. La délétion conduit à trois transcrits différents (c.1756_2115del, c.1900_2115del et c.1988_2115del), qui sont tous LOF en réponse aux IFN dans un système de surexpression stable. La mutation faux-sens induit une réponse rapide à l'IFN-γ diminuée, tandis que la réponse à l'IFN-α reste normale (**Tableau 13**). Les cellules de la patiente expriment majoritairement l'allèle faux-sens, comme l'ont mis en évidence le TOPO-TA et la non-détection des formes tronquées de JAK1 correspondant aux mutations dans les lignées cellulaires testées. Les lignées B-EBV, qui présentent une réponse diminuée à l'IFN-γ, mais normale à l'IFN-α, expriment ainsi un phénotype ressemblant à celui causé par l'allèle faux-sens en système de surexpression. Cette similarité laisse penser qu'il existe une relation de cause à effet entre les phénotypes des B-EBV et l'allèle faux-sens de la patiente. La réalisation d'une expérience de sauvetage (détaillée p.70-71) par transduction de l'allèle WT a permis de confirmer que le phénotype de la patiente est bien causé par un défaut fonctionnel de JAK1. Ce phénotype cellulaire diffère de celui observé dans les lignées B-EBV du patient présentant le premier défaut AR partiel en JAK1[16], car même si les deux lignées ont une réponse similaire à l'IFN-γ, les lignées B-EBV du patient publié ont également un léger défaut de réponse à l'IFN-α. Cette différence est bien plus notable dans les fibroblastes, en particulier les fibroblastes primaires : ceux du patient publié présentent en effet un défaut de réponse à l'IFN-α marqué, à l'inverse de ceux de la patiente étudiée (**Tableau 14**). Ces différences au niveau cellulaire peuvent expliquer les différences de phénotypes cliniques observées chez les deux patients. En effet, les deux patients souffrent d'infections mycobactériennes depuis la tendre enfance, liées au défaut de réponse à l'IFN-γ, mais le fait que seul le patient publié présente un défaut de réponse à l'IFN-α[16] pourrait expliquer le fait qu'il souffre également d'infections virales, contrairement à la patiente actuelle, qui présente un phénotype clinique de MSMD isolé. Cette hypothèse sera vérifiée par l'étude de la réplication virale (VSV et HSV) dans les fibroblastes SV-40 des deux patients, qui est en cours de réalisation.

	Contrôle sain	Patiente				Patient publié
Allèle	WT	p.C657S	c.1756_2115del	c.1900_2115del	c.1988_2115del	p.P733L/P832S
Taux d'expression	+++	+++	+++*	+++*	-	+++
Réponse rapide IFN-γ	+++	+	-	-	-	+
Réponse tardive IFN-γ	+++	+++	-	-	-	+++
Réponse rapide IFN-α	+++	+++	-	-	-	+
Réponse tardive IFN-α	+++	+++	-	-	-	+++

Tableau 13 – Récapitulatif de l'impact des allèles des différents patients sur la réponse aux IFN

* : protéine tronquée, +++ : normal, ++ : diminution, + : forte diminution, +- : très forte diminution, - : non détection

	Contrôle sain		Patiente		Patient publié	
	IFN-γ	IFN-α	IFN-γ	IFN-α	IFN-γ	IFN-α
B-EBV	+++	+++	+-	+++	+	++
Fibroblastes SV-40	+++	+++	+++	+++	+++	++
Fibroblastes primaires	+++	+++	+++	+++	+++	+

Tableau 14 – Récapitulatif des réponses aux IFN dans les différentes lignées cellulaires des patients

+++ : normal, ++ : diminution, + : forte diminution, +- : très forte diminution, - : non détection

Il serait également intéressant de pouvoir déterminer le mécanisme moléculaire exact régulant le défaut de réponse aux IFN chez les deux patients. Il est possible que la mutation faux-sens de la patiente engendre un changement de conformation de la protéine JAK1 qui pourrait empêcher sélectivement la bonne liaison de JAK1 à l'IFN-γR1 mais non à l'IFN-αR2. Les impacts sur ces deux liaisons peuvent être vérifiés par des expériences de co-immunoprécipitation. La réalisation de ces mêmes expériences sur le patient publié permettrait de vérifier si la mutation qui l'affecte impacte les deux liaisons à la fois[16]. Une autre possibilité est que la mutation faux-sens observée chez la patiente étudiée nuirait à l'interaction entre JAK1 et JAK2, prévenant ainsi leur transphosphorylation, mais non entre JAK1 et TYK2. Une

optimisation des WB, permettant l'observation de l'impact des mutations sur la phosphorylation de JAK1 et JAK2 en réponse à l'IFN-γ, permettrait de tester cette hypothèse, mais n'a pu être réalisée jusqu'à présent. Il est également possible que la mutation impacte l'activation du récepteur de l'IFN-γ et donc le recrutement de STAT1. Une étude de la phosphorylation d'IFN-γR1 et une expérience de co-immunoprécipitation en réponse à une stimulation par de l'IFN-γ pourraient permettre de valider cette hypothèse. Ces mêmes expériences devraient également être réalisées pour le récepteur à l'IFN-α chez les deux patients, en réponse à une stimulation par de l'IFN-α. Ce dernier test permettrait en effet d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes régulant les défauts de réponses à l'IFN-α.

Cliniquement, le patient publié possède un phénotype similaire à celui des patients présentant un défaut AR partiel en STAT1, les similarités se trouvant dans le développement d'infections mycobactériennes et virales à un âge correspondant à ce qui est décrit dans la littérature. A l'inverse, la patiente décrite ici présente un phénotype plus proche de celui de patients présentant un défaut AR partiel en IFN-γR1[34,43–46] ou IFN-γR2[12,63,68,69], ou un défaut partiel dominant IFN-γR1[34,40,47–56] ou STAT1[18,19,23,74–78] avec des infections mycobactériennes uniquement. Cette ressemblance est d'autant plus frappante que quatre patients souffrant d'ostéomyélites dues à des défauts partiels en IFN-γR1 ont également d'abord reçu un diagnostic d'histiocytose à cellules de Langerhans, avant d'être traités pour infections mycobactériennes[45,49]. Quoi qu'il en soit, un défaut partiel de réponse à l'IFN-γ semble prédisposer non seulement aux infections mycobactériennes, mais en particulier aux ostéomyélites. En effet, près de deux tiers des patients présentant un défaut AR partiel en IFN-γR1, environ 70% des patients avec un défaut AD partiel en IFN-γR1, un tiers des patients avec un défaut partiel AR en IFN-γR2, la moitié des patients présentant un défaut partiel (AR ou AD) en STAT1 et maintenant 100% (2/2) des patients avec un défaut AR partiel en JAK1 développent des ostéomyélites[2,18,45,68]. Il serait donc intéressant d'effectuer un dépistage génétique systématique chez les patients souffrant d'ostéomyélites afin de vérifier s'il n'a pas des mutations de la voie de réponse à l'IFN-γ, impliquant probablement de nouveaux gènes.

Une différence notable entre les deux patients JAK1 est l'absence de cancer chez la patiente étudiée ici. Il est possible que l'apparition précoce d'un cancer de la vessie chez le patient publié ne soit qu'une coïncidence. Toutefois, de nombreuses mutations somatiques de JAK1 ayant été répertoriées dans des cancers et leucémies, y compris des mutations LOF[134], il est raisonnable de penser que les mutations germinales hypomorphes de JAK1 prédisposent à

un cancer ou que l'infection et l'inflammation persistantes constituent un terrain favorable à l'apparition d'un cancer. La patiente est cependant plus jeune que ne l'était le patient publié lorsqu'il a développé son cancer de la vessie. Un suivi clinico-biologique par un service spécialisé en PID a été proposé. Les mutations somatiques LOF de *JAK1* étant particulièrement associées aux cancers gynécologiques (notamment de l'utérus et de l'endomètre)[134], il semblerait pertinent de recommander un suivi gynécologique régulier à la patiente dans les années à venir, afin de pouvoir prendre en charge le plus rapidement possible tout signe potentiel de cancer.

Bibliographie

1. Rosain, J. *et al.* Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 360–367 (2019).

2. Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L. & Casanova, J. L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-γ immunity. *Seminars in Immunology* (2014). doi:10.1016/j.smim.2014.09.008

3. Casanova, J.-L. & Abel, L. G ENETIC D ISSECTION OF I MMUNITY TO M YCOBACTERIA : The Human Model . *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 581–620 (2002).

4. Al-Muhsen, S. & Casanova, J. L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1043–1051 (2008).

5. Filipe-Santos, O. *et al.* Inborn errors of IL-12/23- and IFN-γ-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Seminars in Immunology* (2006). doi:10.1016/j.smim.2006.07.010

6. Esteve-Solé, A. *et al.* Laboratory evaluation of the IFN-γ circuit for the molecular diagnosis of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (2018). doi:10.1080/10408363.2018.1444580

7. Jouanguy, E. *et al.* Interferon-γ-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N. Engl. J. Med.* (1996).

8. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, L. M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* (1996).

9. Boisson-Dupuis, S. *et al.* Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol. Rev.* (2015). doi:10.1111/imr.12272

10. Boisson-Dupuis, S. *et al.* Tuberculosis and impaired IL-23–dependent IFN- immunity in humans homozygous for a common TYK2 missense variant. *Sci. Immunol.* (2018). doi:10.1126/sciimmunol.aau8714

11. Kong, X. F. *et al.* Disruption of an antimycobacterial circuit between dendritic and helper T cells in human SPPL2a deficiency. *Nat. Immunol.* **19**, 973–985 (2018).

12. Oleaga-Quintas, C. *et al.* A purely quantitative form of partial recessive IFN-γR2

deficiency caused by mutations of the initiation or second codon. *Hum. Mol. Genet.* (2018). doi:10.1093/hmg/ddy275

13. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Human IFN- immunity to mycobacteria is governed by both IL-12 and IL-23. *Sci. Immunol.* (2018). doi:10.1126/sciimmunol.aau6759

14. Okada, S. *et al.* Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science (80-.).* (2015). doi:10.1126/science.aaa4282

15. Kreins, A. Y. *et al.* Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* (2015). doi:10.1084/jem.20140280

16. Eletto, D. *et al.* Biallelic JAK1 mutations in immunodeficient patient with mycobacterial infection. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2016).

17. Chapgier, A. *et al.* A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J. Clin. Invest.* (2009). doi:10.1172/JCI37083

18. Boisson-Dupuis, S. *et al.* Inborn errors of human STAT1: Allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Current Opinion in Immunology* (2012). doi:10.1016/j.coi.2012.04.011

19. Dupuis, S. *et al.* Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science (80-.).* (2001). doi:10.1126/science.1061154

20. Dupuis, S. *et al.* Impaired response to interferon-α/β and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.* (2003). doi:10.1038/ng1097

21. Kristensen, I. A., Veirum, J. E., Møller, B. K. & Christiansen, M. Novel STAT1 alleles in a patient with impaired resistance to mycobacteria. *J. Clin. Immunol.* (2011). doi:10.1007/s10875-010-9480-8

22. Chapgier, A. *et al.* Human Complete Stat-1 Deficiency Is Associated with Defective Type I and II IFN Responses In Vitro but Immunity to Some Low Virulence Viruses In Vivo. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.8.5078

23. Chapgier, A. *et al.* Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet.* (2006). doi:10.1371/journal.pgen.0020131

24. Kong, X. F. *et al.* A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons. *Blood* **116**, 5896–5906 (2010).

25. Swaim, C. D., Scott, A. F., Canadeo, L. A. & Huibregtse, J. M. Extracellular ISG15 Signals Cytokine Secretion through the LFA-1 Integrin Receptor. *Mol. Cell* (2017). doi:10.1016/j.molcel.2017.10.003

26. Jouanguy, E. *et al.* In a novel form of IFN-γ receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-γ. *J. Clin. Invest.* (2000). doi:10.1172/JCI9166

27. Koscielniak, E. *et al.* Disseminated Mycobacterium peregrinum infection in a child with complete interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2003). doi:10.1097/01.inf.0000060181.71042.b5

28. Martínez-Morales, M. C. *et al.* Disseminated infection by M. tuberculosis complex in patient with IFN-γ receptor 1 complete deficiency. *Rev. Alerg. Mex.* (2017).

29. Noordzij, J. G. *et al.* Two patients with complete defects in interferon gamma receptor-dependent signaling. *J. Clin. Immunol.* (2007). doi:10.1007/s10875-007-9097-8

30. Roesler, J. *et al.* Listeria monocytogenes and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-γ-receptor (IFNγR1) deficiency: Mutational analysis and evaluation of therapeutic options. *Exp. Hematol.* (1999). doi:10.1016/S0301-472X(99)00077-6

31. Tesi, B. *et al.* Hemophagocytic lymphohistiocytosis in 2 patients with underlying IFN-γ receptor deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2015). doi:10.1016/j.jaci.2014.11.030

32. Tsolia, M. N. *et al.* Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in a child with interferon-γ receptor 1 deficiency. *Eur. J. Pediatr.* (2006). doi:10.1007/s00431-006-0110-7

33. Wang, Q., Xia, W. & Zhao, D. Interferon-gamma receptor 1 deficiency in a 19-month-old child: case report and literature review. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* (2014).

34. Villella, A. *et al.* Recurrent Mycobacterium avium osteomyelitis associated with a novel dominant interferon gamma receptor mutation. *Pediatrics* (2001).

35. Allende, L. M. *et al.* A point mutation in a domain of gamma interferon receptor 1 provokes severe immunodeficiency. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 133–7 (2001).

36. Altare, F. *et al.* A causative relationship between mutant IFNgR1 alleles and impaired cellular response to IFNγ in a compound heterozygous child [5]. *American Journal of*

Human Genetics (1998). doi:10.1086/301750

37. Chantrain, C. F. *et al.* Successful hematopoietic stem cell transplantation in a child with active disseminated Mycobacterium fortuitum infection and interferon-γ receptor 1 deficiency [4]. *Bone Marrow Transplantation* (2006). doi:10.1038/sj.bmt.1705399

38. Cunningham, J. A. *et al.* Disseminated bacille Calmette-Guerin infection in an infant with a novel deletion in the interferon-gamma receptor gene. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2000).

39. de Vor, I. C. *et al.* Deletion of the entire interferon-γ receptor 1 gene causing complete deficiency in three related patients. *J. Clin. Immunol.* (2016). doi:10.1007/s10875-016-0244-y

40. Dorman, S. E. *et al.* Clinical features of dominant and recessive interferon γ receptor 1 deficiencies. *Lancet* (2004). doi:10.1016/S0140-6736(04)17552-1

41. Gutierrez, M. J., Kalra, N., Horwitz, A. & Nino, G. Novel mutation of interferon-γ receptor 1 gene presenting as early life mycobacterial bronchial disease. *J. Investig. Med. High Impact Case Reports* (2016). doi:10.1177/2324709616675463

42. Holland, S. M. *et al.* Abnormal regulation of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor-alpha in human interferon-gamma receptor 1 deficiency. *J Infect Dis* (1998).

43. Jouanguy, E. *et al.* Partial interferon-γ receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J. Clin. Invest.* (1997). doi:10.1172/JCI119810

44. Remiszewski, P. *et al.* Disseminated Mycobacterium avium infection in a 20-year-old female with partial recessive IFNγR1 deficiency. *Respiration* (2006). doi:10.1159/000088682

45. Sologuren, I. *et al.* Partial recessive IFN-γR1 deficiency: Genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum. Mol. Genet.* (2011). doi:10.1093/hmg/ddr029

46. Kong, X. F. *et al.* A novel form of cell type-specific partial IFN-γR1 deficiency caused by a germ line mutation of the IFNGR1 initiation codon. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 434–444 (2009).

47. Storgaard, M., Varming, K., Herlin, T. & Obel, N. Novel mutation in the interferon-γ-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infections. *Scand. J. Immunol.* (2006). doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01775.x

48. van de Vosse, E. & van Dissel, J. T. IFN-γR1 defects: Mutation update and description of the IFNGR1 variation database. *Hum. Mutat.* (2017). doi:10.1002/humu.23302

49. Edgar, J. D. M. *et al.* Interferon-γ receptor deficiency mimicking Langerhans' cell histiocytosis. *J. Pediatr.* (2001). doi:10.1067/mpd.2001.117068

50. Glanzmann, B. *et al.* Autosomal Dominant IFN-γR1 Deficiency Presenting with both Atypical Mycobacteriosis and Tuberculosis in a BCG-Vaccinated South African Patient. *Journal of Clinical Immunology* (2018). doi:10.1007/s10875-018-0509-8

51. Jouanguy, E. *et al.* A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat. Genet.* (1999). doi:10.1038/7701

52. Obinata, K. *et al.* Two cases of partial dominant interferon-γ receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. *J. Infect. Chemother.* (2013). doi:10.1007/s10156-012-0493-5

53. Okada, S. *et al.* The novel IFNGR1 mutation 774del4 produces a truncated form of interferon-γ receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon-γ signal transduction. *J. Med. Genet.* (2007). doi:10.1136/jmg.2007.049635

54. Rose, D. M., Atkins, J., Holland, S. M. & Infante, A. J. A novel mutation in IFN-γ receptor 1 presenting as multisystem Mycobacterium intracellulare infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.jaci.2013.07.054

55. Sasaki, Y. *et al.* Genetic Basis of Patients with Bacille Calmette-Guérin Osteomyelitis in Japan: Identification of Dominant Partial Interferon-γ Receptor 1 Deficiency as a Predominant Type. *J. Infect. Dis.* (2002). doi:10.1086/339011

56. Sharma, V. K. *et al.* Disseminated Mycobacterium avium Complex Infection in a Child with Partial Dominant Interferon Gamma Receptor 1 Deficiency in India. *J. Clin. Immunol.* (2015). doi:10.1007/s10875-015-0173-1

57. Shabani, M. *et al.* A Novel Recessive Mutation of Interferon-γ Receptor 1 in a Patient with Mycobacterium tuberculosis in Bone Marrow Aspirate. *Journal of Clinical Immunology* (2019). doi:10.1007/s10875-019-00595-7

58. Fieschi, C. *et al.* High levels of interferon gamma in the plasma of children with complete interferon gamma receptor deficiency. *Pediatrics* (2001).

59. Dorman, S. E. & Holland, S. M. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-γ receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* (1998). doi:10.1172/JCI2901

60. Holzer, U., Reinhardt, K., Lang, P., Handgretinger, R. & Fischer, N. Influence of a mutation in IFN-γ receptor 2 (IFNGR2) in human cells on the generation of Th17 cells in memory T cells. *Hum. Immunol.* (2013). doi:10.1016/j.humimm.2013.02.002

61. Hoyos-Bachiloglu, R. *et al.* A digenic human immunodeficiency characterized by IFNAR1 and IFNGR2 mutations. *J. Clin. Invest.* (2017). doi:10.1172/JCI93486

62. Kilic, S. S. *et al.* Severe disseminated mycobacterial infection in a boy with a novel mutation leading to IFN-γR2 deficiency. *J. Infect.* (2012). doi:10.1016/j.jinf.2012.08.008

63. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Mycobacterium simiae Infection in Two Unrelated Patients with Different Forms of Inherited IFN-γR2 Deficiency. *J. Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1007/s10875-014-0085-5

64. Rosenzweig, S. D. *et al.* A Novel Mutation in IFN-γ Receptor 2 with Dominant Negative Activity: Biological Consequences of Homozygous and Heterozygous States. *J. Immunol.* (2004). doi:10.4049/jimmunol.173.6.4000

65. Toyoda, H. *et al.* Multiple cutaneous squamous cell carcinomas in a patient with interferon -γ receptor 2 (IFN-γR2) deficiency. *J. Med. Genet.* (2010). doi:10.1136/jmg.2009.072108

66. Vogt, G. *et al.* Complementation of a pathogenic IFNGR2 misfolding mutation with modifiers of N-glycosylation. *J. Exp. Med.* (2008). doi:10.1084/jem.20071987

67. Vogt, G. *et al.* Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat. Genet.* (2005). doi:10.1038/ng1581

68. Döffinger, R. *et al.* Partial Interferon-γ Receptor Signaling Chain Deficiency in a Patient with Bacille Calmette-Guérin and Mycobacterium abscessus Infection . *J. Infect. Dis.* (2000). doi:10.1086/315197

69. Moncada-Vélez, M. *et al.* Partial IFN-γR2 deficiency is due to protein misfolding and

can be rescued by inhibitors of glycosylation. *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2013-01-480814

70. Kong, X. F. *et al.* Haploinsufficiency at the human IFNGR2 locus contributes to mycobacterial disease. *Hum. Mol. Genet.* (2013). doi:10.1093/hmg/dds484

71. Kamoun, C. *et al.* Successful unrelated cord blood transplant for complete IFN-γ receptor 2 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2016). doi:10.1016/j.jaci.2016.06.017

72. Vairo, D. *et al.* Severe impairment of IFN-γ and IFN-α responses in cells of a patient with a novel STAT1 splicing mutation. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2011-01-330571

73. Shamriz, O. *et al.* Mycobacterium szulgai chronic multifocal osteomyelitis in an adolescent with inherited STAT1 deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2013). doi:10.1097/01.inf.0000437067.43859.4c

74. Boudjemaa, S. *et al.* Disseminated bacillus calmette-guérin osteomyelitis in twin sisters related to STAT1 gene deficiency. *Pediatr. Dev. Pathol.* (2017). doi:10.1177/1093526616686255

75. Hirata, O. *et al.* Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica* (2013). doi:10.3324/haematol.2013.083741

76. Sampaio, E. P. *et al.* A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease. *J. Clin. Immunol.* (2012). doi:10.1007/s10875-012-9659-2

77. Tsumura, M. *et al.* Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum. Mutat.* (2012). doi:10.1002/humu.22113

78. Ueki, M. *et al.* A heterozygous dominant-negative mutation in the coiled-coil domain of STAT1 is the cause of autosomal-dominant Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.clim.2016.11.004

79. Liu, L. *et al.* Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Exp. Med.* (2011). doi:10.1084/jem.20110958

80. Van De Veerdonk, F. L. *et al.* STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N. Engl. J. Med.* (2011). doi:10.1056/NEJMoa1100102

81. Toubiana, J. *et al.* Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2015-11-679902

82. Olbrich, P. *et al.* Diagnostic and therapeutic challenges in a child with complete interferon-γ receptor 1 deficiency. *Pediatr. Blood Cancer* (2015). doi:10.1002/pbc.25625

83. Roesler, J. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for complete IFN-γ receptor 1 deficiency: A multi-institutional survey. *J. Pediatr.* (2004). doi:10.1016/j.jpeds.2004.08.021

84. Quispel, W. T. *et al.* Intact IFN-γR1 expression and function distinguishes langerhans cell histiocytosis from mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *J. Clin. Immunol.* (2014). doi:10.1007/s10875-013-9959-1

85. Wilks, A. F. The JAK kinases: Not just another kinase drug discovery target. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2008). doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.020

86. Wilks, A. F., Kurban, R. R., Hovens, C. M. & Ralph, S. J. The application of the polymerase chain reaction to cloning members of the protein tyrosine kinase family. *Gene* (1989). doi:10.1016/0378-1119(89)90465-4

87. Wilks, A. F. *et al.* Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* (1991). doi:10.1128/mcb.11.4.2057

88. Haan, C., Kreis, S., Margue, C. & Behrmann, I. Jaks and cytokine receptors-An intimate relationship. *Biochemical Pharmacology* (2006). doi:10.1016/j.bcp.2006.04.013

89. Hammarén, H. M., Virtanen, A. T., Raivola, J. & Silvennoinen, O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine* (2019). doi:10.1016/j.cyto.2018.03.041

90. Ferrao, R. & Lupardus, P. J. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 domains: Bringing specificity to JAK-receptor interactions. *Frontiers in Endocrinology* (2017). doi:10.3389/fendo.2017.00071

91. Ferrao, R. *et al.* The Structural Basis for Class II Cytokine Receptor Recognition by JAK1. *Structure* (2016). doi:10.1016/j.str.2016.03.023

92. Radtke, S. *et al.* The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M500822200

93. Zhang, D., Wlodawer, A. & Lubkowski, J. Crystal Structure of a Complex of the Intracellular Domain of Interferon λ Receptor 1 (IFNLR1) and the FERM/SH2 Domains of Human JAK1. *J. Mol. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.jmb.2016.10.005

94. Babon, J. J., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Nicola, N. A. & Varghese, L. N. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem. J.* **462**, 1–13 (2014).

95. Hammarén, H. M., Virtanen, A. T. & Silvennoinen, O. Nucleotide-binding mechanisms in pseudokinases. *Biosci. Rep.* (2016). doi:10.1042/BSR20150226

96. Toms, A. V. *et al.* Structure of a pseudokinase-domain switch that controls oncogenic activation of Jak kinases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2013). doi:10.1038/nsmb.2673

97. Silvennoinen, O., Ihle, J. N., Schlessinger, J. & Levy, D. E. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* (1993). doi:10.1038/366583a0

98. Grumbach, I. M. *et al.* Activation of the Jak-Stat pathway in cells that exhibit selective sensitivity to the antiviral effects of IFN-β compared with IFN-α. *J. Interf. Cytokine Res.* (1999). doi:10.1089/107999099313659

99. Igarashi, K. I. *et al.* Interferon-γ induces tyrosine phosphorylation of interferon-γ receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.* (1994).

100. Lütticken, C. *et al.* Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science (80-.).* (1994). doi:10.1126/science.8272872

101. Robledo, O. *et al.* Signaling of the cardiotrophin-1 receptor: Evidence for a third receptor component. *J. Biol. Chem.* (1997). doi:10.1074/jbc.272.8.4855

102. Lelièvre, E. *et al.* Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine. Specific requirement of the

membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor α component. *J. Biol. Chem.* **276**, 22476–22484 (2001).

103. Stahl, N. *et al.* Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science (80-.).* (1994). doi:10.1126/science.8272873

104. Nicholson, S. E. *et al.* Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994). doi:10.1073/pnas.91.8.2985

105. Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q. & Gao, W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* (2008). doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.003

106. Gaffen, S. L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* **14**, 63–77 (2001).

107. Kovanen, P. E. & Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases: Critical roles of the γc-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunological Reviews* (2004). doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00203.x

108. Bhattacharjee, A. *et al.* IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* (2013). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.553

109. Zhong, J. *et al.* TSLP signaling pathway map: A platform for analysis of TSLP-mediated signaling. *Database* (2014). doi:10.1093/database/bau007

110. Huang, H. M., Lin, Y. L., Chen, C. H. & Chang, T. W. Simultaneous activation of JAK1 and JAK2 confers IL-3 independent growth on Ba/F3 pro-B cells. *J. Cell. Biochem.* (2005). doi:10.1002/jcb.20513

111. Kamiya, S. *et al.* An Indispensable Role for STAT1 in IL-27-Induced T-bet Expression but Not Proliferation of Naive CD4 + T Cells . *J. Immunol.* **173**, 3871–3877 (2004).

112. Takeda, A. *et al.* Cutting Edge: Role of IL-27/WSX-1 Signaling for Induction of T-Bet Through Activation of STAT1 During Initial Th1 Commitment. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.170.10.4886

113. O'Shea, J. J. & Plenge, R. JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2012.03.014

114. Krause, C. D. *et al.* Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN-γ receptor complex: The roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains. *Cell Res.* (2006). doi:10.1038/sj.cr.7310008

115. Briscoe, J. *et al.* Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J.* **15**, 799–809 (1996).

116. Saharinen, P. & Silvennoinen, O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M205156200

117. Hubbard, S. R. Mechanistic insights into regulation of JAK2 tyrosine kinase. *Frontiers in Endocrinology* (2018). doi:10.3389/fendo.2017.00361

118. Lupardus, P. J. *et al.* Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014). doi:10.1073/pnas.1401180111

119. David, M., Chen, H. E., Goelz, S., Larner, A. C. & Neel, B. G. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.* (1995). doi:10.1128/mcb.15.12.7050

120. Migone, T. S. *et al.* Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998). doi:10.1073/pnas.95.7.3845

121. Alicea-Velázquez, N. L., Jakoncic, J. & Boggon, T. J. Structure-guided studies of the SHP-1/JAK1 interaction provide new insights into phosphatase catalytic domain substrate recognition. *J. Struct. Biol.* (2013). doi:10.1016/j.jsb.2012.12.009

122. You, M., Yu, D.-H. & Feng, G.-S. Shp-2 Tyrosine Phosphatase Functions as a Negative Regulator of the Interferon-Stimulated Jak/STAT Pathway. *Mol. Cell. Biol.* (1999). doi:10.1128/mcb.19.3.2416

123. Simoncic, P. D., Lee-Loy, A., Barber, D. L., Tremblay, M. L. & McGlade, C. J. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of Janus family kinases 1 and 3. *Curr. Biol.* (2002). doi:10.1016/S0960-9822(02)00697-8

124. Yamada, T., Zhu, D., Saxon, A. & Zhang, K. CD45 controls interleukin-4-mediated IgE

class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M201781200

125. Babon, J. J. *et al.* The Structure of SOCS3 Reveals the Basis of the Extended SH2 Domain Function and Identifies an Unstructured Insertion That Regulates Stability. *Mol. Cell* (2006). doi:10.1016/j.molcel.2006.03.024

126. Babon, J. J. *et al.* Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2011.12.015

127. Babon, J. J. & Nicola, N. A. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors* (2012). doi:10.3109/08977194.2012.687375

128. Alexander, W. S. *et al.* SOCS1 is a critical inhibitor of interferon γ signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* (1999). doi:10.1016/S0092-8674(00)80047-1

129. Sporri, B., Kovanen, P. E., Sasaki, A., Yoshimura, A. & Leonard, W. J. JAB/SOCS1/SSI-1 is an interleukin-2-induced inhibitor of IL-2 signaling. *Blood* (2001). doi:10.1182/blood.V97.1.221

130. Rodig, S. J. *et al.* Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* **93**, 373–383 (1998).

131. Del Bel, K. L. *et al.* JAK1 gain-of-function causes an autosomal dominant immune dysregulatory and hypereosinophilic syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 2016-2020.e5 (2017).

132. Flex, E. *et al.* Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* (2008). doi:10.1084/jem.20072182

133. Neumann, M. *et al.* Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2012-11-465138

134. Ren, Y. *et al.* JAK1 truncating mutations in gynecologic cancer define new role of cancer-associated protein tyrosine kinase aberrations. *Sci. Rep.* (2013). doi:10.1038/srep03042

135. Haan, C. *et al.* Mapping of a Region within the N Terminus of Jak1 Involved in Cytokine

Receptor Interaction. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:10.1074/jbc.M106135200

136. Canté-Barrett, K., Uitdehaag, J. C. M. & Meijerink, J. P. P. Structural modeling of JAK1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia reveals a second contact site between pseudokinase and kinase domains. *Haematologica* (2016). doi:10.3324/haematol.2015.138248

137. Yang, S. *et al.* Activating JAK1 mutation may predict the sensitivity of JAK-STAT inhibition in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.6684

138. Kan, Z. *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09208

139. Wang, Q. *et al.* Mutations of PHF6 are associated with mutations of NOTCH1, JAK1 and rearrangement of SET-NUP214 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* (2011). doi:10.3324/haematol.2011.043083

140. Suryani, S. *et al.* Evaluation of the in vitro and in vivo efficacy of the JAK inhibitor AZD1480 against JAK-mutated acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cancer Ther.* (2015). doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0647

141. Zhang, J. *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature10725

142. Xie, H. J. *et al.* Mutational analysis of JAK1 gene in human hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* (2009). doi:10.4149/neo_2009_02_136

143. Hornakova, T. *et al.* Oncogenic JAK1 and JAK2-activating mutations resistant to ATP-competitive inhibitors. *Haematologica* (2011). doi:10.3324/haematol.2010.036350

144. Jeong, E. G. *et al.* Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin. Cancer Res.* (2008). doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4839

145. Kleppe, M. *et al.* PTPN2 negatively regulates oncogenic JAK1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-10-314286

146. Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J. B., Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: Cross-talk with IGF1 receptor. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.C500358200

147. Hayashi, T., Kobayashi, Y., Kohsaka, S. & Sano, K. The mutation in the ATP-binding region of JAK1, identified in human uterine leiomyosarcomas, results in defective interferon-γ inducibility of TAP1 and LMP2. *Oncogene* (2006). doi:10.1038/sj.onc.1209434

148. Feinberg, J. *et al.* Bacillus Calmette Guérin triggers the IL-12/IFN-γ axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* (2004). doi:10.1002/eji.200425221

149. Hernandez, N. *et al.* Life-threatening influenza pneumonitis in a child with inherited IRF9 deficiency. *J. Exp. Med.* (2018). doi:10.1084/jem.20180628

150. Xu, G. J. *et al.* Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science (80-.).* (2015). doi:10.1126/science.aaa0698

151. H, L. & R, D. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* (2009).

152. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Transduction of herpesvirus saimiri-transformed T cells with exogenous genes of interest. *Curr. Protoc. Immunol.* (2016). doi:10.1002/cpim.15

153. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* (2014). doi:10.1038/ng.2892

154. Itan, Y. *et al.* The mutation significance cutoff: gene-level thresholds for variant predictions. *Nature Methods* (2016). doi:10.1038/nmeth.3739

155. Müller, M. *et al.* The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-α/β and -γ Signal transduction. *Nature* (1993). doi:10.1038/366129a0

156. Kohlhuber, F. *et al.* A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol. Cell. Biol.* (1997). doi:10.1128/mcb.17.2.695

157. Moens, L. *et al.* A novel kindred with inherited STAT2 deficiency and severe viral illness. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.jaci.2016.10.033

158. Hernandez, N. *et al.* Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J. Exp. Med.* (2019). doi:10.1084/jem.20182295

Annexes (articles et posters)

Articles :

Mycobacterial disease mimicking Langerhans histiocytosis in a patient with a novel form of inherited JAK1 deficiency.

Valentine Jeanne-Julien, Jean Donadieu, Jérémie Rosain, Paul Bastard, Carmen Oleaga-Quintas, Anna-Lena Neehus, Lazaro Lorenzo, Mahbuba Rahman, Fatima Al Ali, Manon Roynard, Emmanuelle Jouanguy, Qian Zhang, Sandra Pellegrini, Laurent Abel, Nico Marr, Dusan Bogunovic, Siobhan O. Burns, Jean-Francois Emile, Shen-Ying Zhang, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jean-Laurent Casanova and Jacinta Bustamante

(Soumis à publication)

Poster :

Mycobacterial disease mimicking Langerhans histiocytosis in a patient with a novel form of inherited JAK1 deficiency.

Valentine Jeanne-Julien, Jean Donadieu, Jérémie Rosain, Anna-Lena Neehus, Carmen Oleaga-Quintas, Manon Roynard, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jean-Laurent Casanova and Jacinta Bustamante

Young Researchers Seminar, Institut Imagine, Mai 2019

Présentation orale (à venir):

Mycobacterial disease mimicking Langerhans histiocytosis in a patient with a novel form of inherited JAK1 deficiency.

Human JAK1 is involved in multiple cytokine responsive pathways, including type I and II IFN signaling pathways. Homozygosity for a rare germline hypomorphic mutation in JAK1 was previously described in a 22-year-old Pakistani patient with mycobacterial and viral infections, as well as early onset bladder malignancy. We investigated a 6-year-old Algerian patient with mycobacterial infections mimicking Langerhans histiocytiosis. By whole-exome sequencing, the patient is compound heterozygous for a missense (p.C657S) and a splice mutation

(c.2108_2115+15del) in JAK1. The splice mutant allele encodes three alternative transcripts (c.1756_2115del, c.1900_2115del, and c.1988_2115del). Upon overexpression, the missense protein impairs but does not abolish responses to IFN-γ, while it does not even impair responses to IFN-α2b. In contrast, the products of the three splice variants are loss-of-function for both IFN-γ and IFN-α stimulation. Moreover, EBV-B cells from the patient respond poorly to IFN-γ, a phenotype that is rescued by retrotransduction with a WT JAK1 cDNA. In contrast, the patient's fibroblasts respond normally to both IFN-γ and IFN-α. We thus describe a second patient with a novel partial form of autosomal recessive JAK1 deficiency, manifesting as isolated MSMD due to an apparently selective impairment of the IFN-γ responsive pathway.

Valentine Jeanne-Julien, Jean Donadieu, Jérémie Rosain, Paul Bastard, Anna-Lena Neehus, Emmanuelle Jouanguy, Qian Zhang, Laurent Abel, Nico Marr, Dusan Bogunovic, Siobhan O. Burns, Jean-François Emile, Shen-Ying Zhang, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jean-Laurent Casanova and Jacinta Bustamante

ESID, Septembre 2019

Article de thèse

Mycobacterial disease mimicking Langerhans histiocytosis in a patient with a novel form of inherited JAK1 deficiency.

Valentine Jeanne-Julien, Jean Donadieu, Jérémie Rosain, Paul Bastard, Carmen Oleaga-Quintas, Anna-Lena Neehus, Lazaro Lorenzo, Mahbuba Rahman, Fatima Al Ali, Manon Roynard, Emmanuelle Jouanguy, Qian Zhang, Sandra Pellegrini, Laurent Abel, Nico Marr, Dusan Bogunovic, Siobhan O. Burns, Jean-Francois Emile, Shen-Ying Zhang, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jean-Laurent Casanova and Jacinta Bustamante

Soumis à publication

Mycobacterial disease mimicking Langerhans histiocytosis in a patient with a novel form of inherited JAK1 deficiency

Valentine Jeanne-Julien[1,2], Jean Donadieu[3], Jérémie Rosain[1,2*], Paul Bastard[1,2]* Carmen Oleaga-Quintas[1,2*], Lazaro Lorenzo-Diaz[1,2*], Mathieu Pochon[1,2], Anna-Lena Neehus[1,2,4], Mahbuba Rahman[5], Fatima Al Ali[5], Manon Roynard[1,2], Emmanuelle Jouanguy[1,2,6], Qian Zhang[1,2,6], Sandra Pellegrini[7,8], Laurent Abel[1,2,6], Dusan Bogunovic[9], Siobhan O. Burns[10,11], Nico Marr[5],Jean-Francois Emile[12], Shen-Ying Zhang[1,2,6¤],Stéphanie Boisson-Dupuis[1,2,6¤], Jean-Laurent Casanova[1,2,6,13,14¤] and Jacinta Bustamante[1,2,6,15@]

[1]Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM UMR1163, Imagine Institute, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France, EU
[2]Paris University, Paris, France, EU
[3]Pediatric Hemato Oncology Department, Armand Trousseau Hospital, Paris, France, EU
[4]Institute of Experimental Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany, EU
[5] Sidra Medicine Research Center, Doha, Qatar
[6]St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, the Rockefeller University, New York, USA
[7]Cytokine Signaling Unit, Pasteur Institute, Paris, France, EU
[8]INSERM U1221, Paris, France, EU
[9]Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA
[10] University College London, Institute of Immunity and Transplantation, London, UK
[11] Department of Immunology, Royal Free London NHS Foundation Trust, London, UK
[12] Department of Pathology, Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt, AP-HP, France, EU
[13]Howard Hughes Medical Institute, New York, USA
[14]Pediatric Hematology-Immunology Unit, Necker Hospital for Sick Children, AP-HP, Paris, France, EU
[15]Center for the Study of Primary Immunodeficiencies, Necker Hospital for Sick Children, AP-HP, Paris, France, EU

*, ¤ equal contributions

@Corresponding author
Jacinta Bustamante, MD, PhD, Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, 24 boulevard du Montparnasse, INSERM UMR1163, Paris, France, EU.
E-mail: jacinta.bustamante@inserm.fr

Key words: IFN, osteitis, mycobacterium, histiocytosis, JAK1

Running title: Inherited JAK1 deficiency

Abstract

Human JAK1 is involved in multiple cytokine responsive pathways, including type I and II IFN signaling pathways. Homozygosity for a rare germline hypomorphic mutation in *JAK1* was previously described in a 22-year-old Pakistani patient with mycobacterial and viral infections, as well as early onset bladder malignancy. We investigated a 6-year-old Algerian patient with mycobacterial infections mimicking Langerhans histiocytiosis. By whole-exome sequencing, the patient is compound heterozygous for a missense (p.C657S) and a splice mutation (c.2108_2115+15del) in *JAK1*. The splice mutant allele encodes three alternative transcripts (c.1756_2115del, c.1900_2115del, and c.1988_2115del). Upon overexpression, the missense protein impairs but does not abolish responses to IFN-γ, while it does not even impair responses to IFN-α2b. In contrast, the products of the three splice variants are loss-of-function for both IFN-γ and IFN-α stimulation. Moreover, EBV-B cells from the patient respond poorly to IFN-γ, a phenotype that is rescued by retrotransduction with a WT *JAK1* cDNA. In contrast, the patient's fibroblasts respond normally to both IFN-γ and IFN-α. We thus describe a second patient with a novel partial form of autosomal recessive JAK1 deficiency, manifesting as isolated MSMD due to an apparently selective impairment of the IFN-γ responsive pathway.

Introduction

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) is a group of diseases characterized by a predisposition to developing infectious diseases caused by weakly virulent intracellular pathogens, mainly mycobacteria like the Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine substrains and environmental mycobacteria (EM), and in a few cases of tuberculosis, in otherwise healthy individuals (1, 2). Additionally, some patients can also suffer from non-typhoid Salmonella infections or from mucocutaneous candidiasis (CMC). Clinical manifestations are highly variable, ranging from localized to disseminated diseases, life-threatening to mild infections, and with early to late onset (1, 2). Causing mutations in 15 genes have been described, all affecting the interferon gamma (IFN-γ) immunity, be it in response to IFN-γ (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1, JAK1* and *CYBB*); in the production of IFN-γ (*IL12B*, *IL12RB1, TYK2, IL12RB2, IL23R, RORC* and *ISG15)* or both (*SPPL2A*, *IRF8* and *NEMO*) (1-11). The allelic heterogeneity on several of those loci defines over 31 genetic etiologies of MSMD, depending on type of disease (isolated or syndromic), the transmission mode (dominant or recessive), the expression or lack-of of the protein, and the mechanisms of the loss of function (as it can affect particular domains). Isolated MSMD refers a group of inborn errors affecting IFN-γ immunity with a selective predisposition of mycobacterial infections. Some forms of MSMD, called "syndromic MSMD", are more complex (6, 7, 10, 11). They are inherited defects caused by mutations in the following four genes: *RORC* (association of mycobacterial and fungal diseases, with a defect in interleukin (IL)-17 immunity) (7), *ISG15* (mycobacterial infections associated with brain calcifications and interferonopathies) (1, 6), *TYK2* and *JAK1* (mycobacterial infections associated with viral diseases, with impaired response to IFNs) (10, 11).

JAK1 is a member of the Janus Kinase family (JAK), along with JAK2, JAK3 and TYK2 (12-15). It is a 130 kDa tyrosine kinase, whose particularity (along with the other JAKs)

is to possess both a C-terminal kinase domain or JAK homology 1 (JH1) domain, and a pseudokinase domain or JAK homology 2 (JH2) domain (12-15). The JH1 domain is essential for the enzymatic activity of the protein, as it contains the tyrosines (Y1034-1035) whose phosphorylation is necessary for activation. The JH2 domain is catalytically impaired but still plays key regulatory functions (12, 16, 17). It also has a 4.1 ezrin-radixin-moesin (FERM) domain and a Src Homology 2 (SH2) domain, that are required to bind to cytokine receptors (18-20). Those domains associate with the box1/box2 region of the receptors, a proline-rich region of the intracellular domain, close to the cell membrane (18). JAK1 is ubiquitously expressed, and associates with class I receptors of the common gamma (IL-2 family) and gp130 (IL-6 family) families and class II receptors of the IL-10 family and the interferons (IFNs) of class I (IFN-α and IFN-β), class II (IFN-γ), and class III (IFN-λ1, IFN-λ2 and IFN-λ3) in both human (16, 17, 21, 22) and mice (23). When the cytokine binds to its receptors, the receptor undergoes a conformational change, which brings JAK1 and its associated JAK kinase closer, and they will phosphorylate each other. That in turn activates the receptors, which leads to recruitment, phosphorylation, polymerisation and nuclear translocation of STAT family transcription factors and transcription of target genes (12, 21, 24).

Several somatic gain-of function (GOF) and loss-of-function (LOF) *JAK1* mutations have been reported in acute leukemia and solid cancers (25-29), but only two germinal mutations have been described to date as responsible of inborn error of immunity (11) (30). The partial autosomal recessive (AR) JAK1 deficiency was reported in a Pakistani patient suffering from systemic atypical mycobacterial infections, associated with various viral, fungal and parasitic infections, and he eventually died from an early onset bladder carcinoma (11). By whole exome-sequencing (WES), two homozygous variants were found in the pseudokinase domain of JAK1: p.P733L and p.P832S. The p.P733L mutation was shown to be hypomorphic in an overexpression system while the other variation, p.P832S, was neutral. Primary fibroblasts

and peripheral leukocytes from the patient showed an impaired response to IFN-α and IFN-γ. The patient leukocytes also had diminished responses to several cytokines signaling through JAK1 (IL-2, IL-4, IL-10 and IL-27) (11). All of these results underlie that partial AR JAK1 deficiency causes syndromic MSMD. The partial autosomal dominant (AD) JAK1 GOF mutation, p.A634D, located in the pseudokinase domain of JAK1, was reported in a family suffering from autoimmune diseases and viral infections, and shown to be GOF in an overexpression system, with an amplified IFN-α response (30). Cells from the patient also displayed an amplified response to IFN-α and IL-6 (30). Therefore, *JAK1* GOF mutations cause autoimmune diseases and susceptibility to viral infections by disruption of the IL-6 and IFN-α pathway respectively. Here we studied a new child patient who suffered from a severe mycobacterial infectious disease.

Results

Case report

The patient is a girl born in 2010 from an Algerian non-consanguineous family living in France (Fig. 1A-B). She had a sebaceous nevus with a lesion on the scalp. She was BCG vaccinated at birth. At 3 months of age, she developed a bulge on the forehead which was explored by an echography that was normal. At 1 year old, she developed a swelling on the left fronto-parietal and a diagnosis of Langerhans cell histiocytosis was made following a biopsy. She was treated with steroids for a year but had a relapse 6 months after the end of the treatment, at 31 months of age. She was then treated with Vinblastine and 6-Mercaptopurine, which was quite efficient, even though new lesions appeared during the treatment. At the age of 5 years, she developed cervical adenopathies and a hypertrophy of the nasal septum, with a little swelling, from an undocumented infection. However, diagnosis of mycobacterial infection was suspected. She then developed a lesion on the tip of the nose (Fig. 1A). QuantiFERON test was negative. A purified protein derivative (PPD) skin test was performed, and was highly positive. She received an antimycobacterial treatment consisting of Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide and Claritromycin, and she proved clinical improvement. A diagnosis of primary immunodeficiency (PID) was suspected (Table 1). Phenotyping of lymphocytes showed high number of B cells, slightly high number of CD4+ T cells, lower percentage of naïve CD8+ T cells with an excess of effective memory CD8+ T and a normal number of natural killer cells (Table 1). Immunoglobulin levels were all in the normal range (Table 1). Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), type 1 and 3 poliovirus, measles, and parvovirus B19 serologies were positive (Table 2). A VirScan confirmed those results and also detected that the patient was positive for human adenovirus B and C, Varicella Zoster Virus (VZV), human respiratory syncytial virus, influenza A and C, enterovirus B and D, mumps virus, Norwalk

virus, rhinovirus A and B, and *Streptococcus pneumoniae* (Table 2). She is currently 9 years old and healthy. Her brother is healthy and he did not suffer from any invasive infections.

Identification of two *JAK1* variations in the patient

WES on was performed and the analysis was made regarding single nucleotide variants (SNVs) and copy number variations (CNVs) and in particular, rare variants (Minor Allele Frequency, MAF < 0.01) of known genes involved in isolated or syndromic MSMD (Supp. Fig. 1A). Interestingly, a compound heterozygous variation was found in *JAK1* gene. A heterozygous nucleotide substitution at position c.1970C>G (Fig. 1C), leading to the replacement of a Cysteine encoding codon with a Serine-encoding codon, p.C657S, in exon 14 as well as a heterozygous nucleotide deletion, c.2108_2115+15del at the end of exon 15 and overlapping on intron 15, predicted *in silico* to create a premature stop codon at the end of exon 15 (Fig. 1B-C). JAK1 is a tyrosine kinase, which plays an essential role in JAK/STAT pathway for multiple cytokines (21, 23). To date, only one patient with a bi-allelic *JAK1* mutation associated to multiple mycobacterial infections and some other viral and fungal infections has been reported in the literature, causing a partial AR JAK1 deficiency (11) (Fig. 1D). We therefore hypothesized that the variations found in the patient could also lead to AR JAK1 deficiency. We mined public databases (GnomAD, ExAC and BRAVO) and found that none of the variations were reported (Supp. Fig. 1B). We also checked in our in-house cohort of > 6,000 WES and these variations were not present either. The C657 residue is highly conserved in the animal species in which *JAK1* has been sequenced (Suppl. Fig. 1C). It is also right next to V658 whose mutation to V658F has been reported in acute leukaemia, and was shown to be GOF (31). Therefore, the missense variant occurs in a key position of the protein (Fig. 1D). Both of the patient's variations also have a high combined annotation-dependent depletion (CADD) score (32), higher than the mutation significance cut-off (MSC of 3.13) for *JAK1* (33)

(Supp. Fig. 1B). All variations were confirmed by Sanger sequencing. The mother of the patient was heterozygous for the missense variation, while the father was heterozygous for the deletion, confirming that the patient's variations are compound heterozygous. The patient's brother was wild-type for both alleles (Fig. 1B-C). Thus, the new patient reported here probably had AR JAK1 deficiency.

Patient cells express mRNA and protein of *JAK1*

Because the c.2108_2115+15del occurs in the terminal part of exon 15 and it involved also proximal part of intron 15, we hypothesized that this variation would produce an aberrant transcript. We amplified a fraction of *JAK1* (exon 12 to 21) by PCR on cDNA from EBV-B cells, fibroblasts (Supp. Fig. 2A) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (data not shown) from the patient and healthy controls. Patient's cells produced a transcript of expected molecular weight (MW), they also produced several transcripts of lower MW, that were not present in the controls' cells, suggesting the occurrence of alternative splicing (Supp. Fig. 2A). We then performed TOPO-TA cloning and we observed that the missense variant p.C657S was predominantly expressed (88% of transcripts), while the c.2108_2115+15del lead to three minor aberrantly spliced variants: two in-frame deletions (c.1756_2115del and c.1900_2115del; with 2% and 5% of transcripts respectively) that do not introduce any premature codon stop and one frameshift deletion (c.1988_2115del; 5%) resulting in a premature stop codon at the end of exon 14 (Fig. 1E). *JAK1* transcript levels were measured by quantitative PCR (qPCR) in EBV-B cells, SV40-fibroblasts and primary fibroblasts from the patient compared with healthy controls and first published patient with AR partial JAK1 deficiency (11). *JAK1* transcripts levels were in the range of the healthy controls (Fig. 2A-C). Moreover, the assessment of JAK1 protein expression in all cell lines of patient detected a single

band at 130kDa (Fig. 2D-F), comparable to healthy controls. Overall, these results show that the patient's cell lines do not display a defect in RNA and protein JAK1 expression.

Splice variants express truncated JAK1 proteins in transient transfection model

We hypothesized that these new alleles (missense, in-frame and frameshift deletions) occurring in a key position as the pseudokinase domain would be deleterious (hypomorphic or LOF). We first studied the alleles *in vitro* using an overexpression system. We performed transient transfection on U4C fibrosarcoma cells (JAK1$^{-/-}$ cells) (34, 35) (Fig. 3A) or on human embryonic kidney (HEK) 293T cells (Supp. Fig. 2A) with wild-type (WT)-*JAK1*, or mutated-*JAK1* alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del), or with an empty plasmid (EV). We included a p.P733L/P832S-*JAK1*plasmid, corresponding to the first *JAK1* germline hypomorphic allele to be described in a patient (11), and *JAK1* p.K908E, a kinase-negative mutation, as negative controls (36). By Western blots and as expected the WT-JAK1 plasmid coded for a single full-length 130 kDa protein, and no protein was detected for the EV (Fig. 3A, Supp. Fig. 2A). The missense p.C657S allele resulted in the production of a single full-length 130 kDa protein, in similar amount to the WT, as did the other missense plasmids. The in-frame deletions c.1756_2115del and c.1900_2115del produced proteins of lower MW than the WT, at the expected size of approximately 115 kDa and 120 kDa respectively, although with similar amounts than the WT plasmid. The frameshift deletion c.1988_2115del leads to a truncated protein at the expected size of approximately 75 kDa, in much reduced amount compared to the WT (Fig. 3A, Supp. Fig. 2A). Thus, alleles produced different amount of JAK1 protein ranging normal to truncated forms of JAK1 protein.

Mutant *JAK1* alleles have an impaired response to IFNs in a transient transfection system

We then assessed the functional consequences of the mutant alleles in overexpression system. We started by studying the effect on JAK1 auto-phosphorylation. As expected, we observed auto-phosphorylation after transfection with the WT plasmid, and none for the EV, the p.K908E kinase-negative mutant and the previously published patient's mutant. Interestingly, the missense p.C657S mutant caused a reduced amount of phosphorylation compared to the WT, while all three deletions produced no phosphorylation at all at the basal level in U4C cells (Fig. 3B) as well as in HEK-T cells (Supp. Fig. 2B). We also studied the allele consequences on responses to IFNs in transfected U4Cs. After stimulation by IFN-γ, we observed an induction of both JAK1 and STAT1 phosphorylation for the WT allele, and none for the EV and kinase-negative mutant. JAK1 phosphorylation was barely detectable for the p.C657S mutant, but not at all for the deletions and p.P733L/P832S mutant (Fig. 3B). However, STAT1 phosphorylation was detectable for both the p.C657S and p.P733L/P832S mutants, although at a lower level than for the WT allele. None of the deletions displayed any STAT1 phosphorylation after IFN-γ stimulation, even though both in-frame deletions showed a very slight induction of JAK1 phosphorylation (Fig. 3C). After IFN-α stimulation, we observe an induction of both JAK1 and STAT1 phosphorylation for the WT allele, and none for the EV and kinase-negative mutant. The p.P733L/P832S allele displayed reduced phosphorylation of both JAK1 and STAT1 compared to the WT (Fig. 3D). The p.C657S allele displayed levels of both JAK1 and STAT1 phosphorylation similar to that of the WT. The c.1756_2115del and c.1900_2115del alleles also displayed phosphorylation of both JAK1 and STAT1 after IFN-α stimulation, although strongly reduced, whereas the c.1988_2115del allele had no response (Fig. 3D). Therefore, in a transient overexpression system, all alleles of the patient displayed an impaired response to IFN-γ, (with the missense mutation being hypomorphic and the

deletions LOF), while the defect after IFN-α is less severe (with the missense mutation being neutral, the in-frame deletions being hypomorphic and only the frameshift mutation being LOF).

Retrotransduction system reveals a severe impact of *JAK1* mutant alleles in response to IFNs

We also studied the mutant alleles in stable retrotransduction of U4C cells (Fig. 4A). Similarly to the transient transfected cells, no protein was detected for the EV, the WT-*JAK1* coded for a single full-length 130 kDa protein, as did the p.C657S mutant, and both in-frame deletions c.1756_2115del and c.1900_2115del produced proteins of lower MW than the WT, at the expected size of approximately 115 kDa and 120 kDa respectively, and with similar amounts than the WT. However, we could not detect any protein for the frameshift deletion c.1988_2115del. These findings suggest that, while the missense mutation leads to a full-length protein, the in-frame deletions lead to truncated proteins and the frameshift variant is loss of expression. Autophosphorylation of JAK1 was not detectable in this system. We therefore only studied all alleles on responses to IFNs in retrotransduced U4Cs. After stimulation by IFN-γ, we observe an induction of both JAK1 and STAT1 phosphorylation for the WT allele, and none for the EV (Fig. 4B-C). The kinase negative mutant displayed a slight STAT1 phosphorylation. However, both JAK1 and STAT1 phosphorylation were reduced for the p.C657S allele and none of the deletions displayed any JAK1 or STAT1 phosphorylation after IFN-γ stimulation (Fig. 4B-C). After IFN-α stimulation, we observe an induction of both JAK1 and STAT1 phosphorylation for the WT allele, and none for the EV and kinase-negative mutant (Fig. 4D-E). The p.P733L/P832S allele displayed reduced phosphorylation of both JAK1 and STAT1 compared to the WT. Interestingly, the p.C657S allele displayed levels of both JAK1 and STAT1 phosphorylation similar to that of the WT but none of the deletions displayed any after

IFN-α stimulation (Fig. 4D-E). We also assessed the late response to IFNs in retrotransduced U4C cells. We studied the induction of HLA class I after stimulation by IFN-γ (Fig. 5A) or IFN-α (Fig. 5B) for 72h by fluorescence-activated cell sorting (FACS) staining. After both stimulations, we observed a strong induction of HLA class I for the WT allele, and none for the EV. The kinase negative mutant p.K908E displayed a response to IFN-γ but not to IFN-α. Both the p.C657S and the p.P733L/P832S alleles displayed responses similar to the WT to both IFNs, while all the deletions showed no response to any stimulation. We also studied the induction of HLA class II after stimulation by three doses of IFN-γ (Fig. 5C). None of the mutants responded to the lowest dose. However, for the other two doses, we observed no response for the EV nor any of the deletions while the WT allele and all the missense alleles showed strong inductions of HLA class II. Therefore, in a stable overexpression system, all of the patient's mutants displayed an impaired early response to IFN-γ, (with the missense mutation being hypomorphic and the deletions LOF), while after IFN-α stimulation, only the deletions displayed a defect. Additionally, all deletions have an abolished late response to both IFNs, while the missense mutation has a normal late response to IFNs. Overall, these data suggest that *JAK1* alleles are truly responsible for syndromic MSMD in this patient.

Impaired response to IFN-γ in the patient's EBV-B cells

We next tested the response to IFNs in cell lines from the patient. We analysed the early response to IFN-γ of EBV-B cells from two healthy controls, the patient, the previously published patient, a complete AR STAT1 deficient patient and a complete AR IFN-γR1 deficient patient (Fig. 6A). We assessed the ability of these EBV-B cells to phosphorylate STAT1 after stimulation with IFN-γ, by WB. For the healthy controls p-STAT1 was detected after stimulation whereas both the STAT1 deficient and IFN-γR1 deficient patients had no response. The patient's response to IFN-γ was strongly diminished compared to the healthy

315 controls. The previously published patient had also a diminished response to IFN-γ, but less so
316 than the patient. We also looked at p-STAT1 levels by flow cytometry. We stained the cells for
317 p-STAT1 after stimulation with IFN-γ (Fig. 6B). The healthy control displayed an increase in
318 p-STAT1 levels after stimulations whereas the STAT1$^{-/-}$ negative control did not (Fig. 6B). As
319 expected, the IFNγR1$^{-/-}$ control had no response to IFN-γ stimulation while still responding to
320 the other stimuli (Fig. 6B). After IFN-γ stimulation, the published patient had a lower increase
321 than the healthy control, and the patient had a barely visible response. We therefore
322 retrotransduced either an empty vector (EV) or WT-*JAK1* in EBV-B cells from a healthy
323 control, a complete STAT1 deficient patient, the patient and the previously published patient,
324 or left the cells untransduced (NT). We then assessed those cells ability to phosphorylate
325 STAT1 after IFN-γ stimulation by flow cytometry (Fig. 6C). For the healthy control, the NT,
326 EV and WT cells displayed comparable amount of p-STAT1 after IFN-γ activation, while none
327 of the STAT1$^{-/-}$ cells displayed any. For both the patient and the previously published patient,
328 retrotransduction with the empty vector has no effect on the response to IFN-γ, while
329 retrotransduction with the WT allele restored STAT1 phosphorylation to levels comparable to
330 that of the healthy controls after stimulation with IFN-γ. Therefore, we can conclude that the
331 impaired response to IFN-γ in the patient's EBV-B cells is due to the absence of a fully
332 functional JAK1 protein.
333
334 **Normal response to IFN-α in the patient's EBV-B cells**
335 We also studied the early response to IFN-α of cells from two healthy controls, the
336 patient, the published patient, a complete AR STAT1 deficient patient, a complete AR STAT2
337 deficient patient, a complete AR TYK2 deficient patient and a complete AR IFN-αR1 deficient
338 patient (Fig. 6D). We checked their ability to phosphorylate both STAT1 and STAT2 after
339 stimulation with IFN-α by western blotting. Phospho-STAT2 was detected after stimulation in

the healthy controls and the STAT1$^{-/-}$ patient, while the IFN-αR1$^{-/-}$, STAT$^{2-/-}$ and TYK2$^{-/-}$ patients had no response. Both the patient and the previously published patient displayed levels of STAT2 phosphorylation comparable to the healthy controls. Phosphorylation of STAT1 was detected in the healthy controls and the STAT2$^{-/-}$ patient but not in the STAT1, IFN-αR1, and TYK2 deficient patients. The patient displayed a level of STAT1 phosphorylation comparable to that of the healthy controls, whereas the previously published patient showed a slightly lower level. For TYK2 phosphorylation, as well as for STAT2 phosphorylation, the patient and the previously published patient responded similarly to the healthy controls (Fig. 6E). We also looked at p-STAT1 levels by flow cytometry in a healthy control, the patient, the published patient a complete AR STAT1 deficient patient and a complete AR IFN-αR1$^{-/-}$ deficient patient. We stained the cells for p-STAT1 after stimulation with IFN-α or IL-27 (Fig. 6F). The healthy control displayed an increase in p-STAT1 levels after both stimulations, whereas the STAT1-/- negative control did not (Fig. 6F). As expected, the IFN-αR1-/- control didn't respond to IFN-α while still responding to the other cytokines (Fig. 6F). Both the patient and the published patient displayed an increase in p-STAT1 comparable to that of the healthy control after IFN-α activation (Fig. 6F). However, after IL-27 activation, the patient had a diminished response, whereas the published patient had a response comparable to the healthy control. Therefore, both the western blots and the FACS of EBV-B cells from the patient showed a severe impairment of the IFN-γ response, in terms of STAT1 phosphorylation, but not of the IFN-α.

Response to IFNs in the patient's fibroblasts is similar to healthy controls

We compared the early response to IFN-γ of SV40-fibroblasts and primary fibroblasts from two healthy controls, the patient, the previously published patient (11), a complete STAT1 deficient patient and a complete IFN-γR1 patient. We performed western blotting to check the ability of these cells to phosphorylate STAT1 (p-Y701-STAT1) after stimulation with IFN-γ

(Fig. 7A-B). The healthy controls produced p-STAT1 after stimulation with IFN-γ, as did the published patient and the STAT1$^{-/-}$ and IFNγR1$^{-/-}$ deficient patients displayed no response. The patient also displayed a response to IFN-γ stimulation, similar to that of the healthy controls. Therefore, for IFN-γ, the patient's SV40-fibroblasts and primary fibroblasts displayed responses comparable to that of the healthy controls. We also assessed the late response to IFN-γ in SV40-fibroblasts from two healthy controls, the patient, the previously published patient and a complete STAT1 deficient patient. We studied the induction of HLA-DR after stimulation by several doses of IFN-γ for 48h by FACS staining (Fig. 7C). For all doses, the healthy controls displayed an induction of HLA-DR (the higher dose, the stronger the induction) while the STAT1 deficient patient had no response. The patient showed an induction of HLA-DR for all doses of IFN-γ, comparable to the healthy controls, as did the previously published patient. Therefore, all the western blots and the FACS of fibroblasts showed that the patient's fibroblasts had no defect in response to IFN-γ. We also compared the early response to IFN-α of SV40-fibroblasts and primary fibroblasts from two healthy controls, the patient, the previously published patient (11), a complete IFN-αR1 deficient, a complete STAT1 deficient patient and a complete STAT2 deficient patient. We performed western blotting to check the ability of these cells to phosphorylate STAT1 and STAT2 after stimulation with IFN-α (Fig. 7D-E). In both cell lines, the healthy controls produced p-STAT2 after stimulation with IFN-α, whereas the STAT1, STAT2 and IFN-αR1deficient patients displayed no response. The published patient and the patient showed a phosphorylation of STAT2 comparable to the healthy controls after stimulation (Fig. 7D-E). Additionally, in both cell lines, the healthy controls and the STAT2 deficient patient produced p-STAT1 after stimulation with IFN-α, whereas the published patient displayed a lower response and the STAT1 and IFN-αR1deficient patients displayed no response. The patient showed a phosphorylation of STAT1 comparable to the healthy controls after stimulation (Fig. 7D-E). Therefore, in both cell lines, the patient showed

a normal early response to IFN-α. We also assessed the late response to IFN-α in SV40-fibroblasts from one healthy control, the patient, the previously published patient, a complete IFN-αR1 deficient, a complete STAT1 deficient patient and a complete STAT2 deficient patient. We studied the induction of HLA class I after stimulation by several doses of IFN-α or by TNF-α for 72h by FACS staining (Fig. 7F). All the individuals responded to TNF-α. For all doses of IFN-α, the healthy control displayed an induction of HLA class I (the higher dose, the stronger the induction) while the IFN-αR1 deficient patient had no response, and the STAT1 and STAT2 deficient patients had diminished responses. The patient showed an induction of HLA class I for all doses of IFN-α, comparable to the healthy control, as did the previously published patient. Therefore, all the western blots and the FACS of fibroblasts showed that the patient's fibroblasts had no defect in response to IFN-α either.

Discussion

We report here a patient of Algerian descent with two compound heterozygous mutations in *JAK1,* c.1970C>G/p.C657S and c.2108_2115+15del. The JAK1 mutation underlying a novel form of AR partial JAK1 deficiency, responsible of isolated MSMD. This defect caused osteomyelitis caused by EM in absence of severe viral infections. This finding contrast with the patient previously described, who suffered syndromic MSMD characterized clinically by mycobacterial and severe viral infectious diseases. The c.2108_2115+15del deletion leads to three splice variants (c.1756_2115del, c.1900_2115del and c.1988_2115del) that are all LOF in response to IFNs in a stable overexpression system, while the missense mutation was hypomorphic in response to IFN-γ but not to IFN-α. In terms of cell lines of patient, EBV-B cells displayed an impaired response to IFN-γ but not to IFN-α and the cellular phenotype is even less severe in fibroblasts. These findings differ from the first AR partial JAK1 deficient patient, as even though both EBV-B cells display a similar response to IFN-γ, the previously published patient's cells also displayed a slightly diminished response to IFN-α. That difference is much more notable in the fibroblasts, especially the primary fibroblasts, where the published patient's cells had a marked defect after IFN-α stimulation that is not present in the patient. Those differences at the cellular level could explain the difference of clinical phenotype. Indeed, both patients suffered from mycobacterial infections from a young age, which can be explained by the defect in the IFN-γ response in the lymphoid (EBV-B) cells. The first published patient had a defect in response to IFN-α and he also suffered from various viral infections (11). Conversely, the patient describe here, was clinically free for severe viral infection and intrinsically the response of IFN-α was intact. Even more, this new patient differs clinically to those with PID caused by bi-allelic mutations in *IFNAR1*, *IFNAR2, STAT1*, *STAT2* or *IRF9* (50-55). Future studies are needed to test the other pathways involved in the control of viral infections.

Another striking difference in between the two JAK1 deficient patients is the lack of cancer in the patient studied here. It is possible that the early apparition of a bladder cancer in the published patient is merely a coincidence. The pathogenesis of cancer disease in MSMD is not necessarily related with the IFN-γ immunity. Very few patients with malignancies have been reported in MSMD, such as Kaposi sarcoma, liver cancer, pineal germinoma, cutaneous squamous cell carcinoma, B-cell lymphoma and bladder cancer (1, 11). Numerous *JAK1* somatic mutations have been reported in patients with diagnosis of cancers and leukemia, including LOF mutations (26), so it is more likely that hypomorphic *JAK1* germinal mutations cause susceptibility to cancer or that the infection or persistent inflammation indirectly induce the apparition of a cancer. The patient is however younger than the published patient was when his bladder cancer manifested. Somatic *JAK1* LOF mutations are especially associated to gynecologic cancers, most notably uterus and endometer cancers (26). Indeed, the patient reported here and other patients with MSMD require a particular surveillance of tumors.

The identification of partial AR JAK1 deficiency as new genetic aetiology for isolated MSMD bridges the gap in the IFN-γ response pathway in between the IFN-γ receptors and STAT1. Indeed, mutations in the *IFNGR1*, *IFNGR2* and *STAT1* genes were reported to cause MSMD (1, 6), with various degrees of clinical severity depending on the residual IFN-γ function (1,6). Complete AR IFN-γR1 and IFN-γR2 deficiencies leads to a complete absence of the response to IFN-γ and severe mycobacterial infections, requiring aggressive treatment for control of mycobacterial diseases. Partial AR IFN-γR1 and IFN-γR2 deficiency leads to a diminished but not abolished response to IFN-γ, and a milder infectious phenotype (1, 4-6, 37-41). Partial autosomal dominant (AD) STAT1 deficiency leads to a partial response to IFN-γ and normal response to IFN-α and a milder clinical phenotype for mycobacteria (1, 42, 44, 45). Clinically, the first partial AR deficiency of JAK1 described is similar to partial AR STAT1 deficiency in terms of phenotype, with mycobacterial and viral infections from a young age

(11). However, the new form we describe here is closer to partial AR IFN-γR1 deficiency (1, 38, 41), partial AR IFN-γR2 deficiency (1, 4, 5, 39, 40) or partial AD IFN-γR1 (1, 41, 46) or partial AD STAT1 deficiency (1, 42, 43), with mycobacterial infections only. Moreover, several patients with partial AR IFN-γR1 and suffering from mycobacterial osteomyelitis were at first wrongly diagnosed with Langerhans cell histiocytosis (41, 47) before being treated for mycobacterial infections, which is similar to what happened to the patient we studied. Thus, a partial defect to IFN-γ response seems to predispose not only to mycobacterial infections but particularly to osteomyelitis. Indeed, nearly two thirds of patients suffering from AR partial IFN-γR1 deficiency, around 70% of patients with partial AD IFN-γR1 deficiency, a third of patients presenting partial AR IFN-γR2 deficiency, half the patients with partial AD or AR STAT1 deficiency and now 100% (two out of two) of patients with a partial AR JAK1 deficiency developed osteomyelitis (1, 41, 42, 48). It would therefore be interesting to perform systemic genetic screening on patients suffering from osteomyelitis, to check for the presence of mutations of the IFN-γ response, possibly involving new genes. Future functional approaches using PBMCs, human macrophages or selected cell types are necessary to test the impact of *JAK1* mutations in the control of intracellular pathogens in bone.

Material and methods

Research involving Human Participants

The research was approved by and performed following the requirements of the institutional ethics committees of Necker Hospital for Children Sick, Paris, France, and The Rockefeller University Hospital, New York, USA. Informed consent was obtained for all patients and healthy control volunteers reported in the study.

Whole exome-sequencing (WES), PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted from whole blood of the patient, her parents, her brother and a healthy control with the iPrep PureLink gDNA Blood kit and the iPrep instruments from Thermo Fisher Scientific, using manufacturer's instructions. WES was done for the patient from 3 µg of DNA. SureSelect Human All Exon 50Mb kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used for exome capture and a HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA), generating 100-base reads was used for paired-end sequencing. Briefly, sequences were aligned to the GRCh37 reference built of the human genome using the BWA aligner (49). PCRs were done on genomic DNA with Taq polymerase (Invitrogen), using a GeneAmp PCR system (9700; Applied Biosystems). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels, purified by centrifugation through Sephadex G-50 Superfine resin (GE Healthcare) and sequenced with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing products purification was done by centrifugation through Sephadex G-50 Superfine resin, and sequences were analyzed with an ABI Prism 3700 apparatus (Applied Biosystems). The sequences were aligned to the genomic sequence of *JAK1* (NM_002227.3) using the Genealysis software.

RNA extraction, qPCR and TOPO-TA cloning

PBMC were extracted from heparin-treated whole blood from the patient and a healthy control, by centrifugal separation through a Ficoll gradient and washing with RPMI 1640. Total RNA was then extracted from PBMCs using RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004), while RNA from EBV-B cells, Simian Virus 40-immortalized fibroblasts (SV40-fibroblasts) and primary fibroblasts was extracted with the RNeasy Mini kit (Qiagen, 74104). Reverse transcription was then performed using Oligo(dT) and Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) using the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was used for qPCR, using a *JAK1* probe covering exons 3 and 4 (Hs01026997_m1, Thermo Fisher) and a *GAPDH* probe (4326317E, Applied Biosystems) as the house-keeping control. TaqMan Fast Universal PCR Master Mix was used as buffer and the reaction was done using a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Amplification of *JAK1* exon 12 to exon 21 cDNA was done by PCR with Taq polymerase (Invitrogen). PCR products were purified with QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). TOPO TA reaction was carried out with TOPO TA kit (to check) and products were transformed into TOP 10 competent cells (Invitrogen, C404006), spread onto LB agar plates supplemented with Ampicillin and Xgal. PCRs on 100 colonies from both the healthy control and the patient were carried out with Taq polymerase (Invitrogen), analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels, purified by centrifugation through Sephadex G-50 Superfine resin (GE Healthcare) and sequenced with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing products purification was done by centrifugation through Sephadex G-50 Superfine resin, and sequences were analyzed with an ABI Prism 3700 apparatus (Applied Biosystems). The sequences were aligned to the cDNA of *JAK1* (NM_002227.3) using the Genealysis software.

Plasmid cloning, mutagenesis, transient transfection and retrotransduction

*p*Rc/CMV, *p*Rc/CMV-*JAK1* WT-VSVG and *p*Rc/CMV-*JAK1* K908E-VSVG were provided by Sandra Pellegrini and transformed into TOP 10 competent cells (Invitrogen, C404006). Multiplied plasmid extraction was done with HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12663). Mutated plasmids (p.C657S, p.P733L/P832S, p.N833S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) were generated by site-directed mutagenesis (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase: Agilent #6006672) according to the manufacturers' instruction, then digested by DpnI digestion (New England Biolabs). These plasmids were then used top transfect HEK293T cells and U4C cells using X-treme GENE9 transfection reagent (Sigma Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Virus production and retrotransduction of U4C were performed as described previously (8). Briefly, WT or mutated *JAK1* cDNA was subcloned in the pLZRS-IRES-ΔNGFR retroviral plasmid. Those plasmids were then transfected in Phoenix A cells using Xtreme GENE9 and the resulting retroviral particles were harvested and concentrated using Retro-X concentrator. The viral solutions thus obtained were used to transduce U4C cells. The retrotransduced cells were then purified by MACS sorting.

VirScan

Patient serum was analyzed by VirScan as previously described (50). Briefly, an oligonucleotide library encoding 56 amino acid peptides tiling across the genomes of 206 viral species was synthesized on a releasable DNA microarray. They were subsequently cloned into T7 phage for expression. Patient serum was added to the phage library. Immunoprecipitation with Protein A and G beads was performed afterwards. Enriched peptides were identified by PCR amplification and sequencing the peptide cassette consisted of cloned oligonucleotide embedded in immunoprecipitated T7 phages using Illumina platform.

Cell culture and stimulation

EBV-B cells were cultured in RPMI supplemented with 10% FBS at 37°C, 5% CO_2, SV40-fibroblasts, HEK293T and U4C cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, at 37°C and 5% CO_2. EBV-B cells, SV40-fibroblasts and U4C cells were stimulated with the indicated doses of IFN-γ (Imukin, Boehringer Ingelheim), IFN-α2b (IntronA, Schering Plough) and IL-27 (2526-IL, R&D) for the indicated times. Whole blood assay was done on heparin-treated blood samples from healthy controls and from the patient. Blood samples were activated with BCG or with BCG plus IFN-γ or IL-12 (R&D). After 48 hours of stimulation, the supernatants were collected and used to perform ELISA against IFN-γ, IL-12p70, or IL-12p40, using the human Quantikine HS kits for IL-12p70 and IL-12p40 from R&D Systems and the human Pelipair IFN-γ kit from Sanquin, according to the manufacturer's instructions.

Cell lysis and immunoblotting

Cells were lysed in modified RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA) supplemented with 1× Complete proteinase inhibitor cocktail mix (Roche), 1× phosSTOP (Roche), 100µM DTT, 1 mM PMSF, and 1 mM Na_3VO_4. After incubation with Laemmli buffer and NuPage (Invitrogen), protein samples were subjected to SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels (Biorad) and transferred on PVDF membranes (Biorad) using the Trans-Blot Turbo Transfer system (Biorad). We used antibodies against phospho-JAK1 (3331S, Cell Signaling), JAK1 N-ter (sc-376996, Santa Cruz), JAK1 Cter (3332S, Cell Signaling), VSVG Tag (#903901, Biolegend), phospho-STAT1 (612133, BD Biosciences), STAT1 (610116, BD Biosciences), phospho-STAT2 (sc-21689-R, Santa Cruz), STAT2 (sc-514193, Santa Cruz), GAPDH (14C10, Cell Signaling) and α-tubulin (sc-23948, Santa Cruz). ECL western blotting detection reagents (Biorad) or SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) were used to reveal bound antibodies.

590 **Flow cytometry (FACS)**

591 To assess STAT1 phosphorylation in EBV-B cells, we stained them with Aqua
592 Live/Dead Cell Stain kit (Thermo Fisher Scientific), activated them with IFN-α, IFN-γ or IL-
593 27 for 30 minutes and permeabilized their nuclei with BD Phosflow buffers. We then washed
594 then in cold PBS and incubated them for 1h at 4°C with an antibody against phospho-STAT1
595 (612597, BD Biosciences) or with the corresponding isotype (565357, BD Biosciences). After
596 washing three times, samples were acquired on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter)
597 and results were analysed with FlowJo as previously described (5). To assess HLA-DR
598 expression in U4Cs and SV40-fibroblasts, cells were activated 72h with the indicated doses of
599 IFN-γ. We then washed then in cold PBS and incubated them for 45 min at 4°C with an antibody
600 against HLA-DR (560944, BD Pharmingen) or with the corresponding isotype (555573, BD
601 Pharmingen). After washing three times, samples were acquired on a Gallios flow cytometer
602 (Beckman Coulter) and results were analysed with FlowJo. To assess HLA class I expression
603 in U4Cs and SV40-fibroblasts, cells were activated 72h with 1000 IU/mL of IFN-α or IFN-γ.
604 We then washed then in cold PBS and incubated them for 45 min at 4°C with an antibody
605 against HLA class I (311406, Biolegend) or with the corresponding isotype (400214,
606 Biolegend). After washing three times, samples were acquired on a Gallios flow cytometer
607 (Beckman Coulter) and results were analysed with FlowJo.

608

609

610

611

612

613

Acknowledgements

We would like to thank the patients and their families for their collaboration, as well as both branches of the Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases for their support and helpful discussions. We also thank Cécile Patissier, Dominick Papandrea, Yelena Nemirovskaya and Céline Desvallées for administrative support. The Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases is funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases grant number 5R37AI095983, the Rockefeller University, the St. Giles Foundation, National Institute of Health and Medical Research (INSERM), Paris Descartes University, the Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases Laboratory of Excellence (ANR-10-LABX-62-IBEID) and the French National Research Agency under the "Investments for the future" program (grant number ANR-10-IAHU-01), ANR-GENMSMD (ANR-16-CE17-0005-01 for JB) and SRC2017 (for JB). VJJ is supported by LABEIX-IBEID. CO-Q is supported by ANR-HGDIFD (ANR-14-CE15-006-01). ALN is supported by ANR-GENMSMD (ANR-16-CE17-0005-01) and Imagine Institute.

Authorship

VJJ, J-LC and JB, designed the study and wrote the manuscript. VJJ identified the mutations, performed familial segregation; and all experiments of cloning, transfection and retrotransduction. VJJ, JR, PB, MP A-LN and LL-D performed the experiments by flow cytometry and culture cells. MRa, FAA and NM performed VirScan. MRo, CO-Q, EJ, LA, DB, SOB, SP, QZ, SB-D, and S-YZ provided expertise and feedback. J-LC and JB secured funding. JD provided material from the patient. JD and JFE conducted the medical follow-up and provided expertise and critical reading. All the authors critically reviewed the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Disclosures of Conflicts of Interest. The authors have no conflict of interest to declare.

Informed consent. Written informed consent was obtained from the guardians of the patient.

References

1. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. Semin Immunol. 2014;26(6):454-70.
2. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. Annu Rev Immunol. 2002;20:581-620.
3. Kong XF, Martinez-Barricarte R, Kennedy J, Mele F, Lazarov T, Deenick EK, et al. Disruption of an antimycobacterial circuit between dendritic and helper T cells in human SPPL2a deficiency. Nat Immunol. 2018;19(9):973-85.
4. Martinez-Barricarte R, Markle JG, Ma CS, Deenick EK, Ramirez-Alejo N, Mele F, et al. Human IFN-gamma immunity to mycobacteria is governed by both IL-12 and IL-23. Sci Immunol. 2018;3(30).
5. Oleaga-Quintas C, Deswarte C, Moncada-Vélez M, Metin A, Krishna Rao I, Kanık-Yüksek S, et al. A purely quantitative form of partial recessive IFN-γR2 deficiency caused by mutations of the initiation or second codon. Human Molecular Genetics. 2018.
6. Rosain J, Kong XF, Martinez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramirez-Alejo N, Markle J, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update. Immunol Cell Biol. 2019;97(4):360-7.
7. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, et al. IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. Science. 2015;349(6248):606-13.
8. Martinez-Barricarte R, de Jong SJ, Markle J, de Paus R, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, et al. Transduction of Herpesvirus saimiri-Transformed T Cells with Exogenous Genes of Interest. Current protocols in immunology. 2016;115:7 21C 1-7 C 12.
9. Boisson-Dupuis S, Ramirez-Alejo N, Li Z, Patin E, Rao G, Kerner G, et al. Tuberculosis and impaired IL-23-dependent IFN-gamma immunity in humans homozygous for a common TYK2 missense variant. Sci Immunol. 2018;3(30).
10. Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramirez-Alejo N, Kilic SS, et al. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. J Exp Med. 2015;212(10):1641-62.
11. Eletto D, Burns SO, Angulo I, Plagnol V, Gilmour KC, Henriquez F, et al. Biallelic JAK1 mutations in immunodeficient patient with mycobacterial infection. Nat Commun. 2016;7:13992.
12. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. The Biochemical journal. 2014;462(1):1-13.
13. Wilks AF. The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target. Seminars in cell & developmental biology. 2008;19(4):319-28.
14. Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. Mol Cell Biol. 1991;11(4):2057-65.
15. Wilks AF, Kurban RR, Hovens CM, Ralph SJ. The application of the polymerase chain reaction to cloning members of the protein tyrosine kinase family. Gene. 1989;85(1):67-74.
16. Hammaren HM, Virtanen AT, Raivola J, Silvennoinen O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. Cytokine. 2018.
17. Toms AV, Deshpande A, McNally R, Jeong Y, Rogers JM, Kim CU, et al. Structure of a pseudokinase-domain switch that controls oncogenic activation of Jak kinases. Nat Struct Mol Biol. 2013;20(10):1221-3.
18. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK-Receptor Interactions. Frontiers in endocrinology. 2017;8:71.

19. Radtke S, Haan S, Jorissen A, Hermanns HM, Diefenbach S, Smyczek T, et al. The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. J Biol Chem. 2005;280(27):25760-8.
20. Zhang D, Wlodawer A, Lubkowski J. Crystal Structure of a Complex of the Intracellular Domain of Interferon lambda Receptor 1 (IFNLR1) and the FERM/SH2 Domains of Human JAK1. J Mol Biol. 2016;428(23):4651-68.
21. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. Annual review of medicine. 2015;66:311-28.
22. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. Biochemical pharmacology. 2006;72(11):1538-46.
23. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. Cell. 1998;93(3):373-83.
24. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994;264(5164):1415-21.
25. Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, Fremont DH, Kasai Y, Molitoris A, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2008;111(9):4809-12.
26. Ren Y, Zhang Y, Liu RZ, Fenstermacher DA, Wright KL, Teer JK, et al. JAK1 truncating mutations in gynecologic cancer define new role of cancer-associated protein tyrosine kinase aberrations. Sci Rep. 2013;3:3042.
27. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, et al. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. J Exp Med. 2008;205(4):751-8.
28. Jeong EG, Kim MS, Nam HK, Min CK, Lee S, Chung YJ, et al. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. Clin Cancer Res. 2008;14(12):3716-21.
29. Albacker LA, Wu J, Smith P, Warmuth M, Stephens PJ, Zhu P, et al. Loss of function JAK1 mutations occur at high frequency in cancers with microsatellite instability and are suggestive of immune evasion. PLoS One. 2017;12(11):e0176181.
30. Del Bel KL, Ragotte RJ, Saferali A, Lee S, Vercauteren SM, Mostafavi SA, et al. JAK1 gain-of-function causes an autosomal dominant immune dysregulatory and hypereosinophilic syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(6):2016-20 e5.
31. Gordon GM, Lambert QT, Daniel KG, Reuther GW. Transforming JAK1 mutations exhibit differential signalling, FERM domain requirements and growth responses to interferon-gamma. The Biochemical journal. 2010;432(2):255-65.
32. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. Nat Genet. 2014;46(3):310-5.
33. Itan Y, Shang L, Boisson B, Ciancanelli MJ, Markle JG, Martinez-Barricarte R, et al. The mutation significance cutoff: gene-level thresholds for variant predictions. Nat Methods. 2016;13(2):109-10.
34. Muller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. Nature. 1993;366(6451):129-35.
35. Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, Feng J, Guschin D, Briscoe J, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. Mol Cell Biol. 1997;17(2):695-706.

762 36. Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, Watling D, Harpur AG, Wilks AF, et al. Kinase-
763 negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an
764 antiviral state. EMBO J. 1996;15(4):799-809.
765 37. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-
766 gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. N Engl J
767 Med. 1996;335(26):1956-61.
768 38. Kong XF, Vogt G, Chapgier A, Lamaze C, Bustamante J, Prando C, et al. A novel form
769 of cell type-specific partial IFN-gammaR1 deficiency caused by a germ line mutation of the
770 IFNGR1 initiation codon. Hum Mol Genet. 2010;19(3):434-44.
771 39. Kong XF, Vogt G, Itan Y, Macura-Biegun A, Szaflarska A, Kowalczyk D, et al.
772 Haploinsufficiency at the human IFNGR2 locus contributes to mycobacterial disease. Hum Mol
773 Genet. 2013;22(4):769-81.
774 40. Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Bogunovic D, Kong XF, Blancas-Galicia L,
775 Tirpan C, et al. Partial IFN-gammaR2 deficiency is due to protein misfolding and can be
776 rescued by inhibitors of glycosylation. Blood. 2013;122(14):2390-401.
777 41. Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J, Vincent QB, Fernandez-Perez L, Chapgier
778 A, et al. Partial recessive IFN-gammaR1 deficiency: genetic, immunological and clinical
779 features of 14 patients from 11 kindreds. Hum Mol Genet. 2011;20(8):1509-23.
780 42. Boisson-Dupuis S, Kong XF, Okada S, Cypowyj S, Puel A, Abel L, et al. Inborn errors
781 of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious
782 phenotypes. Curr Opin Immunol. 2012;24(4):364-78.
783 43. Chapgier A, Kong XF, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Averbuch D, Feinberg J, et al.
784 A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. J Clin Invest. 2009;119(6):1502-14.
785 44. Chapgier A, Wynn RF, Jouanguy E, Filipe-Santos O, Zhang S, Feinberg J, et al. Human
786 complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but
787 immunity to some low virulence viruses in vivo. J Immunol. 2006;176(8):5078-83.
788 45. Kong XF, Ciancanelli M, Al-Hajjar S, Alsina L, Zumwalt T, Bustamante J, et al. A
789 novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons.
790 Blood. 2010;116(26):5895-906.
791 46. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis
792 S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to
793 mycobacterial infection. Nat Genet. 1999;21(4):370-8.
794 47. Edgar JD, Smyth AE, Pritchard J, Lammas D, Jouanguy E, Hague R, et al. Interferon-
795 gamma receptor deficiency mimicking Langerhans' cell histiocytosis. J Pediatr.
796 2001;139(4):600-3.
797 48. Doffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, Fondaneche MC, Stephan JL, Emile JF, et al.
798 Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-
799 Guerin and Mycobacterium abscessus infection. J Infect Dis. 2000;181(1):379-84.
800 49. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler
801 transform. Bioinformatics. 2009;25(14):1754-60.
802 50. Hernandez N, Bucciol G, Moens L, Le Pen J, Shahrooei M, Goudouris E, et al. Inherited
803 IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse to measles and yellow fever live
804 vaccines. J Exp Med. 2019; Jul 3. Pii: jem.20182295.
805 51. Duncan CJ, Mohamad SM, Young DF, Skelton AJ, Leahy TR, Munday DC, et al.
806 IFNRA2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. Sci Transl Med 2015; 7(307):307ra154.
807 52. Hoyos-Bachiloglu R, Chou J, Sodroski CN, Beano A, Bainter W, Angelova M, et al. J
808 Clin Invest. 2017; 127(12): 4415-4420.
809 53. Hambleton S, Goodbourn S, Young DF, Dickinson P, Mohamed SM, Valappil M, et
810 al. STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. Proc Natl Acad Sci USA.
811 2013; 110(8): 3053-8.

54. Moens L, Van Eyck L, Jochmans D, Mitera T, Frans G, Bossuyt X, et al. J Allergy Clin Immunol 2017 ; 139(6) : 1995-1997.
55. Hernandez N, Melki I, Jing H, Habib T, Huang SSY, Danielson J, et al. Life-threatening influenza pneumonitis in a child with inherited IRF9 deficiency. J Exp Med. 2018; 215 (10): 2567-2585.

Figure legends

Figure 1. Identification of compound heterozygous *JAK1* mutations in patient with mycobacterial infectious disease. (A) Evolution of the nasal lesion during antimycobacterial treatment, from day 1 (D1) to 13 months (M13) after. (**B**) Familial segregation of the p.C657S and c.2108_2115+15del mutations. Kindred is from Algeria living in France. E? stands for not genotyped. Healthy individuals are shown in white. Solid black shapes indicate patient with mycobacterial infections. Each generation is designated by a roman numeral (I-II), and each individual by an Arabic number. **(C)** Electropherogram showing the p.C657S and c.2108_2115+15del mutations in patient, parents and brother. **(D)** Schematic diagram of the *JAK1* gene and JAK1 protein with all previously described germline mutations and the p.C657S and c.2108_2115+15del mutations described here (in red). Coding exons are numbered with roman numerals and delimited by a vertical bar. Regions corresponding to the FERM domain (34-420), SH2 domain (439-544), pseudokinase domain (583-855), and kinase domain (875-1153) are indicated. The mutations marked in red are to characterize. The mutation marked in green is gain of function. The mutation marked in blue is hypomorphic. The mutation marked in black is neutral. **(E)** Schematic representation of patient's alleles, compared to wild-type (WT) allele.

Figure 2. JAK1 expression levels in patient's cells. (**A**) Quantitative PCR of the *JAK1* cDNA from EBV-B cells from the patient and the published patient carrying bi-allelic mutations of the *JAK1* gene. (**B**) Quantitative PCR of the *JAK1* cDNA from SV40-fibroblasts from the

patient and the published patient carrying bi-allelic mutations of the *JAK1* gene. (**C**) Relative quantitative PCR of the *JAK1* cDNA from primary fibroblasts from the patient and the published patient carrying bi-allelic mutations of the *JAK1* gene. The results of panels A-C were normalized with *GAPDH* gene. (**D**) Protein were extracted from EBV-B cells from healthy controls, the patient and the published patient and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter antibody, with Tubulin as the loading control. (**E**) Protein were extracted from SV40-fibroblasts from healthy controls, the patient and the published patient and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter antibody, with Tubulin as the loading control. (**F**) Protein were extracted from primary fibroblasts from healthy controls, the patient and the published patient and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter antibody, with Tubulin as the loading control. The results shown in the figure 2 are representative of two independent experiments.

Figure 3. Impaired response to IFNs in transient transfection system. (**A**) U4C cells were left (NT) or were transiently transfected with empty plasmid (EV), *JAK1* plasmids corresponding to wild type (WT), mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known loss-of function, LOF, allele as negative control). Total lysis and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter, anti-JAK1 Cter and anti-VSVtag antibodies, with Tubulin as the loading control. (**B**) U4C cells were left (NT) or were transiently transfected with EV, *JAK1* plasmids corresponding to WT, mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known LOF allele as negative control). Total lysis and western blots were performed with anti-p-JAK1 and anti-JAK1 N-ter antibodies, with Tubulin as the loading control. (**C**) U4C cells were left (NT) or were transiently transfected with EV, *JAK1* plasmids corresponding to WT, mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known LOF allele as negative control). Cells were then stimulated 15 min with 10^3 IU/mL IFN-γ Total lysis and

865 western blots were performed with anti-p-JAK1, anti-JAK1 N-ter, anti-p-STAT1 and anti-
866 STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**D**) U4C cells were left (NT) or were
867 transiently transfected with EV, *JAK1* plasmids corresponding to WT, mutant alleles (p.C657S,
868 c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known LOF allele as
869 negative control). Cells were then stimulated 15 min with 10^3 IU/mL IFN-α Total lysis and
870 western blots were performed with anti-p-JAK1, anti-JAK1 N-ter, anti-p-STAT1 and anti-
871 STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. The results shown are representative of
872 three independent experiments.
873 **Figure 4. Impaired response to IFNs in retrotransduction system.** (**A-E**) 2C4 cells were
874 left and U4C cells were left (NT) or retrotransduced with empty plasmid (EV), *JAK1* plasmids
875 corresponding to wild type (WT), mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del,
876 c.1988_2115del) and p.K908E (known loss-of function, LOF, allele as negative control). (**A**)
877 Total lysis was done and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter, anti-JAK1 Cter
878 and anti-VSVtag antibodies, with Tubulin as the loading control. (**B**) Cells were left
879 unstimulated or stimulated for 15 min with 10^3 IU/mL IFN-γ. Total lysis was done and western
880 blots were performed with anti phospho-JAK1 and anti-JAK1 antibodies, with Tubulin as the
881 loading control. (**C**) Cells were left unstimulated or stimulated for 5 or 15 min with 10^3 IU/mL
882 IFN-γ. Total lysis was done and western blots were performed with anti phospho-STAT1 and
883 anti-STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**D**) Cells were left unstimulated
884 or stimulated for 5 or 15 min with 10^3 IU/mL IFN-α. Total lysis was done and western blots
885 were performed with anti phospho-JAK1 and anti-JAK1 antibodies, with Tubulin as the loading
886 control. (**E**) Cells were left unstimulated or stimulated for 5 or 15 min with 10^3 IU/mL IFNα.
887 Total lysis was done and western blots were performed with anti phospho-STAT1 and anti-
888 STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. The results shown are representative of
889 two independent experiments.

Figure 5. Late response to IFNs in retrotransduced U4C cells. (**A-C**) 2C4 cells were left and U4C cells were left (NT) or retrotransduced with empty plasmid (EV), *JAK1* plasmids corresponding to wild type (WT), mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known loss-of function, LOF, allele as negative control). (**A**) Cells were left unstimulated or stimulated for 72h with 10^3 IU/mL IFN-γ. HLA class I levels were assessed by flow cytometry. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Light gray line: isotype control or no stimulation (NS), continuous black line: 10^3 IU/mL IFN-γ stimulation. (**B**) Cells were left unstimulated or stimulated for 72h with 10^3 IU/mL IFN-α. HLA class I levels were assessed by flow cytometry. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Light gray line: isotype control or no stimulation (NS), continuous black line: 10^3 IU/mL IFN-α stimulation. (**C**) Cells were left unstimulated or stimulated for 72h with 10, 10^2 or 10^3 IU/mL IFN-γ. HLA class II levels were assessed by flow cytometry. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Light gray line: isotype control or no stimulation (NS), hyphenated medium gray line: 10 IU/ml IFN-γ stimulation, dotted dark gray line: 10^2 IU/mL IFN-γ stimulation, continuous black line: 10^3 IU/mL IFN-γ stimulation. The results shown are representative of two independent experiments.

Figure 6. Response to IFN-γ and IFN-α in patient's EBV-B cells. (A) EBV-B cells from healthy controls, the patient, the published patient, a $STAT1^{-/-}$ patient and an $IFN\gamma R1^{-/-}$ patient were stimulated with 10^5 IU/mL IFN-γ for 20 minutes. Total lysis was done and western blots were performed with anti-p-STAT1 and anti-STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**B**) Phosphorylation of STAT1 on Tyr-701 (p-STAT1) levels was measured by flow cytometry in the same cells with and without stimulation with 10^5 IU/mL IFN-γ for 30 minutes. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Gray line: isotype control or no stimulation (NS), continuous black line: indicated stimulation. (**C**) EBV-B cells from a healthy control, the patient, the published patient and a $STAT1^{-/-}$ patient were retrotransduced with WT

915 *JAK1* plasmid and stimulated with 10^5 IU/mL IFN-γ for 20 minutes. Phosphorylation of STAT1
916 on Tyr-701 (p-STAT1) levels were measured by flow cytometry. Overlapping histograms
917 relative to the mode are shown. Gray line: isotype control or no stimulation (NS), continuous
918 black line: stimulation. (**D-E**) EBV-B cells from healthy controls, the patient, the published
919 patient, an IFNαR1$^{-/-}$ patient, a STAT1$^{-/-}$ patient, a STAT2$^{-/-}$ patient and a TYK2$^{-/-}$ patient were
920 stimulated with 10^5 IU/mL IFN-α for 20 minutes. Total lysis was done and western blots were
921 performed with (**D**), anti-p-STAT2, anti-STAT2, anti-p-STAT1 and anti-STAT1 antibodies or
922 (**E**) with anti-p-TYK2 and anti-TYK2 antibodies. Tubulin was used as the loading control. (**F**)
923 Phosphorylation of STAT1 on Tyr-701 (p-STAT1) levels were measured by flow cytometry in
924 the same cells with and without stimulation with 10^5 IU/ml IFN-α or 100 ng/mL IL-27 for 30
925 minutes. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Gray line: isotype control or
926 no stimulation (NS), continuous black line: indicated stimulation. The results shown are
927 representative of three independent experiments.
928 **Figure 7. Response to IFNs in patient's SV40-fibroblasts.** (**A**) SV40-fibroblasts from healthy
929 controls, the patient, the published patient, a STAT1$^{-/-}$ patient and an IFNγR1$^{-/-}$ patient were
930 stimulated with 10^5 IU/mL IFN-γ for 20 minutes. Total lysis was done and western blots were
931 performed with anti-p-STAT1 and anti-STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control.
932 (**B**) Primary fibroblasts from healthy controls, the patient, the published patient, a STAT1$^{-/-}$
933 patient and an IFNγR1$^{-/-}$ patient were stimulated with 10^5 IU/mL IFN-γ for 20 minutes. Total
934 lysis was done and western blots were performed with anti-p-STAT1 and anti-STAT1
935 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**C**) SV40-fibroblasts from healthy controls, the
936 patient, the published patient and a STAT1$^{-/-}$ patient were stimulated with 10, 10^2 or 10^3 IU/mL
937 IFN-γ for 72 hours. HLA-DR levels were assessed by flow cytometry. Overlapping histograms
938 relative to the mode are shown. Light gray line: isotype control or no stimulation (NS),
939 hyphenated medium gray line: 10 IU/ml IFN-γ stimulation, dotted dark gray line: 10^2 IU/mL

IFN-γ stimulation, continuous black line: 10^3 IU/mL IFN-γ stimulation. (**D**) SV40-fibroblasts from healthy controls, the patient, the published patient, an IFNαR1$^{-/-}$ patient, a STAT1$^{-/-}$ patient and a STAT2$^{-/-}$ patient were stimulated with 10^5 IU/mL IFN-α for 20 minutes. Total lysis was done and western blots were performed with anti-p-STAT2, anti-STAT2, anti-p-STAT1 and anti-STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**E**) Primary fibroblasts from healthy controls, the patient, the published patient and a STAT1-/- patient were stimulated with 10^5 IU/mL IFN-α for 20 minutes. Total lysis was done and western blots were performed with anti-p-STAT1 and anti-STAT1 antibodies, with Tubulin as the loading control. (**F**) SV40-fibroblasts from healthy controls, the patient, the published patient, an IFNαR1$^{-/-}$ patient, a STAT1$^{-/-}$ patient and a STAT2$^{-/-}$ patient were stimulated with TNF-α or IFN-α (10, 10^2 or 10^3 IU/mL) for 72 hours. HLA class I levels were assessed by flow cytometry. Overlapping histograms relative to the mode are shown. Light gray line: isotype control or no stimulation (NS), hyphenated medium gray line: 10 IU/ml IFN-α stimulation, dotted dark gray line: 10^2 IU/mL IFN-α stimulation, continuous black line: 10^3 IU/mL IFN-α stimulation, hyphenated black line: TNF-α stimulation.

Legends of supplemental figures

Supplemental Figure 1. Whole exome-sequencing and analysis of *JAK1* mutations. (**A**) Strategy used for WES analysis. (**B**) CADD score of the published *JAK1* mutations, the reported heterozygous and homozygous variations in public databases and of the mutations p.C657S and c.2108_2115+15del. **(C)** Conservation of exon 14 of JAK1 across species. C657 is in red. (**D**) PCR of a fragment of *JAK1* covering exons 12 to 21, on cDNA from EBV-B cells from the patient and published patient.

Supplemental Figure 2. JAK1 protein levels and defect in autophosphorylation in transfected HEK293T cells. (A) HEK293T cells were left (NT) or were transiently transfected with empty plasmid (EV) and *JAK1* plasmids corresponding to wild type (WT), mutant alleles

(p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (known loss-of function, LOF, allele as negative control). Total lysis was done and western blots were performed with anti-JAK1 N-ter, anti-JAK1 C-ter and anti-VSVtag antibodies, with Tubulin as the loading control. (**B**) HEK293T cells were left (NT) or were transiently transfected with EV, and *JAK1* plasmids corresponding to WT, mutant alleles (p.C657S, c.1756_2115del, c.1900_2115del, c.1988_2115del) and p.K908E (LOF allele as negative control). Total lysis was done and western blots were performed with anti-p-JAK1 and anti-JAK1 N-ter antibodies, with Tubulin as the loading control. The results shown are representative of two independent experiments.

Supplemental Figure 3. Normal secretion of IFN-γ and IL-12 by whole blood assays. (A) IFN-γ levels (pg/ml) in whole blood from healthy controls (n=16), and the patient, either not stimulated (NS) or stimulated for 48 hours with live BCG alone or live BCG plus IL-12, as assessed by ELISA. Each symbol represents a value from an independent test and horizontal bars represent means. **(B)** IL-12p40 levels in whole blood from local controls (n=16), travel controls (n=16) and the patient, either not stimulated (NS) or stimulated for 48 hours with live BCG alone or live BCG plus IFN-γ, as assessed by ELISA. Each symbol represents a value from an independent test and horizontal bars represent means. (**C**) IL-12p70 levels in whole blood from healthy controls (n=14) and the patient, either not stimulated (NS) or stimulated for 48 hours with live BCG alone or live BCG plus IFN-γ, as assessed by ELISA. Each symbol represents a value from an independent test and horizontal bars represent means.

Table 1 – Result of immunophenotyping in peripheral blood from patient performed at the age of 7 years old

Subset	Patient	Normal range
CD3+ (/µL)	2510	1200-2600
CD3+ (%)	62	60-76
αβ+/CD3+ (%)	91.5	
γδ+/CD3+ (%)	8,5	
CD3+CD4+ (/µL)	**1619**	**650-1500**
CD3+CD4+ (%)	40	31-47
CD45RO+/CD4+ (%)	30	
CD45RA+/CD4+ (%)	70	58-70
CD31+CD45RA+/CD4+ (%) *Recent thymic emigrant T CD4 cells*	48	43-55
CD3+CD8+ (/µL)	688	370-1100
CD3+CD8+ (%)	**17**	**18-35**
CCR7+CD45RA+/CD8+ (%) *Naïve T CD8 cells*	**31**	**52-68**
CCR7+CD45RA-/CD8+ (%) *Central memory T CD8 cells*	**5**	**3-4**
CCR7-CD45RA-/CD8+ (%) *Effector memory T CD8 cells*	**53**	**11-20**
CCR7-CD45RA+/CD8+ (%) *TEMRA CD8 cells*	**11**	**16-28**
CD19+ (/µL)	**1336**	**273-860**
CD19+ (%)	**33**	**6.1-25.2**
CD27+ (%)	15	8.1-33.3
IgD+CD27- (%)	78	59.7-88.4
IgD+CD27+ (%)	4	3.1-18
IgD-CD27+ (%)	11	2.9-17.4
CD24++CD38++ (%) *Transitionnal B cells*	2	
CD21++CD24+ (%) *Mature B cells*	83	
CD24-CD38++ (%) *Plasmablasts*	0.2	
CD21lowCD38dim (%) *Autoreactive B cells*	3	
CD3-CD16+CD56+ (/µL)	202	100-480
CD3-CD16+CD56+ (%)	5	4-17

Table 2 – Results from assessment of immunoglobulins levels at the age of 7 years old in patient

	Value	Normal range
IgG	9.84 g/l	5.98-11.11
IgA	0.51 g/l	0.49-1.53
IgM	1	0.56-1.59

Table 3 - Antibodies against common viruses assessed at the age of 7 years old in patient.

Parameters	**Results**	**Threshold**
IgG anti-HSV-1	<1.1	>1.1
IgG anti-HSV-2	<1.1	>1.1
IgG anti-VZV	ND	>135
IgG anti-EBV	>750	>20
IgG anti-CMV	173	>14
IgG anti-HAV	ND	>1
IgG anti-Parvovirus B19	42	>1.1
IgG anti-Measles	>300	>16
IgG anti-Mumps	ND	>11
IgG anti-Rubella	ND	>10
IgG anti-Poliovirus 1	5	>5
IgG anti-Poliovirus 3	30	>5

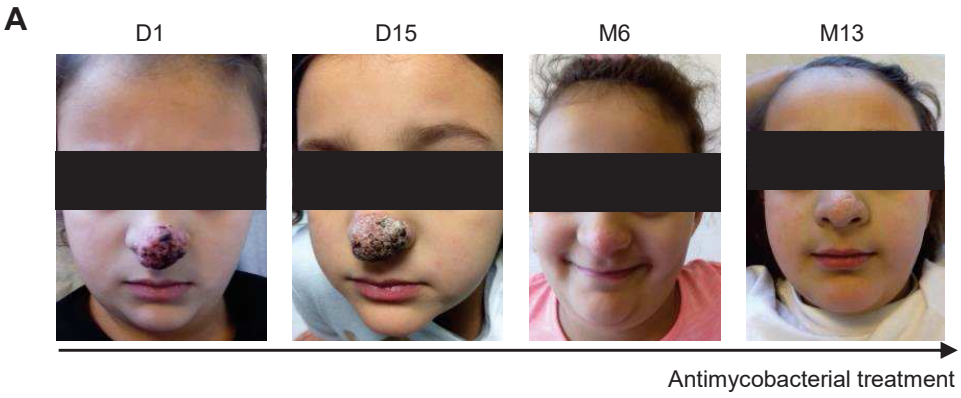
ND : Not Done

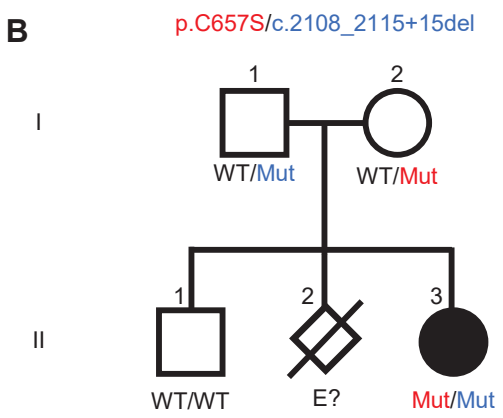
Table 4 : VirScan

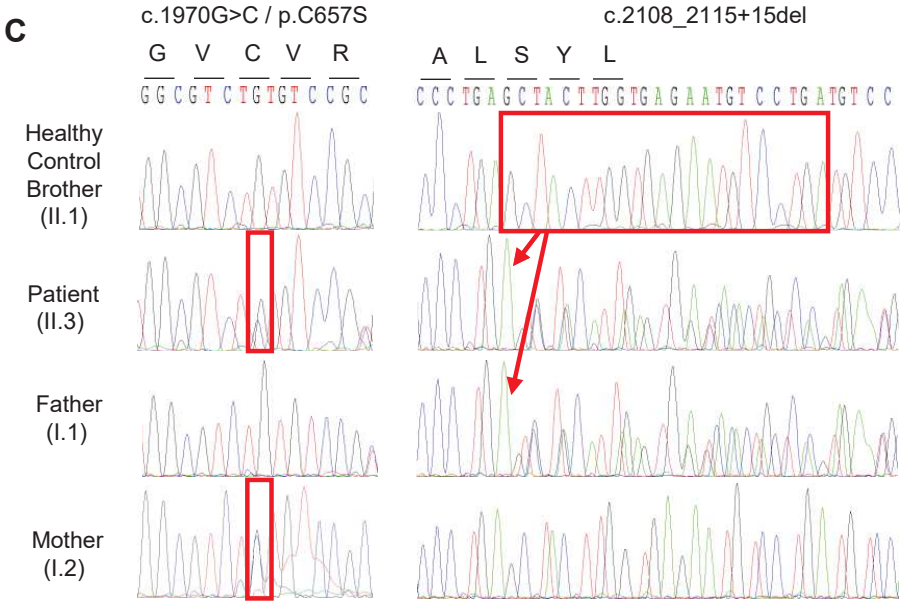
	Patient
Human adenovirus A	0
Human adenovirus B	9
Human adenovirus C	16
Human adenovirus D	0
Human adenovirus E	0
Human herpesvirus 1	0
Human herpesvirus 3	8
Human herpesvirus 4	42
Human herpesvirus 5	107
Human herpesvirus 6A	0
Human herpesvirus 6B	0
Human herpesvirus 7	4
Human metapneumovirus	0
Human respiratory syncitial virus	7
Influenza A virus	10
Influenza C virus	4
Human parainfluenza virus 3	0
Human parainfluenza virus 4	0
Human parvovirus B19	4
Human parechovirus	0
Aichivirus A	0
Alphapapillomatovirus 9	0
Cowpox virus	0
Cosavirus A	0
Enterovirus A	0
Enterovirus B	11
Enterovirus C	0
Enterovirus D	4
Hepatitis C virus	0
Mamastrovirus 1	0
Molluscum contagiosum virus	0
Mumps virus	4
Norwalk virus	7
Pegavirus A	0
Rhinovirus A	12
Rhinovirus B	6
Torque teno virus	0
Rotavirus A	0
Rubella virus	0
Saimiriine herpesvirus 2	0
Sapporo virus	0
Vaccinia virus	0
WU Polyomavirus	0
Borrelia burgdorferi	0
Haemophylus influenzae	0
Helycobacter pylori	0
Mycoplasma pneumoniae	0
Porphyromonas gingivalis	0
Streptococcus pneumoniae	11
Staphylococcus aureus	0
Toxoplasma gondii	0

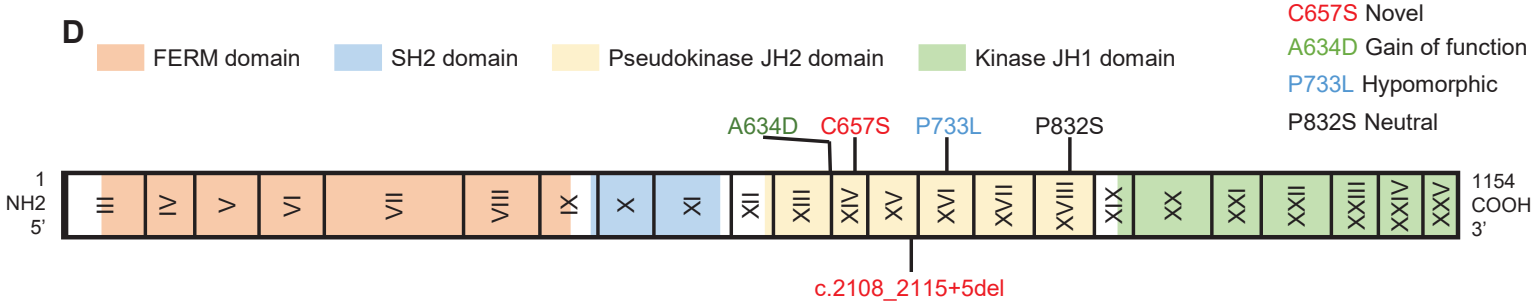
Legend

60	Score
50	
40	
30	
20	
10	
8	
6	
4	
2	
1	
0	


A
D1
D15
M6
M13
Antimycobacterial treatment


B
p.C657S/c.2108_2115+15del
I
II
1
2
WT/Mut
WT/Mut
1
2
3
WT/WT
E?
Mut/Mut


C
c.1970G>C / p.C657S
c.2108_2115+15del
G V C V R
A L S Y L
Healthy Control Brother (II.1)
Patient (II.3)
Father (I.1)
Mother (I.2)


D
FERM domain
SH2 domain
Pseudokinase JH2 domain
Kinase JH1 domain
C657S Novel
A634D Gain of function
P733L Hypomorphic
P832S Neutral
A634D
C657S
P733L
P832S
1
NH2
5'
1154
COOH
3'
c.2108_2115+5del

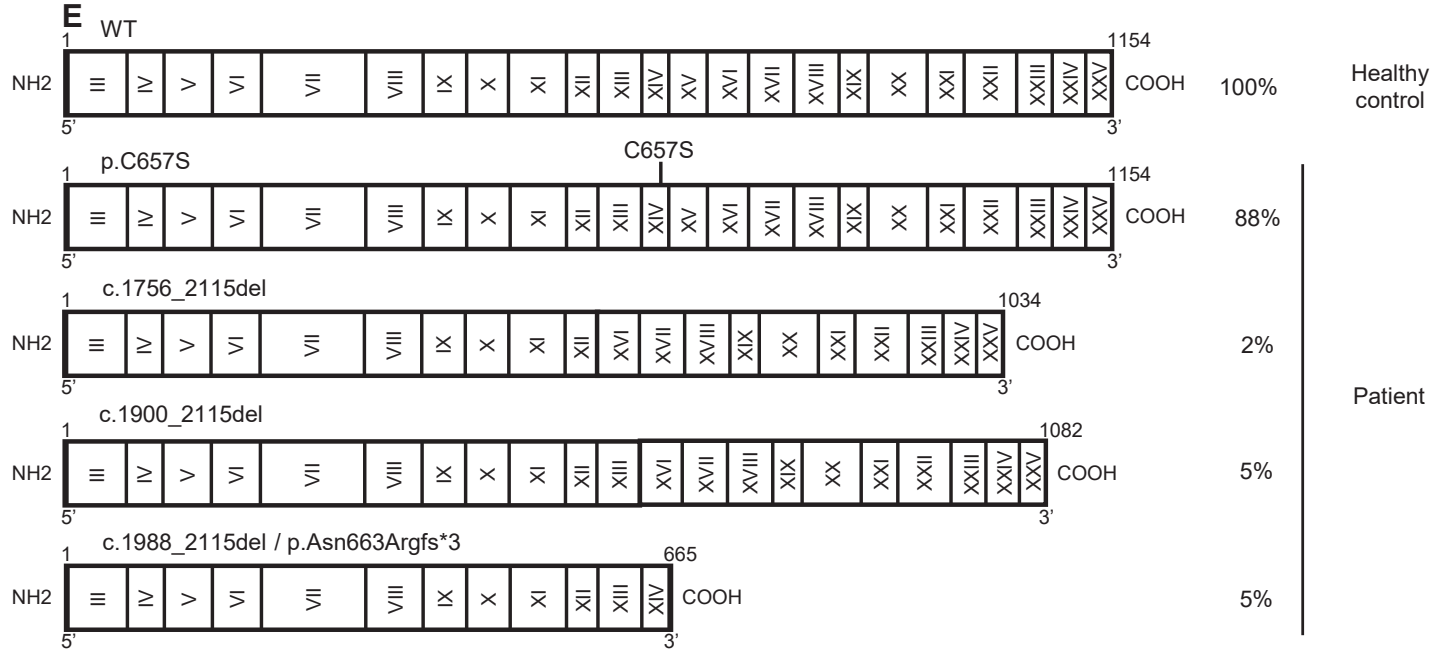
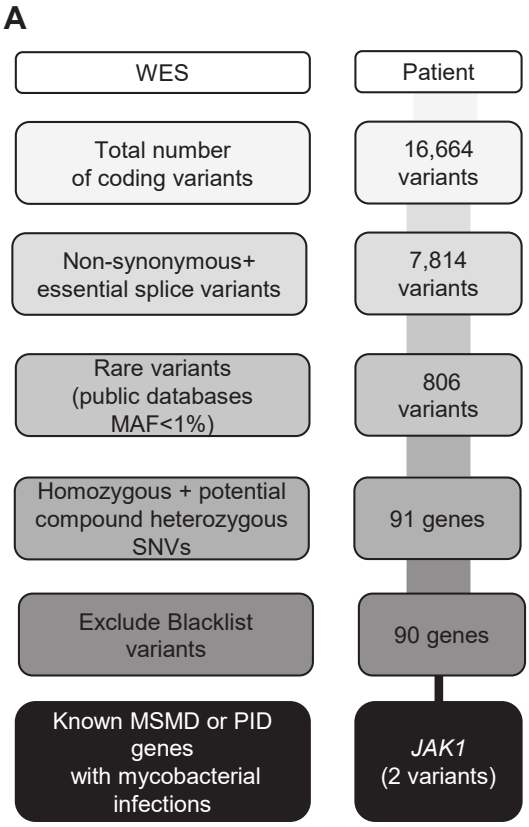
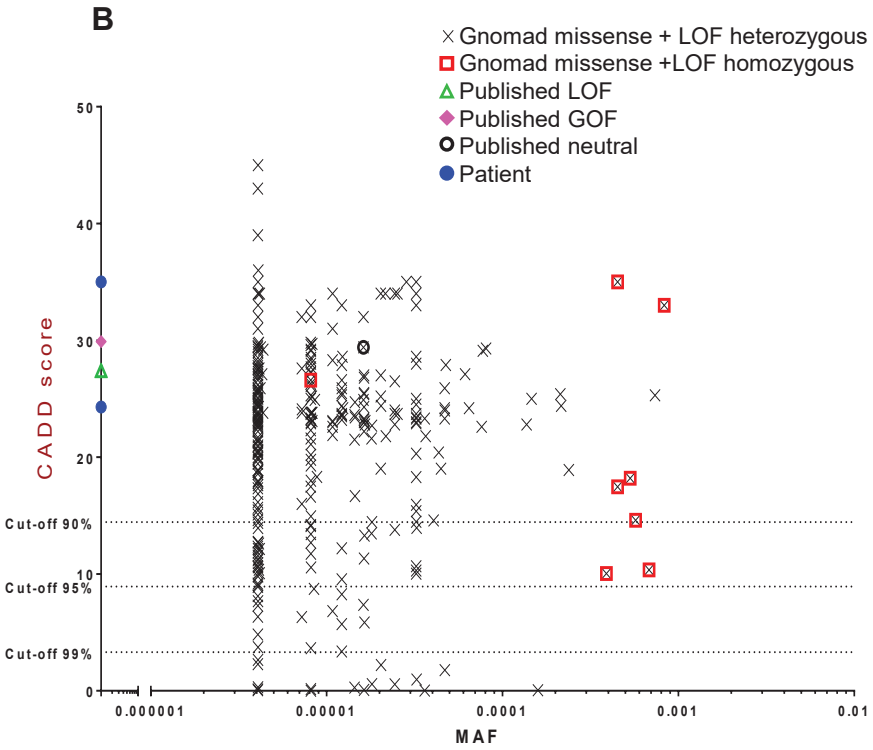

E
WT
p.C657S
C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del / p.Asn663Argfs*3
NH2
COOH
1154
1034
1082
665
100%
88%
2%
5%
5%
Healthy control
Patient

Figure 1

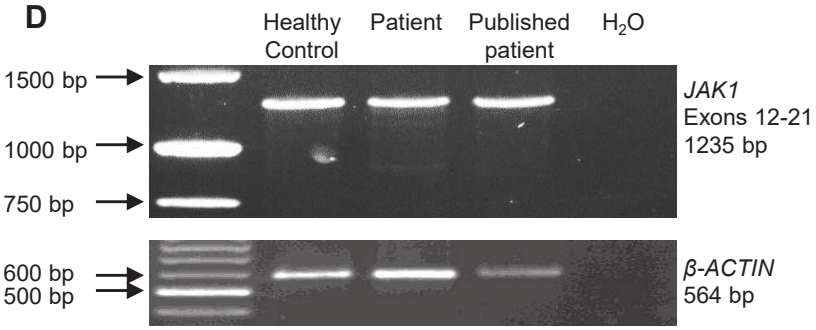




C

Exon 14

Homo sapiens	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Pan paniscus	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Pan troglodytes	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Rhinopithecus roxellana	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Gorilla gorilla gorilla	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Mus musculus	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Canis lupus familiaris	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Felis catus	AFFEAASMMRQVSHKHIVYLYGVCVRDVEN
Gallus gallus	AFFEAASMMRQVSHKHIVFLHGVCVRDLEN



Supplemental Figure 1

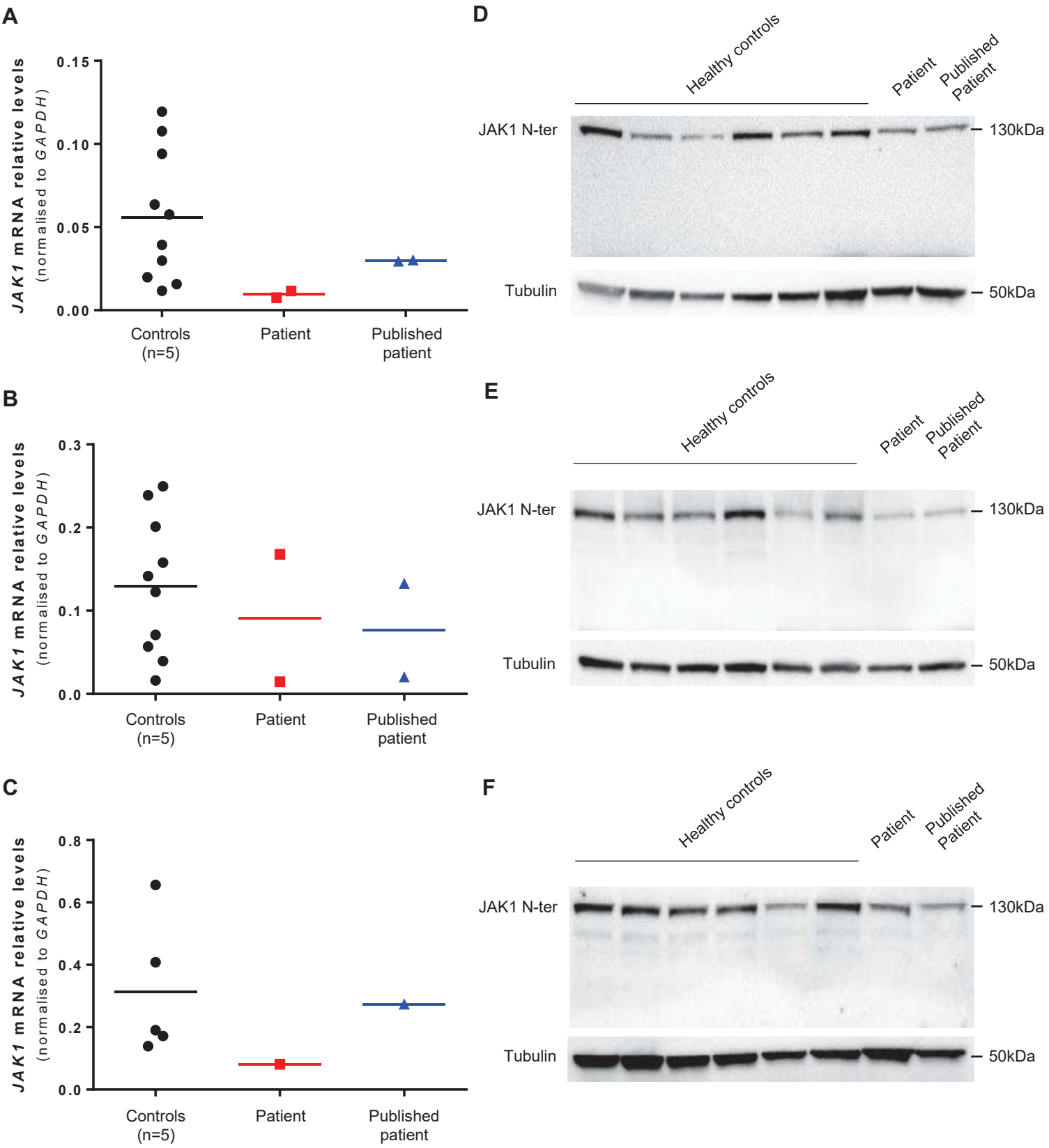

A
JAK1 mRNA relative levels
(normalised to GAPDH)
0.15
0.10
0.05
0.00
Controls
(n=5)
Patient
Published
patient
B
JAK1 mRNA relative levels
(normalised to GAPDH)
0.3
0.2
0.1
0.0
Controls
(n=5)
Patient
Published
patient
C
JAK1 mRNA relative levels
(normalised to GAPDH)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Controls
(n=5)
Patient
Published
patient
D
Healthy controls
Patient
Published
Patient
JAK1 N-ter
130kDa
Tubulin
50kDa
E
Healthy controls
Patient
Published
Patient
JAK1 N-ter
130kDa
Tubulin
50kDa
F
Healthy controls
Patient
Published
Patient
JAK1 N-ter
130kDa
Tubulin
50kDa

Figure 2

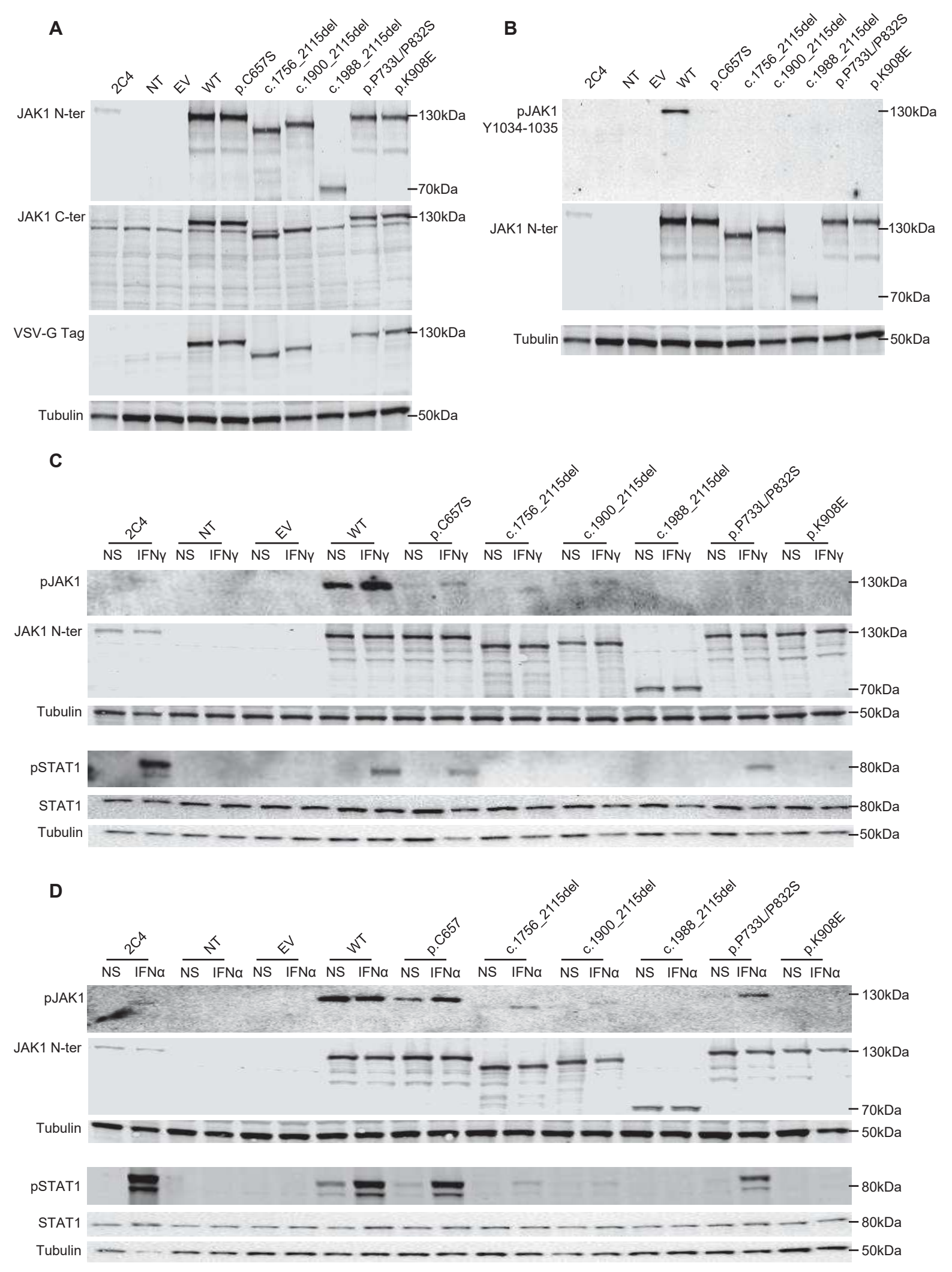
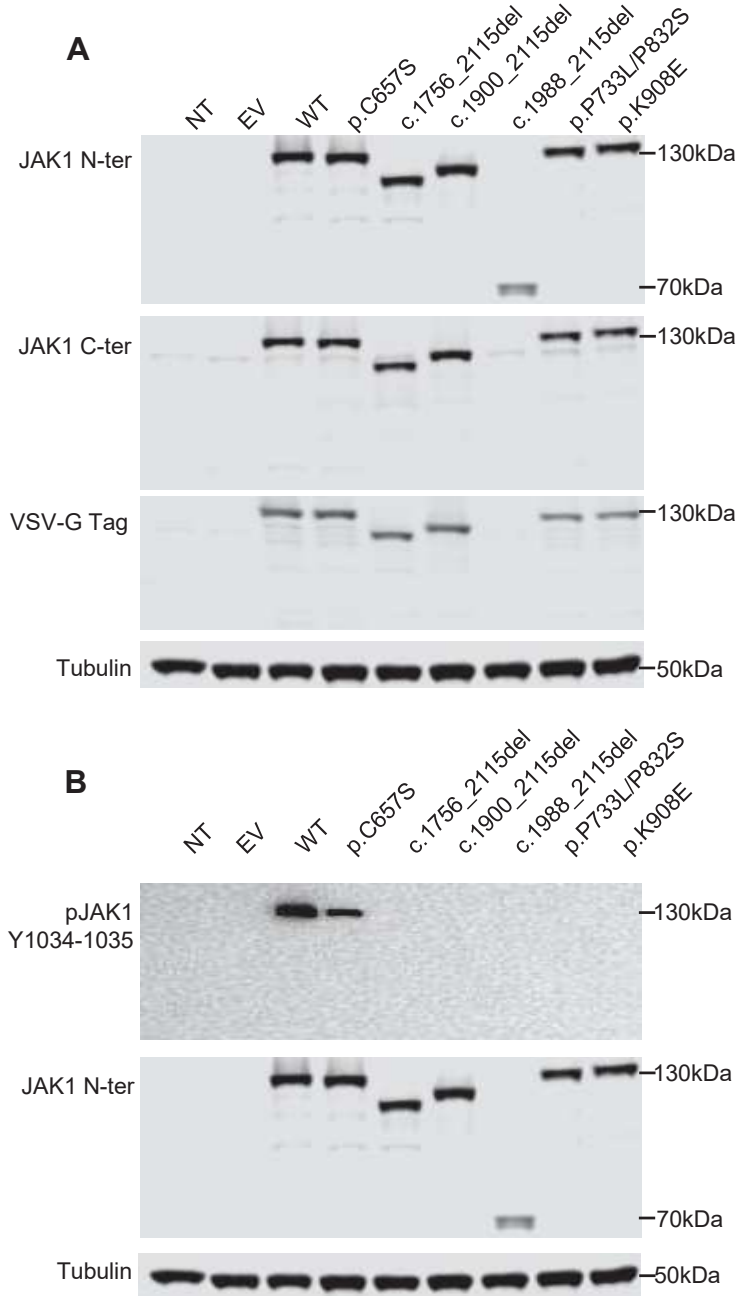

A
2C4
NT
EV
WT
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
p.P733L/P832S
p.K908E
JAK1 N-ter
130kDa
70kDa
JAK1 C-ter
130kDa
VSV-G Tag
130kDa
Tubulin
50kDa
B
2C4
NT
EV
WT
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
p.P733L/P832S
p.K908E
pJAK1
Y1034-1035
130kDa
JAK1 N-ter
130kDa
70kDa
Tubulin
50kDa
C
2C4
NT
EV
WT
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
p.P733L/P832S
p.K908E
NS
IFNγ
pJAK1
130kDa
JAK1 N-ter
130kDa
70kDa
Tubulin
50kDa
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa
D
2C4
NT
EV
WT
p.C657
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
p.P733L/P832S
p.K908E
NS
IFNα
pJAK1
130kDa
JAK1 N-ter
130kDa
70kDa
Tubulin
50kDa
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa

Figure 3



Supplemental Figure 2

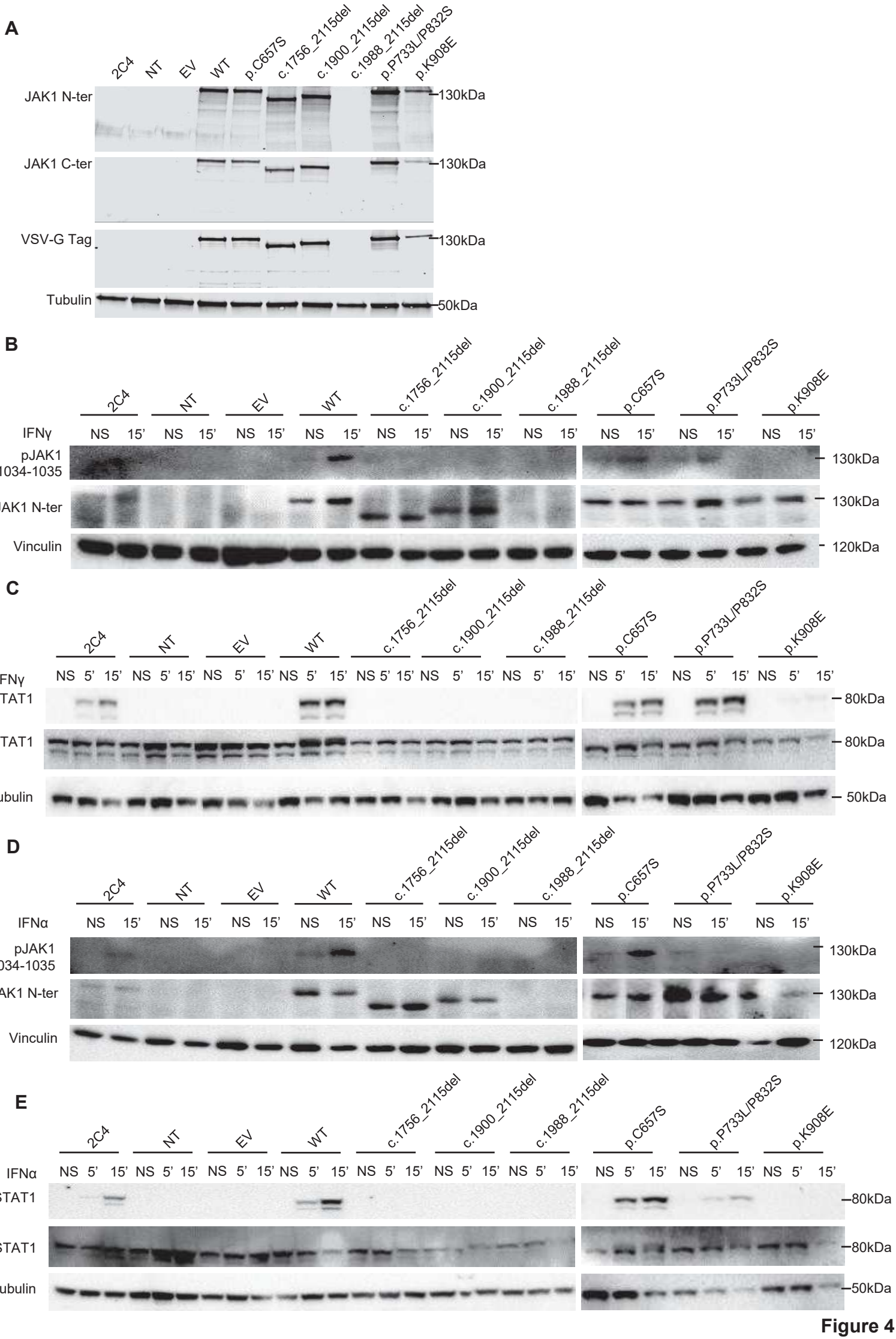

A
2C4
NT
EV
WT
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
p.P733L/P832S
p.K908E
JAK1 N-ter
130kDa
JAK1 C-ter
130kDa
VSV-G Tag
130kDa
Tubulin
50kDa
B
IFNγ
NS 15'
pJAK1 Y1034-1035
130kDa
JAK1 N-ter
130kDa
Vinculin
120kDa
C
IFNγ
NS 5' 15'
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa
D
IFNα
NS 15'
pJAK1 Y1034-1035
130kDa
JAK1 N-ter
130kDa
Vinculin
120kDa
E
IFNα
NS 5' 15'
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa

Figure 4

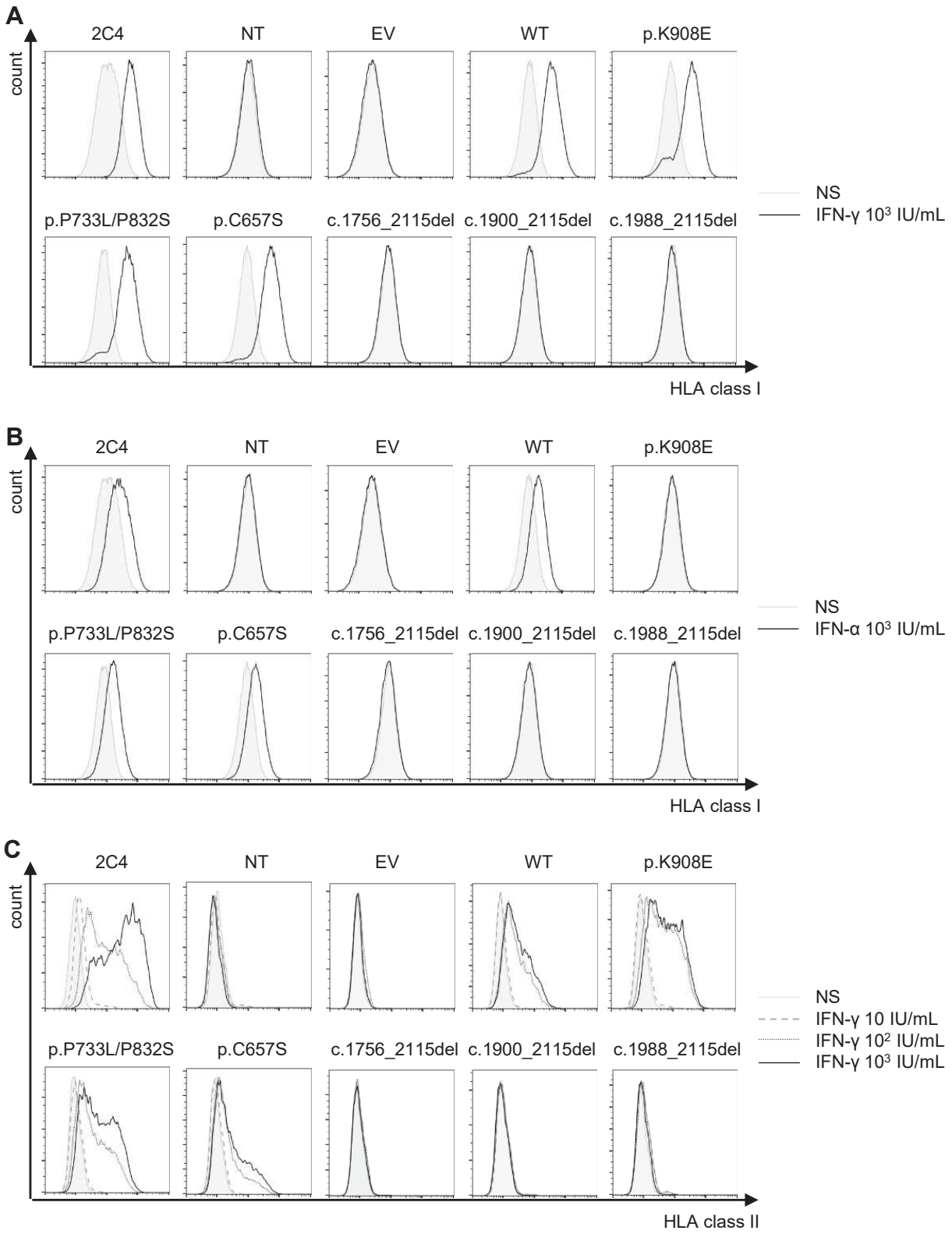

A
2C4
NT
EV
WT
p.K908E
count
p.P733L/P832S
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
NS
IFN-γ 10³ IU/mL
HLA class I
B
2C4
NT
EV
WT
p.K908E
count
p.P733L/P832S
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
NS
IFN-α 10³ IU/mL
HLA class I
C
2C4
NT
EV
WT
p.K908E
count
p.P733L/P832S
p.C657S
c.1756_2115del
c.1900_2115del
c.1988_2115del
NS
IFN-γ 10 IU/mL
IFN-γ 10² IU/mL
IFN-γ 10³ IU/mL
HLA class II

Figure 5

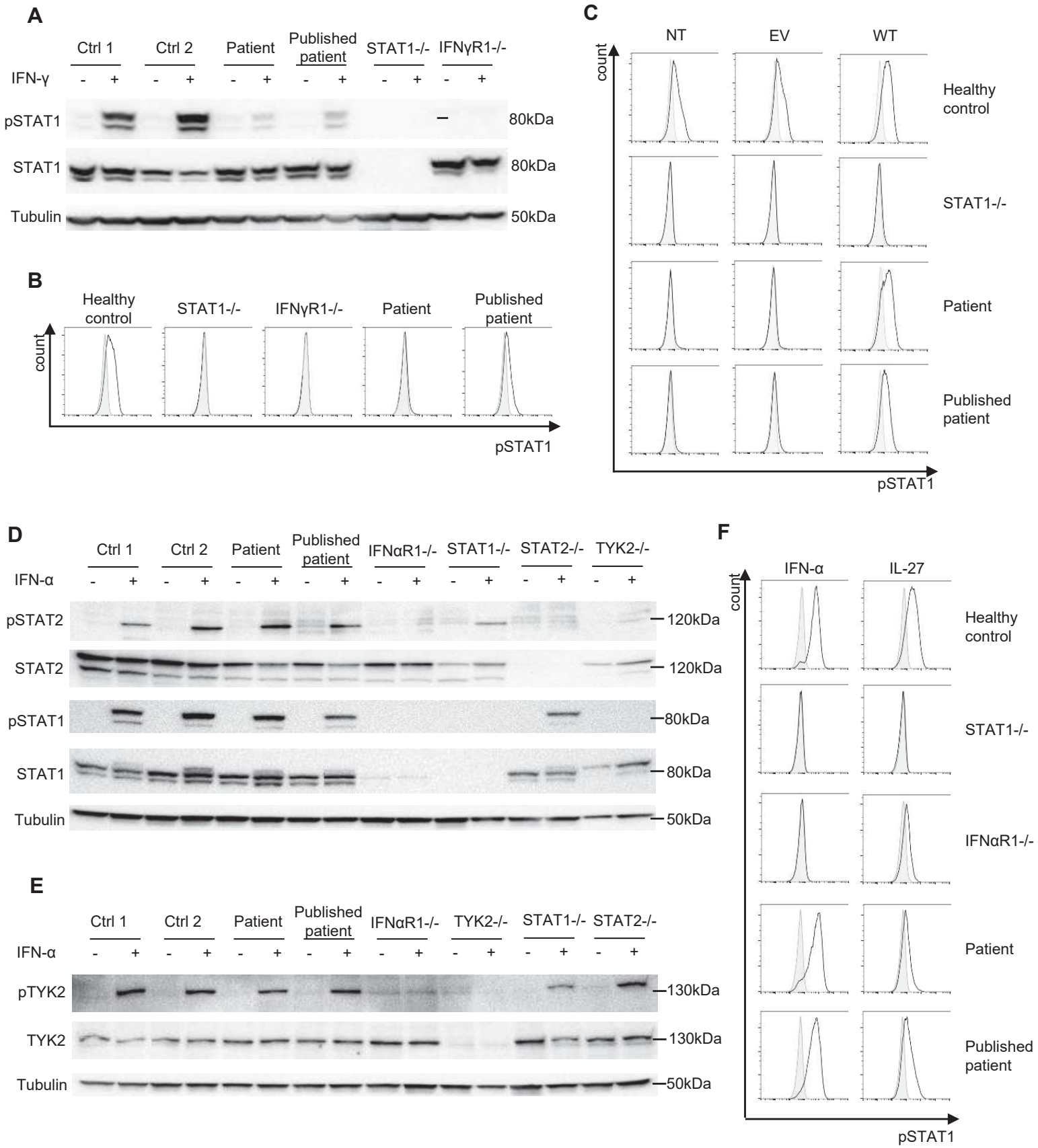

A
Ctrl 1
Ctrl 2
Patient
Published patient
STAT1-/-
IFNγR1-/-
IFN-γ
- + - + - + - + - + - +
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa
B
Healthy control
STAT1-/-
IFNγR1-/-
Patient
Published patient
count
pSTAT1
C
NT
EV
WT
count
Healthy control
STAT1-/-
Patient
Published patient
pSTAT1
D
Ctrl 1
Ctrl 2
Patient
Published patient
IFNαR1-/-
STAT1-/-
STAT2-/-
TYK2-/-
IFN-α
- + - + - + - + - + - + - + - +
pSTAT2
120kDa
STAT2
120kDa
pSTAT1
80kDa
STAT1
80kDa
Tubulin
50kDa
E
Ctrl 1
Ctrl 2
Patient
Published patient
IFNαR1-/-
TYK2-/-
STAT1-/-
STAT2-/-
IFN-α
- + - + - + - + - + - + - + - +
pTYK2
130kDa
TYK2
130kDa
Tubulin
50kDa
F
IFN-α
IL-27
count
Healthy control
STAT1-/-
IFNαR1-/-
Patient
Published patient
pSTAT1

Figure 6

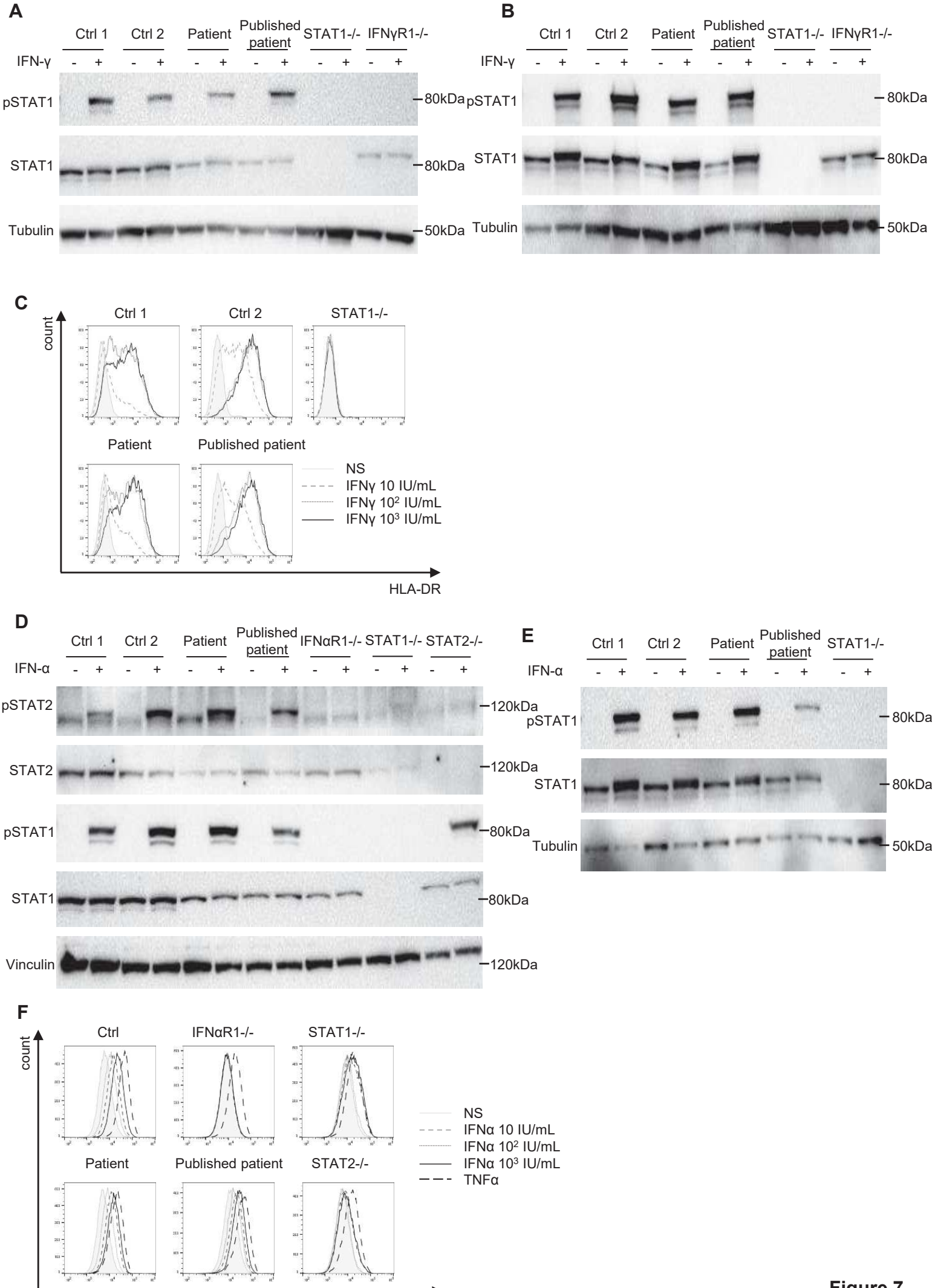
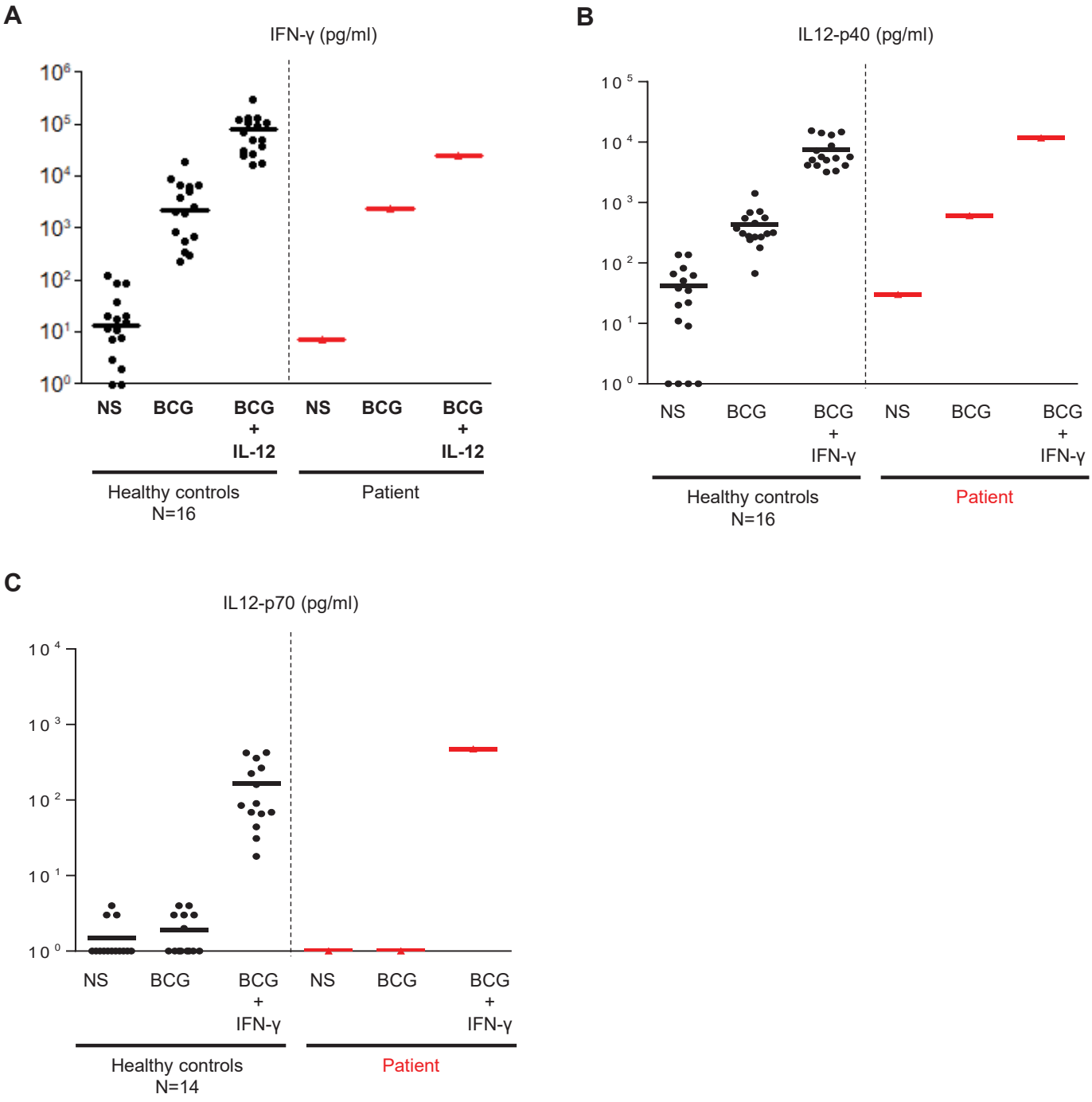

A
Ctrl 1
Ctrl 2
Patient
Published patient
STAT1-/-
IFNγR1-/-
IFN-γ
pSTAT1
STAT1
Tubulin
80kDa
50kDa
B
C
count
HLA-DR
NS
IFNγ 10 IU/mL
IFNγ 10² IU/mL
IFNγ 10³ IU/mL
D
IFNαR1-/-
STAT2-/-
IFN-α
pSTAT2
STAT2
Vinculin
120kDa
E
F
Ctrl
HLA class I
IFNα 10 IU/mL
IFNα 10² IU/mL
IFNα 10³ IU/mL
TNFα

Figure 7



Supplemental Figure 3