Université Paris Cité

Université Paris Cité

École doctorale n°562 Bio Sorbonne Paris Cité

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

Identification et caractérisation des déficits en DOCK11 et en DOCK9 chez des patients atteints d'auto-immunité de survenue précoce

Par Charlotte BOUSSARD

Thèse de doctorat en Immunologie

Dirigée par **Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT**

Présentée et soutenue publiquement le 1/12/2025

Devant un jury composé de :

Claire HIVROZ Directeur de recherche, Université PSL	Rapporteuse
Christophe LAMAZE Directeur de recherche, Université PSL	Rapporteur
Despina MOSHOUS PU-PH, Université Paris Cité	Examinatrice
Isabelle MEYTS PU-PH, Université UZ Leuven	Examinatrice
Alexandre BELOT, PU-PH, Université Claude Bernard	Examinateur
Alain FISCHER PU-PH EMERITE, Université Paris Cité	Membre invité
Frédéric RIEUX-LAUCAT Directeur de recherche, Université Paris Cité	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

RESUME **4**

ABSTRACT **5**

REMERCIEMENTS **6**

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS **8**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **13**

INTRODUCTION **15**

I. LE CYTOSQUELETTE, UN RESEAU COMPLEXE IMPLIQUE DANS DE NOMBREUSES FONCTIONS CELLULAIRES **15**

A. LES COMPOSANTS DU CYTOSQUELETTE 15
1. Les microfilaments *15*
2. Les microtubules *19*
3. Les filaments intermédiaires *21*
B. ROLES DU CYTOSQUELETTE DANS DES FONCTIONS CELLULAIRES IMPORTANTES 23
1. Polarisation cellulaire et points focaux d'adhésion *24*
2. Migration cellulaire *24*
3. Différenciation cellulaire et reprogrammation cellulaire *26*
4. Mécanismes de réparation de l'ADN *27*
5. Stabilité de la membrane plasmique *27*
6. Métabolisme cellulaire *29*
C. ROLES DU CYTOSQUELETTE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET HEMATOPOÏETIQUE 31
1. Migration cellulaire et développement du système immunitaire *31*
2. Synapse immunologique *33*
3. Plaquettes et cytosquelette *34*
4. Actinopathies liées au système immunitaire et aux plaquettes *35*

II. LES GTPASES RHO, PROTEINES REGULATRICES ESSENTIELLES DU CYTOSQUELETTE **39**

A. DEFINITION DES GTPASES RHO 39
1. CDC42 ..... *41*
2. RAC *43*
3. RHOA *44*
B. ROLES DES GTPASES RHO DANS DIFFERENTES FONCTIONS CELLULAIRES 45
1. GTPases RHO et migration cellulaire *46*
2. GTPases RHO et cellules hématopoïétiques *47*
3. GTPases RHO et immunité innée *49*
4. GTPases RHO et Immunité adaptative *50*
5. GTPases RHO et métabolisme *51*
6. GTPases RHO et tissus *52*

III. REGULATEURS DE LA SIGNALISATION DES GTPASES RHO : LES PROTEINES GEFS DOCK **54**

A. LA SOUS-FAMILLE DOCK-A: DOCK1, DOCK2, DOCK5 57
1. DOCK1 ..... *58*
2. DOCK2 ..... *59*
3. DOCK5 ..... *61*
B. SOUS-FAMILLE DOCK-B : DOCK3, DOCK4 63
1. DOCK3 ..... *64*
2. DOCK4 ..... *65*
C. SOUS-FAMILLE DOCK-C : DOCK6, DOCK7, DOCK8 66
1. DOCK6 ..... *67*
2. DOCK7 ..... *67*
3. DOCK8 ..... *69*
D. SOUS-FAMILLE DOCK-D: DOCK9, DOCK10, DOCK11 75

1. DOCK9 76
2. DOCK10 77
3. DOCK11 78

OBJECTIFS DE LA THESE 79

DOCK11 DEFICIENCY IN PATIENTS WITH X-LINKED ACTINOPATHY AND AUTOIMMUNITY 80

INHERITED DOCK9 MUTATIONS LEAD TO SEVERE EARLY-ONSET AUTO-IMMUNE LIPODYSTROPHY, VITILIGO AND ALOPECIA *AERATA* 82

DISCUSSION 112

CONCLUSION 144

ANNEXES 145

BIBLIOGRAPHIE 146

RESUME

Identification et caractérisation des déficits en DOCK11 et en DOCK9 chez des patients atteints d'auto-immunité de survenue précoce

Le remodelage de l'actine joue un rôle clé dans le système immunitaire. Une dérégulation de la dynamique du cytosquelette dans les cellules immunitaires entraîne des actinopathies liées au système immunitaire. Les protéines DOCK (Dedicator of cytokinesis) ont une fonction cruciale de régulation du cytosquelette d'actine. Les déficits en DOCK2 et DOCK8 conduisent à des actinopathies liées au système immunitaire qui mettent en lumière le rôle crucial des DOCK dans les cellules immunitaires. DOCK8, DOCK11 et DOCK9 activent CDC42, une GTPase RHO impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine. DOCK11 et DOCK9 sont des protéines partenaires, et leur rôle dans les déficits immunitaires bien que soupçonné depuis longtemps, n'avait jamais été décrit jusqu'à présent. Nous avons étudié huit patients masculins, issus de sept familles non apparentées, présentant des variants faux-sens hémizygotes de DOCK11 conduisant à une réduction de l'expression de DOCK11. Les patients présentent une auto-immunité précoce avec des manifestations variables incluant des cytopénies, un lupus érythémateux disséminé, et des atteintes inflammatoires cutanées et digestives. Les plaquettes des patients présentent une morphologie et un étalement anormaux, ainsi qu'une activation de CDC42 diminuée. Les cellules T activées *in vitro* et les lignées cellulaires lymphoblastiques B des patients montrent des protubérances aberrantes et une vitesse de migration anormale dans des canaux confinés, en lien avec une polymérisation altérée de l'actine. Une diminution de DOCK11 *in vitro* obtenue par knock-down (KD) a reproduit ces phénotypes cellulaires anormaux dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) et les lymphocytes T activés provenant de témoins sains. Le déficit en DOCK11 entraîne une altération de l'activation de CDC42 et de STAT5 qui sont respectivement associées à un remodelage anormal du cytosquelette d'actine ainsi qu'à un phénotype Tregs anormal, possiblement en lien avec une dérégulation immunitaire et à une auto-immunité sévère d'apparition précoce. Le déficit en DOCK11 est une nouvelle actinopathie liée au système immunitaire et liée au chromosome X. Enfin, nous avons identifié deux mutations hétérozygotes composites dans le gène *DOCK9* chez une patiente atteinte d'auto-immunité des tissus graisseux et cutanés. Ces mutations sont héritées de chacun des deux parents et conduisent, malgré une expression apparemment normale de DOCK9, une diminution de l'activation de CDC42 dans les cellules de la patiente. La perte de graisse a été reproduite dans un nouveau modèle murin knockout (KO) DOCK9. Les plaquettes et les lymphocytes T de la patiente présentent un remodelage anormal de l'actine et la migration des lymphocytes T était altérée *in vitro*. L'activation de STAT5 est plus élevée après stimulation par l'IL-7 et l'IL-15 dans les cellules de la patiente et dans un modèle de lymphocytes T KO DOCK9. L'expression des récepteurs IL-7R, IL-15R, CD44 et IL-18R est perturbée dans les lymphocytes T de la patiente, ce qui suggère un rôle de DOCK9 dans leur régulation. Le déficit en DOCK9 semble être une nouvelle actinopathie d'origine auto-immune conduisant à une auto-immunité cutanéo-graisseuse.

En conclusion, DOCK9 et DOCK11 sont probablement des acteurs majeurs de la régulation immunitaire. Les déficiences en DOCK9 et DOCK11 chez l'homme et la souris fournissent un modèle pour étudier leurs rôles respectifs dans le système immunitaire et dans les tissus.

Mots clefs : actinopathie, DOCK11, DOCK9, CDC42, lipodystrophie, auto-immunité

ABSTRACT

Identification and characterization of DOCK11 and DOCK9 deficiencies in patients with early-onset autoimmunity

Actin remodeling drives key functions in the immune system. Dysregulation in cytoskeleton dynamic in immune cells leads to immune-related actinopathies.
DOCK (Dedicator of cytokinesis) proteins play a central role in actin cytoskeleton regulation. This is highlighted by the DOCK2 and DOCK8 deficiencies leading to actinopathies and immune deficiencies. DOCK8, DOCK11, and DOCK9 activate CDC42, a RHO GTPase involved in actin cytoskeleton dynamics. DOCK11 and DOCK9 are partners, and their roles in human immune disease has been long suspected but was never described before this work. We studied eight male patients from seven unrelated families with hemizygous missense variants of DOCK11 leading to reduced DOCK11 expression. The patients present with early-onset autoimmunity with variable manifestations including cytopenia, systemic lupus erythematosus, and inflammatory skin and gastrointestinal involvement. The patients' platelets show abnormal morphology and spreading, as well as decreased CDC42 activation. *In vitro* activated T cells and B lymphoblast cell lines from patients show aberrant protrusions and abnormal migration speed in confined channels, consistent with impaired actin polymerization. A DOCK11 knock-down recapitulated these abnormal cellular phenotypes in monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) and activated T lymphocytes from healthy controls *in vitro*. DOCK11 deficiency leads to impaired activation of CDC42 and STAT5, which are associated with abnormal actin cytoskeleton remodeling and an abnormal Tregs phenotype, respectively, possibly linked to immune dysregulation and severe early-onset autoimmunity. Thus, DOCK11 deficiency is a new actinopathy linked to the immune system and linked to the X chromosome. Finally, we identified two compound heterozygous mutations in the DOCK9 gene in a patient with autoimmunity of adipose and skin tissues. These mutations are inherited from both parents and, despite apparently normal DOCK9 expression, lead to decreased CDC42 activation in the patient's cells. Fat loss was reproduced in a new DOCK9 knockout (KO) mouse model. The patient's platelets and T lymphocytes show abnormal actin remodeling, and T lymphocyte migration was impaired *in vitro*. STAT5 activation is higher after stimulation by IL-7 and IL-15 in the patient's cells and in a DOCK9 KO T lymphocyte model. The expression of IL-7R, IL-15R, CD44, and IL-18R receptors is disrupted in the patient's T cells, suggesting a role for DOCK9 in their regulation. DOCK9 deficiency appears to be a new actinopathy of autoimmune origin leading to cutaneous-adipose autoimmunity.
In conclusion, DOCK9 and DOCK11 are likely to be major players in immune regulation. DOCK9 and DOCK11 deficiencies in humans and mice provide a model for studying their respective roles in the immune system and in tissues.

Keywords: immune-related actinopathie, DOCK11, DOCK9, CDC42, lipodystrophy, auto-immunity

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse sont le fruit d'un travail d'équipe multi-collaboratif.

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de thèse le Docteur Frédéric Rieux-Laucat. Frédéric a été un excellent directeur de thèse avec le juste équilibre entre autonomie, écoute, soutien et mentorat scientifique. Il m'a toujours soutenue même lors de mes nombreuses errances administratives. Il a fait confiance à mon intuition scientifique et à mes propositions de collaboration et de techniques scientifiques. Frédéric m'a fait grandir en maturité scientifique, diplomatique et professionnelle.
Je ne remercierai jamais assez le Dr Laure Delage, ma co-autrice et mon encadrante de master 2. Nous avons formé une sacrée équipe et affronté les nombreuses montagnes russes scientifiques, diplomatiques et logistiques jusqu'à la publication du papier. Nos discussions scientifiques ont continué bien après ton départ du laboratoire jusqu'à participer au manuscrit de thèse. Tu es une brillante scientifique et c'était un honneur d'avoir été ton étudiante puis ta co-autrice et enfin ton amie.
Le Dr Marie-Claude Stolzenberg a eu un rôle essentiel dans ces travaux de thèse. De nombreux résultats n'auraient pas vu le jour sans ta riche expérience professionnelle, ta force de travail, ta bonne humeur et ta détermination. Travailler main dans la main avec toi est un vrai bonheur et un honneur.
Une autre personne de l'équipe, Camille Brunaud, a été un soutien musclé humain et technique sans faille durant ces années de thèse. Travailler avec toi a été une chance.
Je remercie mon voisin de bureau et co-thésard Olivier pour nos discussions scientifiques, administratives et autres … Être ta co-workeuse m'a beaucoup appris et notamment qu'il est important d'enregistrer ses mots de passe.
J'aimerai également remercier par avance la future Dr Orianne Debeaupuis et le Dr Camille Lefèvre car elles vont faire des étincelles scientifiques dans le projet DOCK9.
Je remercie également mes co-thésards Marie, Boris, Quentin, Léa qui ont participé à ces travaux et apporté de nombreuses réflexions scientifiques.
Faris, Elizabeth, Lucie, Peter, Alicia, quel plaisir de vous avoir encadrés ou co-encadrés.
Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire, membres permanents et non permanents. Ils m'ont bien intégré dans l'équipe et m'ont énormément appris.
Un grand merci à Christine Comparetto et à Malika Tiouri pour leur précieuse aide administrative.

Je remercie la Dr Claire Hivroz, le Dr Christophe Lamaze, la Pr Despina Moshous, la Pr Isabelle Meyts, le Pr Alexandre Belot et le Pr Alain Fischer de m'avoir fait l'honneur d'être membres du jury.
Je tiens à remercier le Pr Alain Fischer pour avoir pris le temps de discuter des résultats et des idées scientifiques autour des travaux de thèse. Ce fut un réel plaisir.

Merci à l'ensemble de la famille Imagine avec la participation de plusieurs équipes et plateformes à ces travaux.

Le Dr Maxime Batignes m'a beaucoup appris en technique et en réflexion scientifique. Son impact a été majeur dans ces travaux de thèse. Travailler avec des collègues de cette qualité a été un privilège.
Je souhaite remercier le Dr Claire Soudais et le Dr Sylvain Latour pour leurs excellents conseils scientifiques et leur contribution essentielle à ces travaux de thèse.
Sans Béatrice Durel, la qualité des images microscopiques (qui a permis de faire deux couvertures) n'aurait pas été la même. Je la remercie chaleureusement pour ses précieux conseils. Je remercie également Nicolas Goudin pour son aide dans l'analyse d'images.
Je remercie Patricia, Tania et Juan Edouardo de l'équipe de Gaël Ménasché et Fernando Sepulveda pour leur implication dans ces travaux.
Je remercie également le Dr Erika Brunet pour ses précieux conseils scientifiques.

Je remercie l'ensemble de la maintenance, de l'équipe de ménage, de sécurité, du service de communication et de valorisation d'Imagine. Je mesure la chance de travailler dans un cadre aussi agréable et dynamique.

Les travaux de thèse n'auraient pas vu le jour sans les nombreuses collaborations extérieures à l'institut Imagine.
Quel plaisir de collaborer avec les Dr Frédéric Adam et Dr Alexandre Kauskot !!
Je souhaite chaleureusement remercier les Pr Corinne Vigouroux et Pr Camille Vatier pour notre superbe collaboration.
Je tiens également à remercier le Dr Isabelle Callebaut pour sa contribution majeure dans ces travaux de thèse et pour m'avoir initiée au monde de la modélisation 3D des molécules.

Je tiens à remercier les nombreux médecins tous plus brillants les uns que les autres sans qui rien n'aurait été possible. Un remerciement particulier aux Pr Despina Moshous, Pr Bénédicte Neven, Dr Martin Castelle, Dr Brigitte Bader-Meunier et Pr Pierre Quartier. Ils m'ont beaucoup appris à la fois sur le plan médical, scientifique mais également humain.

Merci aux patients et à leurs familles. Ils nous ont fait confiance et nous ont confié leurs histoires. Sans cette confiance, aucun des travaux de thèse n'aurait pu être réalisé.

A mes frères d'armes d'Aïkido.
A toute ma famille, mes parents, ma sœur, mes amis.
A Karim, le plus précieux de tous mes soutiens
Et à ma fille adorée Elia qui est un véritable rayon de soleil et qui reste mon temps d'incubation le plus réussi de toute ma thèse !

Charlotte

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adenosine diphosphate

ATP: Adenosine triphosphate

AHAI : Anémie Hémolytique auto-immune

AOS : Syndrome d'Adams Oliver

APC: Cellule présentatrice d'antigènes

APRIL: A proliferation-inducing ligand

ARM: Armadillo

ARN: Acide Ribonucléique

Arp2/3: Actin Related Protein 2/3

BAFF: B-cell activating Factor

BCR : B Cell Receptor

CAAX : C pour résidu cystéine, AA pour deux résidus aliphatiques, et X pour acide aminé C-terminal

CCR : Récepteur de chimiokine C-C

CDC42 : Cell Division Control protein 42

CD40L : CD40 ligand

CID : Déficit immunitaire combiné

CLP: Common lymphoid progenitor

CMP: Common myeloid progenitor

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,

CSH : cellule souche hématopoïétique

DA : Dermatite Atopique

DBL: Dbl-homology domain

DC: Cellules dendritiques

DHR1: DOCK homology region 1

DHR2: DOCK homology region 2

DIDS: DOCK8 related-Immunodefiency syndrome

DOCK: Dedicator of cytokinesis

EBV: Epstein Barr virus

ELMO: Engulfment and Cell Motility

EPAS1 : Endothelial PAS domain protein 1

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FA : Focal adhesion

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

GAP: GTPase activating protein

GDI: Guanosine dissociation inhibitors

GDP: Guanosine diphosphate

GEF: Guanine Exchange Factor

GPI: glycophosphatidylinositol

GPL: Glycopeptidolipids

GSL: Glycosphingolipids

GTP: Guanosine triphosphate

GTPases: Guanosine triphosphate phosphohydrolase

GWAS: Genome-wide association study

γ-TuRC: Gamma-tubulin ring complex

HELIOS: Zinc finger protein Helios

HIES : Hyper-Immunoglobuline E syndromes

HNR : Hyperplasie nodulaire régénérative

HPV : Papillomavirus

HSV : Herpes virus simplex

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IL-R : Récepteur de l'interleukine

ILC : innate lymphoid cells

IMC : Indice de masse corporelle

IFN-γR2 : Récepteur de l'interféron γ 2

IPEX : Immunodérégulation, polyendocrinopathie et entéropathie liée au chromosome X

JAK: Janus kinase

KD: Knockdown

KO: Knockout

KRT: Kératine

LB: Lymphocytes B

LDL: Low density lipoproteins

LINC: Linker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton

LMNA : gène codant la Lamine A/C

LYST: Lysosomal trafficking regulator

MAIT: Mucosal-Associated Invariant T cells

MDDC: Monocyte-derived dendritic cells

mDIA1: Diaphanous-related formin-1

MEP : Megakaryocytes-Erythrocytes Progenitor

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'intestin

MK : Megakaryocytes

MPP: Multipotent progenitor

MSC: Mesenchymal stem cell

MTOC : Microtubules organisation center

MZB : Marginal zone B cell

NADPH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate hydrogéné

NAI : Neutropénie auto-immune

NBEAL2 : Neurobeachin-like 2

NET: Neutrophils extracellular traps

NK: Natural Killer

NM: Nanomètre

NPF: Nucleation Promoting Factor

ORL : Oto-rhino-laryngologie

P : Plasmocyte

PAK : Sérine/thréonine-protéine kinase P

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PDGF: Platelet-Derived Growth factor

PH: Pleckstrin Homology Domain

PIP_3: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKC : Protein Kinase C

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PTI : Purpura thrombopénique immunologique

PYRIN : pyrin domain (PYD)-containing proteins

RAC : Ras-related C3 botulinum toxin

RAS : Rat Sarcoma

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RHO: Ras HOmolog family

RHOA: Ras HOmolog family member A

RHOG: Ras HOmolog family member G

ROCK : protéines kinases associées à RHO

SCID: Severe combined immunodeficiency

SH3: Src homology 3

SI: synapse immunologique

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

SYK: Spleen Tyrosine Kinase

TCM : cellule T centrale mémoire

TCR : T cell receptor

TEM: Lymphocytes T effecteur mémoire

TGF: Transforming Growth Factor

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factors

TNKS: Tankyrase

TREC : cercles d'excision du récepteur des lymphocytes T

TRM : cellules T résident mémoires

TSCM : cellules T mémoires souches

VHB : Virus Hépatite B

VZV : Virus varicelle zona

WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE: WASP family Verprolin homolog

WH2: WASP homology 2

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.Polymérisation et dépolymérisation de l'actine-F 15
Figure 2. Nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3 16
Figure 3. Schéma d'un filopode 17
Figure 4. Formation d'un lamellipode.....18
Figure 5.Point focal d'adhésion avec la formation de fibres de stress.....19
Figure 6.Polymérisation et dépolymérisation des microtubules.....20
Figure 7.Rôle des microtubules dans le transport intracellulaire et dans la formation du fuseau mitotique.....21
Figure 8.Formation d'un filament intermédiaire 22
Figure 9. Schéma du noyau et de la lamina nucléaire 23
Figure 10. Liste non exhaustive de fonctions cellulaires importantes qui impliquent le cytosquelette.....23
Figure 11.Schéma représentant les quatre grandes étapes de la migration 2D 25
Figure 12. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....27
Figure 13. Formation de radeaux lipidiques de la membrane plasmique.....28
Figure 14 .Exemple de fonctions du cytosquelette et nucléosquelette dans un adipocyte 30
Figure 15. Schéma représentant la répartition des lymphocytes T mémoires dans le sang et dans les tissus. 32
Figure 16. Formation d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T et une APC.....34
Figure 17.Schéma des étapes principales de la formation des plaquettes 35
Figure 18.Défaut intrinsèque des plaquettes déficiente en WASP 37
Figure 19. Activation et inactivation des GTPases RHO 39
Figure 20. Synthèse, modifications post-traductionnelles et mécanismes d'action typiques des GTPases RHO 40
Figure 21.Conformation 3D de CDC42 et position des mutations décrites de CDC42 43
Figure 22. Les RHO GTPases, régulateurs principaux du cytosquelette.....45
Figure 23. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques 47
Figure 24.Structure des domaines des onze protéines de la famille DOCK chez les mammifères 55
Figure 25. Voies impliquées dans l'activation et rôles de DOCK1, DOCK2 et DOCK5 57
Figure 26.Voies d'activation et rôles de DOCK3 et DOCK4 63
Figure 27. Voies d'activation et rôles de DOCK6, DOCK7 et DOCK8.....66
Figure 28.Voies d'activation et rôles de DOCK9, DOCK10 et DOCK11 75
Figure 29. Manifestations cliniques des patients et position des mutations de DOCK11 associées 115
Figure 30. Modélisation 3D de la molécule DOCK11 avec position des mutations 116
Figure 31.Mécanismes pouvant conduire au développement de l'auto-immunité et de l'inflammation chez les patients avec un déficit en DOCK11. 121
Figure 32. Mécanismes potentiels impliqués dans le développement du vitiligo en cas de déficit en DOCK9 dans la peau. 133
Figure 33. Mécanismes potentiels impliqués dans l'altération du tissu adipeux en cas de déficit en DOCK9 135
Figure 34. Équilibre entre DOCK8 et DOCK11 dans les lymphocytes T.....141
Figure 35.Modèle de la phosphorylation en cascade des protéines DOCKs 143

Tableau 1.Expression ARN hématopoïétique et autre expression tissulaire majoritaire des protéines DOCK 56
Tableau 2.Tableau résumé de la présentation clinique, les types de mutations et leurs conséquences fonctionnelles des cohortes françaises et autrichiennes des patients avec un déficit en DOCK11 113

INTRODUCTION

I. LE CYTOSQUELETTE, UN RESEAU COMPLEXE IMPLIQUE DANS DE NOMBREUSES FONCTIONS CELLULAIRES

Le cytosquelette est un réseau complexe et dynamique filamenteux qui s'étend du noyau à la membrane plasmique. Il est composé de trois structures : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Cette structure cellulaire très conservée joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires.

A. Les composants du cytosquelette

1. Les microfilaments

a) Définition et composition des microfilaments

Les microfilaments sont les filaments les plus fins (5-9nm) et les plus abondants du cytosquelette. Ils sont composés d'actine monomérique globulaire (actine-G), petite protéine très conservée entre les espèces[1].Les monomères d'actine-G s'associent en filaments formant des polymères d'actine appelés actine filamenteuse (actine-F). Chaque filament est polarisé avec une extrémité positive qui s'allonge cinq à dix fois plus vite que l'extrémité négative. La polymérisation des filaments d'actine comprend trois étapes : la nucléation, l'élongation et l'état d'équilibre du filament[2] (Fig.1).

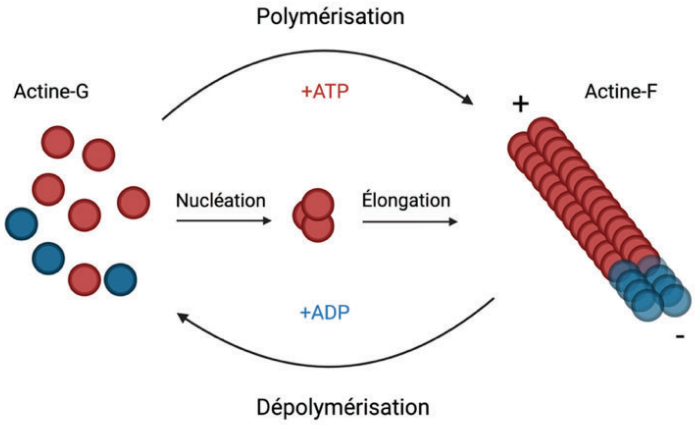


Figure 1.<u>Polymérisation et dépolymérisation de l'actine-F</u>
Les monomères d'actine-G en présence d'ATP (rouge) se polymérisent en filament d'actine ou actine-F à l'extrémité positive (+). L'actine-F se dépolymérise à son extrémité négative et libère les monomères d'actine-G et de l'ADP (bleu). *Adapté à partir de Michard et al [3]*

La polymérisation d'actine est contrôlée par des protéines qui ont la capacité de se lier à l'actine-G ou l'actine-F telles que les protéines de nucléation[4] .

Le complexe Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3) est un complexe de sept sous-unités protéiques important dans l'étape de nucléation de l'actine. Les facteurs de promotion de la nucléation (NPF), dont les protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), activent le complexe Arp2/3 [5]. Les neuf protéines décrites de la famille WASP partagent un motif WH2 (WASP homology 2) commun qui se lie et active le complexe Arp2/3 [6]. L'activation des protéines WASP par les GTPases CDC42 (Cell Division Control protein 42) et RAC (Ras-related C3 botulinum toxin) augmente l'affinité des protéines WASP pour le complexe Arp2/3 qui permet l'activation de ce complexe. La structure tridimensionnelle (3D) du complexe Arp2/3 a été récemment établie par technique de Cryo-microscopie électronique[7]. Cette structure démontre que l'activation du complexe Arp2/3 par WASP conduit à des réarrangements de la conformation du complexe. La modification de la conformation du complexe permet aux protéines de ce complexe d'imiter un dimère d'actine filamenteuse qui crée un noyau de nucléation (Fig.2). Ce noyau de nucléation permet la création puis l'élongation du filament.

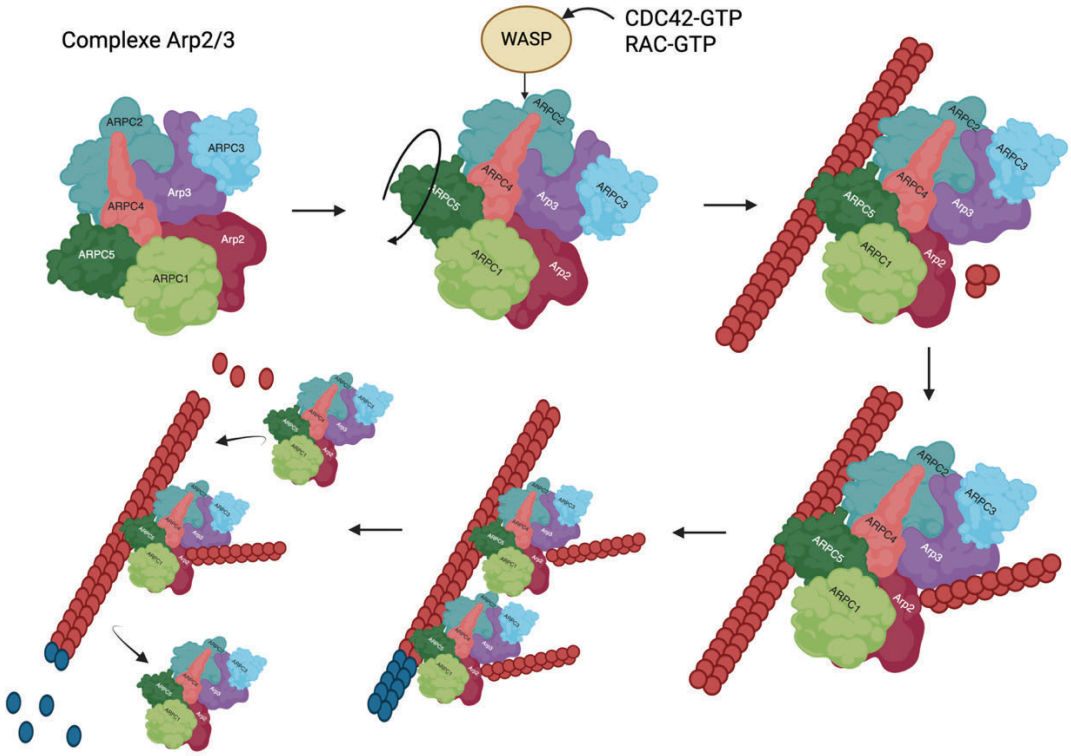


Figure 2. Nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3

Après activation par CDC42 et RAC, WASP active le complexe Arp2/3. L'activation du complexe Arp2/3 conduit au changement de conformation du complexe. Le changement de conformation de Arp2/3 permet la formation d'un noyau de nucléation d'actine-G nécessaire à la création d'un nouveau filament d'actine. De nombreux noyaux de nucléation sont formés

en dynamique et permettent la ramification des filaments d'actine. La dépolymérisation dynamique à l'extrémité négative détache le complexe Arp2/3 qui se fixera à un nouveau filament d'actine polymérisé. *Adapté de Goley et al* [8]

b) Fonctions des microfilaments

La dynamique de la polymérisation d'actine est régulée par de nombreuses protéines. Il existe trois organisations différentes des filaments d'actine : les faisceaux parallèles, les réseaux de mailles et les faisceaux contractiles. Ces organisations permettent la formation des filopodes constitués de faisceaux parallèles, des lamellipodes constitués de réseaux de mailles et de fibres de stress composées de faisceaux contractiles.

Les filopodes sont des extensions longues et fines de membrane cellulaire qui adhèrent au substrat sous-jacent (Fig.3) [9].Ils sont constitués d'un faisceau de filaments d'actine linéaires parallèles reliés par l'α-actinine et constituent un support mécanique de la membrane plasmique. Les filopodes ont la capacité de polymériser rapidement. Ils jouent un rôle de détection des signaux extracellulaires grâce à leurs nombreux récepteurs membranaires. Ils sont notamment impliqués dans la migration cellulaire et dans l'embryogenèse.

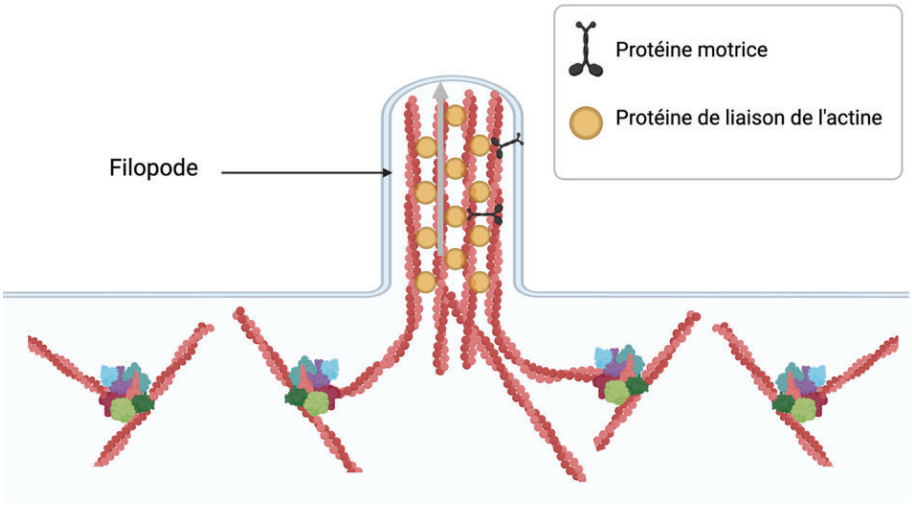


Figure 3. Schéma d'un filopode

La tige du filopode est composée d'un faisceau de filaments d'actine rigides reliés entre eux par des protéines de liaison à l'actine comme l'α-actinine et maintenu par des protéines motrices à la membrane. *Adapté de Mattila et al*. [10]

Les lamellipodes sont de fins feuillets peu compacts de membrane au bord principal de la cellule (Fig.4). Ils sont constitués de filaments d'actine ramifiés denses et sont dépourvus d'organites [11]. Ils sont formés par un réseau de mailles constitué de microfilaments entrecroisés avec des angles de 70°C à 90°C. Les lamellipodes sont impliqués dans l'exocytose et l'endocytose, en particulier dans la phase finale du transport des vésicules. Ils interviennent également dans la migration cellulaire [2].

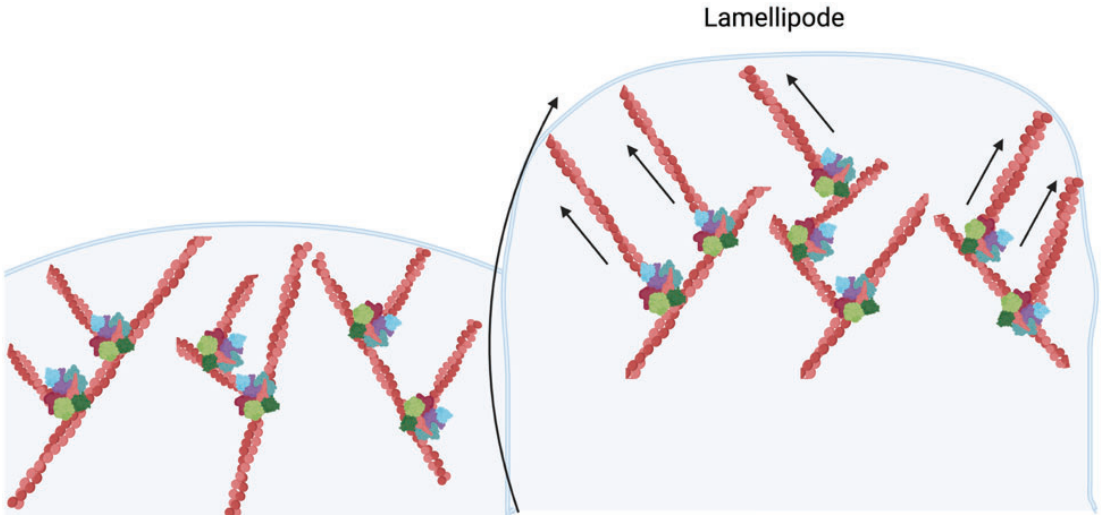


Figure 4. Formation d'un lamellipode

La formation du lamellipode implique l'extension d'un réseau de maille constitué de microfilaments. Les assemblages de filaments sont maintenus et permettent l'extension du réseau de maille. *Adapté de Lamellipodium*[12]

Les fibres de stress sont composées de filaments antiparallèles[13]. Des protéines dites motrices comme la myosine se déplacent sur le filament d'actine vers l'extrémité positive (Fig.5). Le complexe formé entre l'actine et la myosine est appelé actomyosine. Le mouvement des myosines entraine le glissement des faisceaux antiparallèles de l'un par rapport à l'autre aboutissant à la contraction des fibres de stress. Les fibres de stress sont connectées à des structures appelées points focaux d'adhésion. Le point focal est un complexe multiprotéique dynamique qui permet de connecter les microfilaments d'actine aux protéines de la matrice extracellulaire via des protéines transmembranaires incluant les intégrines[14,15]. L'assemblage des fibres de stress aux points focaux d'adhésion génère une force mécanique. Cette tension mécanique est une étape de la mécanotransduction définie par la conversion d'un signal mécanique en signal biochimique dans la cellule. Les fibres de stress sont impliquées dans la migration cellulaire, la cohésion des tissus et la résistance aux agressions mécaniques des tissus.

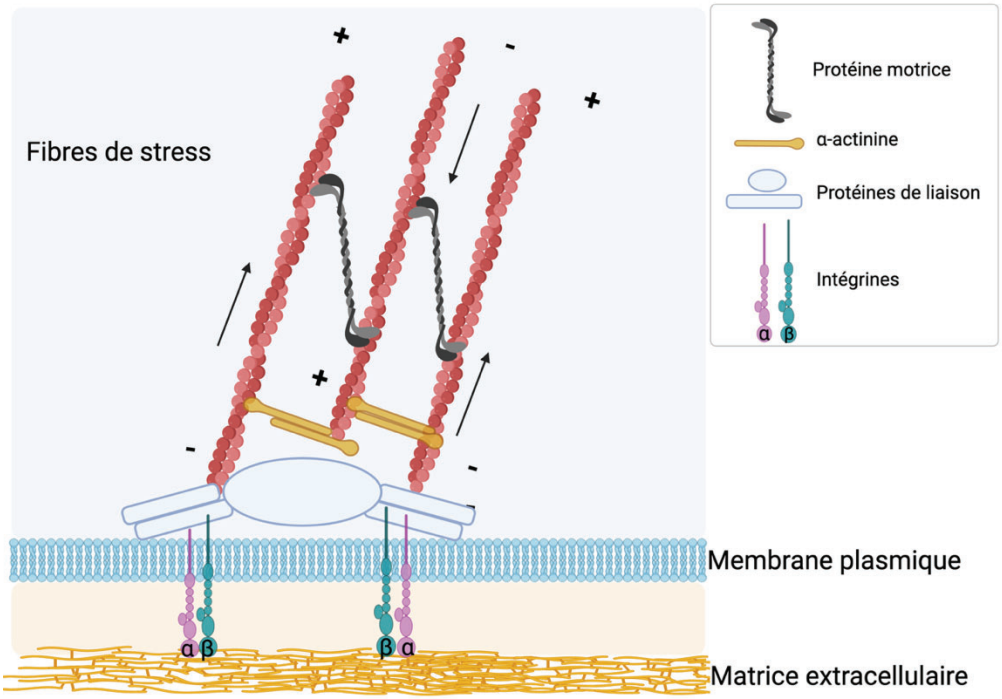


Figure 5.Point focal d'adhésion avec la formation de fibres de stress

Le contact focal entre la matrice extra-cellulaire et la membrane plasmique permet l'activation des intégrines à la surface de la cellule. Les protéines de liaison entre les intégrines activées et le cytosquelette fonctionnent comme des protéines adaptatrices pour recruter d'autres protéines au contact focal. La signalisation permet l'assemblage local de l'actine en faisceaux antiparallèles reliés par l'α-actinine appelés fibres de stress. Le mouvement des protéines motrices entraine le glissement des faisceaux antiparallèles de l'un par rapport à l'autre qui aboutit à la contraction des fibres de stress. Cette contraction participe à la transduction d'un signal mécanique de la matrice extracellulaire à un signal biochimique intracellulaire ou mécanotransduction. *Adapté de Mitra et al*[16]

2. Les microtubules

a) Définition et composition des microtubules

Les microtubules sont des fibres creuses de 25 nm de diamètre composés d'un assemblage de tubulines. La tubuline α et la tubuline β s'activent par la fixation de GTP et s'associent en dimères pour former un protofilament. Les protofilaments s'assemblent pour aboutir à la polymérisation d'un microtubule[17] (Fig.6).

La formation du microtubule se déroule également en trois étapes : la nucléation, l'élongation et l'équilibre.

La nucléation des microtubules se déroule dans le centre d'organisation des microtubules (MTOC)[18,19]. Les microtubules sont des structures polaires avec une extrémité à croissance rapide et une extrémité enchâssée dans le MTOC. La polarisation du MTOC et la dynamique des microtubules impliquent un réseau important de protéines de régulation[20–23].

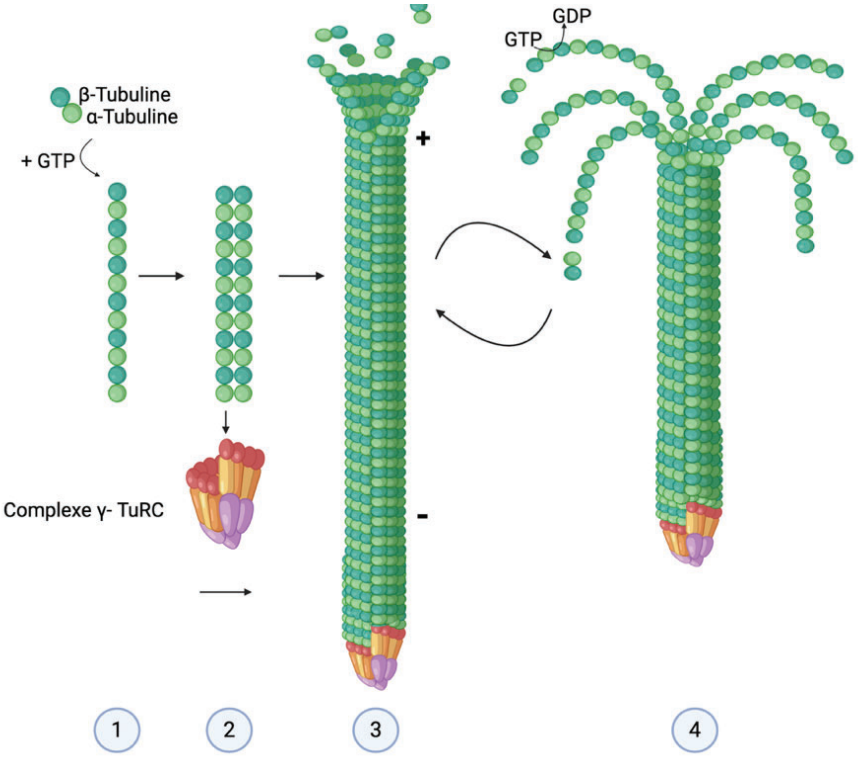


Figure 6.Polymérisation et dépolymérisation des microtubules

1.Étape d'assemblage de dimères de tubuline en protofilament. **2**.Nucléation des microtubules grâce au complexe multiprotéique γ-TuRC (gamma-tubulin ring complex) constitué de γ-tubuline puis assemblage latéral de protofilament.**3**. Étape de polymérisation du microtubule à l'extrémité positive avec ajout dynamique de dimères de tubulines.
4.Phénomène de catastrophe ou dépolymérisation du microtubule à l'extrémité positive. Il existe un équilibre dynamique entre l'étape 3 et l'étape 4.

b) Fonctions des microtubules

Les microtubules sont des acteurs clés du transport dans la cellule et constituent de véritables « rails intra-cellulaires » du MTOC à la membrane plasmatique [24].Les protéines motrices ont pour but de transporter des macromolécules, des petites vésicules et des organites le long de ces rails (Fig.7.1). La dynamique des microtubules permet de générer des forces de traction pour remodeler les membranes des organites intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique [25].
Le remodelage des microtubules participe à la formation d'un assemblage supramoléculaire de protéines qui constitue le fuseau mitotique lors de la division cellulaire (Fig.7.2). Les extrémités dynamiques des microtubules s'associent au fuseau mitotique et entraînent le mouvements des chromosomes et du noyau nécessaire à la division cellulaire[26].
De plus, les microtubules et le cytosquelette d'actine se coordonnent dans de nombreuses fonctions cellulaires [27].

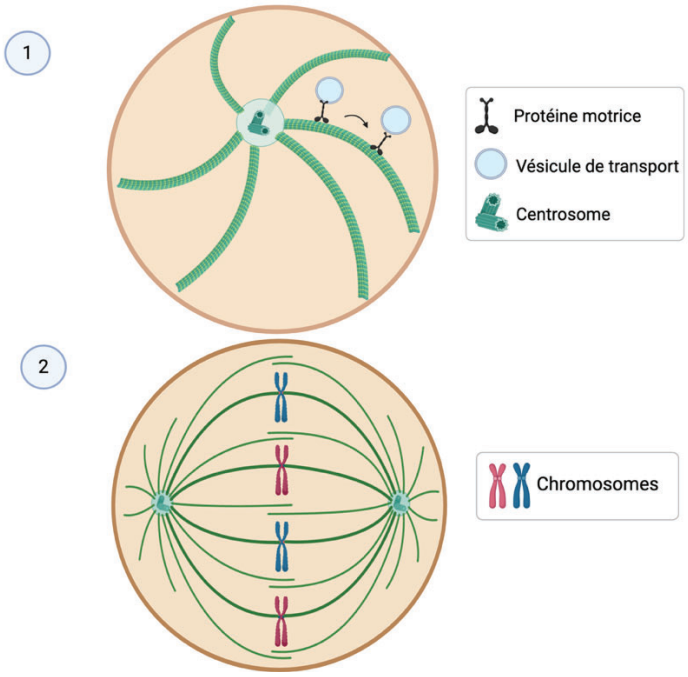


Figure 7.Rôle des microtubules dans le transport intracellulaire et dans la formation du fuseau mitotique

1. Les microtubules forment des rails intracellulaires qui partent du MTOC vers la membrane plasmique. Le MTOC est constitué de nombreuses protéines et contient un organite non membranaire composé de deux centrioles entourés de matériel péricentriolaire appelé centrosome. Les vésicules de transport sont transportées le long des microtubules via des protéines motrices. **2**. Lors de la division cellulaire, la formation du fuseau mitotique est une étape importante qui permet l'alignement des chromosomes. L'alignement des chromosomes nécessite la polarisation de deux MTOC de part et d'autre de la cellule. Les microtubules enchâssés dans les MTOC exercent des forces de traction pour l'alignement des chromosomes.

3. Les filaments intermédiaires

a) Définition et composition des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des fibres hélicoïdales, de 10nm de diamètre, constituées de protéines ubiquitaires[28]. Les protéines monomériques composant ces filaments sont des protéines longues, fines qui s'assemblent spontanément en polymères stables sans polarisation (Fig.8) [29]. Il existe cinq types de filaments intermédiaires définis par les protéines qui constituent le filament.

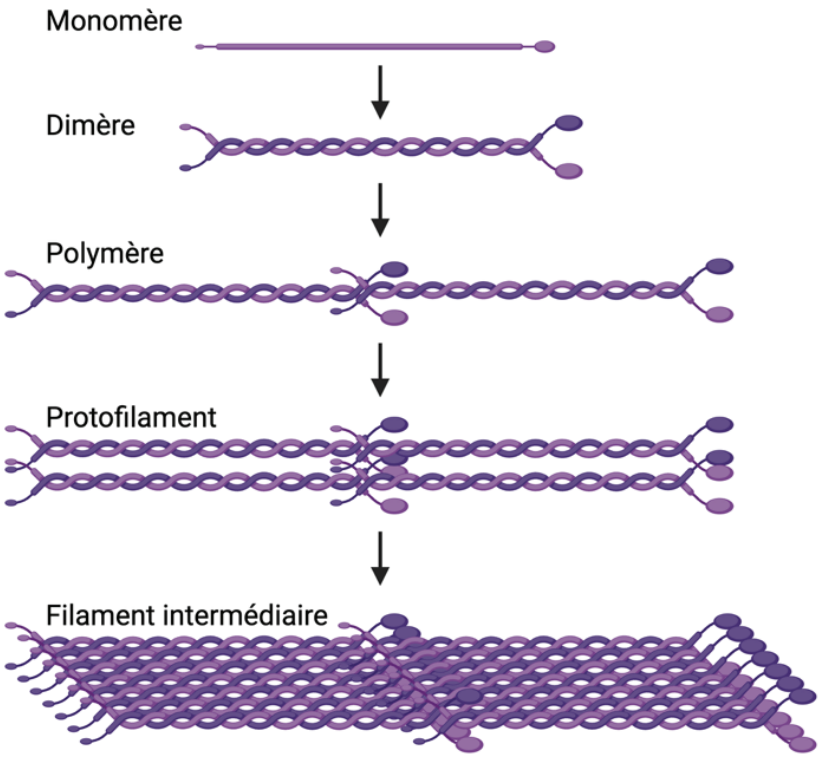


Figure 8.Formation d'un filament intermédiaire

Exemple de la formation d'un filament intermédiaire constitué de kératine. Les protéines monomériques s'assemblent en dimères puis en polymères. Les polymères s'assemblent en protofilament. L'assemblage des protofilaments conduit à la formation des filaments intermédiaires.

b) Fonctions des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires de types I et II sont composés de kératines (K1 à K18) avec une distribution spécifique à chaque tissu principalement des muqueuses de la peau, digestive et des phanères [30]. Ces filaments sont importants pour la cohésion, la stabilité et la résistance au stress mécanique du tissu. Le type III peut être composé de vimentine ou de desmine [29]. Les filaments à base de vimentine permettent l'ancrage des organites au cytosquelette et stabilisent les interactions avec les autres composants du cytosquelette. La desmine est spécifique des cellules musculaires et participent à l'homéostasie du muscle [31]. Le type V est constitué de lamine, une protéine de l'enveloppe nucléaire. Ces filaments forment un réseau fibrillaire qui tapisse la membrane interne du noyau et qui participe à la forme du noyau (Fig.9) [32].

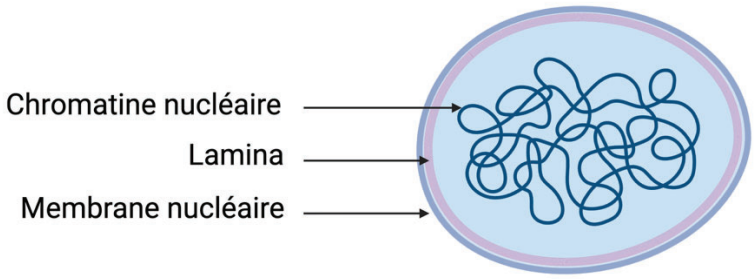


Figure 9. Schéma du noyau et de la lamina nucléaire

La lamina nucléaire est un réseau de filament intermédiaire constitué de lamine qui tapisse la membrane interne du noyau.

Le dynamisme du cytosquelette constitué de microfilaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions cellulaires.

B. Rôles du cytosquelette dans des fonctions cellulaires importantes

Le cytosquelette joue un rôle clef dans de nombreuses fonctions cellulaires. Dans ce chapitre, nous détaillerons le rôle du cytosquelette dans les fonctions suivantes : la polarisation, la migration, la différenciation, la reprogrammation et le métabolisme cellulaire ainsi que la réparation de l'ADN et la stabilité de la membrane plasmique (Fig.10).

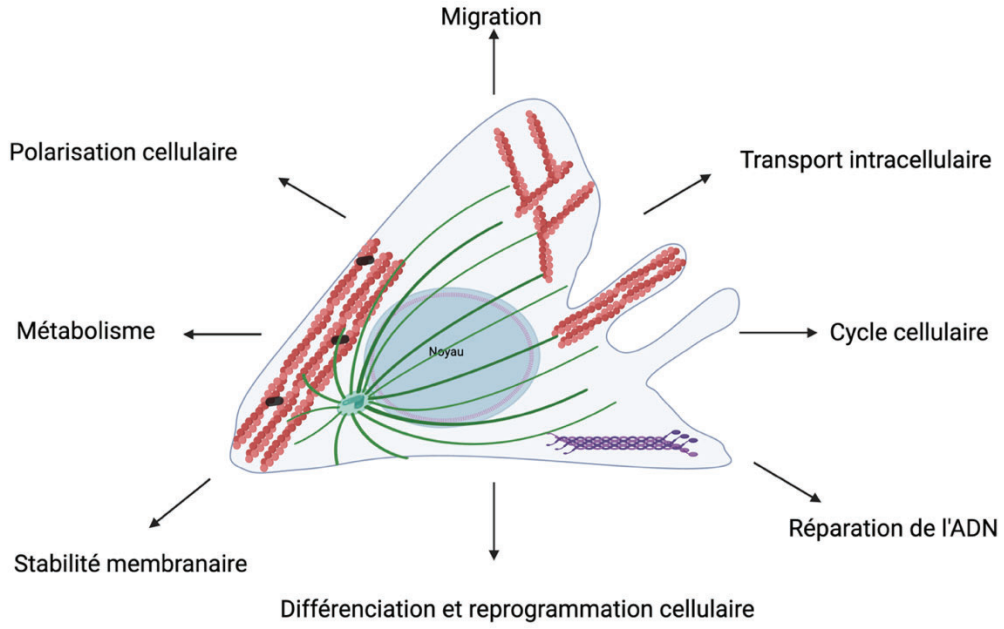


Figure 10. Liste non exhaustive de fonctions cellulaires importantes qui impliquent le cytosquelette

1. Polarisation cellulaire et points focaux d'adhésion

Les cellules sont intimement liées à l'environnement extérieur par les points focaux d'adhésion (FA) à la matrice extracellulaire[33]. Les FA s'organisent autour d'un complexe multiprotéique impliquant des protéines transmembranaires de la famille des intégrines connectées au cytosquelette et aux microtubules[34] . Ces complexes d'adhésion à la matrice extra-cellulaire permettent la polarisation de la cellule vers les points focaux formés. Le désassemblage des FA et leur renouvellement sont des processus finement régulés. Le désassemblage de l'adhésion focale permet l'internalisation des composants de l'adhésion focale par recyclage endocytaire vers la membrane plasmique afin de reformer de nouveaux sites d'adhésion. Les FA sont des biocapteurs essentiels du microenvironnement cellulaire et sont impliqués dans la migration des cellules [13].

2. Migration cellulaire

La migration cellulaire est une fonction cellulaire complexe impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Le mouvement de la cellule est le résultat des changements coordonnés du cytosquelette et des sites d'adhésion entre la cellule et un substrat extracellulaire [35]. Le processus de migration sur un support solide (migration 2D) se déroule en 4 étapes : la protrusion, l'adhésion, la translocation, et la rétraction [36,10] (Fig.11).

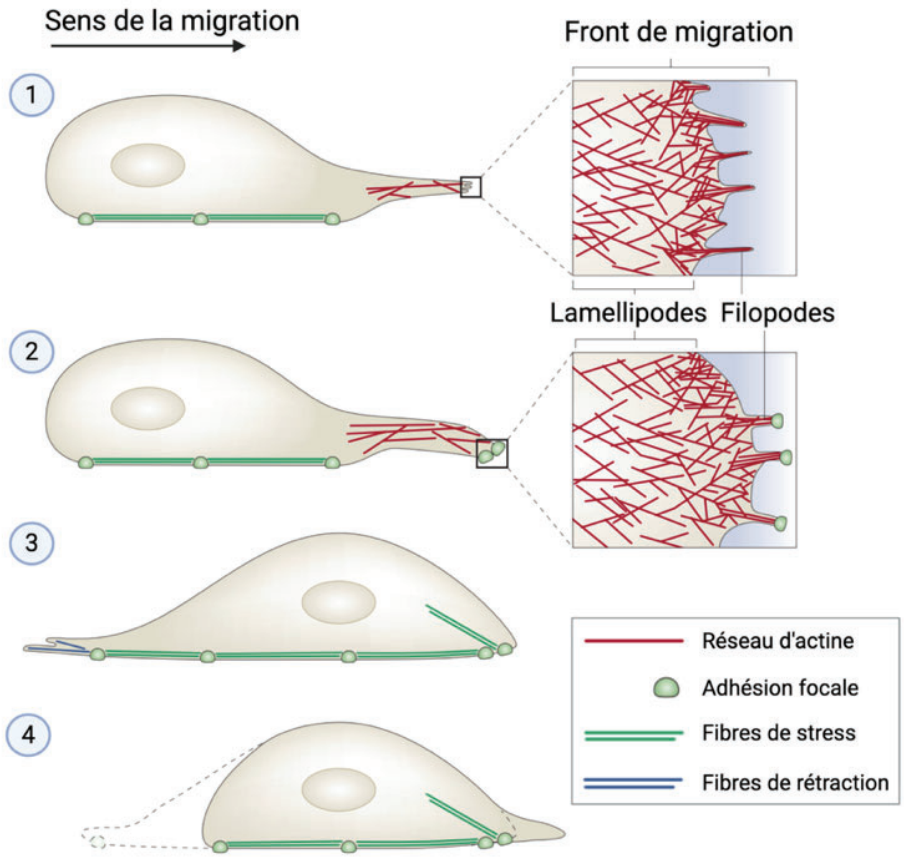


Figure 11.<u>Schéma représentant les quatre grandes étapes de la migration 2D</u>

1.La protrusion : après un signal externe chimique ou mécanique, une cascade de signalisation intracellulaire induit la polymérisation du cytosquelette pour former des protrusions comme les filopodes et les lamellipodes. Cette première étape définit le front de migration ou bord d'attaque vers lequel est polarisée la cellule. Le signal initial active des voies de signalisation intracellulaires via la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui conduit à l'activation de protéines G lesquelles induisent la polymérisation d'actine[37]. **2.** L'adhésion : L'extension de ce front par la formation de points focaux est la phase d'adhésion. La formation des points d'ancrage empêche la rétraction des lamellipodes lors de la deuxième étape. Les microtubules en expansion ciblent les points focaux pour recruter des protéines adaptatrices et régulatrices qui interagissent directement avec les microfilaments d'actine. À l'avant de la cellule, des complexes focaux stationnaires se forment dans le lamellipode avec une dépolymérisation des microtubules. **3.** La translocation: la contraction des fibres de stress permet le détachement des points focaux postérieurs qui conduit au déplacement de la cellule [38]. Les filaments intermédiaires participent à la transmission et la direction des forces de traction et interagissent avec les microtubules [31]. **4.** La rétraction : Le retrait des points d'ancrage à l'arrière de la cellule est nécessaire pendant la phase de rétraction pour finir le mouvement et implique le dynamisme des microtubules. L'internalisation par recyclage endocytaire des complexes protéiques, comme les intégrines des points focaux d'adhésion, vers le front de migration cellulaire , permet la formation de nouveaux sites d'adhésion pour la poursuite de la migration[39] . *Adapté de Mattila et al [10]*

La motilité cellulaire *in vivo* se produit généralement dans des environnements confinés (3D) entourés de matrice extracellulaire[40]. Pour se déplacer, les cellules doivent soit dégrader la matrice par protéolyse soit modifier leur forme pour s'adapter à l'espace disponible. Au cours de la migration en milieu 3D, le corps cellulaire et le noyau doivent se déformer pour permettre le passage des cellules. Le noyau est la partie la plus rigide de la cellule car il est composé de lamine A/C et de chromatine condensée. Le squelette nucléaire est constitué de réseau de filaments intermédiaires de lamine spécifiques du noyau. Il contribue à déterminer la taille et la rigidité du noyau [41]. Le nucléosquelette est connecté au cytosquelette notamment via un complexe multiprotéique associés aux membranes interne et externe du noyau, le complexe LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)[42]. La condensation de chromatine par méthylation de l'ADN participe également à la rigidité du noyau et impacte la déformabilité du noyau [43].

3. Différenciation cellulaire et reprogrammation cellulaire

La différenciation cellulaire est un processus par lequel les cellules jeunes et immatures acquièrent des caractéristiques de structure et de fonctions nécessaires à leur spécialisation. La régulation du cytosquelette et du nucléosquelette sont impliquées dans la différenciation cellulaire[44] . Celle-ci est régulée par la composition de la matrice extracellulaire qui permet d'orienter le remodelage de l'actine via la mécanotransduction.

Par exemple, la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules graisseuses ou cellules osseuses est régulée par la dynamique de l'actine [45](Fig.12). La ramification des filaments d'actine par le complexe Arp2/3 induit la formation de cellules osseuses. L'inhibition de la ramification de l'actine stimule la formation de cellules adipeuses. [46]

L'intégrité de la lamine A, protéine du nucléosquelette, influence également la différenciation cellulaire. Une augmentation de cette protéine induite par la rigidité de la matrice extracellulaire oriente vers l'ostéogénèse. A l'inverse, la diminution de lamine A , induite par une matrice souple, oriente la différenciation vers l'adipogénèse [47].

La réorganisation des programmes transcriptionnels lors de la reprogrammation cellulaire permet la conversion d'une lignée à une autre sans passer par un état pluripotent intermédiaire. Après stimulation mécanique, le dynamisme du cytosquelette interconnecté au nucléosquelette permet de modifier l'état mécanique des membranes nucléaires, l'organisation et la rigidité du noyau, l'état de compactage de la chromatine puis la transcription de gènes[48]. Le nucléosquelette régule l'organisation de la chromatine, la transcription génétique et probablement les modifications épigénétiques impliquant l'ADN [49].

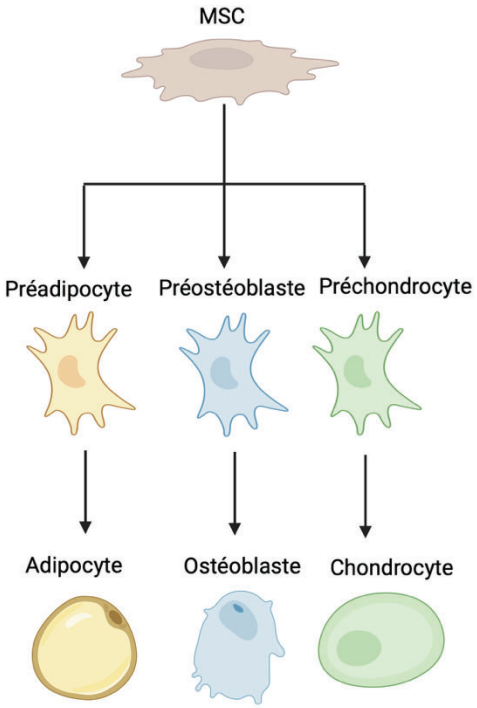


Figure 12. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses
Différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en adipocyte, ostéoblaste ou chondrocyte. *Schéma adapté de Reagan et al*[45].

4. Mécanismes de réparation de l'ADN

Les mécanismes de réparation de l'ADN permettent à la cellule d'identifier et corriger les dommages aux molécules d'ADN génomique. Le cytosquelette remplit plusieurs fonctions qui participent au maintien de la stabilité du génome [50,51,52]. Des travaux récents suggèrent l'influence de l'intégrité du cytosquelette sur la dynamique des protéines de réparation de l'ADN[53]. La rigidité de la matrice extracellulaire participe à l'efficacité de la réparation de l'ADN et ainsi à la sensibilité cellulaire aux agents génotoxiques [54].

5. Stabilité de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche lipidique séparant le cytoplasme du milieu extracellulaire. Elle est constituée de phospholipides, de cholestérol et de multiples protéines membranaires reparties de manière hétérogène[55].
L'interface entre la membrane lipidique et le cytosquelette est un élément important de la dynamique des protéines membranaires[56] . La fonctionnalité de cette interface est probablement bidirectionnelle[57] . La dynamique membranaire régulée par le cytosquelette permet l'activation de voies de signalisation régulant de nombreuses fonctions cellulaires.

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique composés notamment de cholestérol et de sphingolipides[58] (Fig.13). Les radeaux lipidiques sont enrichis en protéines du cytosquelette selon plusieurs analyses protéomiques[59–63].

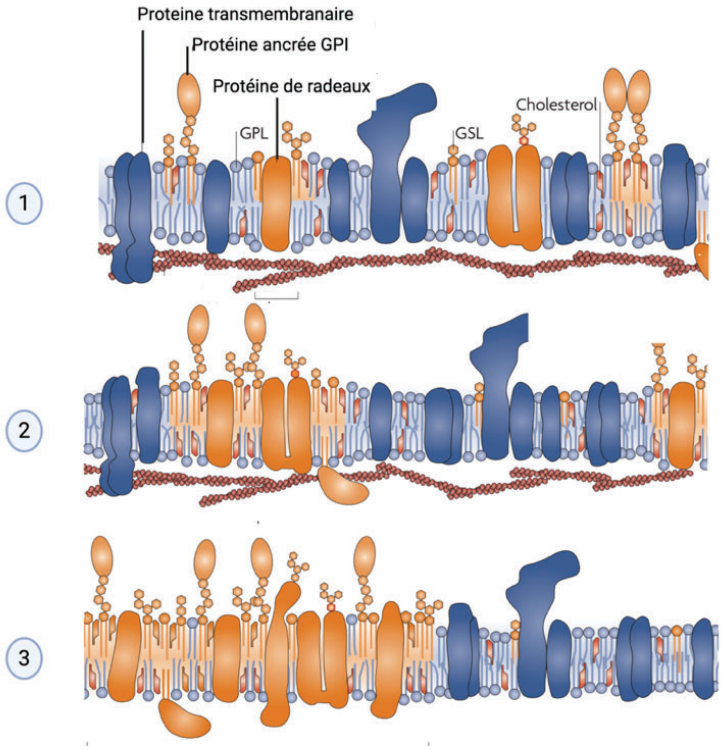


Figure 13. Formation de radeaux lipidiques de la membrane plasmique

1. Les assemblages nanométriques de stérols tels que le cholestérol, de sphingolipides (GPL) tels que la sphingomyéline et les glycosphingolipides (GSL), et de protéines dans la membrane plasmique varient en termes de composition. Les protéines ancrées par glycosylphosphatidylinositol (GPI), les protéines transmembranaires sont supposées constituer ces assemblages, qui peuvent être régulés par les filaments d'actine. **2**. En réponse à des signaux externes ou au déclenchement d'événements de trafic membranaire, des plateformes radeaux lipidiques se forment à partir d'assemblages par le biais d'interactions multiples entre lipides et protéines. Ces plateformes sont importantes pour la signalisation membranaire et le trafic membranaire. **3**. Des « phases » de radeaux lipidiques de taille micrométrique peuvent être induites à l'équilibre. *Schéma modifié de Simons et al* [64]

Les radeaux lipidiques participent à la stabilité dynamique de la membrane plasmique.

La stabilisation des membranes est cruciale dans des conditions de stress et le cytosquelette d'actine régule de la tension membranaire après un signal mécanique[40,65].

La plasticité de la membrane plasmique requiert la spécialisation en domaines membranaires différenciés. Parmi ces domaines, on retrouve les cavéoles qui sont des petites invaginations caractéristiques de la membrane plasmique riches en molécules de signalisation [66]. Authentiques organites cellulaires, les cavéoles sont des mécano-senseurs et des structures de mécano-signalisation[67]. L'organisation des cavéoles est régulée par les fibres de stress[68] .

Elles interagissent avec le cytosquelette pour le transport de lipides vers la membrane et pour leur capacité de réponse à un stress mécanique[69] .
La signalisation des récepteurs transmembranaires implique des interactions dynamiques de ces récepteurs avec l'actine et des nanodomaines lipidiques. Blouin et al ont mis en évidence le rôle de l'organisation nanométrique des membranes dans le changement conformationnel du récepteur de l'interféron γ (IFN-γR2) nécessaire à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT impliquée dans le système immunitaire[70].

6. Métabolisme cellulaire

Le métabolisme est un ensemble de processus complexe et dynamique de transformation de matière et d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire.
Le métabolisme du glucose implique de multiples mécanismes dont l'absorption du glucose par les cellules via la signalisation de l'insuline et la dégradation du glucose intracellulaire (Fig.14).
Le glucose dans le sang stimule la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas. Le transport et la fusion des granules contenant l'insuline en vue de l'exocytose implique le remodelage des filaments d'actine[71,72]. L'insuline via son récepteur déclenche l'absorption intracellulaire du glucose via l'activation des transporteurs de glucose. La dynamique des récepteurs de l'insuline et des transporteurs du glucose est finement régulée par le cytosquelette [73,74].
Le stockage des lipides est une étape du métabolisme des lipides. Il implique des organites appelés gouttelettes lipidiques. Le cytosquelette d'actine et les microtubules participent à la formation et la dynamique des gouttelettes lipidiques [75,76].
Lors de la différenciation des cellules graisseuses, le nucléosquelette régule la compression du noyau sous la membrane plasmique nécessaire à l'accumulation des gouttelettes lipidiques. Le remodelage du noyau s'accompagne d'une régulation de transcription de gènes impliqués dans l'adipogénèse [77].
L'altération du cytosquelette et du nucléosquelette peuvent conduire à une dysfonction du tissu graisseux. Des mutations bi-alléliques du gène *LMNA,* codant la lamine A, ont été identifiées chez des patients qui présentent une atrophie graisseuse (lipodystrophie), et une dystrophie musculaire, associées à un syndrome de vieillissement prématuré [78]. La structure, la rigidité du noyau et la liaison aux partenaires protéiques de la Lamine A dans l'enveloppe nucléaire sont perturbées dans les adipocytes de ces patients. Le défaut du nucléosquelette a des conséquences sur la différenciation et le maintien des adipocytes dans le tissu graisseux, ce qui contribue à la lipodystrophie des patients.

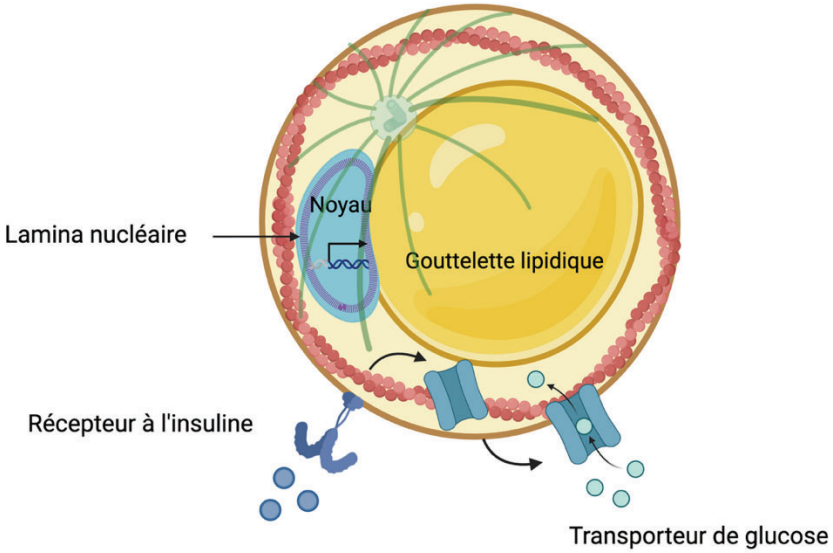


Figure 14 .<u>Exemple de fonctions du cytosquelette et nucléosquelette dans un adipocyte</u>
Lors de la maturation d'un adipocyte, le cytosquelette est remanié et permet l'augmentation de la gouttelette lipidique qui refoule le noyau. La déformation du noyau implique le dynamisme du nucléosquelette. Le remodelage du noyau s'accompagne d'une régulation de transcription de gènes impliqués dans l'adipogénèse. Le cytosquelette participe à l'expression membranaire du transporteur de glucose en réponse à la signalisation de l'insuline.

C. Rôles du cytosquelette dans le système immunitaire et hématopoïétique

Le cytosquelette régule de nombreuses fonctions impliquées dans le système immunitaire et les plaquettes.

1. Migration cellulaire et développement du système immunitaire

La migration des cellules immunitaires permet au système immunitaire inné et adaptatif de patrouiller dans tous les tissus de l'organisme.

a) Les Neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation et sont les premières cellules recrutées sur le site de l'infection. La mobilité des neutrophiles et leur passage à travers l'endothélium vers le site d'infection implique le cytosquelette d'actine. L'élimination des pathogènes par les neutrophiles requiert plusieurs mécanismes, comme la phagocytose, la dégranulation, la production et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont régulées par le cytosquelette. Les neutrophiles sont capables de libérer des pièges extracellulaires appelés NET (Neutrophils Extracellular Traps) utilisés pour éliminer des pathogènes. Le remodelage de l'actine et de l'actomyosine participe à la formation des NETs. [79] .

b) Les Lymphocytes T

L'ontogenèse des lymphocytes T nécessite la migration des progéniteurs des cellules T de la moelle osseuse vers le thymus qui permet la maturation des lymphocytes T [80]. Le processus de maturation dans le thymus des cellules T nécessite la mobilité des thymocytes dans le cortex et la médulla thymique pour assurer les étapes de la sélection positive et négative avant la libération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans la circulation périphérique. La mobilité des lymphocytes T naïfs est limitée aux organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T effecteurs et mémoires acquièrent la capacité de migrer vers les tissus non lymphoïdes, essentielle à l'immunité tissulaire (Fig.15). La capacité de migration dans un environnement confiné permet la mobilité des cellules T dans les tissus[81].

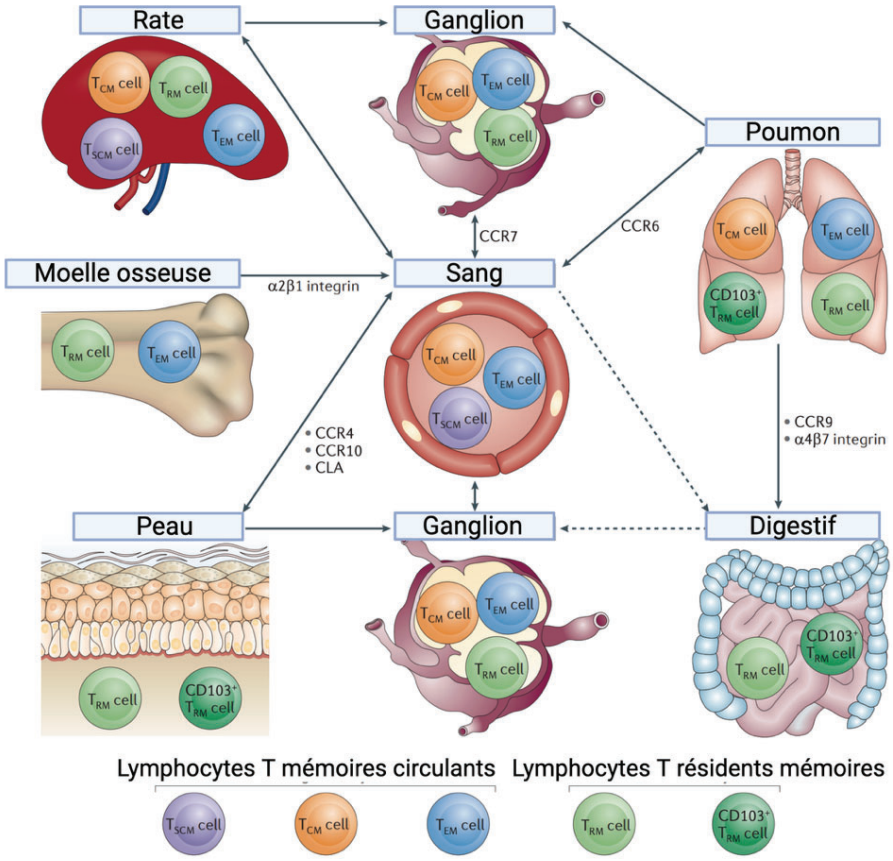


Figure 15. Schéma représentant la répartition des lymphocytes T mémoires dans le sang et dans les tissus.

La distribution tissulaire et les schémas de migration des principaux sous-ensembles de cellules T mémoires humaines sont présentés : les cellules T mémoires souches (T_{SCM}), les cellules T mémoires centrales (T_{CM}) et les cellules T mémoires effectrices (T_{EM}) — ainsi que les populations de cellules T mémoires résidant dans les tissus (T_{RM}) dans plusieurs sites, y compris les cellules T_{RM} $CD8^+$ qui sont définies par l'expression de CD103 (cellules T_{RM} $CD103^+$) et qui sont associées aux sites muqueux et à la peau. L'expression des récepteurs à chimiokines C-C (CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10) des cellules T permet de guider leur migration par chimiotactisme dans les différents sites de migration en fonction du récepteur exprimé. *Adapté de Farber et al* [82].

c) Les lymphocytes B

Les précurseurs des lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse en cellules B immunocompétentes et sont libérés en périphérie [81]. Après la rencontre avec un antigène reconnu par les immunoglobulines membranaires, les lymphocytes B activés migrent vers les organes lymphoïdes secondaires au niveau du centre germinatif où ils vont proliférer. Ils vont ensuite subir une maturation d'affinité et une commutation de classe leur permettant de produire les immunoglobulines A, E ou G. C'est également le lieu de différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes à courte et à longue durée de vie.

d) Les Cellules Dendritiques

Les progéniteurs des cellules dendritiques migrent vers les organes non lymphoïdes et se différencient en cellules dendritiques (DC) immatures [83]. Les DC immatures se répartissent dans l'ensemble des tissus et forment un réseau de cellules sentinelles. Grâce à leurs protrusions et leur surface régulées par le cytosquelette, elles échantillonnent et traitent des antigènes du soi et du non-soi. Elles s'activent après reconnaissance d'antigènes et augmentent l'expression du récepteur 7 des chimiokines (CCR7). L'expression de CCR7 permet la migration par chimiotactisme des DCs vers les vaisseaux lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires. Grâce au remaniement du cytosquelette, les DCs présentent les peptides antigéniques aux cellules T grâce à la formation d'une synapse immunologique. La présentation antigénique aboutit à l'induction de la tolérance immunologique ou à l'expansion de population T effectrices.

2. Synapse immunologique

La synapse immunologique (SI) joue un rôle crucial dans la communication entre les cellules immunitaires. La SI concentre la signalisation, la sécrétion et l'endocytose au point de contact entre les cellules effectrices et les cellules présentatrices d'antigènes (APC) [84]. Cette zone de contact dynamique et structurée est le résultat d'un processus finement régulé de polarisation cellulaire du lymphocyte.
La polarisation du lymphocyte conduit à la relocalisation des corécepteurs, de protéines de signalisation intracellulaire et de protéines d'adhérence. Les récepteurs spécialisés impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion de la cible s'organisent pour former des micro-amas[85].

La capacité de remodelage du cytosquelette d'actine fournit une base structurelle pour l'architecture dynamique et polymorphe de la synapse immunologique (Fig.16). En périphérie de la zone de contact, l'actine s'organise en réseau dynamique ramifié en forme d'anneau permettant la stabilisation de la structure. Le centre de la synapse est caractérisé par une déplétion partielle en actine-F [86]. L'endocytose et le recyclage des récepteurs spécialisés sont régulés par le réseau dynamique d'actine. Les points de contrôles immunitaires, sont des récepteurs situés sur la membrane plasmique des lymphocytes T et ils participent à la régulation de la réponse immunitaire via la synapse immunologique [87].
Le réarrangement du réseau de microtubules induit la polarisation du MTOC vers la synapse immunologique [88,89].La polarisation du MTOC permet le rapprochement des compartiments cellulaires impliqués dans le trafic vésiculaire des granules cytolytiques et la sécrétion spécialisée de molécules vers la surface de l'APC [90,91]. Les filaments intermédiaires participent à l'architecture et à l'intégrité de la synapse immunologique[29] .

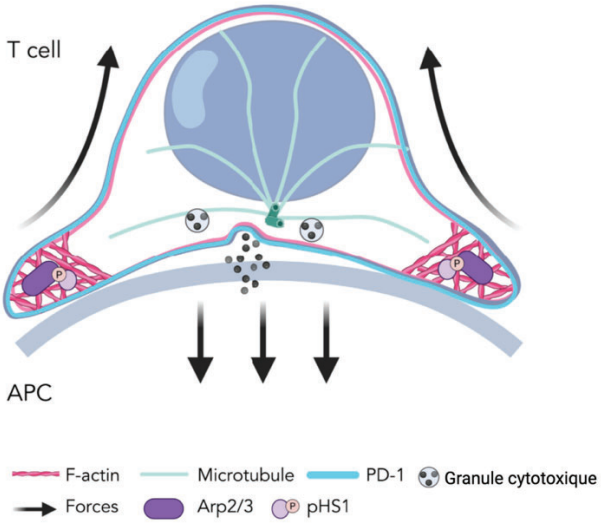


Figure 16. Formation d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T et une APC
L'activation du lymphocyte T induit un remodelage de l'actine-F au niveau de la synapse. La formation de lamellipodes distaux et la déplétion partielle en actine-F au centre permettent la déformation du lymphocyte T qui s'étend sur l'APC. Le remodelage de l'actine génère également des forces mécaniques qui potentialisent la fusion des granules cytotoxiques et la cytotoxicité. *Schéma et légende adaptés de Paillon et al*[87].

3. Plaquettes et cytosquelette

Les plaquettes sont de petits fragments cellulaires sans noyau, dérivés des mégacaryocytes, (MK) qui circulent dans le sang. Les plaquettes jouent un rôle important dans l'hémostase, la thrombose, l'inflammation et la biologie vasculaire [92]. Le processus de maturation des MK dans la moelle osseuse, la formation des pro-plaquettes à partir des extensions membranaires des MK et la libération des plaquettes dans la circulation impliquent la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules[93].
Les plaquettes s'activent après stimulation par des agonistes tels que la thrombine ou par le contact avec la matrice extracellulaire. L'activation des plaquettes entraine une réorganisation du cytosquelette qui conduit à un changement de la forme des plaquettes, à leur adhésion et à la sécrétion de leurs granules[94] .Ces mécanismes régulent leur fonction hémostatique[92].
Les MK sont les cellules de la moelle osseuse qui génèrent les plaquettes par un processus qui comprend deux étapes principales : l'augmentation du nombre de chromosomes responsable de l'augmentation de la taille des MK et l'extension de longs pseudopodes, appelés pro-plaquettes, à travers la barrière endothéliale qui entraine la libération des plaquettes dans le sang (Fig.17).

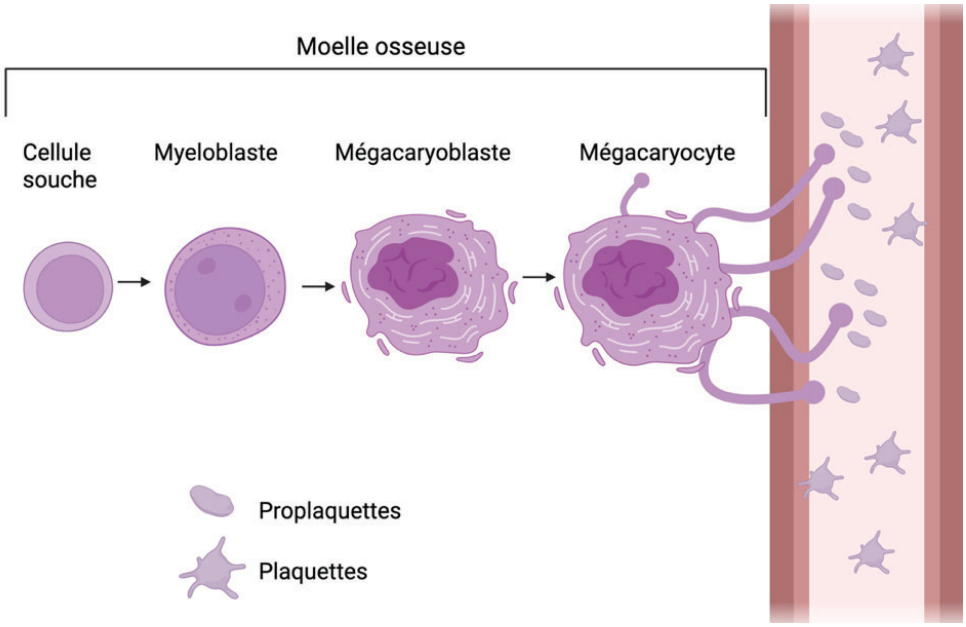


Figure 17.Schéma des étapes principales de la formation des plaquettes

La cellule souche hématopoïétique peut se différencier en myéloblaste, précurseur des mégacaryoblastes. La différenciation en mégacaryoblaste implique une augmentation de sa taille et de la taille du noyau avec la multiplication du nombre de chromosomes ou polyploïdisation et un remaniement des membranes. Le mégacaryoblaste se différencie en mégacaryocyte capable d'émettre de longues extensions appelées pseudopodes. Ces longs pseudopodes permettent la formation des pro-plaquettes, précurseurs des plaquettes.

4. Actinopathies liées au système immunitaire et aux plaquettes

Les actinopathies désignent un groupe de maladies génétiques rares associées à des mutations dans des gènes codant des protéines de régulation du cytosquelette d'actine. Moins de trente actinopathies liées au système immunitaire ont été identifiées à ce jour[95,96].

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à quelques exemples d'actinopathies associées à un déficit immunitaire et une atteinte plaquettaire.

a) Le syndrome WAS

Le syndrome WAS est un déficit immunitaire combiné, associé à des mutations hémizygotes dans le gène *WAS* qui est localisé sur le chromosome X et qui code la protéine WASP[97].

WASP est exprimée uniquement dans les cellules d'origine hématopoïétique. Il appartient à la famille de facteurs favorisant la nucléation de l'actine via le complexe Arp2/3[98]. Les mutations de WASP décrites initialement sont pertes de fonction. Des mutations gain de fonction de WASP ont également été décrites et sont associées à une neutropénie sévère[99].

Le défaut de la protéine WASP entraîne un phénotype de sévérité variable allant de la thrombocytopénie légère isolée à un déficit immunitaire combiné sévère caractérisé par une thrombocytopénie avec risque hémorragique, un eczéma précoce, une forte susceptibilité au développement de tumeurs et des manifestations auto-immunes. Le signe pathognomonique biologique du WAS est la présence de plaquettes de petite taille en nombre diminué (microthrombocytopénie)[100] . Les mécanismes à l'origine de la microthrombocytopénie sont débattus dans la littérature et semblent être multiples. Des études suggèrent une production centrale inefficace de plaquettes et d'autres études une production normale mais une élimination périphérique accrue.
Les souris dépourvues de la protéine WASP développent une thrombopénie avec des plaquettes de taille normale. La thrombopénie murine résulte d'une thrombopoïèse défectueuse associée à une élimination périphérique des plaquettes dépourvues de WASP médiée par les macrophages et les auto-anticorps dirigés contre les plaquettes.
Dans un modèle murin avec une délétion conditionnelle dans les mégacaryocytes, la dérégulation du cytosquelette plaquettaire conduit à la sécrétion inappropriée du ligand CD40 (CD40L). Le CD40L est une glycoprotéine qui interagit avec le CD40 à la surface des cellules immunitaires [101]. L'axe CD40-CD40L est impliqué dans de nombreuses réactions inflammatoires. L'expression augmentée de CD40L sous forme soluble ou à la surface des plaquettes déficientes en WASP induit l'activation des lymphocytes B via le CD40 et la production d'auto-anticorps[102](Fig.18). Ces résultats suggèrent le rôle autonome des plaquettes dans le développement de l'auto-immunité en l'absence de WASP.

Les patients atteints de WAS présentent un risque accru d'infections virales, bactériennes et fongiques impliquant le système immunitaire innée et adaptatif [100]. Les monocytes et les macrophages des patients présentent un défaut marqué de réponses chimiotactiques et phagocytaires. L'adhésion des neutrophiles et leur production de ERO induites par les intégrines sont altérées [103]. Les cellules tueuses naturelles (NK) présentent un défaut de migration médiée par les intégrines et une formation désorganisée de la synapse immunologique [104,105]. La mobilité des DCs est réduite ainsi que leur capacité à produire une synapse immunologique stable et fonctionnelle avec les lymphocytes T et NK[106,107].
La lymphopénie T est fréquente chez ces patients affectant plutôt les lymphocytes T naïfs en particulier $CD8^+$ .Les cellules T présentent des anomalies du cytosquelette après activation du TCR *in vitro* [108,109] .
Les patients présentent également des anomalies intrinsèques de développement et de différenciation des lymphocytes B. Les lymphocytes B mémoires sont souvent diminués, en particulier chez les patients plus âgés. La sous-population lymphocytaire B $CD21^{low}$, enrichie en lymphocytes auto-réactifs, est augmentée[110]. Près de 70% des patients développent de l'auto-immunité dont les plus fréquentes sont les cytopénies auto-immunes (anémie hémolytique, neutropénie, thrombocytopénie) [111].Les autres atteintes sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des vascularites, des arthrites inflammatoires et des

maladies rénales immunologiques [100]. Les lymphocytes B naïfs matures des patients semblent présenter une fréquence accrue de clones exprimant des anticorps auto-réactifs [112].
Les lymphocytes T régulateurs des patients sont en nombre normal mais présentent un défaut de suppression *in vitro*[113] .
L'altération des fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs (Tregs), la survie des clones de cellules B productrices d'autoanticorps et la présentation d'antigènes par les plaquettes aux lymphocytes B semblent participer au défaut de tolérance périphérique chez ces patients[100] .

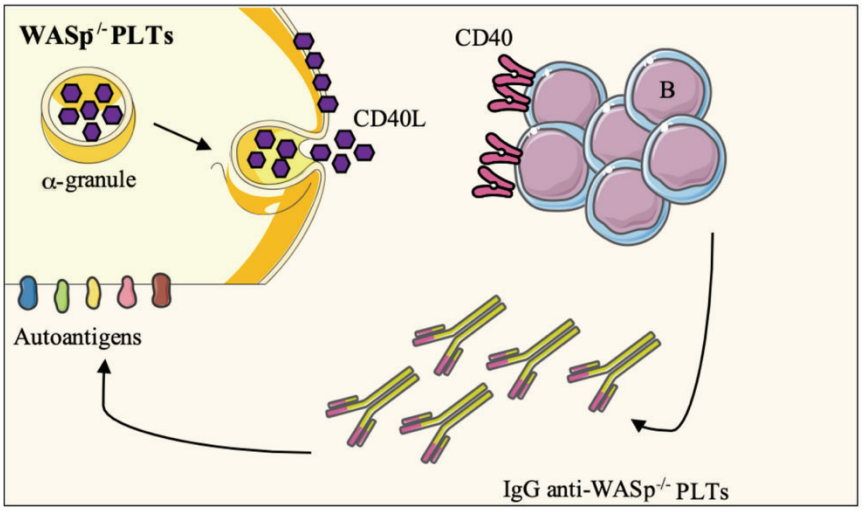


Figure 18.Défaut intrinsèque des plaquettes déficiente en WASP

La délétion conditionnelle de *Was* dans les plaquettes conduit à la sécrétion inappropriée de CD40L contenu dans les granules α à la surface des plaquettes. L'augmentation de l'expression membranaire CD40L et de la forme soluble de CD40L médient l'interaction avec le récepteur CD40 à la surface des lymphocytes B. Cette interaction induit une réponse B avec la production d'autoanticorps dirigée contre les autoantigènes plaquettaires. Ce défaut intrinsèque plaquettaire pourrait contribuer à l'élimination périphérique des plaquettes. *Schéma de Sereni et al* [102].

b) Le déficit en ARPC1B

Des mutations bi-alléliques pertes de fonction du gène *ARPC1B* ont été identifiées chez des patients présentant un phénotype similaire aux patients atteints d'un WAS [114,115]. Ce gène code la protéine ARPC1B appartenant au complexe Arp2/3, élément majeur de la régulation de la nucléation d'actine par WASP. Les patients présentent une thrombocytopénie variable, des infections bactériennes et virales, un eczéma précoce, des vascularites cutanées des petits vaisseaux, des maladies inflammatoires du tube digestif et un retard de croissance. Les plaquettes des patients sont similaires à ceux atteints d'un WAS avec un volume plus petit et des anomalies du cytosquelette[115]. Les neutrophiles déficients en ARPC1B présentent un défaut de migration mais avec une fonction oxydative normale [116]. Les patients présentent une

lymphopénie globale affectant particulièrement les lymphocytes naïfs. *In vitro*, les lymphocytes T déficients en ARPC1B présentent des filopodes et une formation de synapse immunologique altérée. La migration par chimiotactisme et la prolifération médiée par le récepteur des lymphocytes T sont également diminuées [117].

c) Le déficit en ARPC5

Des mutations bi-alléliques pertes de fonction du gène *ARPC5* ont été identifiées chez des patients présentant un phénotype similaire aux patients atteints d'un déficit en ARPC1B. La protéine ARPC5 codée par ce gène fait également partie du complexe Arp2/3. Les patients décrits développent des infections récurrentes et graves associées à de l'auto-immunité précoce, une thrombocytopénie, une inflammation et un dysmorphisme[118]. Les neutrophiles et les fibroblastes ont également une altération du cytosquelette d'actine avec l'absence de lamellipodes, la présence aberrante de filopodes et un défaut de migration. Nunes-Santos et al. ont mis en évidence un défaut de signalisation de IL-6/IL-6R dans les lymphocytes T des patients. La diminution d'expression à la surface des lymphocytes T du récepteur de l'IL-6 (IL6-R) et une augmentation du complexe IL-6/IL-6R soluble participe au défaut de signalisation de la voie IL6/IL6R. Les auteurs suggèrent que la dérégulation du cytosquelette conduit à l'altération de cette voie de signalisation[118].

Le cytosquelette est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires en particulier dans le système immunitaire et les plaquettes. L'organisation et la dynamique du cytosquelette sont finement régulées par les GTPases RHO.

II. LES GTPASES RHO, PROTEINES REGULATRICES ESSENTIELLES DU CYTOSQUELETTE

Les GTPases (guanosine triphosphate phosphohydrolase) sont des petites protéines G très conservées qui catalysent l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) pour donner une guanosine diphosphate (GDP) et un ion phosphate (Fig.19). Les GTPases alternent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP [119]. Les GTPases RHO (Ras homology) appartiennent à la super famille des GTPases RAS (rat sarcoma) et jouent un rôle prépondérant dans l'organisation du cytosquelette, la polarisation des structures cellulaires et la structuration des voies de signalisation.

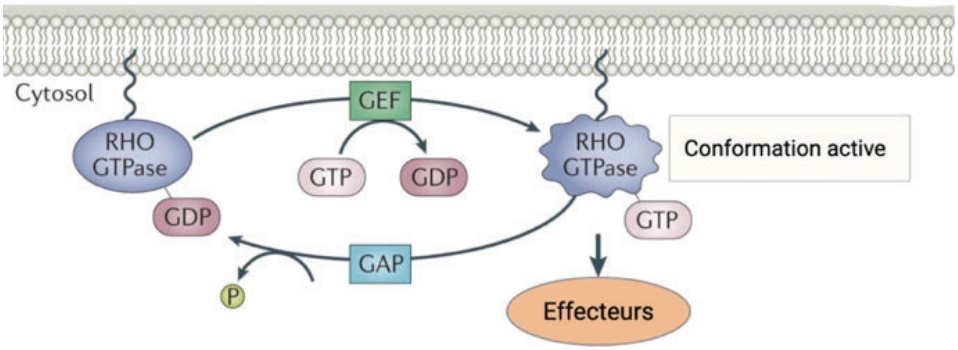


Figure 19. Activation et inactivation des GTPases RHO

Après l'ancrage à la membrane des GTPases RHO liées au GDP, Les facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEFs) activent les GTPases RHO en remplaçant le GDP par le GTP. À l'inverse, les protéines activatrices de GTPase (GAPs) accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP. À l'état actif lié au GTP, les GTPases RHO changent de conformation et peuvent se lier à des effecteurs. *Adapté de Masri et Delon* [120]

A. Définition des GTPases RHO

Les GTPases RHO s'associent essentiellement à la membrane plasmique et participent à la signalisation cellulaire via différents récepteurs membranaires et effecteurs. On retrouve 22 membres de cette famille chez l'humain, parmi lesquels CDC42 , RAC, et RHOA (Ras HOmolog family member A) [121]. Les GTPases RHO sont régulées par des facteurs d'échange de guanine (GEFs), des protéines activatrices de GTPase (GAPs) et des inhibiteurs de la dissociation de la guanosine (GDIs) [122].

Les GDIs séquestrent les GTPases RHO dans le cytoplasme en dissimulant leur chaine lipidique pour les empêcher de s'ancrer à la membrane plasmique[123]. En plus du cycle GTP/GDP, les GTPases RHO sont régulées par des modifications post-traductionnelles qui participent principalement à leur stabilité, leur localisation dans la cellule, leur transport et à leur

dégradation[124].En réponse à une stimulation par des chimiokines, des cytokines ou des facteurs de croissance, les protéines GEFs activent les GTPases RHO en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Les protéines GAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP, ramenant ainsi ces petites protéines G à un état inactif. Les GTPases RHO activées se lient à des effecteurs en aval et déclenchent plusieurs cascades de signalisation [122] (Fig.20). Plusieurs protéines cibles ont été identifiées dont les nucléateurs d'actine de la famille des protéines WASP, les kinases p21-activées (PAK) et les protéines kinases associées à RHO (ROCK) en aval de CDC42, RAC et RHO [125].

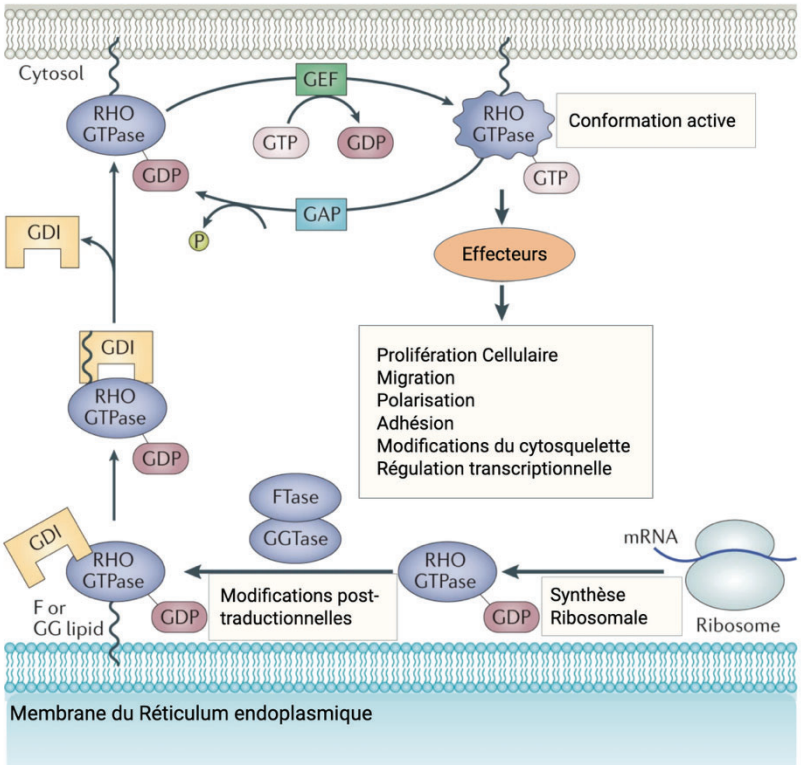


Figure 20. Synthèse, modifications post-traductionnelles et mécanismes d'action typiques des GTPases RHO

Lors de la synthèse ribosomale d'une GTPase RHO, la protéine subit rapidement une modification post-traductionnelle à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique (ER). Cette modification consiste en l'ajout de lipides farnésyle (F) ou géranylgéranyle (GG) sur le résidu cystéine du motif CAAX de la GTPase RHO par la farnésyltransférase (FTase) ou la géranylgéranyl transférase (GGTase), respectivement. Les GDIs peuvent se lier à la GTPase RHO et l'extraire de la membrane de l'ER. L'insertion de la fraction lipidique de la GTPase RHO dans la poche hydrophobe du GDI assure la séquestration cytosolique de la GTPase sous sa forme inactive liée au GDP. Lors de la signalisation, la libération du GDI et l'ancrage de la GTPase RHO liée au GDP à la membrane plasmique, les GEFs peuvent activer la GTPase en remplaçant le GDP par le GTP. À l'inverse, les protéines GAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans leur état actif lié au GTP, les GTPases RHO changent de conformation et peuvent se lier à des effecteurs et les activer afin de déclencher de multiples fonctions cellulaires, notamment la prolifération, la migration, la polarisation, l'adhésion, les modifications du cytosquelette et la régulation transcriptionnelle. *Schéma et légende de Masri et Delon*[120].

1. CDC42

a) Définition de CDC42

CDC42 est une petite protéine G intracellulaire codée par le gène *CDC42* situé sur le bras court du chromosome 1. Cette GTPase RHO est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, le maintien de la polarité et la migration cellulaire, la progression du cycle cellulaire, le transport intracellulaire et la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes[121,126–128].
Les GDIs se lient à la forme inactive de CDC42 et la maintiennent dans le cytosol. Le passage à l'état actif de CDC42 entraîne sa libération des GDIs et sa fixation à la membrane plasmique par ancrage lipidique. Un réservoir de CDC42 dans le golgi a également été décrit [129]. Après activation, les changements de conformations dans deux régions de CDC42 appelé switch I et switch II lui permettent de former une plateforme d'interaction avec de nombreux effecteurs en aval impliqués dans différentes voies de signalisation. Les protéines cibles de CDC42 les mieux décrites sont celles de la famille WASP, qui induit la polymérisation des microfilaments d'actine et la sérine/thréonine kinase PAK[130,131].

b) Pathologies associées à CDC42

De nombreuses mutations somatiques de *CDC42* ont été rapportées dans des cancers colorectaux ou cancer du sein[132,133] . A partir de 2015, des mutations germinales de *CDC42* ont été rapportées chez des patients atteints de phénotypes cliniques hétérogènes[134–136]. Les différentes analyses de l'impact structurel et fonctionnel des mutations montrent qu'elles perturbent de manière variable les fonctions biochimiques de CDC42 et affectent différemment les processus cellulaires[129,137].
Une mutation hétérozygote (p.Y64C) a été identifiée chez des patients atteints d'un syndrome de Takenouchi-Kosaki caractérisé par une macrothrombocytopénie, une dysmorphie faciale et un retard intellectuel et de croissance. Thanasegran et al ont montré que la différenciation mégacaryocytaire des cellules souches pluripotentes induites reprogrammées à partir des PBMC (cellules mononuclées du sang) des patients produisaient peu de progéniteurs, un défaut de mégacaryopoïèse et une macrothrombocytopénie suggérant l'impact de CDC42 sur l'homéostasie des plaquettes[138].

En 2018, Martinelli et al ont identifié neuf mutations situées dans des régions différentes de *CDC42* chez quinze patients avec des phénotypes cliniques hétérogènes (retards de croissance, dysmorphie faciale et anomalies neurodéveloppementales, immunitaires, inflammatoires et hématologiques) [139]. Ces mutations hétérozygotes ont été rapportées comme pouvant perturber les interactions entre CDC42 et ses différents partenaires de liaison.
Les mutations de *CDC42* ont été classées en quatre groupes en fonction de leur caractérisation structurelle et fonctionnelle[137] (Fig.21).

Dans le premier groupe, les mutations sont situées dans le domaine switch II, et entraînent une altération de liaison de CDC42 à ses régulateurs et molécules effectrices. Elles sont souvent associées à des anomalies plaquettaires.
Dans le deuxième groupe, les mutations sont situées dans, ou à proximité, de la poche de liaison nucléotidique. Elles sont associées à une hyperactivité variable de CDC42 et les patients présentent une dysmorphie faciale particulière.
Dans le troisième groupe, les mutations affectent des résidus impliqués dans l'interaction entre CDC42 et les protéines effectrices contenant un motif de liaison avec RAS. Les patients de ce dernier groupe présentent un phénotype similaire au syndrome de Noonan caractérisé par une petite taille, une dysmorphie faciale caractéristique, des anomalies cardiaques et un risque accru de cancers. Ce syndrome ou RASopathie a été décrit dans les anomalies de la voie RAS appartenant à une autre famille de GTPases[140].
Les mutations décrites dans les trois groupes altèrent la fonction de CDC42 à des degrés différents en affectant le passage entre les états actif et inactif de la GTPase ou en affectant son interaction avec ses protéines cibles.
En 2019, trois nouvelles mutations hétérozygotes situées dans la région C terminale ont été identifiées chez des patients présentant un syndrome auto-inflammatoire précoce sévère, une cytopénie et une atteinte cutanée[141]. La localisation de ces mutations dans la région d'interaction avec les protéines GDIs a permis d'identifier un quatrième groupe de mutations. Bien que les mécanismes physiopathologiques restent peu connus, une étude récente montre qu'une de ces mutations identifiées (p.R186C) de CDC42 dans la région C terminale entraîne un défaut de localisation de la protéine. Cette mutation entraîne la rétention de CDC42 dans le golgi qui aboutit à une inhibition de la polymérisation des filaments d'actine et une hyperactivation de voies inflammatoires[129].

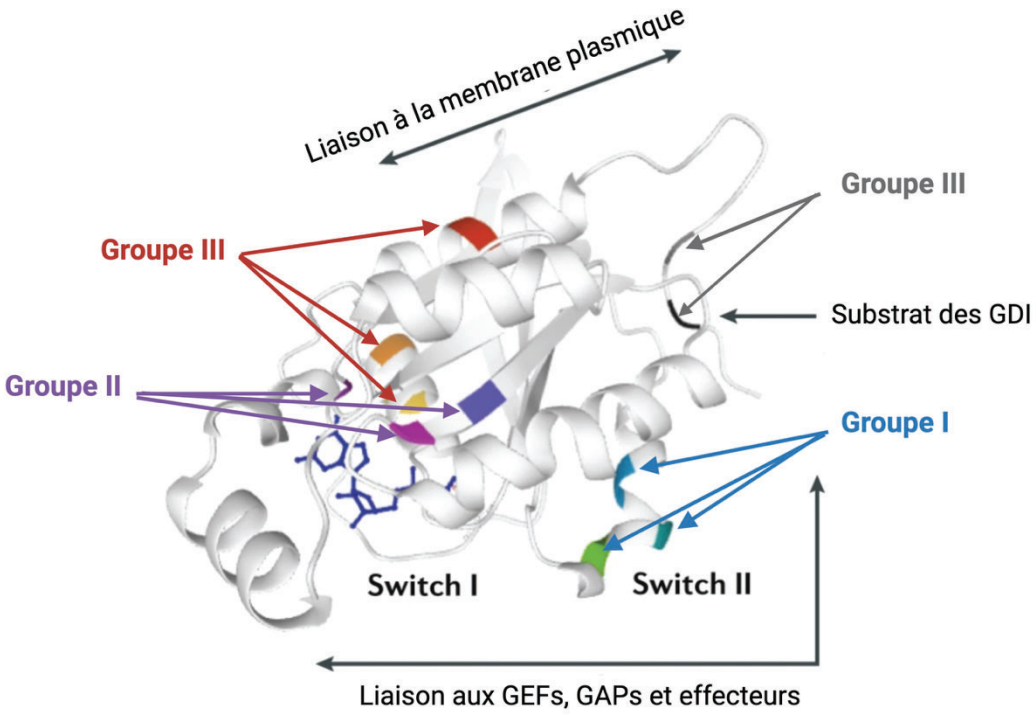


Figure 21.Conformation 3D de CDC42 et position des mutations décrites de CDC42
Les résidus affectés par les mutations de *CDC42* sont représentés sur la structure 3D de CDC42-GDP. Les mutations de CDC42 classées dans le groupe I sont signalées par une flèche bleue et sont localisées dans le domaine Switch II, clé pour l'activation de CDC42 par les GEFs. Les mutations de CDC42 classées dans le groupe II sont signalées par une flèche violette et sont localisées dans des domaines de liaison à la base guanine. Les mutations de CDC42 classées dans le groupe III sont signalées par une flèche rouche et sont localisées dans des domaines de liaison à la membrane plasmique. Les mutations de CDC42 classées dans le groupe III sont signalées par une flèche grise et sont localisées dans le domaine d'interaction avec les GDIs. *Schéma adapté de Masri et Delon*[120].

2. RAC

a) Définition de RAC

RAC est une petite GTPase RHO impliquée dans la migration, la phagocytose, le cycle cellulaire et l'apoptose[122]. Trois isoformes ont été décrites chez l'homme : RAC1, RAC2 et RAC3. L'expression de RAC2 est essentiellement hématopoïétique.
L'activité de RAC est déterminée par son état de liaison au GTP et par sa localisation cellulaire et tissulaire. Après activation, RAC-GTP se lie à de multiples effecteurs en aval et est impliquée dans l'activation du complexe NADPH, la polymérisation de l'actine, l'activation de PAK et la signalisation calcique [142,143].

b) Pathologies associées à RAC

Une cinquantaine de mutations de *RAC2* ont été rapportées dans la littérature et sont associées en majorité à une augmentation de l'activité de RAC2[144,145].

Une grande majorité des patients identifiés présente un déficit immunitaire combiné (CID) caractérisé par une lymphopénie et des infections respiratoires récurrentes associées à des mutations bi ou mono-allélique gains de fonction [145,146].

Les patients porteurs de mutations hétérozygotes conduisant à une forme constitutivement active de RAC2 sont atteints de déficit immunitaire combiné sévère (SCID) associé à une neutropénie et des infections néonatales.

Les patients porteurs de mutations dominantes négatives pertes de fonction ont une lymphopénie et des infections sévères cutanées. Chez ces patients, les abcès et infections du cordon sont similaires aux pathologies de défaut d'adhésion leucocytaire ce qui montre le rôle essentiel de RAC2 dans l'immunité et en particulier dans la migration vers les tissus.

3. RHOA

a) Définition de RHOA

RHOA est une petite protéine G principalement impliquée dans la régulation de la forme, de la polarité et de la migration cellulaire, la transcription, la progression du cycle cellulaire et la transformation cellulaire[147].

ROCK est une des principales protéines effectrices de RHOA-GTP. Après activation, ROCK entraîne une cascade de signalisation impliquant différentes myosines ce qui conduit à la polymérisation de filaments d'actine et la formation d'actomyosine[148]. Cette protéine participe à la formation de fibres de stress et la contractilité de l'actomyosine. Elle est impliquée dans la dynamique des microtubules lors de la réorganisation du cytosquelette [122,149]. Cette GTPase participe également au contrôle transcriptionnel [150].

b) Pathologies associées à RHOA

Les mutations décrites du gène *RHOA* sont présentes dans différents types de cancers [151]. Les mutations décrites conduisent à une hyperactivation ou surexpression de RHOA qui aboutit à une réorganisation aberrante du cytosquelette étape essentielle de l'oncogenèse[152].

Une augmentation de la signalisation de RHOA tissulaire est associée à des manifestations inflammatoires digestives et cutanées[153,154].

Chez l'Homme, seules des mutations en mosaïque du gène *RHOA,* affectant quelques types cellulaires, ont été décrites[155]. Vabres et al ont décrit des mutations pertes de fonction de RHOA dans le tissu neurectodermique. Les patients présentent des atteintes tissulaires dérivées du neurectoderme : atteintes cutanéo-muqueuses avec une hypopigmentation

linéaire de la peau, une alopécie, des atteintes neurologiques et des anomalies faciales, oculaires et dentaires.

B. Rôles des GTPases RHO dans différentes fonctions cellulaires

Les GTPases RHO sont les principaux régulateurs de l'organisation du cytosquelette et participent à de nombreuses fonctions cellulaires. Nous détaillerons le rôle des GTPases RHO dans la migration cellulaire, le développement des cellules hématopoïétiques, l'immunité innée et adaptative, le métabolisme et l'homéostasie des tissus (Fig.22).

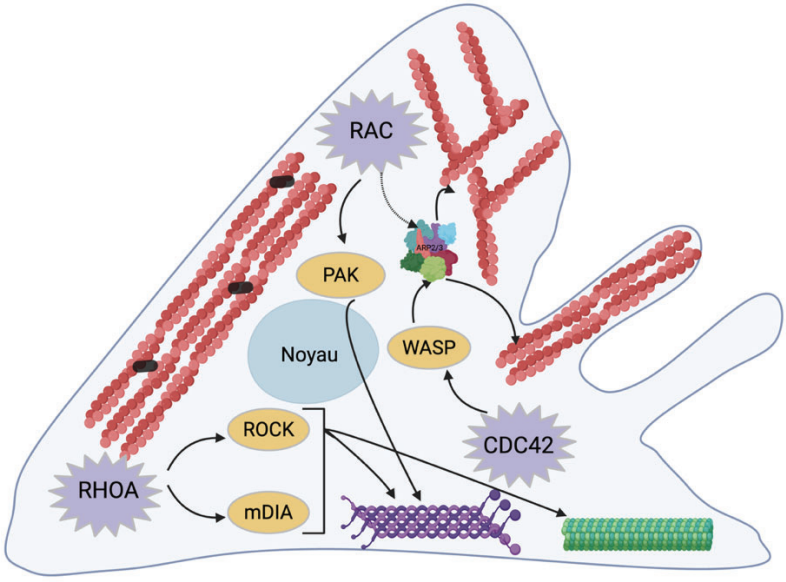


Figure 22. Les RHO GTPases, régulateurs principaux du cytosquelette
RHOA génère les fibres de stress. RHOA, par l'intermédiaire de ses effecteurs mDIA1 (Diaphanous-related formin-1) et ROCK, contrôle les filaments intermédiaires, le cytosquelette cortical d'actine, les filaments de myosine et les microtubules. RAC favorise la formation des lamellipodes. RAC, par l'intermédiaire de PAK, intervient dans les fonctions des filaments intermédiaires et de la polymérisation de l'actine à l'avant d'une cellule en migration et au niveau de la synapse immunologique. CDC42 favorise la formation des filopodes. CDC42, principalement par l'intermédiaire de WASP, contrôle la polarité cellulaire, qui est nécessaire pour générer et maintenir la migration, la formation de synapses et la sécrétion polarisée de cytokines. *Schéma et légende adaptés de Masri et Delon*[120].

1. GTPases RHO et migration cellulaire

Les GTPases RHO jouent un rôle crucial dans la régulation de l'étalement, de l'adhésion et de la migration cellulaire en aval de l'engagement de l'intégrine avec la matrice extracellulaire [121,128,156].

L'activité des GTPases RHO est finement régulée à différents endroits de la cellule pour permettre aux cellules de se déplacer en réponse à des stimuli mécaniques ou chimiques. L'équilibre spatio-temporel nécessite l'activation/inactivation dynamique coordonnée des GTPases RHO par les protéines régulatrices [156–158].

Lors de la migration cellulaire médiée par les intégrines, la polarisation cellulaire dépend directement des activités localisées de CDC42, RAC1 et RHOA [159].

a) Migration 2D

En migration 2D, RAC et CDC42 agissent au bord d'attaque de la cellule. RAC entraîne la formation de lamellipodes et CDC42 est associée à l'extension des filopodes[156].

CDC42 intervient dans la polarisation cellulaire dépendante des microtubules, la réorientation du Golgi et du centrosome, et un recyclage membranaire dirigé[127,160].

L'avancement du bord avant de la cellule se couple avec la rétraction de l'arrière de la cellule par contractilité de l'actomyosine régulée par RHOA et son effecteur ROCK.

Récemment, les techniques de FRET (Transfert d'énergie par résonnance de fluorescence) biosenseurs ont permis de localiser la localisation spatio-temporelle dynamique et l'état d'activation des GTPases RHO. La présence de CDC42, RAC et RHOA a été décrite dans les lamellipodes du bord avant de la cellule [161]. RHOA intervient dans la phase initiale du processus, tandis que RAC1 et CDC42 participent au renforcement et à la stabilisation de la protrusion nouvellement développée[162]. RHOA active des effecteurs distincts pour réguler la dynamique du bord ou la rétraction de l'arrière de la cellule.

Le réseau de signalisation intégrine recrute les GEFs et les GAPs vers les complexes d'adhésion afin d'y activer les RHO-GTPases[119]. La formation précoce des adhésions focales dépend de l'activation de RAC et d'une suppression concomitante de l'activité de RHOA [157,163]. La propagation médiée par l'intégrine et la maturation de l'adhésion focale se développent grâce à l'équilibre entre les activités relatives de RHOA et RAC et permet le renouvellement des structures hautement organisées.

b) Migration Confinée

Les GTPases RHO sont impliquées dans la migration cellulaire en environnement confiné. CDC42 est un élément essentiel de la formation des protrusions riches en actine permettant la dégradation de la matrice extracellulaire [164]. L'activation de la signalisation RHOA ou CDC42/RAC dépend de l'élasticité de la matrice environnante influençant le type de migration la plus adaptée au milieu confiné [156].

2. GTPases RHO et cellules hématopoïétiques

a) Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les précurseurs des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes [165](Fig.23). CDC42, RAC et RHO contrôlent différentes fonctions des CSH[152] . RHO, CDC42 et RAC participent à l'auto-renouvellement des CSH qui permet le maintien de la production des cellules sanguines.

RAC et CDC42 sont également nécessaires à la prolifération, la survie et la rétention des CSH dans la moelle osseuse.

Les progéniteurs myéloïdes se différencient en érythrocytes, mégacaryocytes, mastocytes ou granulocytes.

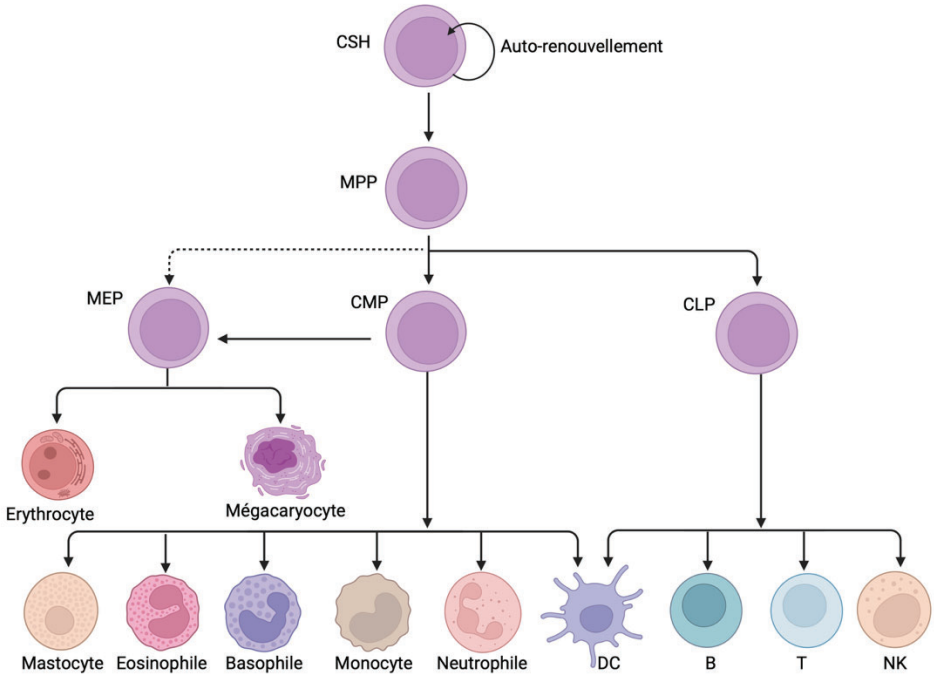


Figure 23. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont la capacité d'auto-renouvellement et se différencient en cellules progénitrices multipotentes (MPP). Les cellules MPP se différencient en progéniteur myéloïde commun (CMP), en progéniteur lymphoïde commun (CLP) et selon certains auteurs en progéniteur mégacaryocytes-érythrocytes (MEP). Les cellules CMP vont se différencier en mastocyte, éosinophile, basophile, monocyte, neutrophiles ou DC. Les cellules CLP vont se différencier en DC, lymphocytes B, T ou NK. Les cellules MEP vont se différencier en MK ou en érythrocytes. *Schéma adapté de Wang et al et Reagan et al*[45,165]

b) Globules Rouges

Les globules rouges sont des cellules dépourvues de noyau produites à partir des érythrocytes après une succession d'étapes au cours de l'érythropoïèse.
CDC42 régule l'équilibre entre la myélopoïèse produisant les granulocytes et les macrophages et l'érythropoïèse [166]. Dans un modèle murin de délétion de *Cdc42* dans les progéniteurs myéloïdes, les souris développent un syndrome myéloprolifératif sévère et un blocage précoce de l'érythropoïèse ce qui suggère le rôle d'équilibre de CDC42[167].
L'érythropoïèse est un processus finement régulé par les GTPases RHO[152]. CDC42 régule la polarisation cellulaire, la polarisation et l'énucléation au cours de la dernière étape de différenciation des érythrocytes [168].
RAC participe également à l'érythropoïèse[169].Les souris déficientes en RAC dans les cellules hématopoïétiques développent une anémie hémolytique associée à la fragilité des globules rouges par la diminution de la déformabilité des globules rouges[170].

c) Plaquettes

Les plaquettes sont générées à partir des mégacaryocytes. Au cours de la mégacaryopoïèse, les mégacaryocytes subissent de nombreux remaniements du cytosquelette[93,171]. CDC42 régule la dynamique du cytosquelette qui conduit à la formation des prolongements cytoplasmiques du MK[172]. La délétion spécifique de *Cdc42* dans les MK chez la souris entraîne une diminution de la formation des pro-plaquettes et macrothrombocytopénie[173]. L'équilibre entre CDC42 et RHOA participe à la mégacaryopoïèse [174].
L'activation des plaquettes est une étape importante de leurs fonctions hémostatiques et inflammatoires[175]. Le remodelage du cytosquelette régulé par RHOA, RAC et CDC42 participe au changement de forme des plaquettes lors de leur activation [175,176]. L'activation de CDC42 est associée à la formation des filopodes et à la sécrétion des granules plaquettaires. Dans les plaquettes, le rôle spécifique de CDC42 dans le développement des filopodes est débattu dans la littérature [175]. Enfin, CDC42 participe à la régulation des intégrines à la surface des plaquettes nécessaire à de nombreuses fonctions plaquettaires[177].

3. GTPases RHO et immunité innée

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les pathogènes.
La reconnaissance des agents pathogènes par des récepteurs engage la réponse immunitaire innée et implique les GTPases-RHO [178–180].
Après l'activation des récepteurs, les leucocytes sont mobilisés et migrent par chimiotactisme vers le site inflammatoire [181,182].
En contact avec l'agent pathogène sur le site de l'infection après migration, l'activation de récepteurs phagocytaires des leucocytes conduit à la phagocytose de ces micro-organismes. La phagocytose nécessite un assemblage ordonné et finement régulé de filaments d'actine sous la cible impliquant les GTPases RHO[183]. L'équilibre entre RAC et CDC42 régule la production de ERO par le complexe NADPH[184].
La formation des NET, véritables pièges extracellulaires pour les agents pathogènes, par les neutrophiles, implique les activités CDC42 et RAC[79,185].

Les agents pathogènes ont développé des toxines et des facteurs de virulence ciblant les GTPases. La régulation des GTPases RHO par les pathogènes détourne la dynamique du cytosquelette et leur permet d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte [186].Les pathogènes via leurs facteurs de virulence ont la capacité d'imiter les GEFs, les GAPs et les GDIs pour modifier les activités de GTPases[187].
La cellule hôte a mise en place des stratégies pour surveiller la fonction des facteurs de virulence et des toxines en détectant l'activité anormale des GTPases RHO. L'inflammasome est un des mécanismes développés.
L'inflammasome est un complexe macromoléculaire qui se forme par oligomérisation d'un récepteur, d'un adaptateur et de la caspase-1 qui conduit à l'activation de cette dernière. L'activation de la caspase 1 permet la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-18, et le déclenchement de la mort cellulaire hyper-inflammatoire[188–191]. CDC42 a récemment été identifiée comme un régulateur essentiel de l'activation de l'inflammasome PYRIN [192,193].

Les DCs sont des cellules du système immunitaire à l'interface du système immunitaire inné et adaptatif. CDC42, RHOA et RAC régulent la dynamique du cytosquelette essentielle à la maturation des DCs et à leurs fonctions [194].
La maturation et l'activité sécrétoire des DCs implique l'activation de CDC42[195] .
RHOA et CDC42 participent à la migration dirigée des cellules dendritiques par chimiotactisme[196]. RAC quant à elle, contrôle la formation des dendrites dans les cellules dendritiques, leur migration polarisée vers les lymphocytes T et l'activation des lymphocytes T [106]. La libération de cytokines au niveau de la synapse immunitaire est contrôlée par la polarisation du MTOC dans les cellules dendritiques et dépend de CDC42 [197].

4. GTPases RHO et Immunité adaptative

Les lymphocytes T et B sont les acteurs du système immunitaire adaptatif [128,196,198].

a) Les Lymphocytes T

RAC et CDC42 sont impliquées au cours de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus [199]. CDC42 participe à l'homéostasie des cellules T naïves en favorisant leur survie cellulaire et en inhibant leur activation. Chez les souris, la suppression conditionnelle de CDC42 dans les cellules T bloque la thymopoïèse et entraîne une lymphopénie qui affecte majoritairement les T CD4+ et CD8+ matures périphériques[200] . RHOA régule l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le développement des thymocytes [150].

L'activation de lymphocytes T spécifiques d'antigène par les cellules APC implique la régulation spatio-temporelle des activités CDC42, RAC et RHOA au sein de la synapse immunologique. La perte de localisation de RHOA-GTP à l'opposé du site de contact et l'activation de CDC42 et RHOA au niveau de la synapse permet la polarisation cellulaire[201]. Cette polarisation cellulaire permet d'orienter le transport intracellulaire vers la synapse et favorise la communication entre les deux cellules[126]. La communication entre le lymphocyte et la cellule APC implique le regroupement de molécules de signalisation et des radeaux lipidiques à l'interface de contact. Ce processus est régulé par CDC42 et RHOA [202,203]. L'interaction entre les récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine est régulée par les GTPases RHO et aboutit à l'engagement du TCR du lymphocyte T[204,205] .

L'engagement du TCR participe à la différenciation des lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+ [206]. Les lymphocytes T de type 1 (TH1) sécrètent principalement de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'interféron gamma (IFN-γ) en réponse aux pathogènes intracellulaires. L'immunité contre les parasites extracellulaires implique les lymphocytes T de type 2 (TH2) qui sécrètent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Les lymphocytes T de type 17 (TH17) se caractérisent par leur sécrétion d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 en réponse aux infections bactériennes et fongiques extracellulaires.
Des réponses excessives TH1 et TH17 peuvent être associées à de l'auto-immunité et à l'inflammation. Une dérégulation de la réponse TH2 est retrouvée dans les maladies allergiques[207].
L'équilibre entre les réponses T effectrices est finement régulé par de nombreuses protéines dont les GTPases RHO. Chez la souris, en l'absence de CDC42 dans les cellules T, les lymphocytes T CD4 naïfs ont une différenciation polarisée de type TH1 et les T CD8+ une différenciation en cellules effectrices et mémoires. Ces modèles mettent en lumière le rôle prépondérant de CDC42 dans la différenciation T[200]. Enfin, RHOA participe à la différenciation des cellules TH2 et TH17 [208].
Les Tregs inhibent les fonctions T effectrices ce qui favorise la tolérance immunitaire. CDC42 participe à la différenciation et à la stabilité des Tregs[209] .

Dans le modèle murin, la délétion de CDC42 dans les lymphocytes T CD4+ et l'inhibition pharmacologique de CDC42 induisent une diminution du nombre de Tregs et leur instabilité[200,209].

b) Les Lymphocytes B

CDC42 est impliquée dans la différenciation des précurseurs des lymphocytes B ainsi que dans leur maturation [153,210]. La signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR) et la transduction du signal en aval permettent l'activation des cellules B et sont finement régulés par les GTPases RHO[211]. CDC42 et RHOA participent à la réponse humorale via la signalisation du BCR , la coopération entre les lymphocytes B et T, la formation des centres germinatifs, de plasmocytes puis la production d'immunoglobulines [211].

5. GTPases RHO et métabolisme

a) GTPases RHO et métabolisme du glucose

L'implication des GTPases RHO dans le métabolisme du glucose comprend la libération d'insuline par les cellules β pancréatiques et l'absorption du glucose par les muscles et les tissus adipeux après stimulation par l'insuline.

CDC42 et RAC participent à la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose grâce à leurs rôles dans la réorganisation de l'actine[212,213]. L'activation de CDC42 en réponse à la stimulation par le glucose entraîne le remodelage du cytosquelette d'actine et l'exocytose de granules sécrétoires d'insuline [214].

CDC42, RAC et RHOA sont très exprimées dans les muscles et les tissus adipeux, organes impliqués dans l'absorption du glucose [215].Ce processus implique la mobilisation et l'insertion du transporteur de glucose 4 (GLUT4) à la membrane plasmique en aval de la signalisation de l'insuline[216] . Les GTPases RHO sont impliquées dans la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique[217,218].

b) GTPases RHO et métabolisme des lipides

Les GTPases RHO sont de plus en plus étudiées dans le tissu adipeux dans l'objectif de développer des thérapeutiques contre l'obésité notamment[215,219,220] .

Les tissus adipeux et musculaires proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses réciproquement en adipocytes et en myocytes. La modulation de la signalisation GTPase RHO détermine le destin cellulaire entre l'adipogénèse et la myogénèse [221–223].

Au cours de la différenciation adipocytaire, RAC et CDC42 participent à la régulation de la dynamique d'actine nécessaire à l'accumulation de gouttelettes lipidiques [224](Yang et al).
Au stade d'adipocyte mature, l'augmentation de la taille des adipocytes avec l'accumulation importante de lipides intracellulaire implique les GTPases RHO [221].
Ueyama et al suggèrent le rôle possible des GTPases RHO des cellules tissulaires dans la régulation de la différenciation des adipocytes locaux[225]. En effet, les auteurs ont montré le rôle de la signalisation dépendante de RAC provenant des kératinocytes, cellules de la peau, dans la différenciation des adipocytes dans le tissu sous-cutané.

6. GTPases RHO et tissus

a) GTPases RHO et peau

L'homéostasie du tissu cutané implique de nombreux mécanismes régulés par les GTPases RHO.
Les mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes (responsables de la pigmentation), sont régulés par CDC42 [226,227]. Les mélanocytes se répartissent dans l'épiderme et le derme, par des mécanismes régulés par les GTPases RHO en particulier CDC42[228]. A l'aide des dendrites mélanocytaires, les mélanocytes stockent et transfèrent des organites contenant la mélanine (mélanosomes) aux kératinocytes assurant la pigmentation de la peau.
La délétion de *CDC42* dans les mélanoblastes murins conduit à un défaut de polarisation, de migration et des anomalies morphologiques des mélanocytes. Les souris présentent donc une perte de pigmentation sévère.

Les kératinocytes ont de multiples fonctions dont la synthèse de la kératine qui assure l'intégrité de la barrière cutanée et des fonctions immunitaires. CDC42 est impliquée dans la différenciation des cellules souches épidermiques, la migration, la prolifération et l'apoptose des kératinocytes, fonctions essentielles au maintien de la membrane basale de la peau[229–231].
La voie RHOA/ROCK régule l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes humains [232].
CDC42 participe également au vieillissement des cellules souches des follicules pileux, à leur activation et au cycle des follicules pileux qui régulent la dynamique de la pilosité [233,234].

b) GTPases RHO et muqueuse digestive

L'épithélium intestinal est une interface dynamique et constitue une véritable barrière physique, chimique et immunitaire. Les GTPases RHO participent à l'architecture, l'intégrité, le transport intracellulaire et la différenciation épithéliale de la muqueuse intestinale[235]. CDC42 est essentielle à la division, survie et différenciation des cellules souches épithéliales [236]. Cette

GTPase contrôle également la polarité, l'adhésion et la migration des cellules épithéliales, fonctions cruciales pour l'intégrité de la barrière intestinale [237,238].

CDC42 et RHOA sont des acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie de la muqueuse digestive. Dans des biopsies digestives de patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), l'activation de CDC42 est diminuée alors que celle de RHOA est augmentée. Le déséquilibre entre les activités de ces GTPases RHO participe au processus inflammatoire tissulaire [235,239,240].

Un autre acteur important de l'équilibre intestinal est le système immunitaire. L'Azathioprine est un médicament utilisé dans le traitement des MICI et cible RAC1 dans les lymphocytes T. L'inactivation de RAC1 induit l'apoptose des lymphocytes T, notamment dans la muqueuse intestinale et prévient les poussées de la maladie[241] .

Les GTPases RHO sont également impliquées dans les interactions complexes entre le microbiote et l'épithélium intestinal dont le déséquilibre peut conduire au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires[154]. L'endocytose des antigènes de la flore commensale contribue à l'homéostasie lymphocytaire de la muqueuse intestinale et est régulée par les GTPases RHO[242].

L'activation des GTPases RHO régule la dynamique du cytosquelette et les GEFs sont les acteurs principaux de leur activation.

III. REGULATEURS DE LA SIGNALISATION DES GTPASES RHO : LES PROTEINES GEFS DOCKS

Les GEFs RHO sont des facteurs d'échange de guanine dont la fonction principale est l'activation des GTPases RHO. Ces protéines sont capables d'activer des GTPases spécifiques telles que CDC42, RAC et RHOA en favorisant la libération du GDP et la liaison au GTP.
Les GEFs RHO sont classées en deux familles distinctes : les protéines contenant un domaine d'homologie DBL (DH) et les protéines DOCK (dedicator of cytokinesis)[243].
Les membres de la famille DBL (diffuse B-cell lymphoma) se caractérisent par un domaine d'homologie DBL (DH) unique qui a une activité catalytique très efficace.

Les GEFs DOCK possèdent deux domaines conservés : la région d'homologie DOCK -1 (DHR-1) qui se lie aux lipides et facilite la localisation des DOCK dans les compartiments membranaires, et la région d'homologie DOCK-2 (DHR-2) qui induit la réaction d'échange GDP-GTP [244].
Si les protéines DBL activent plusieurs GTPases, les protéines DOCK présentent souvent une spécificité élevée pour une ou deux GTPases [245].
Les membres de la famille DOCK sont des grandes protéines multi-domaines de plus de 2000 acides aminés. Cette famille comprend onze membres qui sont classés en fonction de leurs domaines protéiques communs en quatre sous-familles DOCK-A, DOCK-B, DOCK-C, DOCK-D [246](Fig.24). L'expression tissulaire des onze protéines DOCK est variable [247–257](Tableau.1). Dans ce dernier chapitre, nous allons détailler les rôles, les fonctions et les pathologies humaines associées de chaque protéine DOCK.

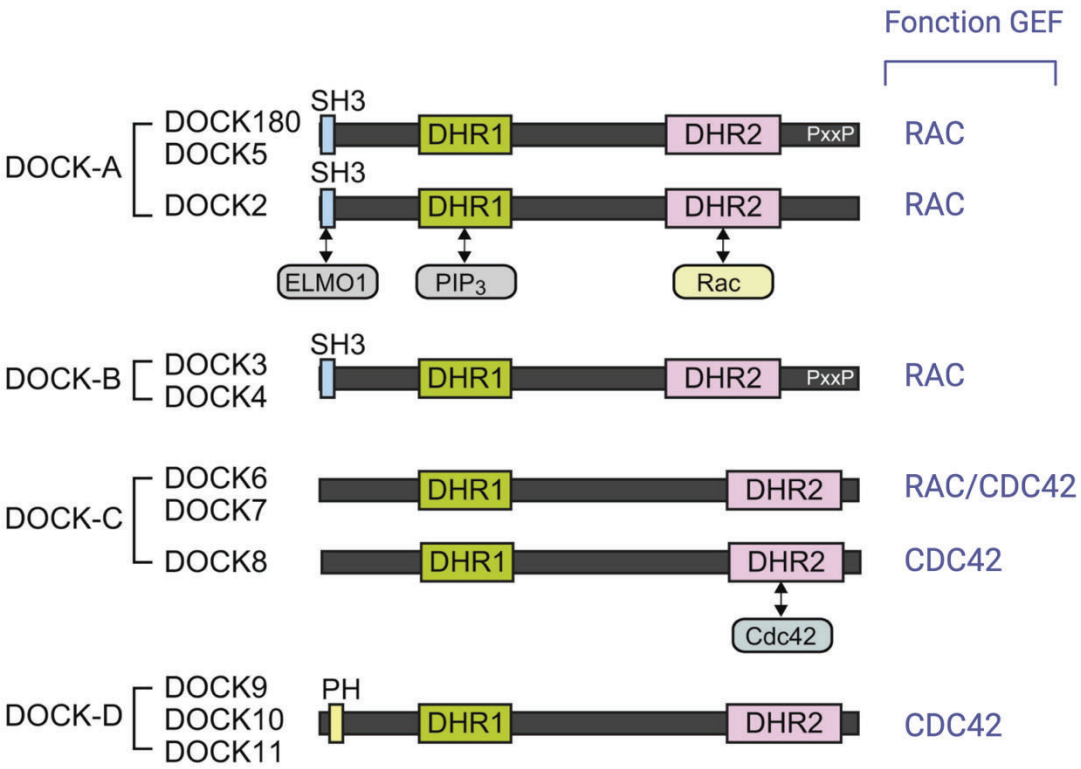


Figure 24.<u>*Structure des domaines des onze protéines de la famille DOCK chez les mammifères*</u>
Cette famille comprend 11 membres qui sont classés en quatre sous-familles (DOCK-A, -B, -C et -D) en fonction de leur homologie de séquence et de leur fonction GEF. La famille DOCK se caractérise par un domaine DHR1 qui se lie à la protéine membranaire phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP_3) et un domaine DHR-2 qui catalyse l'échange de nucléotides sur RAC ou CDC42. Les sous-familles DOCK-A et DOCK-B sont constituées réciproquement de DOCK1, DOCK2, DOCK5 et de DOCK3, DOCK4. Elles se caractérisent par l'activation spécifique de RAC et par la présence d'un domaine SH3 (Src homology 3) qui permet l'interaction avec la protéine ELMO (Engulfment and cell motility). L'interaction entre ces membres des sous-famille DOCK-A et de DOCK-B avec la protéine ELMO favorise leur fonction GEF. La sous-famille DOCK-C est constituée de DOCK6, DOCK7, qui ont une activité GEF à la fois RAC et CDC42, et de DOCK8 qui active essentiellement CDC42. La sous-famille DOCK-D comprend les membres DOCK9, DOCK10 et DOCK11 et se caractérise par la présence d'un domaine PH (Pleckstrin Homology Domain) qui permet leur ancrage à la membrane plasmique. Les membres de la famille DOCK-D activent spécifiquement CDC42. *Adapté de Nishikimi et al*[258]

	Expression hématopoïétique	*Autre expression tissulaire majoritaire*
DOCK1	Oui+ Macrophages, lymphocytes T, DC, MK	Glande thyroïde, glande mammaire, tube digestif, poumon, tissu adipeux
DOCK2	Oui+++ Neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et B, NK, mastocytes, DC, MK	Poumon, rein, peau
DOCK3	Non	Cortex cérébral, tube digestif
DOCK4	Oui + Neutrophiles, macrophages	Tissu cérébral, poumon, endothélium
DOCK5	Oui++++ Neutrophile, macrophages, Lymphocytes T et B	Poumon, cerveau, peau, rein
DOCK6	Oui + Macrophages	Cerveau, tube digestif, glande thyroïde, tissu adipeux
DOCK7	Oui + Macrophages, lymphocytes T, DC, MK, érythrocytes	Œil, cerveau, tissu digestif, tissu adipeux
DOCK8	Oui +++ Neutrophiles, lymphocytes T et B, DC, NK, Macrophages	Peau, muqueuse, poumon, tube digestif
DOCK9	Oui + Lymphocytes T	Tissu adipeux, poumon, peau, tube digestif, pancréas, hépatique
DOCK10	Oui +++ Mastocytes, macrophages, lymphocytes T et B, NK, DC	Cerveau, peau, glande mammaire
DOCK11	Oui++ Neutrophiles, phagocytes, lymphocytes T et B, NK, DC, MK, érythrocytes	Peau, cerveau, tube digestif, rein

Tableau 1.Expression ARN hématopoïétique et autre expression tissulaire majoritaire des protéines DOCK

DC : cellules dendritiques, NK : Natural killer, MK : mégacaryocytes

+ : expression ARN faible ; ++ : expression ARN intermédiaire ; +++ : expression ARN forte

A. La sous-famille DOCK-A : DOCK1, DOCK2, DOCK5

La famille DOCK-A comprend trois membres : DOCK1, DOCK2, DOCK5 (Fig.25). Ces protéines se caractérisent par l'activation exclusive de RAC et par la présence en position N-terminale d'un domaine SH3. Ce domaine est impliqué dans l'interaction avec des partenaires protéiques et participe à l'activité GEF des protéines DOCK-A[259].

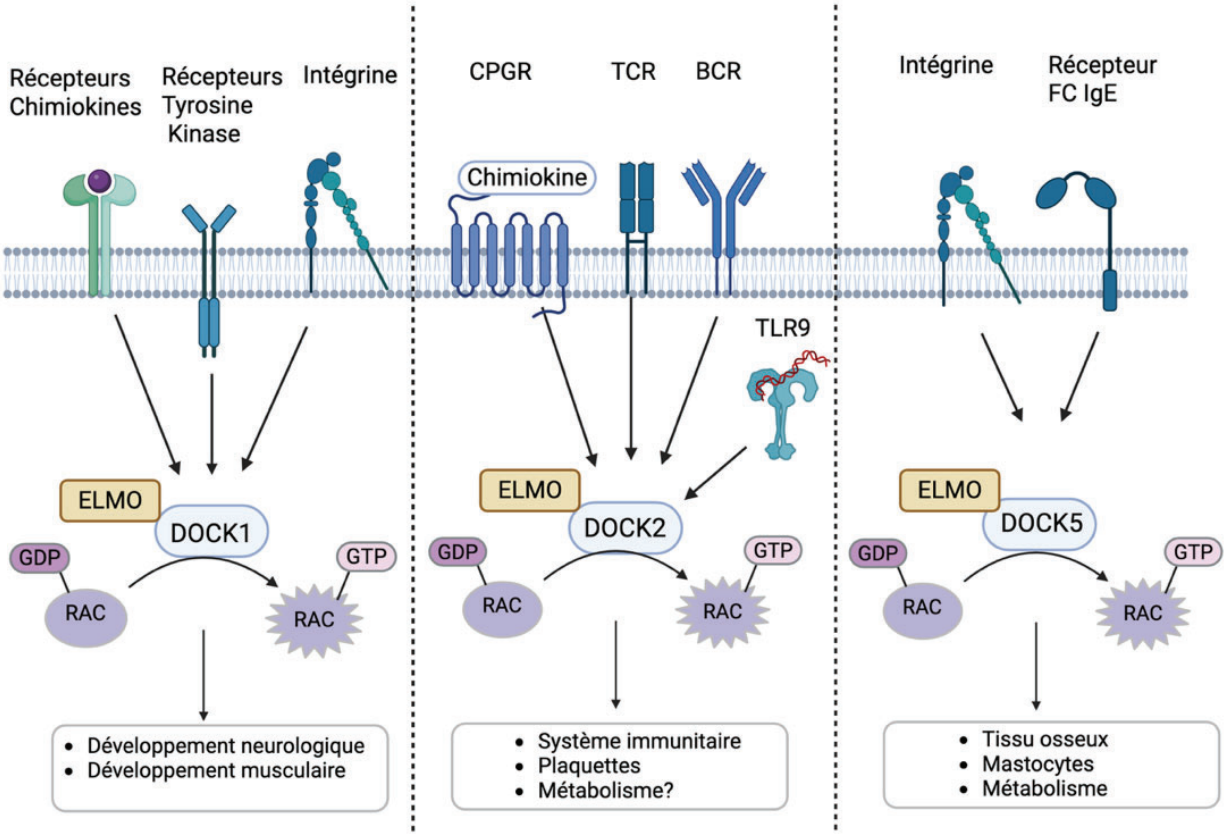


Figure 25. Voies impliquées dans l'activation et rôles de DOCK1, DOCK2 et DOCK5

DOCK1 est activée par les voies de signalisation impliquant des récepteurs à chimiokines, des récepteurs tyrosine kinase et des intégrines. La voie des récepteurs couplés aux protéines G (CPGR), du BCR, du TCR et le récepteur intracellulaire TLR9 (Toll like receptor 9) activent DOCK2. Le voie des intégrines et du récepteur Fc IgE activent DOCK5. Ces trois protéines interagissent avec ELMO pour favoriser leur activation spécifique de RAC.

1. DOCK1

a) Définition et fonction GEF

DOCK1 est l'un des premiers membres décrit des protéines de la famille DOCK, codée par le gène *DOCK1* localisé sur le chromosome 10.
La stimulation de la réorganisation du cytosquelette induite par DOCK1 et les autres membres des sous-familles DOCK-A et DOCK-B dépend des interactions avec les protéines ELMO [245,260].
Les protéines ELMO sont des adaptateurs capables de réguler l'activité d'autres protéines grâce à leur capacité à médier les interactions protéine-protéine. Ces protéines interagissent physiquement avec les protéines DOCK (DOCK1 à DOCK5) qui contiennent un domaine SH3.
L'interaction entre DOCK1 et ELMO nécessite le domaine PH d'ELMO qui assure l'interaction avec le domaine SH3 de DOCK1. La perturbation des interactions DOCK1-ELMO limite la capacité de DOCK1 à promouvoir les changements cytosquelettiques dépendants de RAC. Le complexe DOCK1-ELMO présente une activité GEF plus élevée que DOCK1 seul.
Une autre GTPase appartenant à la famille des GTPases RAC, RHOG (Ras Homology Growth-related), interagit avec un autre domaine de ELMO et des études suggèrent que cette interaction est nécessaire à l'activation de RAC1 médiée par DOCK1[261].
Des études suggèrent que le complexe ELMO-DOCK existe sous une conformation inactive dite « fermée » et une conformation active « ouverte » avec une activité RAC plus importante[262].
Le domaine PH d'ELMO permet une localisation du complexe à la membrane et l'activation localisée de RAC par DOCK1 [263]. DOCK1 agit en aval des récepteurs tyrosine kinases, des intégrines et des récepteurs de chimiokines[264].

b) Rôles de DOCK1

L'activation de RAC par DOCK1 entraîne des modifications de la morphologie cellulaire et régissent des processus tels que la migration, la phagocytose des cellules apoptotiques, le développement musculaire et neuronal[264] .
L'activation de RAC dépendante de DOCK1 a été étudiée chez l'Homme dans la progression de certains cancers et des maladies infectieuses. Dans la leucémie aiguë myéloïde, l'expression élevée de DOCK1 dans plusieurs cohortes est un facteur de pronostic défavorable par son effet pro-survie des cellules leucémiques et donc une cible thérapeutique potentielle[265,266]. Par ailleurs, une activation inappropriée de DOCK1 peut être un mécanisme d'invasion infectieuse [267]. Handa et al ont mis en évidence le recrutement du complexe ELMO/DOCK1 à la membrane par une protéine effectrice (IpgB1) des shigelles, bactéries à gram négatif. Cette protéine effectrice permet l'activation de RAC par le complexe ELMO/DOCK1 et la formation de plis membranaires qui favorise l'invasion bactérienne.
Des études récentes suggèrent que DOCK1 est impliquée dans l'homéostasie de la myéline des cellules gliales du système nerveux périphérique chez la souris et le poisson zèbre[268]. DOCK1

joue un rôle au cours du développement embryonnaire avec une quasi-absence de tissu musculaire chez la souris déficiente en DOCK1 [269].

2. DOCK2

a) Définition et fonction GEF

Le gène *DOCK2* est situé sur le chromosome 5 et code la protéine DOCK2. DOCK2 est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques contrairement aux autres membres de la sous-famille qui sont exprimés dans différents tissus[246].
DOCK2 agit en aval des récepteurs d'antigènes et des récepteurs de chimiokines et active RAC. La structure tridimensionnelle du complexe DOCK2-ELMO1 permet une meilleure compréhension de l'activation de RAC par DOCK2 et de l'interaction entre DOCK et ELMO1 [245].
DOCK2 et ELMO contrôlent leur activité grâce à des interactions auto-inhibitrices intramoléculaires. La région N-terminale d'ELMO se lie à son extrémité C-terminale. Le domaine SH3 de DOCK2 interagit avec le domaine DHR2 et la partie C-terminale de DOCK2[245,270] . Ces formes auto-inhibées de DOCK2 et ELMO1 permettent au complexe DOCK2-ELMO1 d'adopter une conformation fermée inhibée.
Le changement de conformation de la sous-unité ELMO1 conduit à la levée de l'auto-inhibition vers un état actif et ouvert. La conformation ouverte expose les sites de liaison pour RAC sur le DHR2 de DOCK2, et pour des ligands régulateurs (RHOG) sur ELMO1.

b) Rôles de DOCK2

DOCK2 participe à l'adhésion, la migration, l'activation et aux fonctions effectrices des cellules immunitaires [271].
L'activation de RAC par DOCK2 est impliquée dans la migration des lymphocytes par chimiotactisme vers les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes *DOCK2*$^{-/-}$ ont un défaut d'activation RAC après stimulation aux chimiokines (CCL21, CXCL13) *in vitro,* qui conduit à une absence de migration et à une atrophie des organes lymphoïdes secondaires [271].
La formation de la synapse immunologique avec la polarisation du TCR et l'agrégation de radeaux lipidiques dépend de DOCK2 [272]. L'engagement du TCR induit l'activation de RAC par DOCK2 qui participe la signalisation en aval du TCR.
La migration des lymphocytes B, l'activation du BCR et la différenciation plasmocytaire implique DOCK2 [273,274].
DOCK2 participe également à la fonction cytotoxique et la dégranulation des NK qui impliquent l'activité RAC[275].
La voie DOCK2/RAC est impliquée dans l'immunité antivirale par la production d'interféron de type I, fonction essentielle des DCs de type plasmacytoïdes[276]. Dans d'autre types de cellules dendritiques, l'activité de DOCK2 est compensée par celles de DOCK1 et DOCK5.

DOCK2 régule la chimiotaxie des neutrophiles, la production de ERO et la formation de NET via son activité RAC[277,278]. La polarisation des neutrophiles et la motilité induite par chimiotactisme implique la signalisation DOCK2/RAC et son accumulation au bord d'attaque.

c) Déficit en DOCK2

En 2015, Dobbs et al ont décrit les cinq premiers patients atteints d'infections sévères précoces associés à un déficit autosomique récessif en DOCK2 [279]. A ce jour, dix-huit patients présentant un déficit en DOCK2 ont été identifiés dans la littérature[280,281].
Les patients présentent un déficit immunitaire combiné sévère avec des infections virales et bactériennes sévères et précoces. Les mutations du gène *DOCK2* rapportées sont des mutations bi-alléliques. Elles entraînent une absence ou une réduction marquée de l'expression protéique de DOCK2 ou l'expression d'une protéine tronquée sans le domaine DHR-2 aboutissant à une perte de la fonction GEF.
Chez les premiers patients décrits, les auteurs ont mis en évidence un défaut d'activation RAC dans les lymphocytes T conduisant à une lymphopénie T et B , une migration par chimiotactisme et une polymérisation d'actine défectueuses dans les cellules T, B et NK[279].Les altérations des lymphocytes T, B et NK conduisent à des infections virales et bactériennes invasives chez les patients.
Les thymocytes des patients présentent un défaut de prolifération et un défaut de maturation dans le thymus.
Les cercles d'excision du récepteur des lymphocytes T (TREC) sont les séquences d'ADN excisées lors des réarrangements du récepteur TCR au cours de la maturation des lymphocytes T. Les TREC sont diminués chez les patients atteint d'un déficit en DOCK2 reflétant un défaut de maturation thymique des cellules T.
Les lymphocytes B des patients présentent une production d'anticorps spécifique diminuée malgré un taux d'immunoglobulines normal. Les NK présentent une dégranulation altérée. Après exposition au virus HSV1 (Herpes Virus Simplex 1) des PBMC des patients, la production d'interféron de type I et de type III était diminuée. Randall et al ont démontré récemment le rôle intrinsèque de DOCK2 dans l'expansion clonale des lymphocytes T CD8+ après infection à HSV dans un modèle murin [282]. De plus, l'expression de DOCK2 était fortement diminuée chez les patients atteints d'infection sévère à SARS-CoV2, suggérant son rôle clé dans l'immunité anti-virale contre ce virus [283].
Une autre étude suggère que le déficit en DOCK2 affecte le métabolisme des lymphocytes T avec une dysfonction mitochondriale après stimulation du TCR, en lien avec la localisation mitochondriale de RAC[284].

Moens et al ont mis en évidence l'implication des défauts de fonctions neutrophiliques dans les mécanismes physiopathologiques du déficit en DOCK2[280]. La production de ERO en réponse à des chimio attractants des neutrophiles est diminuée mais moins que dans le modèle murin *Dock2*$^{-/-}$.

DOCK2 joue un rôle essentiel dans l'immunité tissulaire comme le suggèrent les infections invasives sévères cutanées et digestives des patients. Un modèle murin de gastro-entérite à entérobactéries montre que l'absence de DOCK2 augmente l'invasion bactérienne avec une fixation facilitée des bactéries aux cellules épithéliales intestinales[285].
Les études sur l'infection virale des souris *Dock2*$^{-/-}$ ont montré une perte de poids importante témoin de la sévérité du phénotype[282,283,285]. Cependant Guo et al ont démontré que les souris déficientes en Dock2 soumise à un régime riche en graisse perdaient du poids avec une diminution du tissu adipeux[286]. Cette étude suggère un rôle métabolique de DOCK2 dans le tissu adipeux.

DOCK2 est également exprimée dans les plaquettes humaines et les souris *Dock2*$^{-/-}$ présentent une macrothrombocytopénie associée à défaut de mégacaryopoïèse ce qui suggère un rôle prépondérant de cette protéine dans les plaquettes et les mégacaryocytes[287] . Chez l'homme les conséquences du déficit en DOCK2 sur les plaquettes n'ont pas été étudiées.

Dans un modèle murin de maladie allergique chez les souris *Dock2*$^{-/-}$, Tanaka et al ont démontré le rôle de Dock2 dans la régulation de la chaine alpha du récepteur de l'IL-4 (IL-4Rα) et dans le contrôle de la polarisation de la réponse TH2 . En effet les lymphocytes T CD4+ des souris *Dock2*$^{-/-}$ présentent une baisse de son expression à la surface et donc de la signalisation et une réponse TH2 excessive. Bien que le modèle murin *Dock2* $^{-/-}$ semble prédisposer aux manifestations allergiques, aucune manifestation allergique n'a été rapportée chez les patients avec un déficit autosomique récessif en DOCK2.

Parmi l'ensemble des patients décrits, cinq des sept patients traités par greffe de moelle osseuse ont survécu [281]. Trois patients sont traités par immunoglobulines et antibiotiques. Les autres patients sont décédés de défaillance multiviscérale d'origine infectieuse.

3. DOCK5

a) Définition et fonction GEF de DOCK5

DOCK5 est codée par le gène *DOCK5* localisé sur le chromosome 8, et est exprimée dans les tissus osseux, adipeux, hématopoïétiques, hépatiques et pancréatiques[289] . Comme les autres membres de la sous-famille DOCK-A , la structure 3D du complexe ELMO1-DOCK5 montre que ELMO1 facilite la fonction GEF de DOCK5[290].

b) Rôles de DOCK5

A ce jour aucune mutation de DOCK5 n'a été décrite chez l'Homme mais le rôle de DOCK5 est particulièrement étudié dans l'homéostasie osseuse et la dégranulation mastocytaire[291–293] . DOCK5 joue un rôle essentiel à la résorption osseuse par les ostéoclastes[291]. L'adhésion des ostéoclastes *Dock5*$^{-/-}$ à la matrice osseuse est altérée en conséquence d'une diminution d'activité RAC en aval de la signalisation par les intégrines. L'inhibition pharmacologique de DOCK5 par le blocage de son activité GEF prévient l'ostéolyse en agissant sur l'organisation des podosomes ostéoclastiques et en préservant la formation osseuse. DOCK5 est donc étudiée comme une cible thérapeutique des traitements anti-ostéolytiques dans l'ostéoporose.

Les mastocytes ont un progéniteur commun avec les ostéoclastes et sont impliqués dans les mécanismes de résorption osseuse. Le rôle de DOCK5 a été étudié dans les fonctions de dégranulation mastocytaire lors des réactions allergiques. DOCK5 est impliquée dans la dynamique des microtubules en aval de la signalisation d'un récepteur IgE, pendant la dégranulation mastocytaire [293]. Les souris *Dock5*$^{-/-}$ constitue un modèle de résistance à l'anaphylaxie systémique et cutanée.

Une étude suggère le rôle de DOCK5 dans les lymphocytes B. Cependant, la délétion de *Dock5* chez la souris a un effet modéré sur le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Une diminution des lymphocytes B folliculaires (FO) et de la zone marginale (MZ) a été observée et suggère un rôle possible de DOCK5 dans la différenciation périphérique des lymphocytes B [294].

DOCK5 est impliquée dans le métabolisme des lipides et du glucose. Le déficit en DOCK5 dans les cellules podocytaires rénales murines conduit à une accumulation de lipides dans le podocyte et une dysfonction rénale [295].Dans le cadre d'un régime riche en graisses, la délétion de *Dock5* chez la souris favorise l'obésité et affecte le métabolisme du glucose en aggravant l'insulinorésistance[296]. Ces études suggèrent un rôle de DOCK5 dans le métabolisme des lipides dans les cellules rénales et le tissu adipeux.

B. Sous-Famille DOCK-B : DOCK3, DOCK4

La famille DOCK-B comprend les membres DOCK3 et DOCK4 (Fig.26). Ces deux protéines présentent 40% de séquences protéiques similaires à la sous-famille DOCK-A ainsi que le domaine SH3. La présence de ce domaine permet la liaison avec la protéine ELMO bien que cette interaction reste peu étudiée dans cette sous-famille.

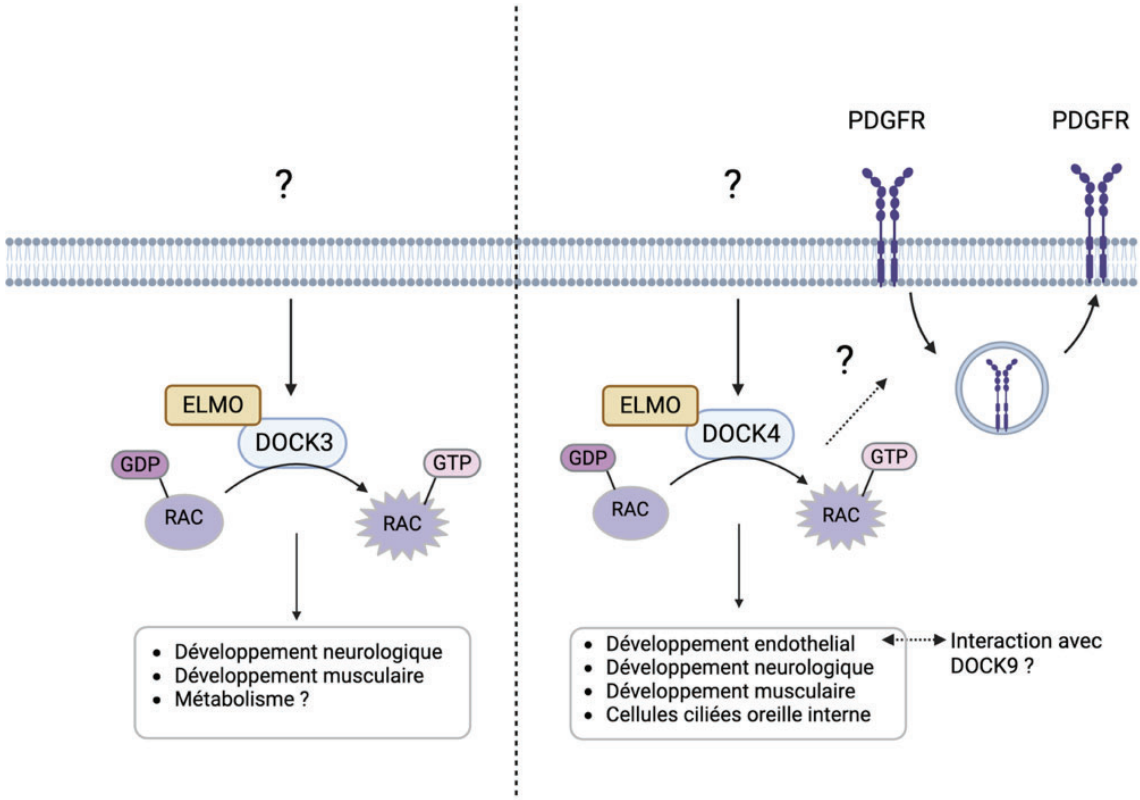


Figure 26.Voies d'activation et rôles de DOCK3 et DOCK4

Les voies impliquées dans l'activation de DOCK3 et DOCK4 ne sont pas connues. DOCK3 et DOCK4 interagissent avec la protéine ELMO pour favoriser leur fonction GEF. DOCK4 interagit avec DOCK9 lors du développement endothélial[297]. DOCK4 participerait au recyclage du récepteur du facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)[298].

1. DOCK3

a) Définition et fonction GEF de DOCK3

DOCK3 est codée par le gène *DOCK3* situé sur le chromosome 3, et est principalement exprimée dans le système nerveux central, périphérique et les muscles [299]. L'activité GEF de DOCK3 cible spécifiquement RAC1.

b) Rôles de DOCK3

Cette GEF joue un rôle prépondérant dans la croissance des prolongements des neurones [300,301].Les souris *Dock3* $^{-/-}$ développent des troubles sensitivo-moteurs et des troubles cognitifs associés à une dégénérescence des axones, prolongements des neurones conduisant le signal nerveux. Namekata et al ont montré que le recrutement membranaire du complexe protéique formé par une protéine de la famille WASP, WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein) et DOCK3 via son domaine DHR1 permet l'activation de RAC après une lésion du nerf optique [300]. Puis RAC-GTP et WAVE se dissocient de la forme phosphorylée de DOCK3 et conduisent à la réorganisation du cytosquelette et la croissance axonale. L'assemblage des microtubules est impliqué dans la régénération axonale. DOCK3 interagit avec d'autres partenaires via son domaine DHR1 essentiel au dynamisme des microtubules[302]. Ces études suggèrent également que l'état de phosphorylation de DOCK3 régule l'interaction avec ses partenaires. Des activateurs de DOCK3 sont envisagés en traitement des lésions axonales et des maladies neurodégénératives[300].

c) Déficit en DOCK3

Chez l'Homme, DOCK3 est associée à la maladie d'Alzheimer et son expression est réduite dans le liquide céphalorachidien des personnes atteintes de cette maladie [301]. Des mutations bi-alléliques du gène *DOCK3* entrainent une expression normale ou réduite de DOCK3 associée à une perte de fonction. Six patients ont été décrits avec un déficit en DOCK3 associé à un retard de développement et une hypotonie musculaire probablement lié à un développement axonal anormal[303–306] .

DOCK3 joue un rôle dans le muscle et son métabolisme. Dans un modèle murin de délétion conditionnelle de *Dock3* dans le muscle squelettique, les souris présentaient une activité locomotrice réduite avec une organisation, une régénération des fibres musculaire et un métabolisme du glucose altérés. Les auteurs ont montré le rôle de DOCK3 dans la signalisation de l'insuline et le transport de glucose en régulant l'activation du récepteur du glucose GLUT4 [299].

2. DOCK4

a) Définition et fonction GEF de DOCK4

Le gène *DOCK4* est situé sur le chromosome 7 et code la protéine DOCK4 dont l'expression majoritaire se situe dans les tissus cérébraux, endothéliaux et dans la peau. Comme les protéines de DOCK1 à DOCK5, DOCK4 participe à l'activation de RAC en interagissant avec ELMO [307].

b) Rôles de DOCK4

DOCK4 est exprimée dans l'endothélium et participe au transport du LDL (low-density lipoprotein) cholestérol dans les cellules endothéliales via son activité GEF [308].
Yazbeck et al suggèrent que DOCK4 est également impliquée dans la perméabilité endothéliale en maintenant l'équilibre avec les activités RHOA et RAC1[309]. Une autre étude suggère que la signalisation DOCK4/RAC interagit avec la signalisation DOCK9/CDC42 pour favoriser les protrusions nécessaires à la formation de la lumière endothéliale[297].
DOCK4 est également impliquée lors de différenciation et la morphologie des érythrocytes par son rôle régulateur du cytosquelette[310,311] .
DOCK4 participe à la migration cellulaire en réponse au facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Dans un modèle de fibroblastes, Kawada et al ont montré que DOCK4 interagit avec un complexe à l'avant de la cellule pour favoriser le recyclage du récepteur PDGFβ pendant la migration cellulaire dépendante du facteur de croissance PDGF[298].

DOCK4 joue un rôle dans la différenciation des neurites et la formation dendrites dans les neurones [312]. Cette protéine est associée à des maladies neuropsychiatriques, notamment l'autisme et la schizophrénie. Dans un modèle murin déficient en DOCK4, les souris développent des déficits sociaux de type autisme montrant le rôle de la signalisation DOCK4/RAC dans le comportement social [313]. DOCK4 est impliquée dans la morphologie des cellules ciliées de l'oreille interne qui peut altérer l'audition des souris déficientes en DOCK4 et modifier leur comportement [314].

c) Déficit en DOCK4

En 2024, Herbst et al ont identifié sept patients avec des mutations hétérozygotes de DOCK4 associées à un retard de développement et une microcéphalie[315]. Les mutations décrites sont pertes de fonction avec une activation réduite de la signalisation DOCK4/RAC.

C. Sous-Famille DOCK-C : DOCK6, DOCK7, DOCK8

La sous-famille DOCK-C comprend les membres DOCK6, DOCK7 et DOCK8 (Fig.27). Contrairement aux sous-familles DOCK-A et DOCK-B, les protéines de cette famille ne contiennent pas de domaine SH3 en N-terminal et n'interagissent pas avec la protéine ELMO *in vitro*. Elles ont la capacité d'avoir une activité RAC et CDC42 exceptée DOCK8 qui a une activité essentiellement CDC42. DOCK8 est la protéine la plus étudiée de toute la famille des protéines DOCK.

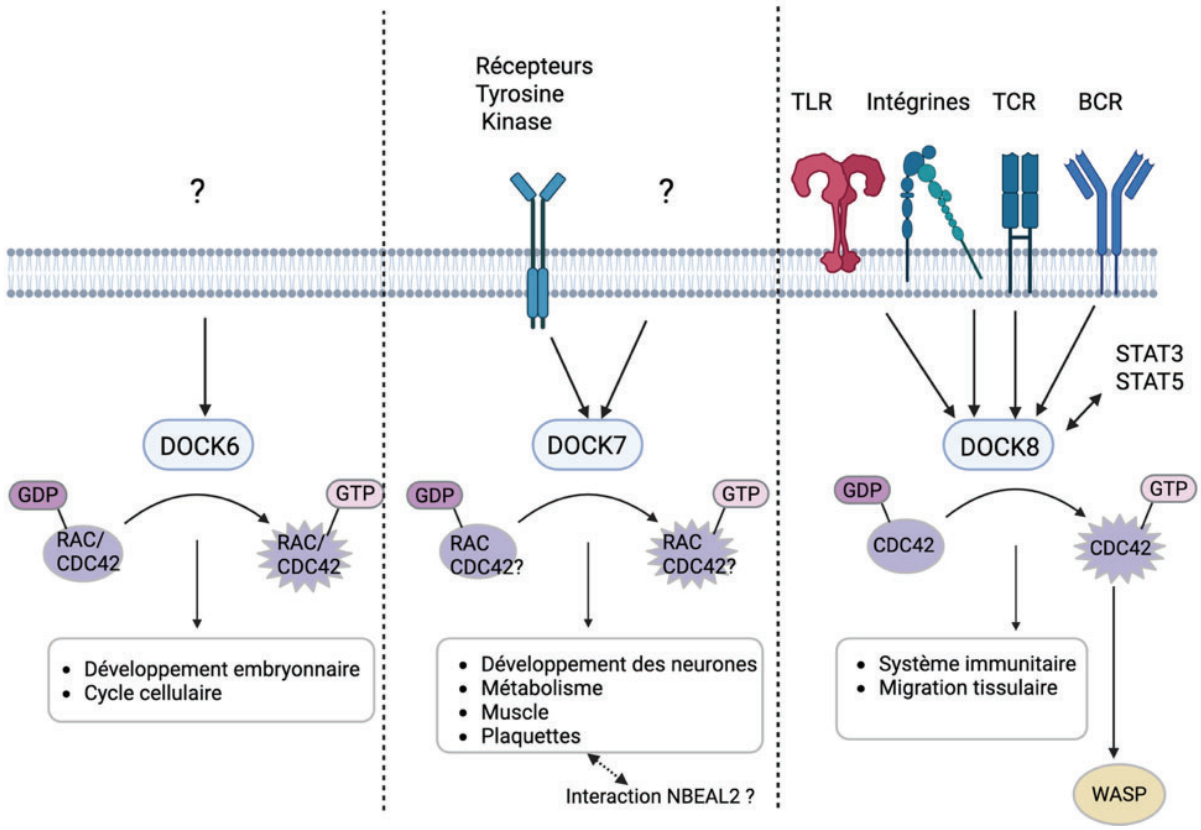


Figure 27. Voies d'activation et rôles de DOCK6, DOCK7 et DOCK8

L'activation de DOCK6 n'est pas décrite dans la littérature et DOCK6 joue un rôle dans le développement embryonnaire. DOCK7 est activée par les récepteurs des tyrosine kinase et est impliquée dans le développement des neurones, des muscles et dans le métabolisme. Une interaction est suspectée dans les plaquettes avec NBEAL2. DOCK8 est activée après l'activation des intégrines, des TLR, l'engagement du TCR ou du BCR. DOCK8 interagit physiquement avec STAT3 et STAT5. DOCK8 active CDC42 qui active à son tour WASP. DOCK8 a de nombreux rôles dans le système immunitaire.

1. DOCK6

a) Définition et fonction GEF de DOCK6

La protéine DOCK6 est codée par le gène *DOCK6* situé sur le chromosome 19 et active RAC1 et CDC42.

b) Rôles de DOCK6

DOCK6, via l'activation de RAC1 et CDC42, est impliquée dans la croissance des neurones et joue un rôle important dans l'alignement des chromosomes dépendant de CDC42 lors de la mitose[316]. DOCK6 participe à l'équilibre entre les activités RAC et RHOA au cours du cycle de division cellulaire.
Grâce à son domaine DHR1, DOCK6 est localisée dans le réticulum endoplasmique. Cerikan et al suggèrent que DOCK6 régule l'activité de CDC42 nécessaire au trafic membranaire à l'interface entre le Golgi et le RE [317]. Ils ont mis en évidence un rôle indirect de DOCK6 sur des protéines GAPs. La régulation négative de protéines GAPs permet le maintien des formes actives de RAC et CDC42 en cas absence prolongée de DOCK6 dans un modèle cellulaire humain *in vitro*.

c) Déficit en DOCK6

Les mutations récessives qui conduisent à l'inactivation du gène *DOCK6* chez l'humain sont l'une des causes du syndrome d'Adams-Oliver (AOS) [318]. L'AOS se caractérise par des anomalies du développement cutané du cuir chevelu, des malformations terminales transversales des membres et souvent des anomalies vasculaires congénitales. Des mutations gains de fonction autosomiques dominantes de ARHGAP31(Rho GTPase-activating protein 31), protéine GAP régulatrice des activités RAC et CDC42 , sont associées au AOS [319].La perte de fonction de DOCK6 et le gain de fonction ARHGAP31 conduisent à une diminution de l'activité RAC/CDC42 et altèrent la migration cellulaire lors du développement embryonnaire précoce de l'ectoderme.

2. DOCK7

a) Définition et fonction GEF de DOCK7

La protéine DOCK7 est codée par le gène DOCK7 situé sur le chromosome 1 et elle est très exprimée lors du développement du tissu cérébral.

b) Rôles de DOCK7

DOCK7 est impliquée dans l'organisation spatiale des microtubules lors de la formation des axones liée à l'activité RAC [320] .La localisation spatio-temporelle de DOCK7 semble impliquée dans la morphogénèse neuronale.
DOCK7 régule l'activité de récepteurs tyrosine kinase impliqués dans le développement des axones [321]. Yamauchi et al ont démontré que la migration des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique implique la phosphorylation de DOCK7 après stimulation de récepteur tyrosine kinase qui conduit à l'activation de RAC et CDC42.
L'activation de DOCK7 par phosphorylation participe à la régulation de la réponse au stress de réplication de l'ADN. La forme phosphorylée de DOCK7 induit son recrutement vers la chromatine qui conduit à l'activation de protéines de stabilisation de la chromatine [322].

DOCK7 est également exprimée dans les mégacaryocytes et les plaquettes dans les granules α et à la membrane[323]. NBEAL2 (Neurobeachin-like 2) est une protéine cargo impliquée dans la formation des granules α des plaquettes. Des mutations dans le gène *NBEAL2* sont associées au syndrome des plaquettes grises résultant d'une absence de granules α [324].DOCK7 est un partenaire de NBEAL2 et les plaquettes des patients atteints du syndrome des plaquettes grises sont dépourvues de DOCK7. Mayer et al suggèrent que l'interaction entre NBEAL2 et DOCK7 est essentielle à la régulation du cytosquelette dans les plaquettes et les mégacaryocytes.

Le rôle de DOCK7 dans le tissu adipeux et cutané a été identifié après séquençage du modèle murin Misty utilisé pour son pelage gris.
Les souris Misty (*m/m)* portent une mutation homozygote avec perte de fonction de *Dock7* et un pelage gris. Les mélanocytes de ces souris ont une forme et un contenu en mélanine associés à une faible prolifération en culture *in vitro*[325].Les souris Misty homozygotes présentent une petite taille et une proportion de masse grasse diminuée. La lignée de souris Moonlight (*mnlt/mnlt)* présente également un défaut de pigmentation du pelage qui résulte d'une altération du gène *Dock7*. Ces modèles murins montrent l'importance de DOCK7 dans le tissu adipeux et cutané.
Les souris Misty sont de petite taille, et présentent une faible densité minérale osseuse associée à une formation osseuse altérées. Le et al ont montré le rôle de DOCK7 dans la différenciation et la fonction ostéoblastique[326].

DOCK7 participe au fonctionnement normal, à la structure et à la performance des muscles comme le suggère l'altération de la fonction musculaire dans les souris avec une délétion conditionnelle de *Dock7* dans les muscles[327].

c) Déficit en DOCK7

Des mutations bi-alléliques de DOCK7 ont été rapportées chez 7 patients atteints d'un syndrome incluant une dysmorphie faciale, une épilepsie réfractaire précoce, un retard mental et une cécité [328,329].Les auteurs ont suggéré un mécanisme perte de fonction autosomique récessif et une étude a montré une absence d'expression protéique pour deux patients.

3. DOCK8

a) Définition et fonction GEF de DOCK8

La protéine DOCK8 est codée par le gène *DOCK8* localisé sur le chromosome 9.
DOCK8 active CDC42 et est majoritairement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Son activité RAC est débattue dans la littérature et dépend du modèle cellulaire étudié [246].
DOCK8 régule de nombreuses fonctions des cellules immunitaires dont la migration, l'assemblage de la synapse immunologique, la cytotoxicité, la différenciation des lymphocytes T et B, la fonction des cellules T régulatrices et la production d'anticorps par les cellules B. L'axe DOCK8/CDC42 est central dans l'activation du remodelage de l'actine dans les différentes voies de signalisation en aval de récepteurs clés comme les récepteurs d'antigènes (TCR, BCR) , les intégrines et les Toll-like récepteurs (TLR) [330]. DOCK8 est impliquée dans la dynamique du cytosquelette essentielle à la survie cellulaire et aux processus cytotoxiques dans les cellules NK, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules lymphoïdes innées [331].

b) Déficit en DOCK8

Depuis la première description de déficit en DOCK8 ou syndrome d'immunodéficience DOCK8 (DIDS) en 2009 , un peu moins de 200 patients ont été identifiés dans la littérature [330,332–335].
Les patients présentent un déficit immunitaire combiné caractérisé par des infections récurrentes et sévères, une maladie allergique sévère et une prédisposition au cancer. Dans cette maladie rare, autosomique récessive, les mutations bi-alléliques décrites entraînent le plus souvent une large délétion avec une absence complète ou quasi-complète de la protéine DOCK8. Le locus du gène DOCK8 comporte de nombreuses séquences répétitives qui prédisposent à la génération de délétions importantes en présence de mutations bi-alléliques. Les autres mutations observées chez les patients consistent en des mutations de site d'épissage, du décalage du cadre de lecture ou des non-sens aboutissant pour la majorité des cas à une perte d'expression de DOCK8[330]. La protéine DOCK8 résiduelle contribue à la variabilité du phénotype et de sa sévérité. Le diagnostic de déficit en DOCK8 repose sur l'absence ou la réduction importante de la protéine intracellulaire DOCK8 en cytométrie de flux.

Parmi les atteintes infectieuses décrites chez les patients, on retrouve des infections cutanéo-muqueuses sévères et chroniques à *staphylococcus aureus*, au virus de l'herpès simplex (HSV) et varicelle-zona (VZV), au papillomavirus humain (HPV) et au molluscum contagiosum. Les infections au virus d'Epstein-Barr chronique (EBV) contribuent à l'augmentation du risque de lymphome et de cancer de la peau outre les infections à papillomavirus humain mal contrôlées [333].

(1) Déficit immunitaire combiné dans le DIDS

Les patients atteint d'un déficit en DOCK8 présentent un déficit immunitaire combiné avec une altération des lymphocytes T, B et NK.
Chez ces patients, on détecte un faible nombre de TREC suggérant, comme dans le déficit en DOCK2, une altération du développement T au niveau thymique. Le déficit en DOCK8 est associé à une lymphopénie T notamment une diminution des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs et une augmentation des lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs mémoires épuisés, mettant en lumière le rôle de DOCK8 dans la survie et la fonction des lymphocytes T $CD8^+$ périphériques[331,336,337] .

DOCK8 participe avec la protéine WASP à signalisation reliant le TCR au cytosquelette, voie essentielle à l'assemblage de l'actine après activation du TCR. La polarisation de la synapse immunologique et la division cellulaire rapide après rencontre de l'antigène sur les cellules dendritiques est régulée par DOCK8. Le défaut de contrôle des infections chez les patients suggère une altération de l'immunité à médiation cellulaire. DOCK8 est essentielle à la fonction cytotoxique des T $CD8^+$[338].
Les patients atteints de DIDS développent des infections sévères des sinus et des poumons associées à un défaut de réponse humorale avec une diminution importante de cellules B mémoires $CD27^+$ suggérant un rôle de DOCK8 dans la mémoire sérologique[339].
Le maintien de la mémoire immunitaire prolongée implique la maturation des lymphocytes B naïfs en lymphocytes B mémoire et en plasmocytes à longue durée de vie[340]. Jabara et al ont décrit la liaison de DOCK8 à TLR9 après activation du TLR9 qui conduit à la phosphorylation de DOCK8. La phosphorylation de DOCK8 permet l'activation de la voie de signalisation SYK/STAT3 essentielle à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes B.
DOCK8 intervient dans la modulation de la maturation de l'affinité des lymphocytes B du centre germinatif en contribuant au recrutement des molécules d'adhésion vers la synapse immunitaire via la protéine WASP. Une étude récente a mis en évidence le rôle de DOCK8 dans la prolifération et la sélection positive des lymphocytes B spécifiques d'un antigène dans les centres germinatifs [341].Chez la souris *Dock8*$^{-/-}$, les auteurs ont décrit que la coopération entre les lymphocytes T et B dans les centres germinatifs, qui est nécessaire à la survie, à la sélection et à la différenciation en plasmocytes ou en cellules B mémoires, était altérée.
Chez les patients, il a été observé un nombre normal de lymphocytes B transitoires mais un nombre augmenté de lymphocytes B auto-réactifs suggérant un défaut de tolérance périphérique.

DOCK8 participe à la migration tissulaire des cellules dendritiques par son activité GEF. L'activation spatio-temporelle de CDC42 est importante pour la polarisation et la mobilité des cellules. Les patients atteint de DIDS ont une diminution du nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes en périphérie et produisent moins d'interféron de type I après stimulation virale altérant l'immunité anti-virale[342].
Le tropisme cutané des infections chez les patients souligne une altération de l'immunité tissulaire cutanée.

(2) Tropisme cutané des infections dans le SDID

Le tropisme cutané chronique et sévère des infections dans le syndrome d'immunodéficience DOCK8 est très marqué par rapport aux autres déficits immunitaires combinés[330].
Après une infection virale initiale non sévère, les lésions cutanées persistent et s'étendent progressivement. Les infections par HSV affectent le tissu cutanéo-muqueux et conduisent à des lésions chroniques souvent ulcéreuses difficilement contrôlables et résistantes aux anti-viraux. Les infections par VZV peuvent provoquer des épisodes récurrents de zona et des vascularites. Les infections à HPV entraînent l'apparition de nombreuses verrues qui s'étendent et peuvent évoluer en cancer de la peau. Le HSV provoque des lésions cutanées sévères et potentiellement mortelles chez les souris *Dock8*$^{-/-}$ [332] .

La susceptibilité aux infections localisées au tissu cutanéo-muqueux a été étudiée par de nombreux auteurs[343,344,345,346,347] .Les lymphocytes T et les cellules NK jouent un rôle important dans la destruction des cellules infectées par des virus dans les tissus. Le dynamisme du cytosquelette d'actine régulé par DOCK8 via l'activation de CDC42 est essentiel pour la migration de ces cellules à travers les tissus riches en collagène tels que la peau. La migration des lymphocytes T déficients en DOCK8 est altérée dans des environnements complexes.
Shen et al ont mis en évidence récemment un rôle de DOCK8 dans le maintien de la forme des cellules T et de l'intégrité du noyau pendant leur migration en milieu confiné [348]. DOCK8 contribue à l'intégrité cellulaire après contrainte mécanique. Cette fonction prévient la déformation nucléaire, l'accumulation de dommages à l'ADN et la senescence cellulaire prématurée lors de la migration des lymphocytes en milieu 3D. Les lymphocytes déficients en DOCK8 se déplacent de manière aléatoire en adoptant une morphologie aberrante et un noyau déformé dans un microenvironnement riche en collagène ou dans des échantillons de peau. Après quelques heures de migration, les cellules T anormales présentent une morphologie inhabituelle de mort cellulaire catastrophique par fragmentation appelée cytotripsie [348,332]. La génération de lymphocytes T CD8+ mémoires résidents cutanés à longue durée de vie est affectée expliquant les infections à HSV localisées à la peau.

Zhang et al suggèrent que la voie DOCK8/CDC42/PAK est altérée ce qui retentit sur l'intégrité morphologique des lymphocytes du fait d'une polymérisation d'actine anormale en l'absence

de DOCK8[349]. DOCK8 participe à l'activation de la protéine WASP via l'activation de CDC42 et la déficience en WASP conduit à une polymérisation d'actine défectueuse, comparable à celle des lymphocytes T déficients pour DOCK8 [350]. Mais les patients atteints de WAS ont moins d'infections virales cutanées et surtout elles sont moins sévères. Les lymphocytes T dépourvus de WASP ne présentent pas de morphologie anormale ni de cytotripsie lors de leur migration dans un environnement 3D riche en collagène. Ces différences suggèrent l'existence possible d'autres effecteurs activés par CDC42 ou un rôle de DOCK8 indépendant de son activité GEF dans la régulation de la morphologie lymphocytaire essentielle à l'immunité de la peau.

(3) Mécanismes des allergies cutanées et digestives

Les patients déficients pour DOCK8 présentent une dermatite atopique (DA) de sévérité variable[333].
Contrairement à l'eczéma commun, les patients et les souris *Dock8*$^{-/-}$ présentent une barrière cutanée intacte avec un nombre de Tregs réduit. Les auteurs ont montré que DOCK8 était important pour la stabilité des Tregs sur les sites d'inflammation allergique et pour la génération, la survie et l'activité suppressive des cellules Tregs inductibles[351]. L'altération des Tregs en synergie avec la colonisation microbienne jouent un rôle clef dans le développement de la DA sévère chez ces patients. Le rôle de la cytotripsie dans la dysfonction des Tregs ou dans la colonisation microbienne reste indéterminée chez les patients présentant un déficit en DOCK8.

L'interleukine IL-31 est une cytokine produite par les lymphocytes TH2 et est associée à l'intensité du prurit chez les patients atteint de DA [352]. Yamamura et al ont découvert que DOCK8 régule négativement, et indépendamment de l'activation de CDC42, la translocation nucléaire du facteur de transcription EPAS1 (Endothelial PAS domain protein 1) responsable de l'activation du promoteur du gène *IL-31*. Le déficit en DOCK8 entraîne une production importante de l'IL-31 dans les lymphocytes CD4+, ce qui contribue à la sévérité de l'eczéma chez les patients[353].

Les manifestations allergiques associées à une absence de DOCK8 résultent d'une polarisation TH2 produisant les cytokines IL-4 , IL-5 et IL-13 et d'une baisse des réponses TH1 et TH17[354]. La production augmentée de l'IL-4 favorise le changement de classe d'isotype IgE dans les lymphocytes B impliquée dans la réponse allergique médiée par les IgE[355].
La plupart des patients ont un taux élevé d'IgE sérique et le déficit en DOCK8 était initialement appelé syndrome hyper IgE autosomique récessif en raison de sa ressemblance clinique avec le syndrome hyper IgE autosomique dominant (AD-HIES, aussi appelé syndrome de Job). La plupart des patients avec AD-HIES portent des mutations hétérozygotes dominantes négatives du gène *STAT3*[356]. Les phénotypes cliniques similaires et la réduction du nombre de cellules TH17 dans le SDID et l'AD-HIES ont permis de mettre en évidence le rôle de DOCK8 dans la fonction STAT3 et dans l'immunité des cellules TH17[317]. Keles et al ont démontré que DOCK8

permet la translocation de STAT3 vers le noyau et intervient dans la transcription de gène dépendants de STAT3 [357]. Si DOCK8 interagit avec STAT3 indépendamment de son activité GEF, celle-ci est nécessaire à la régulation de la phosphorylation de STAT3. Ce facteur de transcription étant essentiel à la polarisation TH17, l'altération de la différenciation TH17 des cellules T CD4+ naïve chez les patients avec un déficit en DOCK8 résulterait du défaut de régulation de STAT3.

La prédominance et la sévérité de maladies allergiques, en particulier alimentaires, chez les patients DIDS en comparaison aux patients avec un déficit en STAT3, suggère une implication des mastocytes indépendante de STAT3.
.Janssen et al ont très récemment mis en évidence le rôle de l'expansion des mastocytes muqueux dans l'anaphylaxie orale présentée par les souris dépourvues de DOCK8[343]. La diminution des cellules TH17 présents dans la muqueuse intestinale associée à une dysbiose augmente la production d'IL-4 par les cellules TH2 qui induit l'expansion des mastocytes muqueux. Les Tregs *Dock8* $^{-/-}$ ne sont pas capables de réguler l'expansion des mastocytes associée à la polarisation TH2. Ces résultats suggèrent un rôle central de DOCK8 dans l'homéostasie immunitaire intestinale.

Les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) produisant des cytokines de type TH17 sont importantes dans l'immunité des muqueuses digestives et sont régulées par DOCK8. Eken et al ont démontré que DOCK8 participait à la signalisation des cytokines produites par les ILC qui sont essentielles à l'immunité protectrice contre les pathogènes entériques[358] .

(4) Auto-immunité chez les patients atteints de DIDS

Chez les patients déficients en DOCK8 on retrouve un nombre normal de lymphocytes B transitoires, mais un nombre augmenté de cellules B auto-réactives, suggérant un défaut de tolérance périphérique et non centrale[359].Une majorité de ces patients ont des auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles détectables, mais l'auto-immunité est présente seulement chez 13% des patients avec notamment des anémies auto-immunes et des vascularites.
Bozkurt et al ont mis en évidence un répertoire TCR αβ restreint avec la détection de clones de cellules T CD8+ potentiellement auto-réactifs[360].
La présence de manifestations auto-immunes chez certains patients suggère un dysfonctionnement des T régulateurs avec un nombre réduit de Tregs détectés [330]. Chez des patients atteints d'un déficit de DOCK8 avec une expression résiduelle de la protéine, des cas exceptionnels d'auto-immunité associés à une entéropathie ont été rapportés dans la littérature[361]. Ce phénotype rare est similaire à celui des patients atteints d'un syndrome d'Immunodérégulation, de polyendocrinopathie, d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX) associé à des mutations du gène *FOXP3* codant un facteur de transcription essentiel au développement et à la fonction suppressive des Tregs[362] .

Le KO conditionnel de DOCK8 dans les Tregs conduit à une inflammation multiviscérale avec un entéropathie, une hyperactivation des lymphocytes T, la production de cytokines inflammatoires et des auto-anticorps [345]. Cependant la souris *Dock8*$^{-/-}$ et la majorité des patients avec un déficit en DOCK8 ne développent pas d'auto-immunité ni d'auto-inflammation malgré la diminution du nombre et une altération de la fonction *in vitro* des Tregs. Janssen et al ont démontré le rôle essentiel de DOCK8 dans la voie IL2/STAT5 qui est essentielle dans les Tregs [363]. Les auteurs suggèrent également que le rôle de DOCK8 dans la dynamique de l'actine participerait à l'activation du TCR et à la stabilité de la synapse immunologique dans les Tregs.

La suppression conditionnelle ou ubiquitaire de *Dock8* dans le modèle murin ne conduit pas au même phénotype. Le déficit ubiquitaire de DOCK8 est associé à un déficit secondaire de STAT3 dans les lymphocytes T effecteurs, ce qui peut participer à limiter le développement de l'auto-immunité et de l'inflammation systémique chez les patients et chez la souris *Dock8*$^{-/-}$. Su et al suggèrent que, chez les patients, des réversions somatiques, corrigeant le déficit dans les lymphocytes T effecteurs mémoires, pourraient être impliqués dans le développement d'une auto-immunité [330]. La recombinaison de l'ADN dans le locus *DOCK8* est facilitée par la présence de nombreux éléments de séquences répétitives. Pillay et al ont décrit trois patients avec un déficit en DOCK8 chez qui des réversions somatiques avaient été identifiées dans plusieurs sous-populations lymphocytaires conduisant à la guérison des infections et de la maladie allergique[364].

(5) Traitement des patients atteints de SDID

En l'absence de greffe de moelle osseuse, la moitié des patients décède avant l'âge de 20 ans et la quasi-totalité avant la quatrième décennie malgré les traitements prophylactiques et la substitution en Immunoglobulines[330,365]. Le recours à la greffe de cellules souches hématopoïétiques avec des donneurs apparentés, donneurs apparentés haplo-identiques et donneurs non apparentés compatibles a permis de transformer la morbidité et la mortalité du déficit en DOCK8. Ce traitement bien que risqué, guérit la susceptibilité aux infections et la dermatite atopique avec un taux de survie supérieur à 80%[365]. Il n'existe pas encore de données sur le risque de malignité et l'auto-immunité pré et post-greffe chez ces patients. Les allergies alimentaires persistent après la greffe suggérant la persistance de plasmocytes à longue durée de vie sécrétant des IgE spécifiques aux allergènes alimentaires après la greffe.
Les patients souffrants d'allergies sévères peuvent bénéficier d'un traitement par un anticorps monoclonal humain antagoniste de l'IL-4Rα, sous-unité commune aux récepteurs de l'IL-4 et l'IL-13 avant la greffe[366]. Cette immunothérapie permet de supprimer les réponses médiées par ces cytokines notamment la libération d'IgE et de cytokines pro-inflammatoires. Ce traitement également utilisé dans les DA et les asthmes sévères en population générale permet de réduire l'eczéma de ces patients et de diminuer le taux d'IgE circulants[367,368] .
Ce traitement bien toléré permet d'améliorer la qualité de vie des patients mais également l'état cutané limitant la morbidité au cours de la greffe de moelle osseuse.

D. Sous-Famille DOCK-D : DOCK9, DOCK10, DOCK11

La sous-famille DOCK-D est la famille la moins explorée avec peu de littérature et comprend les membres DOCK9, DOCK10 et DOCK11 (Fig.28). Les protéines DOCK appartenant à cette famille se caractérisent par la présence d'un domaine PH (Pleckstrin homology). Ce domaine permet leur insertion à la membrane via leur interaction avec des phospholipides appelés phosphoinositides[369].

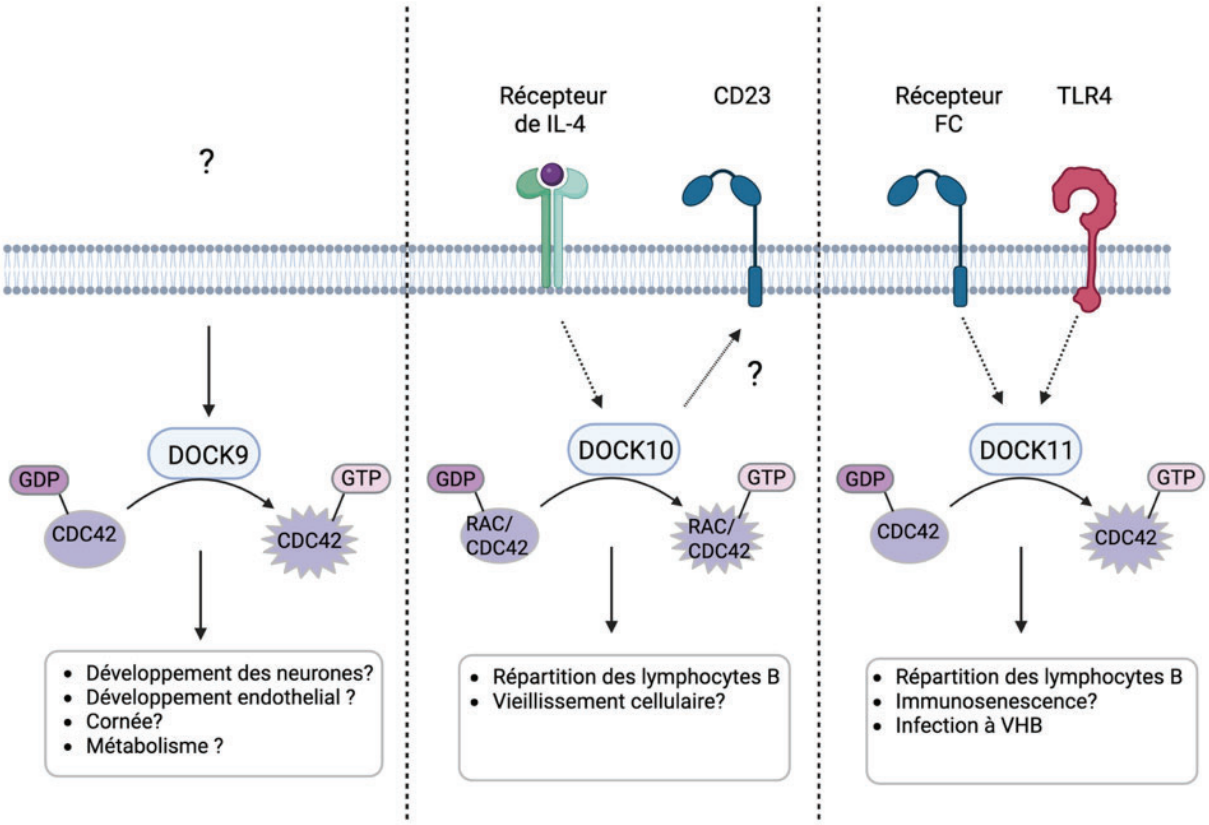


Figure 28.Voies d'activation et rôles de DOCK9, DOCK10 et DOCK11

Les voies d'activation de DOCK9 ne sont pas connues et les rôles de DOCK9 sont très peu décrits dans la littérature. Le récepteur de l'IL-4 participe probablement à l'activation de DOCK10. DOCK10 est impliquée dans la répartition des sous-populations lymphocytaires B et jouerait un rôle dans l'expression membranaire du CD23 qui est un récepteur Fc spécifique de l'IgE. Les récepteurs Fc et le TLR4 semblent participer à l'activation de DOCK11. DOCK11 joue un rôle dans les lymphocytes B et dans l'infection à VHB.

1. DOCK9

a) Définition et fonctions de DOCK9

Le gène DOCK9, situé sur le chromosome 13, code la protéine DOCK9 (ou ZIZIMIN-1). Elle active spécifiquement CDC42 et son expression est relativement ubiquitaire avec une absence d'expression dans les lymphocytes B [370].
DOCK9 a la capacité d'inhiber son activité GEF par repliement de sa partie N-terminale sur la partie C-terminale contenant le domaine d'interaction avec CDC42 [369,371].
Il existe dix-neuf isoformes codantes de DOCK9 renseignées sur les bases de données [372]. Les isoformes les plus grandes divergent notamment sur le premier exon et intron. L'expression des isoformes a été étudiée pour deux d'entre-elles et varient en fonction du type cellulaire [370]. DOCK9 a une expression cytoplasmique et nucléaire variable en fonction de la lignée cellulaire étudiée.

b) Rôles de DOCK9

DOCK9 est impliquée dans la morphologie cellulaire et contribue à la formation de protrusions membranaires comme les filopodes [373]. Dans un modèle cellulaire *in vitro* de neurones de rat, DOCK9 participe à la croissance des dendrites via son activité GEF [374].
DOCK9 participe à la morphogénèse des vaisseaux via son activité GEF[297]. DOCK4 est un partenaire de DOCK9 dans les cellules endothéliales et l'activation de RAC par DOCK4 participerait à l'activation de CDC42 par DOCK9.
Dans un modèle cellulaire de surexpression des deux protéines SMAD2 et SMAD3, majeures de la signalisation du TGFβ (transforming growth factor β), DOCK9 est partenaire de ces deux protéines[375].

Le modèle murin *Dock9*$^{-/-}$ n'a pas été décrit dans la littérature mais est renseigné sur des bases de données[376]. Le phénotype est métabolique et essentiellement présent chez les mâles. Les souris mâles *Dock9*$^{+/-}$ présentent une diminution de la masse grasse et une augmentation de la masse maigre. Une hausse du taux de cholestérol ainsi qu'une densité minérale osseuse plus importante sont constatées chez les souris *Dock9*$^{-/-}$ et *Dock9*$^{+/-}$. Une augmentation du volume globulaire moyen des globules rouges est observée chez les souris mâles et femelles mais seules les souris *Dock9*$^{+/-}$ présentent une augmentation de la bilirubine.
Chez l'humain, des polymorphismes du gène *DOCK9* ont été retrouvés chez des patients atteints de dystrophie cornéenne dont le sexe n'est pas toujours précisé [377].Une autre étude suggère que DOCK9 jouerait un rôle dans des maladies psychiatriques comme la bipolarité [378].
Des auteurs suggèrent l'implication de DOCK9 dans le cancer comme un facteur pronostic ou un facteur régulateur de l'angiogenèse et des réponses immunitaires antitumorales[379]. Une étude par GWAS (genome-wide association studies) met en évidence l'association entre DOCK9 et l'IMC (indice de masse corporelle) et entre DOCK9 et la densité minérale osseuse [380].

2. DOCK10

a) Définition et fonction de DOCK10

Le gène *DOCK10* est localisé sur le chromosome 2 et code la protéine DOCK10. DOCK10 est exprimée principalement dans les lymphocytes B et T et a une activité GEF à la fois sur RAC1 et sur CDC42 [381].La structure cristallographique du domaine DHR2 de DOCK10 montre la capacité de ce domaine de se lier à CDC42 ou RAC1 en modifiant la position de ses deux lobes catalytiques [382].

L'expression de DOCK10 augmente avec la stimulation par l'IL-4 dans les lymphocytes B [383]. DOCK10 comprend au moins 6 isoformes codantes renseignées sur les bases de données[384]. L'utilisation alternative du premier exon codant conduit à deux isoformes principales dont l'une est majoritaire dans les lymphocytes B et l'autre dans les lymphocytes T. DOCK10 est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules lymphocytaires.

b) Rôles de DOCK10

La délétion de *Dock10* chez la souris entraine une anomalie de la répartition des lymphocytes B avec une diminution de lymphocytes B circulants, des lymphocytes B folliculaires et des lymphocytes B de la zone marginale dans la rate. DOCK10 régule l'expression membranaire de CD23, un récepteur à faible affinité pour l'immunoglobuline E, dans les lymphocytes B folliculaires. Les auteurs suggèrent que la régulation négative de l'expression de CD23 par DOCK10 pourrait affecter le développement des cellules B mais pas les réponses lymphocytaires B [385].

DOCK10 joue un rôle dans la morphologie, l'étalement et la formation de protrusions dans les cellules adhérentes[386]. Son activité GEF participe à la migration de certaines cellules cancéreuses humaines et des macrophages dans un modèle murin neuro-inflammatoire [387].
Enfin une étude suggère un rôle de DOCK10 dans le vieillissement dans des modèles cellulaires *in vitro* et dans le modèle murin *Dock10*$^{-/-}$.[388].

3. DOCK11

a) Définition et fonction de DOCK11

Le gène *DOCK11* situé sur le chromosome X code la protéine GEF DOCK11 (ou ZIZIMIN-2) qui comprend 6 isoformes différentes et qui est exprimée essentiellement dans les cellules lymphocytaires et dendritiques [370,389].
DOCK11 active CDC42 et se lie aux deux formes de CDC42 liées au GDP et au GTP dans une boucle de rétroaction positive pour l'activation de CDC42[390]. Lin et al ont montré que le domaine DHR2 de DOCK11 permet d'abord d'activer faiblement CDC42. Puis, en se liant à l'extrémité amino-terminale de DOCK11 et dans une région proche au DHR2, CDC42 peut être complètement activée. La suppression *in vitro* de la partie amino-terminale de DOCK11 aboutit à une faible activité GEF de DOCK11 et confirme la fonction de régulation positive de CDC42 par DOCK11.

b) Rôles de DOCK11

Les rôles de DOCK11 ont été très peu décrit dans la littérature. Cette protéine est impliquée dans la formation des filopodes et la stimulation des récepteurs Fcγ ou TLR4 augmente son expression protéique dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris [391].
Le modèle murin dépourvu de DOCK11 ne semble pas avoir de phénotype clinique malgré une anomalie de réparation de la population B[391]. Matsuda et al ont mis en évidence la diminution de l'expression de DOCK11 associée à l'âge et suggèrent le possible rôle de DOCK11 dans le vieillissement immunologique des lymphocytes B. Les souris dépourvues de DOCK11 présentent une augmentation des lymphocytes B immatures de la moelle osseuse et une diminution des cellules B de la zone marginale. La production d'anticorps après exposition à des antigènes est normale dans ce modèle. Cependant DOCK11 contribue à la signalisation intrinsèque aux lymphocytes B lors de l'expansion des populations spécifiques d'un antigène dans les centres germinatifs après immunisation[392]. Sugiyama et al suggèrent que DOCK11 serait plutôt impliquée dans les réponses immunitaires secondaires, après une deuxième exposition à un antigène, et dans la production de certaines cytokines pro ou anti - inflammatoires (IL-6, TNFα, TGFβ, IL10).

DOCK11 est étudiée dans la littérature comme cible thérapeutique dans le traitement de l'infection chronique hépatique au virus de l'hépatite B (VHB)[393]. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de DOCK11 dans le maintien du VHB dans les cellules hépatiques [393,394,395]. Ide et al ont montré une diminution de l'infection et de la réplication virale du VHB dans les cellules hépatiques après l'endocytose d'un peptide de fusion bloquant l'interaction entre DOCK11 et ses partenaires *in vitro*. Pour sa réplication, le virus VHB utilise la machinerie de réparation de l'ADN de l'hôte. Après internalisation du virus, l'ADN relâché circulaire (ADNrc)

des capsides virales est complété et converti en ADN circulaire clos covalent (ADN ccc). L'ADN ccc sert de matrice pour la synthèse des ARN viraux qui codent pour les différentes protéines virales. La conversion de l'ADNrc en ADNccc utilise le système de réparation de l'ADN de la cellule infectée. DOCK11 s'accumule dans le noyau au site de dommage de l'ADN et entraine la polymérisation de l'actine, y compris nucléaire qui permet l'assemblage du système de réparation de l'ADN. Li et al ont mis en évidence l'association de DOCK11 avec des protéines de transport rétrograde dans le réseau trans-golgi et la capside du VHB. Cette association permet au virus d'éviter l'étape de dégradation lysosomale et favorise ainsi l'infection de la cellule[394].
Ces études suggèrent un rôle de DOCK11 non lymphocytaire cytoplasmique et nucléaire dans les infections cellulaires à virus ADN et dans le système de réparation de l'ADN.

La sous-famille DOCK-D est l'une des moins décrite de la littérature et aucun déficit en DOCK-D chez l'Homme n'avait été encore identifié.

OBJECTIFS DE LA THESE

Dans ce travail de thèse, nous avons décrit pour la première fois huit patients présentant une auto-immunité sévère à début pédiatrique associé à un déficit en DOCK11 lié à l'X. Nous avons identifié une patiente atteinte d'une lipodystrophie généralisée et un vitiligo précoce associé à deux mutations hétérozygotes de DOCK9 probablement pertes de fonction. Le premier sujet a fait l'objet d'une publication en juin 2023 et le deuxième sujet est en cours d'étude.

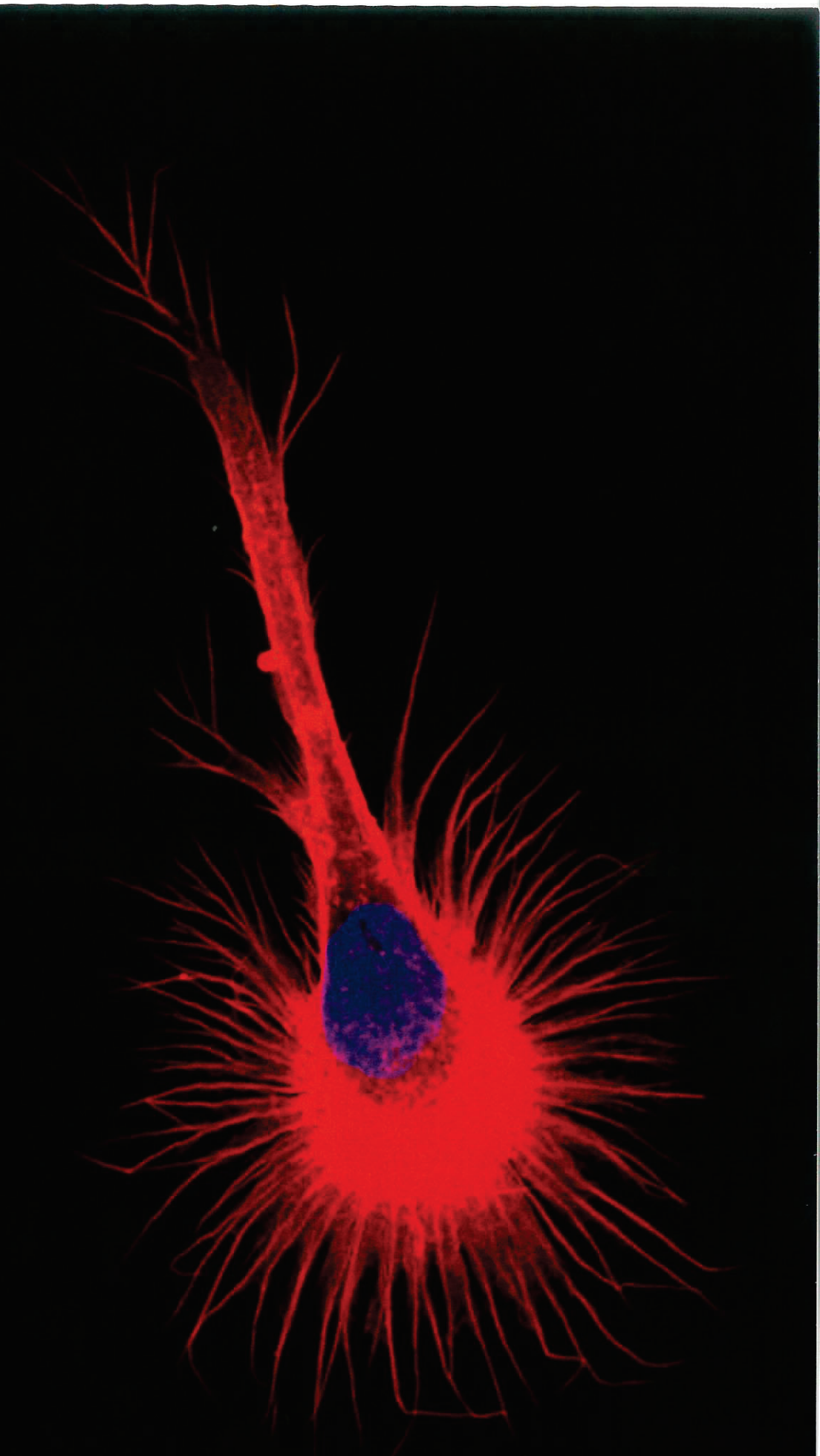
DOCK11 DEFICIENCY IN PATIENTS WITH X-LINKED ACTINOPATHY AND AUTOIMMUNITY

Nous avons débuté le projet DOCK11 en janvier 2021 pendant mon stage de Master 2 dans le laboratoire d'accueil. Ce projet a débuté après l'identification de mutations hémizygotes de *DOCK11* chez quatre garçons atteints de cytopénies auto-immunes par Laure Delage, une ancienne doctorante du laboratoire.
Pour ce projet, nous avons établi rapidement des collaborations avec des équipes ayant des expertises différentes afin d'étudier les types cellulaires des patients.
Nous avons travaillé en étroite collaboration avec le Dr Laure Delage pour étudier les anomalies cellulaires des patients et élargir la cohorte de patients.
Pour ce projet, j'ai participé à la conceptualisation de l'étude en proposant des hypothèses de recherche et en mettant au point des collaborations avec d'autres laboratoires. J'ai collecté et mis en forme l'ensemble des données et figures cliniques en collaboration avec les médecins assurant le suivi des patients. J'ai également organisé les collectes des échantillons et particulièrement pour les tests plaquettaires qui doivent être réalisés dans les heures qui suivent le prélèvement.
J'ai réalisé l'ensemble des expériences des figures 2I, 3A, 3B, 5, 6 en binôme avec ma co-autrice. J'ai préparé les cellules nécessaires (wt ou modifié avec shRNA) aux expériences faites en collaboration avec d'autres laboratoires (cell migration, scanning electron microscopy…).
J'ai participé à la rédaction de la version originale complète du manuscrit, ainsi qu'à toutes les révisions et corrections critiques du manuscrit. J'ai contribué aux réponses aux reviewers.

Nous avons soumis un premier papier en juin 2022 puis resoumis en septembre 2022 et le papier a été publié en juin 2023 après révision. Une des images de microscopie d'une cellule de patient a été sélectionné pour faire la couverture du journal.
Depuis cette publication, nous avons constitué une cohorte de patients avec des variants de DOCK11. Nous optimisons actuellement des outils pour pouvoir tester rapidement ces variants et confirmer ou infirmer leur caractère délétère.
Nous avons également réalisé l'interactome de DOCK11 dans des lymphocytes T pour identifier les protéines partenaires de DOCK11. L'identification des partenaires de DOCK11 va sans doute nous ouvrir des pistes sur les différentes fonctions de DOCK11 dans le système immunitaire.

blood®

AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY®



COVER:

- **DOCK11 actinopathy associated with autoimmunity**
  (p 2713)
- **Therapeutic T-cell engineering with novel safe sites**
  (p 2665, p 2698)
- **Improved outcomes for relapsed Hodgkin lymphoma after SCT**
  (p 2666, p 2727)
- **Predicting imatinib failure with single-cell analyses**
  (p 2668, p 2738)
- **Nivolumab plus BV in R/R MGZL**
  (p 2673, p 2780)
- **Function and molecular mechanism of parmodulins**
  (p 2675)
- **How I Treat: neonatal thrombocytopenia**
  (p 2685)

VOLUME 141 | NUMBER 22 | 1 JUNE 2023

blood®
Regular Article

IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY

DOCK11 deficiency in patients with X-linked actinopathy and autoimmunity

Charlotte Boussard,[1,2,*] Laure Delage,[1,2,*] Tania Gajardo,[1,3,†] Alexandre Kauskot,[4,†] Maxime Batignes,[1,5,†] Nicolas Goudin,[1,6] Marie-Claude Stolzenberg,[1,2] Camille Brunaud,[1,2] Patricia Panikulam,[1,3] Quentin Riller,[1,2] Maryse Moya-Nilges,[7] Jean Solarz,[4] Christelle Repérant,[4] Béatrice Durel,[1,8] Jean-Claude Bordet,[9] Olivier Pellé,[1,2,10] Corinne Lebreton,[1,11] Aude Magérus,[1,2] Vithura Pirabakaran,[1,2] Pablo Vargas,[1,12] Sébastien Dupichaud,[7] Marie Jeanpierre,[1,2] Angélique Vinit,[13] Mohammed Zarhrate,[1,14] Cécile Masson,[1,15] Nathalie Aladjidi,[16,17] Peter D. Arkwright,[18] Brigitte Bader-Meunier,[1,2,19,20] Sandrine Baron Joly,[21] Joy Benadiba,[22] Elise Bernard,[23] Dominique Berrebi,[24] Christine Bodemer,[1,25] Martin Castelle,[1,19] Fabienne Charbit-Henrion,[1,11,26,27] Marwa Chbihi,[1,19] Agathe Debray,[28] Philippe Drabent,[1,29] Sylvie Fraitag,[1,29] Miguel Hié,[30] Judith Landman-Parker,[31] Ludovic Lhermitte,[1,32] Despina Moshous,[1,19,33,34] Pierre Rohrlich,[22] Frank Ruemmele,[1,11,26] Anne Welfringer-Morin,[1,25] Maud Tusseau,[35] Alexandre Belot,[35,36] Nadine Cerf-Bensussan,[1,11] Marie Roelens,[1,37] Capucine Picard,[1,34,37,38] Bénédicte Neven,[1,2,19] Alain Fischer,[1,38-40] Isabelle Callebaut,[41] Mickaël Ménager,[1,5,42,‡] Fernando E. Sepulveda,[1,3,‡] Frédéric Adam,[4,‡] and Frédéric Rieux-Laucat[1,2,‡]

[1]Université Paris Cité, Paris, France; [2]Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases and [3]Laboratory of Molecular Basis of Altered Immune Homeostasis, Institut Imagine, INSERM UMR-S_1163, Paris, France; [4]INSERM, UMR_S1176, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; [5]Laboratory of Inflammatory Responses and Transcriptomic Networks in Diseases, Institut Imagine, Atip-Avenir Team, INSERM UMR 1163, Paris, France; [6]Necker Bio-image Analysis Platform, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24, CNRS UMS3633, Paris, France; [7]Institut Pasteur, UTechS Ultrastructural BioImaging UBI, Paris, France; [8]Cell Imaging Platform, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24, CNRS UMS3633, Paris, France; [9]Laboratoire d'Hémostase, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; [10]Flow Cytometry Core Facility, Structure Fédérative de Recherche Necker INSERM US24, CNRS UMS3633, Paris, France; [11]Laboratory of Intestinal Immunity, Université Paris Cité, Imagine Institute, INSERM UMR-S_1163, Paris, France; [12]Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151/CNRS UMR 8253, Université de Paris, Paris, France; [13]Sorbonne Université, UMS037, PASS, Plateforme de cytométrie de la Pitié-Salpêtrière CyPS, Paris, France; [14]Genomics Core Facility and [15]Bioinformatics Core Facility, Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 et INSERM US24/CNRS UAR3633, Université Paris Cité, Paris, France; [16]Centre de Référence National des Cytopénies Auto-immunes de l'Enfant, Bordeaux, France; [17]Pediatric Oncology Hematology Unit, University Hospital, Plurithématique CIC, Centre d'Investigation Clinique, 1401, INSERM, Bordeaux, France; [18]Lydia Becker Institute of Immunology and Inflammation, University of Manchester & Department of Pediatric Allergy and Immunology, Royal Manchester Children's Hospital, Manchester, United Kingdom; [19]Pediatric Immunology, Hematology and Rheumatology Department, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [20]Reference Centre for Rheumatic, AutoImmune and Systemic Diseases in Children, Paris, France; [21]Department of Pediatrics, Nîmes University Hospital, Nîmes, France; [22]Department of Pediatric Hematology-Oncology, Nice University Hospital, Nice, France; [23]Departement of General Pediatrics, Centre Hospitalier de Mayotte, Mamoudzou, France; [24]Department of Pediatric Pathology, Hôpital Robert-Debré, Hôpital Universitaire Robert-Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [25]Department of Dermatology, referral Center for Genodermatoses and Rare Skin Diseases, [26]Department of Pediatric Gastroenterology, and [27]Department of Genomic Medecine for Rare Diseases, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; [28]Departement of General Pediatrics and Infectious Diseases, Hôpital Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [29]Department of Anatomopathology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; [30]Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Médecine Interne 2, Institut E3M, INSERM UMRS 1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses-Paris, Paris, France; [31]Sorbonne Université, Department of Pediatric Hematology Oncology, Hôpital Armand-Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [32]Laboratory of Onco-Haematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université de Paris Cité, Institut Necker-Enfants Malades, INSERM UMR 1151, Paris, France; [33]Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Université Paris Cité, Imagine Institute, INSERM UMR 1163, Paris, France; [34]French National Reference Center for Primary Immune Deficiencies, Necker-Enfants Malades University Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [35]Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France; [36]Department of Pediatric Nephrology, Rheumatology, Dermatology, Reference Centre for Rheumatic, AutoImmune and Systemic Diseases in Children, Hôpital Femme Mère Enfant, CHU Lyon, Bron, France; [37]Study Center for Primary Immunodeficiencies, Hôpital Necker-Enfants Malades University, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [38]Université Paris Cité, Imagine Institute, INSERM UMR 1163, Paris, France; [39]Department of Pediatric Immuno-Haematology and Rheumatology, Reference Center for Rheumatic, AutoImmune and Systemic Diseases in Children, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; [40]Collège de France, Paris, France; [41]Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, Paris, France; and [42]Labtech Single-Cell@Imagine, Imagine Institute, INSERM UMR-S_1163, Paris, France

KEY POINTS

- **DOCK11 deficiency is a new X-linked immune-related actinopathy.**
- **DOCK11 deficiency leads to impaired CDC42 activity, abnormal actin cytoskeleton remodeling, and immune dysregulation.**

Dedicator of cytokinesis (DOCK) proteins play a central role in actin cytoskeleton regulation. This is highlighted by the DOCK2 and DOCK8 deficiencies leading to actinopathies and immune deficiencies. DOCK8 and DOCK11 activate CDC42, a Rho–guanosine triphosphate hydrolases involved in actin cytoskeleton dynamics, among many cellular functions. The role of DOCK11 in human immune disease has been long suspected but, to the best of our knowledge, has never been described to date. We studied 8 male patients, from 7 unrelated families, with hemizygous *DOCK11* missense variants leading to reduced DOCK11 expression. The patients were presenting with early-onset autoimmunity, including cytopenia, systemic lupus erythematosus, skin, and digestive manifestations. Patients' platelets exhibited abnormal ultrastructural morphology and spreading

as well as impaired CDC42 activity. In vitro activated T cells and B-lymphoblastoid cell lines from patients exhibited aberrant protrusions and abnormal migration speed in confined channels concomitant with altered actin polymerization during migration. Knock down of DOCK11 recapitulated these abnormal cellular phenotypes in monocytes-derived dendritic cells and primary activated T cells from healthy controls. Lastly, in line with the patients' autoimmune manifestations, we also observed abnormal regulatory T-cell (Treg) phenotype with profoundly reduced FOXP3 and IKZF2 expression. Moreover, we found reduced T-cell proliferation and impaired STAT5B phosphorylation upon interleukin-2 stimulation of the patients' lymphocytes. In conclusion, DOCK11 deficiency is a new X-linked immune-related actinopathy leading to impaired CDC42 activity and STAT5 activation, and is associated with abnormal actin cytoskeleton remodeling as well as Treg phenotype, culminating in immune dysregulation and severe early-onset autoimmunity.

Introduction

Immune-related actinopathies are inborn errors of immunity owing to gene defects affecting actin cytoskeleton remodeling. More than 20 entities are described so far.[1] Actin cytoskeleton remodeling is a dynamic and tightly regulated process crucial for cell shape modifications, cell adhesion, motility, and other main cellular functions.[2] Rho–guanosine triphosphate hydrolases (GTPases), RAS-related guanosine triphosphate-binding proteins, such as RAC, CDC42, and RHO, are key players in the intracellular actin reorganization.[3,4] The phenotypic spectrum of *RAC2* mutations ranges from granulocytes deficiency (loss-of-function mutations) to severe combined immunodeficiency with bone marrow hypoplasia (gain-of-function mutations).[5] De novo mutations in *CDC42* were recently found in patients presenting with Takenouchi-Kosaki syndrome, with associating features such as macrothrombocytopenia and developmental abnormalities; or with neonatal cytopenia with dyshematopoiesis, autoinflammation, rash, and hemophagocytic lymphohistiocytosis, termed NOCARH syndrome.[6] Rho-GTPases are activated by guanine exchange factors (GEFs), such as dedicator of cytokinesis (DOCK) family members like DOCK2 and DOCK8.[7] Biallelic mutations in *DOCK2* result in early-onset invasive bacterial and severe viral infections and T-cell lymphopenia.[8] *DOCK8* mutations also result in severe bacterial, viral, and fungal infections, as well as eczema and severe environmental allergies.[9] These descriptions highlight the predominant role of DOCK protein members in immune-related actinopathies.[10] A role of DOCK11 in human immune disease has been long suspected but, to the best of our knowledge, never described so far. Here, we have identified 7 hemizygous mutations in *DOCK11*, a member of the DOCK-D subfamily, in 8 patients with early-onset autoimmunity, including autoimmune cytopenia and systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods

This section briefly describes the methods; further details are provided in the supplemental Appendix, available on the *Blood* website. Before the study, all patients signed informed consents approved by the CERAPH-Centre (IRB: #00011928). The biological samples are part of INSERM UMR1163/Imagine collection declared to the French Ministère de la Recherche (CODECOH no DC-2020-3994).

Protein structure analysis

Three-dimensional (3D) structure prediction of the DOCK11 protein was performed by combining information from literature-described structures and AlphaFold2 predictions.[11] The detailed method is described in the supplemental Appendix.

Genetic and functional analysis

Whole-exome and Sanger sequencing, mass cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and G-protein–linked immunosorbent assay, confocal microscopy, migration assays, and *DOCK11* knockdown methods are detailed in the supplemental Appendix.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 (GraphPad, La Jolla, CA). Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by a post hoc test, or unpaired nonparametric Mann-Whitney tests or Kruskal-Wallis tests as indicated in the figure legends. Differences were considered significant when $P < .05$.

Results

Clinical and biological features of the cohort

In total, 8 male patients (aged, 7-29 years) from 7 families of various ethnic origins were studied. Clinical and biological data are summarized in Table 1, supplemental Table 1, and supplemental Figure 1. Detailed clinical cases are in the supplemental Appendix.

All patients presented with early-onset autoimmunity at a median age of 5 years (range, 1-14 years). Five patients (A, C, E, F, and G) had autoimmune cytopenia (Table 1). Twin patients (D1 and D2) had SLE. Patient B had a severe rheumatoid factor–positive polyarticular juvenile arthritis and recurrent hemolytic anemia with positive Coombs tests. In addition, patient F had an autoinflammatory syndrome with lymphoproliferation (supplemental Appendix).

Five patients (A, C, D1, D2, and F) presented with various cutaneous manifestations (detailed in Table1; Figure 1A; supplemental Figure 1), and 4 patients (A, B, D1, and F) with digestive manifestations (Table 1; supplemental Figure 2). None

Table 1. Clinical and biological data of the cohort

Patients	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D1	Patient D2	Patient E	Patient F	Patient G
AA change	p.L1298R	p.H1336R	p.T275S	p.D414Y	p.D414Y	p.L1706S	p.R1366Q	p.R1885C
Age (y)	14	7	29	20	20	20	6.5	14
Clinical manifestations								
Age at onset (y)	1.4	5	5	14	9	3	5	5
Autoimmune manifestations	Severe ITP	RF polyarticular JIA	Evans	SLE	SLE	Evans	AI neutropenia	Evans
Skin manifestation	Sweet syndrome, panniculitis	—	Folliculitis	Oral discoid LE	Bullous cutaneous SLE	—	Ecthyma gangrenosum	—
Digestive manifestation	Severe IBD (ileo-colitis)	Colon cryptitis	—	Ileitis	—	—	Anal and oral ulcers Intermittent diarrhea	—
Others	Non regenerative anemia	Hemolytic anemia	—	PID, growth retardation	Growth retardation	—	Autoinflammatory syndrome, lymphoprolife-ration, underweight	—
Therapies	Corticosteroids, IVIG, rituximab, azathioprine, everolimus, infliximab	Corticosteroids, methotrexate, adalimumab	Corticosteroids	Corticosteroid, MMF, HCQ, belimumab	Steroids, HCQ	IVIG, corticosteroids	Antibiotics	Corticosteroids, rituximab, sirolimus
Immunophenotypage	Defect memory and transitional B cells	Normal B cells, T and NK cell lymphopenia, NC	Excess of $CD21_{low}$ B cells, B cell lymphopenia, diminished MZB, and switched memory B cells	Excess $CD21_{low}$ and transitional B cells, diminished MZB	Excess $CD21_{low}$ and transitional B cells, NK cell lymphopenia	Normal, NC	Global lymphopenia, excess of $CD21_{low}$ and transitional B cells	Diminished switch memory B cells and excess of transitional B cells
Immunoglobulin dosage	Value / Reference values	Value / Reference values	Value / Reference values	Value	Value / Reference values	Value / Reference values	Value / Reference values	Value / Reference values
g/L	IgG 14 / 6.6-15.3 IgA 2.15 / 0.5-2.2 IgM 0.25 / 0.53-1.62	IgG N / — IgA N IgM N	IgG 1.24 / 6.6-15.3 IgA <0.05 / 0.5-2.2 IgM 0.46 / 0.53-1.62	γ 26.3 g/L	γ 17 gr/L / 6.9-15	IgG 10.73 / 6.44-11.96 IgA 1.24 / 0.63-2.02 IgM 0.42 / 0.416-1.31	IgG 27 / 5.5-11.15 IgA 3 / 0.4-1.6 IgM 7 / 0.5-1.5	IgG 3.69 / 6.6-15.3 IgA 0.16 / 0.5-2.2 IgM 0.25 / 0.53-1.62
Autoantibodies	ANCA, anti-αIIbβ3, ANA, anti-TPO, antithyroglulin	RF, +IgG Coombs	+IgG Coombs	ANA, RF, anti-RNP, anti-Sm	ANA, RF, anti-RNP, anti-Sm	+IgG Coombs	Weak + anti-CD16	+IgG and complement Coombs

Clinical and biological phenotypes of patients with mutated *DOCK11*.

Listed are reference ranges or laboratory values for the patient age groups. Therapy refers to all therapies that patients received.

AI neutropenia, autoimmune neutropenia; ANA, antinuclear antibodies; ANCA, antineutrophil cytoplasmic antibody; anti-αIIbβ3, antibody against integrin α-IIb/β-3; anti-RNP, antiribonucleoprotein antibody; anti-Sm, antismooth muscle antibody; HCQ, hydroxychloroquine; +IgG Coombs, positive direct Coombs with detection of immunoglobulin G; +IgG and complement Coombs, positive direct Coombs with detection of immunoglobulin G and C3; IBD, inflammatory bowel disease; IVIG, intravenous immunoglobulins; JIA, juvenile idiopathic arthritis; LE, lupus erythematosus; MMF, mycophenolate mofetil; MZB, marginal zone B cells; N, normal values; NC, not complete B phenotype; NK, natural killer; PID, pulmonary interstitial disease; RF, rheumatoid factor; TPO, thyroid peroxidase antibody; γ, gamma globulins detected in serum protein electrophoresis.

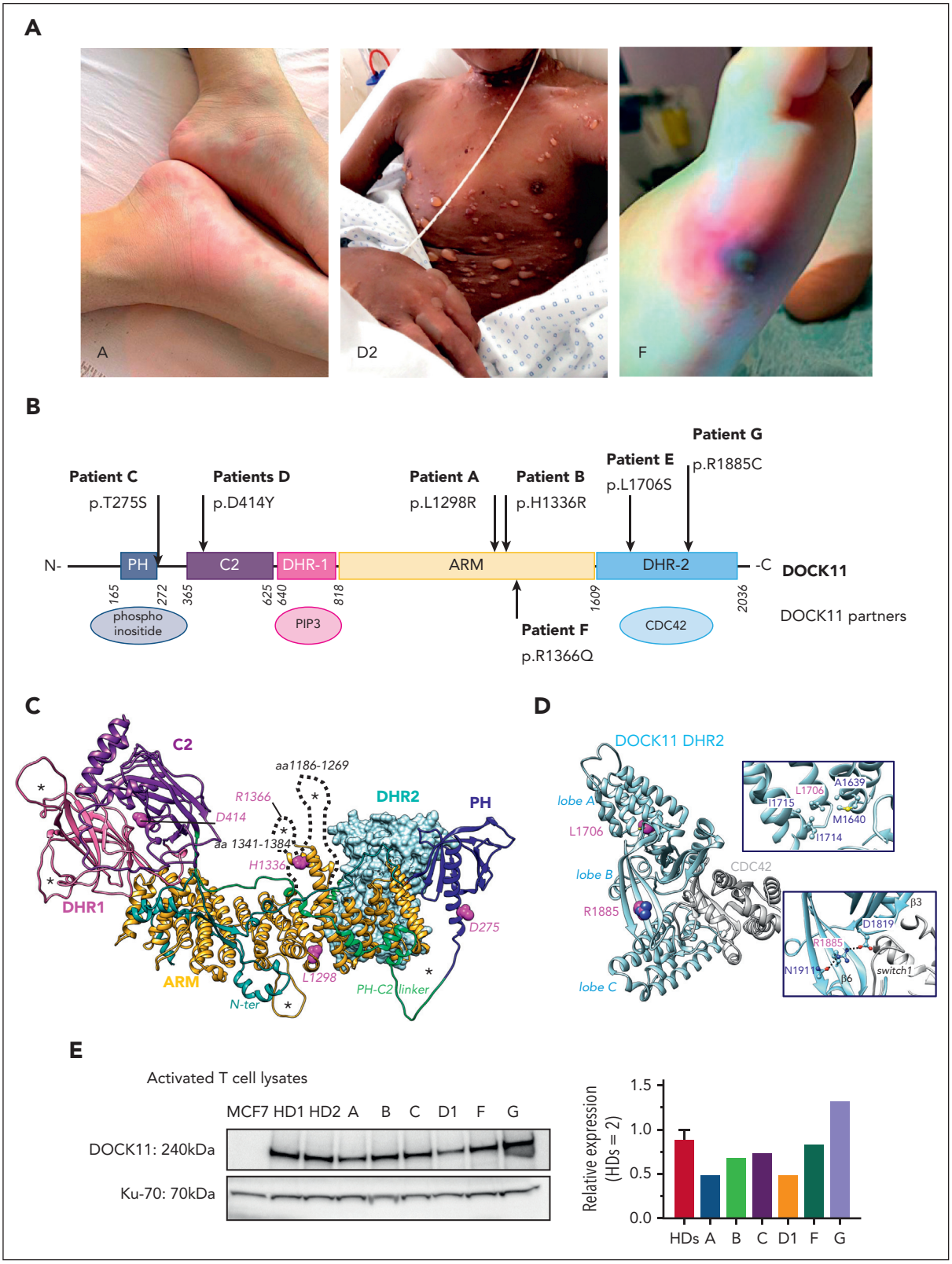


Figure 1. *DOCK11* hemizygous mutations: structural consequences and protein expression. (A) Dermatological clinical findings of patients with DOCK11 deficiency (from left to right): lobular panniculitis on feet in patient A, bullous cutaneous SLE in patient D2, and noninfectious ecthyma gangrenosum on external lateral border of the right foot in patient F. (B) Schematic overview of DOCK11 protein with the positions of patients' DOCK11 mutations. Molecular partners described to interact with DOCK11 are mentioned below the domain they bind to. (C) 3D structure of human DOCK11, as predicted by AlphaFold2 (ribbon representation, except for DRH2, which is shown as a blue surface). Confidence is high (pLDDT > 90) for the individual domain 3D structures, whereas the 3D structure of the N- and C-terminal sequences, linkers between domains and large loops (often disordered) remain elusive (low pLDDT values indicated by asterisks). Two such very large loops are depicted with broken lines, with the amino acid intervals. Positions of the domains relative to each other also remain uncertain, except form the C2-DHR1 interface (very low PEA [predicted error alignment] values). Mutated amino acids are depicted in magenta (patients A, B, C, D, and F). D414 is predicted exposed at the surface of the C2 domain and likely to play a significant role in the C2-DRH1

of the patients presented with recurrent or severe infections, allergies, nor bleeding disorders.

Among the maternal carriers, patient B's mother had metastatic melanoma and has been treated with immunotherapy; patient C's mother died of colorectal cancer at age 52.

Hemizygous deleterious mutations in *DOCK11*

Seven different hemizygous missense variants of *DOCK11* were identified by whole-exome sequencing (Figure 1B) in 7 unrelated and nonconsanguineous families. The 6 mothers who were tested, all carried the gene variants (supplemental Figure 3A). We assessed the expression of the mutant and wild-type alleles in $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, B cells, and monocytes in 2 mothers. The expression of both DOCK11 alleles was similar, indicating a global random X-inactivation in T and B cells as well as in monocytes (supplemental Figure 3B). These mutations were predicted to be deleterious in silico, and 5 are private variants (supplemental Figure 3A). The mutated amino acids are located in distinct domains of the DOCK11 protein (Figure 1B). Prediction of DOCK11 protein 3D structure allowed us to apprehend mutations' potential deleterious impact (Figure 1C-D; supplemental Figure 4) and suggests that the variants may cause abnormal protein folding or directly affect DOCK11 interactions with its partners. Finally, DOCK11 expression was variably reduced in lysates from patients' activated T cells (Figure 1E).

DOCK11 mutations impair platelet function and morphology

Platelets play a central role in immune thrombocytopenia (ITP) and participate in the immune dysregulation in SLE pathogenesis.[12] Because 4 patients presented with ITP, and 2 patients with SLE, we investigated the impact of *DOCK11* mutations on platelet function.

A significant decrease in the expression of DOCK11 was observed in platelets of patients compared with those of healthy donors (HDs) (Figure 2A).

Patient platelet counts were normal or subnormal, except for patients A and C, who presented mild to severe thrombocytopenia (Figure 2B) but without glycosylation profile defect (supplemental Figure 5A). Patient platelet size was also normal, except for patient A who exhibited macroplatelets (Figure 2C; supplemental Figure 5B). Moreover, electron microscopy ultrastructure analysis revealed abnormal morphology with elongated platelets in patients D1, D2, and G, which was in contrast with the discoid shape of resting platelets in HDs (Figure 2D-F).

Of 6 patients tested, 5 exhibited a defect of αIIbβ3 integrin activation at low concentrations of thrombin and convulxin (supplemental Figure 5C), indicating a thrombopathy. Of note, the expression of the main platelet receptors, glycoprotein Ibα, glycoprotein VI, and integrin αIIbβ3 was normal in patients, except for patient A whose integrin αIIbβ3 level was reduced (supplemental Figure 5D). Analysis of platelet morphologies during platelet adhesion on various matrixes (Figure 2G-H; supplemental Figure 5E) identified discoid platelets (resting stage), platelets with filopodia (intermediate morphological stage), and platelets with lamellipodia or full spreading (final morphological step).[13] All patients exhibited an abnormal frequency of platelets at the final stage, except for patient D2, who exhibited more resting platelets. These results indicate that the patient platelets exhibit abnormal morphological modifications during platelet adhesion and spreading. Of note, platelet functional assays were also performed for 2 mothers. A normal integrin αIIbβ3 activation was observed after stimulation of platelets by thrombin or convulxin and normal platelet morphologies distributions after adhesion (supplemental Figure 6A-B). Because DOCK11 is a GEF activating CDC42,[14] CDC42 activation was evaluated by G-protein–linked immunosorbent assay in patient platelets upon thrombin activation (Figure 2I). In all tested patients (A, D1, D2, F, and G), platelets exhibited impaired CDC42 activity, providing a rationale for the lower frequency of filopodia stage upon adhesion and suggesting that *DOCK11* mutations are loss-of-function mutations. Predominant lamellipodia or full spreading of patient platelet suggested an impact on others Rho-GTPases, such as RhoA.[15] In 2 patients tested (A and F), the RhoA activity was increased (supplemental Figure 5F). This was mimicked by pharmacological treatment with Cdc42 inhibitor of HD platelets. In this condition, the RhoA activity was also increased (supplemental Figure 5F). Taken together, these results indicated an imbalance in the CDC42/RHOA activity in patient cells.

DOCK11-mutated cells present abnormal morphological features

T-cell receptor-activated T cells from patients or HDs were spread on coverslips previously coated with poly-L-lysine, used as internal control, or with anti-CD28 and anti-CD3 antibodies at different concentrations (Figure 3A). On the antibodies-coated coverslips, activated T cells tended to increase their spreading area along with the concentration of anti-CD3 antibody. At a mild concentration (0.1 μg/mL), patient T cells showed reduced circularity and increased area, probably because of higher numbers of protrusions formed by *DOCK11*-mutated T cells (supplemental Figure 7A). At a higher anti-CD3 concentration (1 μg/mL), mutated *DOCK11* T cells had a larger spreading area than HD T cells (Figure 3A). Notably, pharmacological activation of CDC42 restored cell spreading area to control levels (Figure 3A). These results were confirmed in activated T cells from HDs after *DOCK11* short hairpin RNA (shRNA) inactivation (supplemental Figure 7B).

Figure 1 (continued) interface (supplemental Figure 6A-C). L1298 is predicted with confidence as being buried with the hydrophobic core of the ARM repeats, conserved in DOCK-C proteins (Figure S6D). The region including H1336 and R1366, more variable and predicted with a lower confidence, is located at the concave surface of the ARM repeats, where interactions take place in complexes of other DOCK proteins with partners. (D) 3D structure of DHR-2 domain of human DOCK11, as predicted by AlphaFold2. The DHR-2 (in light blue) is represented to interact with CDC42 (in gray), as deduced from the superimposition of DOCK11 with the 3D structure of DOCK9 in complex with CDC42. Mutated amino acids are depicted in magenta and correspond to mutations in patients E and G. L1706 is in the hydrophobic core of DHR2 lobe A, important for dimerization. R1885 is part of DHR2 lobe B, which consists of 2 sheets predicted in direct contact with the switch 1 domain of CDC42. (E) DOCK11 expression was evaluated in activated T cells of HDs and patients (A, B, C, D1, F, and G) by western blotting. The graph shows the relative expression of DOCK11 vs HDs (set to 1) ± standard error of the mean (SEM) after normalization against Ku-70 expression.

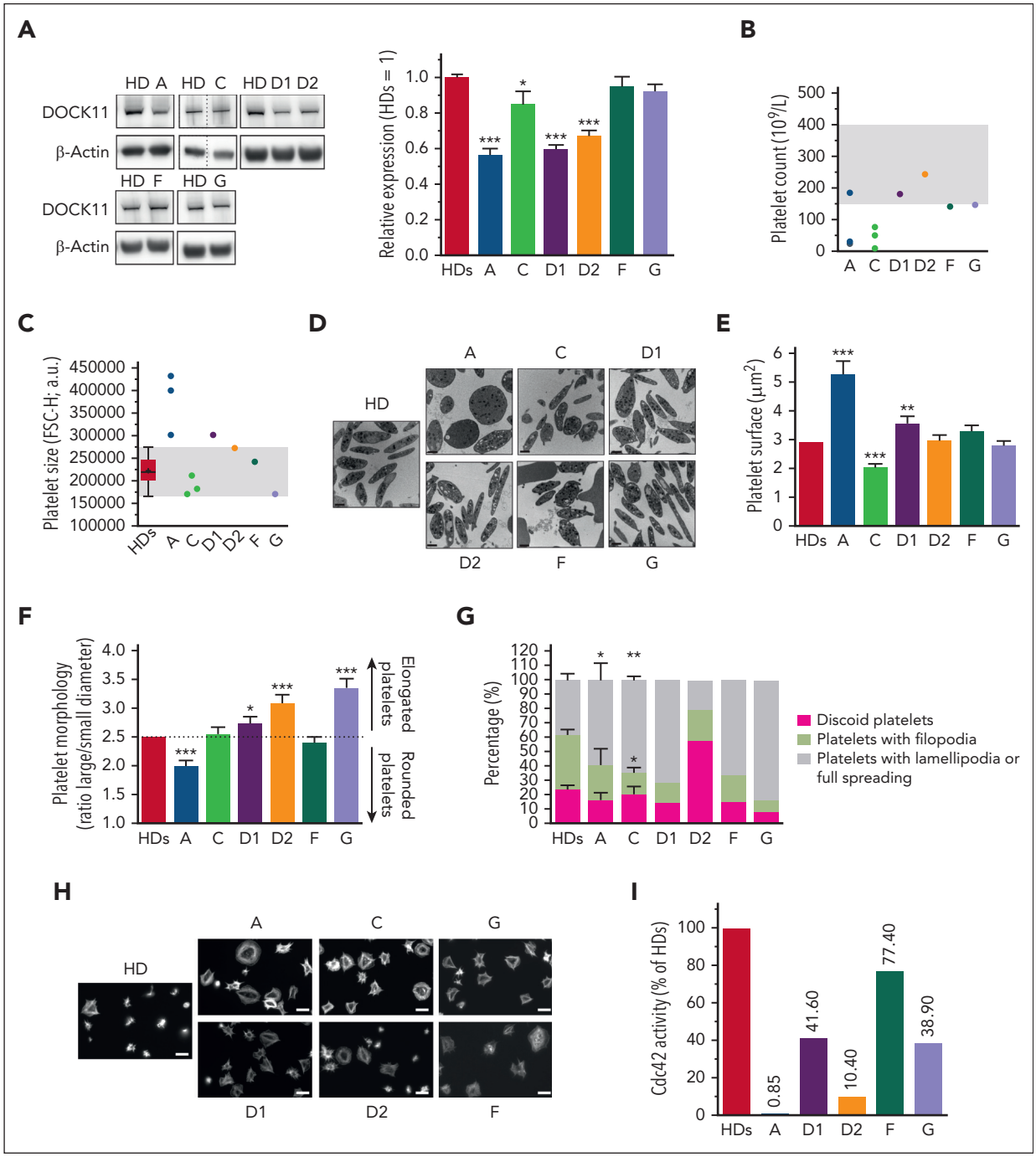


Figure 2. Study of platelets from patients with mutated *DOCK11*. (A) DOCK11 expression was evaluated in platelets of HDs, and patients (A, C, D1, D2, F and G) by western blotting. Dotted lines indicate that the samples were derived from the same gel but were noncontiguous. The graph shows the mean of the relative expression of DOCK11 vs HD (set to 1) ± SEM after normalization against β-actin expression from several independent experiments (HDs, n = 69; A, n = 22; C, n = 14; G, n = 16; D1, D2, n = 8; F, n = 15). Statistical difference was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett correction test for multiple comparisons (*$P < .05$; ***$P < .001$). (B) Platelet count for each patient (A, C, D1, D2, F, and G) was determined by automated blood cell counter. Shaded area represents the normal range between 150×10^9 and 400×10^9 platelets per L. Patients A and C were investigated for their platelet count several times (2 and 3 times, respectively). (C) Platelet size was evaluated by flow cytometry. Each dot represents the mean size measured by the mean forward scatter height (FSC-H; a.u., arbitrary units) of washed platelets from HDs and patients./ The box-and-whisker plot shows the normal range, determined from HDs. Whiskers represent the 5th to 95th percentiles, the box correspond to the interquartile range, the center line is the median, and the cross indicates the mean of 65 platelets. (D) Platelet ultrastructure, which was analyzed once for each patient using transmission electron microscopy (TEM). Scale bar represents 1 μm. (E-F) TEM analysis of platelet ultrastructure in each patient. Platelet surface (E) and platelet shape (F), which is defined as the ratio between the largest diameter and the smallest diameter, are derived from the TEM images. Graphs represent the mean ± SEM of at least 1100 HD platelets and 100 patient platelets. Statistical significance was determined in a one-way ANOVA with the Dunnett posttest for multiple comparisons. (G) Graph represents the mean percentage ± SEM of discoid platelets (dark gray), platelets with filopodia (light gray) and platelets with lamellipodia or full spreading (white) of at least 150 analyzed platelets from several independent experiments (HDs, n = 17; patient A, n = 4; patient C, n = 3). Statistical significance was determined only for patients A and C compared with HDs in a one-way ANOVA with the Dunnett posttest for multiple comparisons (*$P < .05$; **$P < .01$). Patients D1, D2, F, and G were not statistically analyzed because only 1 experiment was performed. Scale bar represents 10 μm. (H) Spreading of HD and patient platelets onto fibrinogen matrix for 30 minutes was analyzed by epifluorescence microscopy in the presence of apyrase (5 U/mL) and indomethacin (4.5 μM). Platelet morphology was visualized using F-actin detection by fluorescently labeled phalloidin. (I) CDC42 activity evaluated in HD platelets and patient platelets by G-LISA after stimulation by 0.5 U/mL thrombin for 1 minute in unstirred conditions. Graph represents the relative CDC42 activity of each patient compared with that of HDs (set to 100%). G-LISA, G-protein–linked immunosorbent assay.

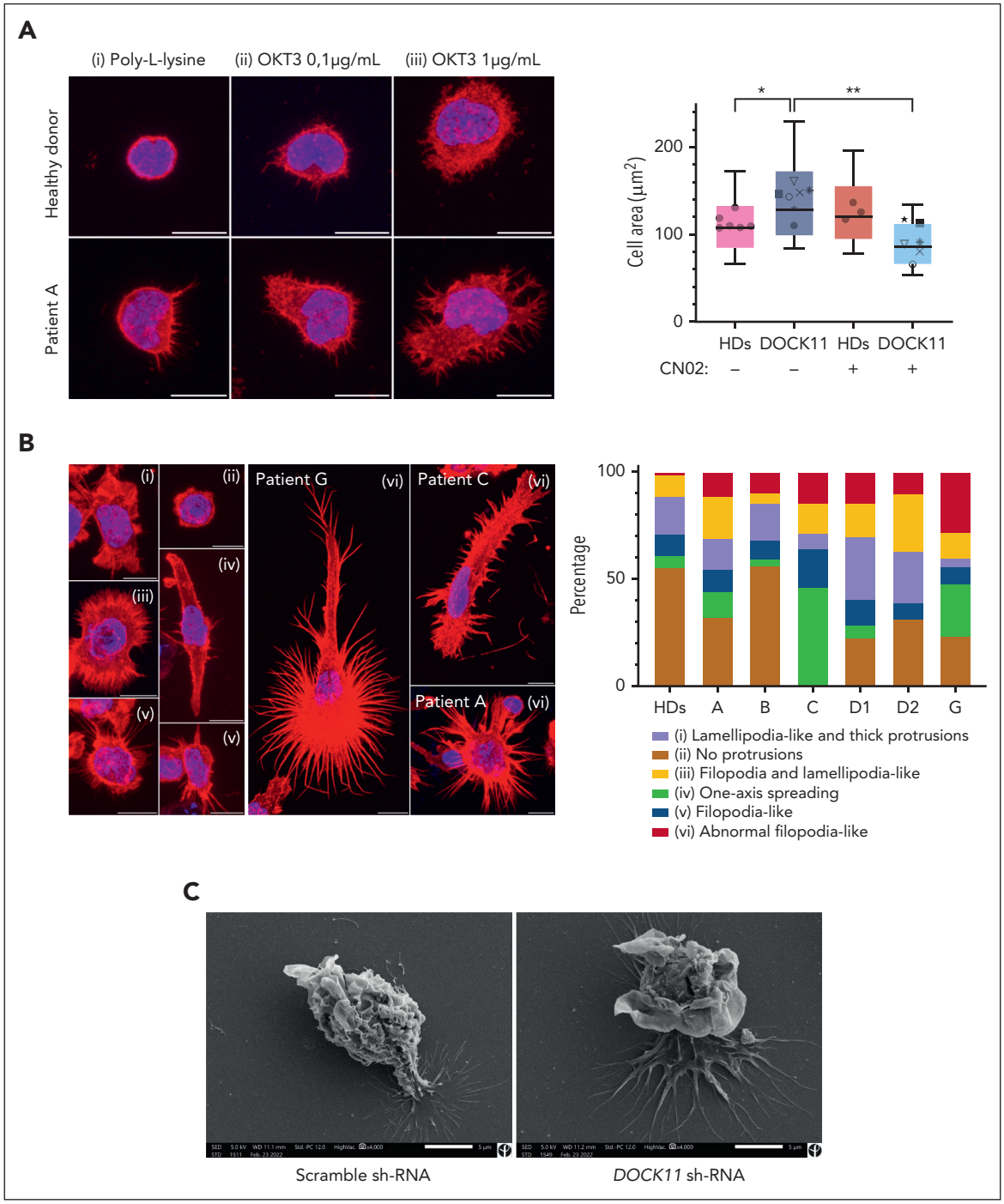


Figure 3. *DOCK11* mutations lead to abnormal cell morphologies. Spreading assays with different lymphocytes subsets. (A) T-cell morphologies after spreading. Blue color corresponds to 4′,6-diamidino-2-phenylindole staining (nucleus). Red color corresponds to actin staining. Each patient is represented by a different symbol: patient A (✳), patient B (●), patient C (■), patient D1 (×), patient D2 (★), patient F (∇), and patient G (○). Coverslips were coated with either poly-L-lysine (i); poly-L-lysine, anti-CD28, and anti-CD3 (0.1 µg/mL) antibodies (ii); or poly-L-lysine, anti-CD28, and anti-CD3 (1 µg/mL) antibodies (iii). Scale is set at 10 µm. Cell area was measured with or without CN02 treatment (CDC42/RAC1 activator). Nonparametric Kruskal-Wallis test was performed (*$P < .05$). (B) B-lymphoblastic cell lines morphologies after spreading. Several morphologies were observed: cells with no protrusion, cells spread along 1 axis, cells with fine protrusions (filopodia), cells with lamellipodia, and cells presenting both lamellipodia and filopodia. Cells from patients presented abnormal protrusions. Repartition of each morphology types is shown. Scale is set at 10 µm. (C) Morphologies of mature MDDCs from HD, using either a scramble shRNA or a *DOCK11*-shRNA, after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL for 24 hours, were observed using scanning electron microscopy. Scale is set at 5 µm.

Subsequently, we analyzed morphologies of B-lymphoblastoid cell lines (B-LCLs) after spreading on anti-CD44–coated coverslips (Figure 3B). In these conditions, some B-LCL cells from patients exhibited an abnormal morphology, with numerous fine and long protrusions (Figure 3B).

Finally, *DOCK11* shRNA inactivation was also performed in monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) from HDs. DOCK11 expression was reduced by almost 80% at the messenger RNA and protein levels (supplemental Figure 7B). After activation and spreading, *DOCK11*-inactivated MDDCs had larger and more

prominent protrusions (supplemental Figure 8A-B) and produced more interleukin-1β (IL-1β) cytokine (supplemental Figure 8C). Moreover, ruffles were aberrant and not comparable with the cells transfected with the scramble shRNA (Figure 3C).

Finally, primary skin-derived fibroblasts from patient A revealed abnormal protrusions compared with HD fibroblasts (supplemental Figure 9).

Overall, our results suggest that DOCK11 deficiency impairs the morphology of several cell lineages.

DOCK11 mutations affect leukocyte migration, and polarization of actin cytoskeleton under confinement

To confirm that *DOCK11* variants impair actin cytoskeleton dynamics in lymphocytes, we compared the spontaneous migratory capacity of activated T and B-LCL cells from HDs and patients with DOCK11 (A-G) under confinement (Figure 4A).

As previously described,[16] human activated HD T cells presented constant trajectories with few directional changes (Figure 4B). In contrast, all T cells derived from patients were faster than their HD counterpart (Figure 4C). Of note, T cells of patient B's mother had a migration speed similar to that of HDs (supplemental Figure 6C). Similarly, patient-derived B-LCLs had higher migration speeds (supplemental Figure 10A). To determine whether the increased speed of DOCK11-deficient cells correlated with alterations in actin polymerization, we assessed the front-rear distribution of actin in T cells fixed during migration in microchannels. In agreement with previous work,[16] HD cells presented a bimodal actin distribution, at the front and the rear of the cells (Figure 4D). In contrast, in patients who were tested, DOCK11-deficient cells accumulated more actin at the rear of the cell (ie, reduced front/rear actin ratio), consistent with the increased speed of these cells (Figure 4C-D).

Mechanistically, the motility of activated T cells in microchannels depends on the balance in actin polymerization at the

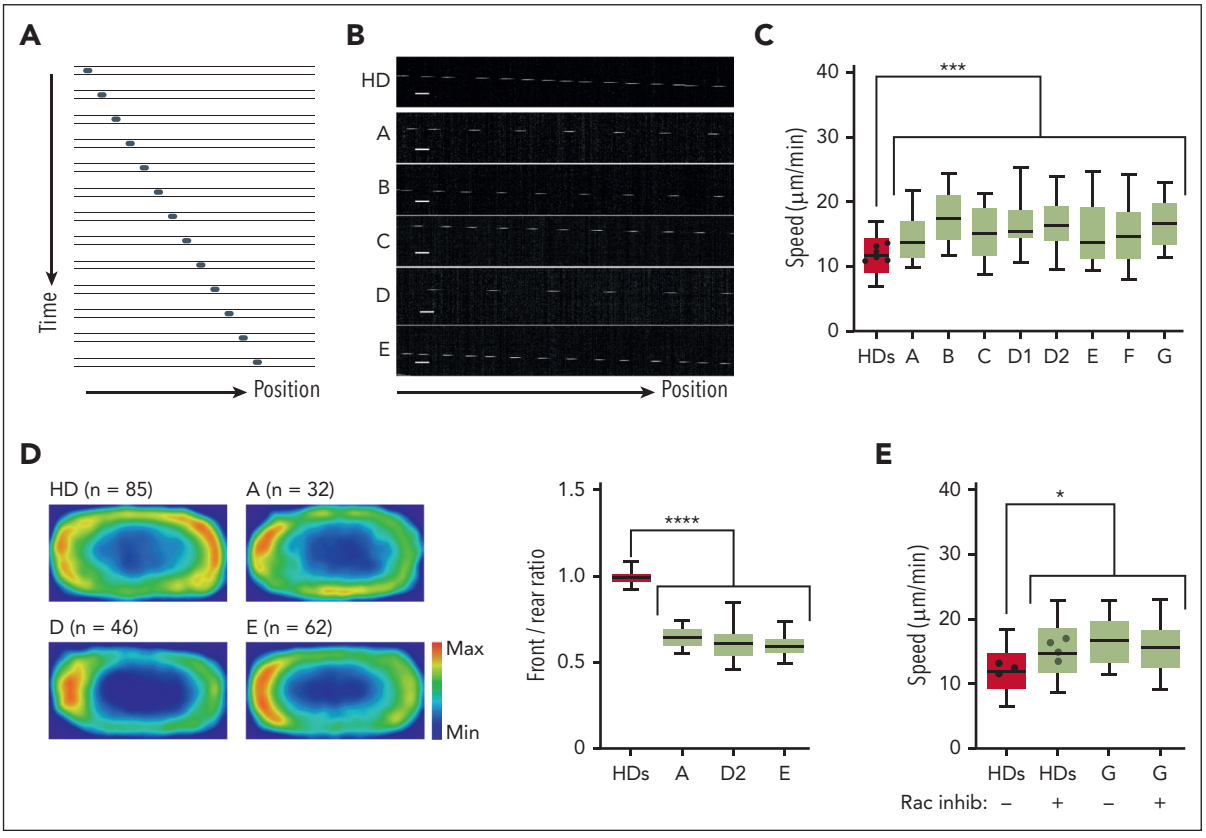


Figure 4. DOCK11 is needed for human leukocytes migration under confinement. Analysis of human HD and DOCK11-deficient T-cell migration in fibronectin-coated microchannels. Boxes include the 80% of the points, and bars represent the higher and lower 10% of points. (A) Representative montage of the change of position over time of human T-cell blast migrating inside microchannels of 4 × 5 µm with a timelapse of 2 minutes. (B) Representative kymograph of T-cell blast from HD (top panel) and DOCK11 patients (A-E, lower panels as indicated). (C) Mean instantaneous speed of HD and DOCK11 T-cell blasts migrating in 4 × 5 µm microchannels. Results from n = 2 independent experiments with each condition. Unpaired nonparametric Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance between the mean speeds of cells from controls and patients (*$P < .05$; **$P < .01$; ***$P < .001$). (D) Density maps representing the enrichment of actin in HD and DOCK11-deficient T cells migrating in 8 × 5 µm microchannels. Cells were allowed to migrate, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) to maintain the polarized morphology, and stained with phalloidin to visualize F-actin. The density maps were generated by averaging the signal from HD (n = 85), patient A (n = 32), patient D (n = 46), and patient E (n = 63) cells. Quantification of the signal intensity on density maps presented as front/rear ratio per cell. One-way ANOVA was used to evaluate statistical significance. (E) Mean instantaneous speed of HD and DOCK11 T-cell blasts (patient G) migrating in 4 × 5 µm microchannels, with or without RAC inhibitor treatment. Results from n = 2 independent experiment with each condition. One-way ANOVA test was used to evaluate statistical significance. Unpaired nonparametric Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance between the mean speeds of cells from controls and treated controls, patients and patients who were treated (*$P < .05$).

front (reflecting CDC42 activity) and rear (reflecting RHOA activity) of the cell.[17] These results were also observed in activated T cells from HDs after *DOCK11* shRNA inactivation (supplemental Figure 10C).

Considering that DOCK11 has been associated with CDC42 activation,[7,14] we hypothesized that DOCK11 defects could reduce the activity of actin nucleators at the leading edge, which would displace the balance of actin polymerization and increase polymerization at the rear of the cells (thus increasing their speed). To test this hypothesis, HD T cells were treated with a pharmacological RAC1/CDC42 inhibitor. This treatment increased the speed of control T cells and impaired the front-rear ratio of actin polarization, recapitulating the alterations displayed by the DOCK11-deficient cells (Figure 4E; supplemental Figure 10D). Altogether our results suggest that DOCK11 is a critical regulator of the actin cytoskeleton dynamics and leukocytes migration under confinement.

DOCK11 deficiency results in abnormal Tregs phenotype and STAT5B activation in lymphocytes

Next, we analyzed the impact of DOCK11 deficiency on the immune phenotype and some immune functions. Flow cytometry immunophenotyping revealed variable alterations of circulating immunoglobulins and B-cell subsets, especially increased frequencies of $CD21_{low}$ and transitional B cells (Table 1; supplemental Table 1). Elevated concentrations of a proliferation inducing ligand (APRIL) and B-cell activating factor (BAFF) were found in plasma from patients (supplemental Figure 11). Elevated plasma concentrations of inflammatory cytokines were also observed in most patients (supplemental Figure 11). Mass cytometry immunophenotyping on whole blood did not reveal major alterations of cell subsets except for reduced proportions of early and late natural killer cells, mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, and memory B cells (Figure 5). Of note, CD57 expression was significantly increased in $CD4^+$ T cells and γδ T cells (supplemental Figure 12).

Autoimmune manifestations were prominent in all patients. In some cases, severe autoimmune enteropathy, reminiscent of the clinical presentation of FOXP3 deficient patients, suggested possible regulatory T-cell (Tregs) dysfunction.[18] Tregs were first analyzed using the $CD4^+CD25^+CD127_{low}$ surface markers. Despite a slight decrease in patient F, the proportion of this subset in the 2 other patients tested is comparable with that in the HD controls (Figure 6A). Conversely, we observed a substantial reduction in the expression of FOXP3, and to a lesser extent, of HELIOS, by analyzing intracellular staining (Figure 6B). Therefore, the proportion of activated Tregs defined as $CD4^+$ $FOXP3^+$ $HELIOS^+$, was lower in these patients compared with in controls (Figure 6B). These results suggested that DOCK11 could be involved in the regulation of FOXP3 in Tregs. Among multiple factors regulating the FOXP3 transcription, STAT5B activation has been described as a main regulator of FOXP3.[19] Consistent with the reduced FOXP3 expression in Tregs, we found a reduced activation of STAT5B in patient T cells compared with HDs upon IL-2 stimulation (Figure 5C-D). In contrast, we observed a normal, or slightly reduced, IL-6–dependent STAT3 activation in the patient cells, suggesting a major impact of DOCK11 deficiency on the IL-2–STAT5 pathway only (supplemental Figure 13C). A decreased IL-2–induced STAT5B activation was also observed in B lymphocytes and MAIT cells (Figure 5C-D). More importantly, we confirmed a decreased IL-2–induced STAT5B activation in T cells from patients (supplemental Figure 13A) and from HDs, in which we induced a decrease in DOCK11 expression by knockdown (supplemental Figure 13B). Consistently, we also observed a variably reduced proliferation upon CD3 stimulation in activated T cells from 5 patients compared with HDs (supplemental Figure 14). Overall, these results suggest that the DOCK11 deficiency is associated with impairment of the IL-2–STATB pathway in different patients' lymphocyte subsets, as well as in DOCK11-knockdown T cells from HDs.

Discussion

We identified 7 private and rare hemizygous missense mutations of *DOCK11* leading to early-onset autoimmune disease. To the best of our knowledge, human DOCK11 deficiency has never been described thus far. DOCK11 is a GEF protein of the DOCK-D family. Mostly expressed in hematopoietic cells, DOCK11 is suspected to affect actin cytoskeleton remodeling through CDC42 activation, an important Rho-GTPase.[8,16]

All *DOCK11* mutations are predicted to be deleterious, and 3D modeling suggests that these mutations could affect the stability of the protein conformation or its interactions with putative partners. Accordingly, reduced DOCK11 expression was observed in patients' platelets and lymphocytes. The different variants, leading to a variable protein expression, may account for the variable clinical phenotypes observed in patients. Nevertheless, all patients who were tested showed reduced CDC42 activity in platelets, highlighting the abnormal function of the *DOCK11* mutants. Decreased CDC42 activity in platelets was associated with impaired platelet morphology, spreading, and activation. The spreading of platelets implicates Rho-GTPases such as CDC42, RAC, and RHO via integrin activation.[13,15] Some studies suggested that CDC42 is involved in platelet filopodia formation and spreading on fibrinogen.[20] RhoA activity, implicated in lamellipodia and stress fiber formation of platelets, was increased in the patients tested and increased after inhibition of CDC42 in platelets of HDs. Stimulated platelets from patients had a higher proportion of spread platelets, with deficient filopodia formation, reflecting a potentially disrupted balance between the Rho-GTPases CDC42 and RhoA.

Of note, reduced integrin αIIbβ3 activation was observed in patient platelets upon stimulation with an agonist at low concentration but not at high concentration. These results are consistent with a partial impairment of CDC42 activation in patient platelets.[21] Interestingly, circulating anti-αIIbβ3 antibodies were detected in patient A, who developed severe ITP with highly fluctuating platelet counts. The absence of significant bleeding disorder in DOCK11-deficient patients, with or without ITP, suggests that the hemostatic role of platelets is not affected. Platelets extensive exploration highlighted impaired actin cytoskeleton, abnormal activation, and disrupted Rho-GTPase balance in all patients tested, regardless of the presence or absence of thrombocytopenia. Functional non-hemostatic thrombopathy may impair the immunoregulation role of platelets as described in other autoimmune diseases.[12,22,23]

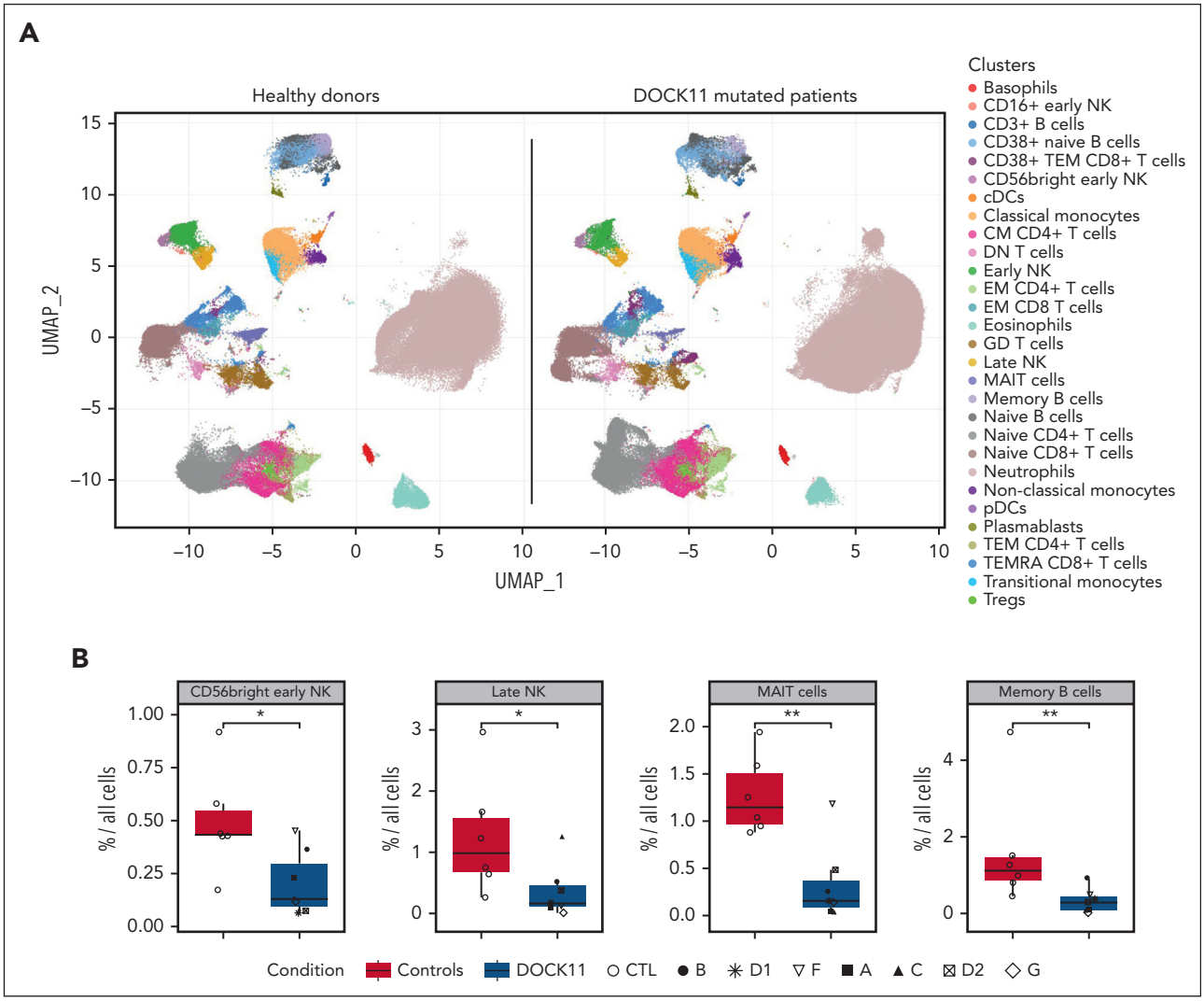


Figure 5. Immune phenotype by mass cytometry. (A) Uniform manifold approximation and projection (UMAP) of immune cell subset clusters analyzed by mass cytometry on whole blood samples from DOCK11 patients (n = 7) and age-matched HDs (n = 6). Each cluster is color coded. (B) Cell cluster biases observed between DOCK11 patients and HDs. DOCK11 patients have a significantly lower percentage of $CD56_{bright}$ natural killer (NK) cells, late NK cells, MAIT cells, and memory B cells. Two-tailed *P* values were determined with a nonparametric Mann-Whitney test. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .005.

T- and B-cell development and function can be disrupted in immune-related actinopathy, as previously described in other DOCK deficiencies.[24-26] Patients' T cells and *DOCK11*-knockdown activated T cells from healthy controls exhibited aberrant cytoskeleton rearrangement with larger spreading areas and more protrusions, which could impair migration, sensing, or interactions with other immune cells.[27,28] Indeed, migration speed under confinement was increased concomitantly with an abnormal actin polymerization at the rear during migration of the patient activated T cells and in the DOCK11-knockdown model, a finding consistent with an impaired balance in the activity of Rho-GTPases.[29] Moreover, the pharmacological inhibition of RAC/CDC42 in HD-derived T cells reproduced the aberrant spreading, faster migration, and impaired actin polarization, as observed in T cells derived from patients. Conversely, incubating the patients' T cells with a CDC42 activator restored normal spreading. Taken together, these results support the conclusion that DOCK11 deficiency impairs the balance between CDC42 and RHOA activity in activated T cells, as observed in platelets. Interestingly, a faster migration was also observed in patients' B-LCL, indicating that DOCK11 would be a general regulator of lymphocyte migration. Lastly, we observed aberrant protrusions and ruffles upon reduced protein expression by *DOCK11* knockdown in MDDCs from HDs. This is reminiscent of the role of mouse DOCK11 (Zizimin2) in the actin remodeling of bone marrow–derived dendritic cells.[30] The abnormal cell shape of DOCK11-inactivated MDDCs, and their increased production of IL-1β suggested that the patients' dendritic cells could contribute to the immune dysregulation observed in these individuals.

The patients' immunological phenotyping showed an abnormal distribution of the B-cell subsets with increased circulating BAFF and APRIL in the patients' plasma. Impaired balance of B-cell populations in favor of transitional and $CD21_{low}$ B cells with elevated cytokine levels of the BAFF complex may promote autoimmunity in patients, as already described in other immune disorders.[31] The DOCK11-deficient mouse model

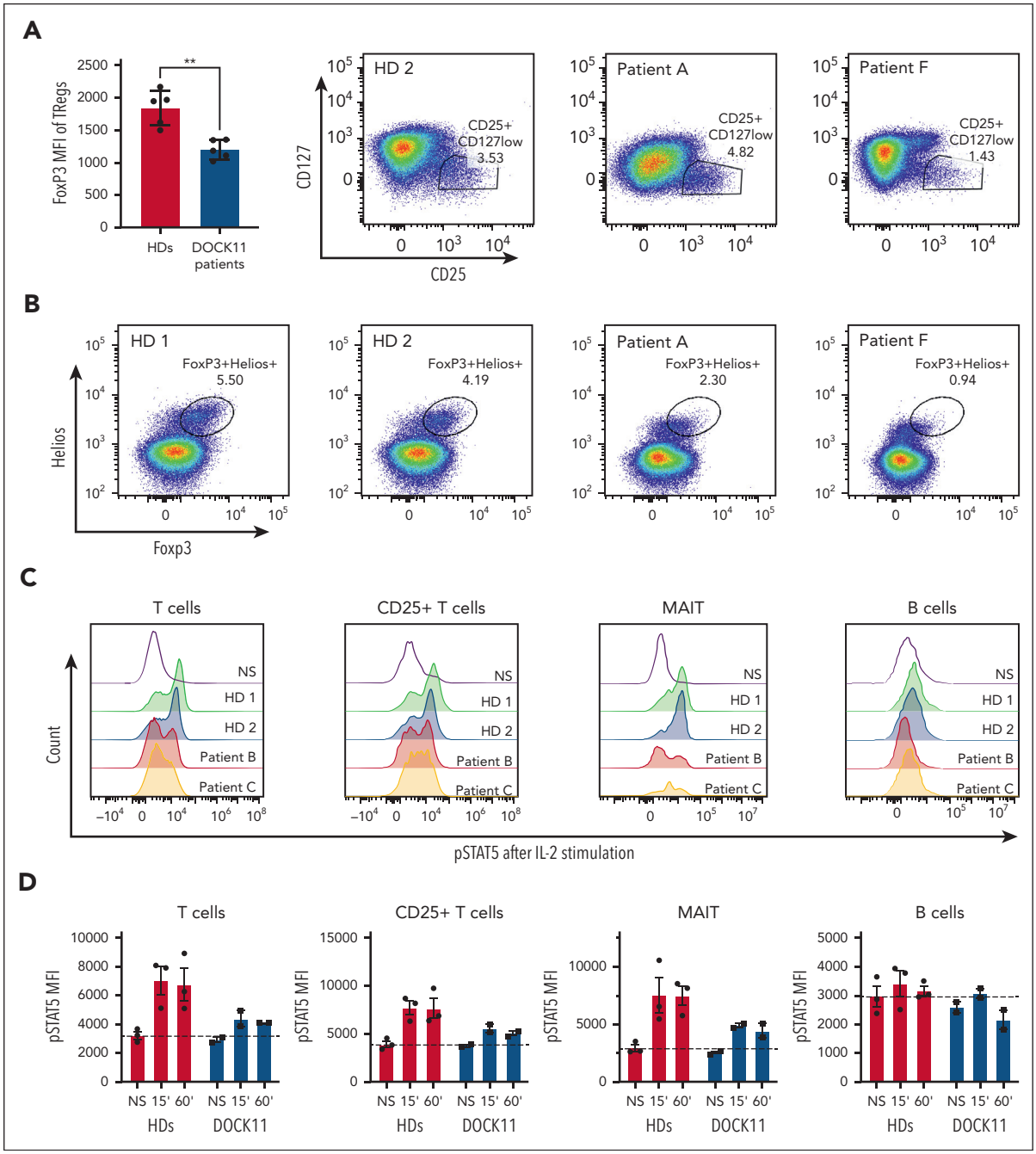


Figure 6. Treg phenotype and STAT5 activation. (A) FoxP3 mean fluorescence intensity on Tregs from HDs and patients with DOCK11. Treg are defined by $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127_{low}$ as depicted in the graph on the right side of the panel. (B) Representative dot plots of $CD3^+$ $CD4^+$ $Foxp3^+$ $Helios^+$ cells from HDs and 2 patients with DOCK11. (C) Representative histograms of phospho-STAT5 in T cells, $CD25^+$ T cells, and B cells from HDs and patients with DOCK11. Cells were stimulated for 60 minutes with IL-2. Results for unstimulated (NS) cells are shown with the black peak. (D) Kinetics of phospho-STAT5 expression upon IL-2 stimulation: unstimulated (NS), 15 and 60 minutes. Mean fluorescence intensity (MFI) of phospho-STAT5 in T cells, $CD25^+$ T cells, MAIT cells, and B cells from HDs and patients with DOCK11.

(known as the zizimin-2 knockout, the mouse counterpart of DOCK11) showed disturbed B-cell subset distribution.[32] Surprisingly, these mice did not develop autoimmune manifestations. However, many examples of genetic defects lead to very different phenotypes in humans and mice. For example, *Lrba* knockout in mice has no impact on regulating the immune response, whereas patients who are LRBA deficient present with primary immune deficiency and a broad spectrum of autoimmune manifestations.[33,34]

T-cell subset distribution was not overtly disturbed except for a reduced proportion of MAIT cells. Natural killer-cell subsets were also low in patients but without obvious clinical consequences such as viral infections or macrophage activation syndrome. Immunosenescence of T cells was increased in patients, consistent with the immune-aging role of DOCK11 suggested by the mouse models.[30,32] Increased proinflammatory Th1 and Th17 cytokines in patients' plasma, without any documented infection, suggested a possible immune dysregulation that

could be the cause, or the consequence, of the patients' autoimmune and autoinflammatory phenotypes.

All patients presented with various clinical phenotypes, including severe autoimmune cytopenia, SLE, autoinflammatory syndrome, or lymphoproliferation. Most patients had inflammatory bowel disease, and some had various immune-related skin manifestations. Importantly, none of the patients had severe or recurrent infections, and vaccinal responses were normal in the 2 patients who were tested, indicating an overall normal humoral response.

The severe early-onset autoimmune enteropathy observed in some patients was reminiscent of the prominent symptoms observed in patients who are FOXP3 deficient, suggesting a potential Treg defect in the patients with DOCK11 deficiency.[18] Although we observed a mildly reduced proportion of Tregs in 1 patient, we found the expected proportion of this subset in the remaining patients. However, more strikingly, we found a markedly decreased expression of FOXP3, the master Treg transcription factor, and HELIOS, to a lesser extent. These 2 transcription factors are essential to sustain the Treg suppressive functions.[35,36] Moreover, Tregs are highly dependent of IL-2 and its downstream signaling pathway, as observed in IL-2, IL-2RA, IL2RB, and STAT5B deficiencies,[37,38] all characterized by impaired Treg function and overt autoimmune manifestations. Interestingly, we observed a reduced STAT5B activation in the patient T and B cells upon IL-2 stimulation. This was corroborated by a slight, but consistent, reduction in T-cell proliferation. More importantly, the reduced IL-2–induced STAT5B activation is observed in DOCK11-knockdown T cells from healthy controls. All these results point to a global IL-2–STAT5 signaling impairment in the context of DOCK11 deficiency and provide a molecular basis for the underlying mechanisms leading to autoimmunity in these patients.

A challenging observation is that patients with DOCK11 develop overt autoimmune manifestations but not viral, bacterial, or fungal infections, whereas patients with DOCK8 patients predominantly present with recurrent sinopulmonary and mucocutaneous infections, severe allergy with elevated serum levels of immunoglobulin E but mild or any autoimmune symptoms.[39] Nevertheless, both defects are leading to a reduced CDC42 activity,[40] which therefore seems to be the main cause of the loss of cell shape integrity and abnormal motility, and indicates that both GEFs are nonredundant and possibly working in concert in this process. This also indicates that the impaired CDC42 activation is not fully involved in the pathophysiological mechanisms of each defect. The list of DOCK partners is probably far from being wholly defined. Because DOCK8 and DOCK11 belong to different DOCK subfamilies, one can anticipate that they may share common but also different partners. In addition, their respective expression may differ based on immune cell subsets. In humans, DOCK8 deficiency is reportedly associated with a reduced STAT3 activation in various lymphocyte subsets, consistent with the observation that patients who are DOCK8 deficient share common clinical and biological features with those who are STAT3 deficient, such as hyper immunoglobulin E, food allergy, and mucocutaneous infections related to impaired Th17 function.[41] In this study we uncovered an IL-2–STAT5 (but not an IL-6–STAT3) signalization defect and an abnormal Treg phenotype, 2 findings that are consistent with the development of autoimmunity. Surprisingly, a similar Treg dysfunction has also been described in patients who are DOCK8 deficient, despite the lack of prominent autoimmunity, further blurring the understanding of the mechanisms involved.[42] Very interestingly, although mice that are DOCK8 deficient have impaired Treg function but do not develop autoimmunity, mice with Treg-specific DOCK8 deficiency have lymphoproliferation, autoantibodies production, and enteropathy,[43] thus suggesting that DOCK8 deficiency in conventional T cells, or maybe in other immune subsets, protects against the onset of autoimmunity in patients.

In contrast, one might speculate that the impairment of some immune subsets, such as the MAIT cells, for instance, or that the platelet abnormalities observed in patients with DOCK11 deficiency could contribute to the development of autoimmunity. Lastly, the DOCK11 expression pattern is not restricted to the hematopoietic compartment but also allows its expression in various skin and intestinal cells.[44] Accordingly, we observed aberrant protrusions of primary skin fibroblasts derived from patient A, suggesting an impact on the actin cytoskeleton remodeling in nonhematopoietic cells. Therefore, it cannot be excluded that DOCK11 deficiency in nonhematopoietic cells contributes to tissue inflammation, possibly driving the autoimmune response to these tissues.

Another sharp contrast with the DOCK8 deficiency is the lack of overt viral infection despite the impact of DOCK11 deficiency on T-cell migration and possibly other immune cells, suggesting that DOCK11-deficient T cells could convey a normal tissue surveillance, possibly in line with a normal, or only slightly reduced, STAT3 activation. In addition to differential expression in immune cells, this might also relate to DOCK11-specific functions. Recently, Ide et al identified DOCK11 as a potential therapeutic target to prevent persistent hepatitis B virus infection[45]; the authors suggested that DOCK11 plays a role in the retrograde trafficking in the hepatitis B virus infection and contributes to maintaining covalently closed circular DNA. If this mechanism holds for other Herpes viruses, DOCK11 deficiency might passively protect against such viral infections.

In conclusion, this study describes a new X-linked immune-related actinopathy in 8 patients with severe early-onset autoimmunity, including SLE, caused by *DOCK11* hemizygous mutations. Platelets, and T and B cells from patients who are DOCK11 deficient showed aberrant cytoskeleton remodeling with impaired CDC42 activity. The regulation of FOXP3 in Tregs is impaired, involving the IL-2–STAT5B pathway. Our results underscore the crucial DOCK11 function in hematopoietic cells, and provide a novel example of the implication of actin cytoskeleton in human immune disorders. Further analyses are warranted to better understand the complex interactions between DOCK11 and other DOCK molecules, notably DOCK8, as well as to better characterize the molecular link with the IL-2–STAT5B pathway. This can provide key information to help clinicians to adopt the best therapeutic options. All patients have been treated with different immunosuppressive drugs that variably controlled the autoimmune manifestations. Considering that DOCK11 deficiency affects cell shape, the mechanical migration, or the adhesion of circulating cells, T regulators, and possible tissue-resident immune cells, allogenic hematopoietic stem cell transplantation could be contemplated as a therapeutic option.

Limits of the study

All patients presented with autoimmune features that may reflect biased recruitment in our laboratory. Furthermore, the identified mutations seem to confer a partial DOCK11 defect. Therefore, we do not exclude that *DOCK11* mutations could be associated with a broader or more severe clinical phenotype, including auto-inflammatory diseases,[40-42] or combined immune deficiencies, notably in patients with a complete DOCK11 deficiency.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their families for participating in the study. The authors thank Noémie Paillon and Juan-Jose Saez-Pons from the laboratory of Claire Hivroz at Institute Curie, Université PSL, U932 INSERM, Integrative Analysis of T cell Activation Team, Paris, France, for the help with T-cell spreading assay. The authors thank the CIQLE Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (France) for expert technical assistance with the electron microscopy studies, and Dominique Lasne and Delphine Borgel at Necker Children's Hospital (Hematology Department, Paris) for their assistance with platelet studies. In addition, the authors thank the staff from the *Imagine* genomic, bioinformatics and cytometry core facilities and the Salpétrière CyPS cytometry facility for advice and technical assistance. Lastly, the authors thank the attending physicians for their support and for coordinating the patients' clinical care and sample collection. The graphical abstract was created with BioRender.com.

The study was funded by the INSERM, the French government (managed by the French National Research Agency) (Agence Nationale de la Recherche) through the "Investissements d'avenir" program (Institut Hospitalo-Universitaire Imagine, grant reference: ANR-10-IAHU-01; Recherche Hospitalo-Universitaire, grant reference: ANR-18-RHUS-0010), and other grants from the Agence National de la Recherche (ANR-18-CE17-0001 "Action," ANR-18-CE15-0017), the Fondation pour la Recherche Médicale (grant reference: Equipe FRM EQU202103012670). The authors acknowledge the Centre de Référence Déficits Immunitaires Héréditaires, and the Centre de Référence des Cytopénies Auto-Immunes de l'Enfant (CEREVANCE), which allowed patient enrollment through the OBS'CEREVANCE and ACTION cohorts. This work was also supported by several grants. C. Boussard was a recipient of an INSERM "poste d'accueil" program and was awarded the prize of the Société Française de Pédiatrie. L.D. received a grant from the Imagine Thesis Award program. Q.R. received an Institut Imagine MD-PhD fellowship (funded by the Fondation Bettencourt Schueller) and a Société Nationale Française de Médecine Interne fellowship.

Authorship

Contribution: C. Boussard, L.D., T.G., A.F., A.K., F.A., F.E.S., I.C, and F.R.-L. conceptualized the study; I.C. and P.V. developed the methodology; C. Boussard, L.D., T.G., A.K., M.B., C. Brunaud, B.D, M.M.-N., J.S., C.R., J.-C.B., P.P., M.-C.S., O.P., A.M., V.P., P.V., S.D., A.V., M.Z., C.M., and M.R. performed investigations; L.D, N.G., I.C., Q.R. and C.M. were responsible for data curation; C. Boussard, L.D., I.C., T.G., P.P., and Q.R. performed formal analysis; C. Boussard, L.D., T.G, F.E.S., I.C., A.K., F.A., and F.R.-L. wrote the original manuscript draft; I.C., Q.R., N.A., P.D.A., M. Castelle, P.P., N.C.-B., F.C.-H., S.F., P.D., L.L., D.M., P.R., A.W.-M., M.R., B.N., J.-C.B., A.M., A.K., F.A., M.B., M.-C.S., C. Boussard, L.D., and F.R.-L. wrote, reviewed, and edited the manuscript; I.C., L.D., C. Boussard, Q.R., N.G., T.G., P.P., F.A., A.K., M.M.-N, B.D., J.-C.B., and T.G. were responsible for data visualization; C.L., N.A., P.D.A., B.B.-M., S.B.J., A.B., J.B., E.B., D.B., C. Bodemer, M. Chbihi, M.J., N.C.-B., F.C.-H., A.D., S.F., P.D., M.H., J.L.-P., L.L., P.R., F.R., M.T., A.W.-M., M.R., C.P., and B.N. provided resources; M.M., F.E.S., A.K., F.A., and F.R.-L. supervised the study; F.E.S. and F.R.-L. acquired funding for the study; and all authors reviewed the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: L.D. is a former employee of Sanofi, France, and may hold shares and/or stock options in the company. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: L.D., 0000-0002-5235-9985; A.K., 0000-0002-4064-8114; M.B., 0000-0002-2383-840X; M.-C.S., 0000-0001-8026-0360; P.P., 0000-0003-0647-0030; Q.R., 0000-0003-3323-0235; J.S., 0000-0003-3282-2976; O.P., 0000-0003-0027-4610; A.M., 0000-0001-7365-699X; P.V., 0000-0002-6475-494X; A.V., 0000-0003-3344-4911; C.M., 0000-0001-7870-7821; N.A., 0000-0003-0231-4460; M. Castelle, 0000-0001-9087-4411; F.C.-H., 0000-0003-4615-3953; M. Chbihi, 0000-0002-2771-851X; P.D., 0000-0003-0273-0050; D.M., 0000-0001-6719-3693; A.B., 0000-0003-4902-5332; N.C.-B., 0000-0003-0665-1245; M.R., 0000-0002-6212-8742; C.P., 0000-0001-8788-5056; M.M., 0000-0002-6838-2389; F.E.S., 0000-0001-5865-4929; F.A., 0000-0001-6603-2687; F.R.-L., 0000-0001-7858-7866.

Correspondence: Frédéric Rieux-Laucat, Institut Imagine, 24 Blvd du Montparnasse, 75015 Paris, France; email: frederic.rieux-laucat@inserm.fr.

Footnotes

Submitted 11 October 2022; accepted 19 March 2023; prepublished online on *Blood* First Edition 23 March 2023. https://doi.org/10.1182/blood.2022018486.

*C. Boussard and L.D. contributed equally to this study.

†T.G., A.K., and M.B. contributed equally to this study.

‡M.M., F.E.S., F.A., and F.R.-L. are joint senior authors.

Data are available on request from the corresponding author, Frédéric Rieux-Laucat (frederic.rieux-laucat@inserm.fr).

The online version of this article contains a data supplement.

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

REFERENCES

1. Kamnev A, Lacouture C, Fusaro M, Dupré L. Molecular tuning of actin dynamics in leukocyte migration as revealed by immune-related actinopathies. *Front Immunol*. 2021;12:750537.
2. Mastrogiovanni M, Juzans M, Alcover A, Di Bartolo V. Coordinating cytoskeleton and molecular traffic in T cell migration, activation, and effector functions. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:591348.
3. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(8):496-510.
4. El Masri R, Delon J. RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):499-513.
5. Lougaris V, Baronio M, Gazzurelli L, Benvenuto A, Plebani A. RAC2 and primary human immune deficiencies. *J Leukoc Biol*. 2020;108(2):687-696.
6. Su HC, Orange JS. The growing spectrum of human diseases caused by inherited CDC42 mutations. *J Clin Immunol*. 2020;40(4):551-553.
7. Chen Y, Chen Y, Yin W, et al. The regulation of DOCK family proteins on T and B cells. *J Leukoc Biol*. 2021;109(2):383-394.
8. Dobbs K, Domínguez Conde C, Zhang S-Y, et al. Inherited DOCK2 deficiency in patients with early-onset invasive infections. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2409-2422.

9. Engelhardt KR, Gertz ME, Keles S, et al. The extended clinical phenotype of 64 patients with DOCK8 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):402-412.

10. Kunimura K, Uruno T, Fukui Y. DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms. *Int Immunol*. 2020;32(1):5-15.

11. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*. 2021; 596(7873):590-596.

12. Linge P, Fortin PR, Lood C, Bengtsson AA, Boilard E. The non-haemostatic role of platelets in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(4):195-213.

13. Aslan JE, McCarty OJT. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(1):35-46.

14. Lin Q, Yang W, Baird D, Feng Q, Cerione RA. Identification of a DOCK180-related guanine nucleotide exchange factor that is capable of mediating a positive feedback activation of Cdc42. *J Biol Chem*. 2006;281(46): 35253-35262.

15. Goggs R, Williams CM, Mellor H, Poole AW. Platelet Rho GTPases-a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem J*. 2015;466(3):431-442.

16. Gajardo T, Lô M, Bernard M, et al. Actin dynamics regulation by TTC7A/PI4KIIIα axis limits DNA damage and cell death during leukocyte migration. *bioRxiv*. Preprint posted online 14 October 2021. https://doi.org/10.1101/2021.10.14.464382

17. Mack NA, Georgiou M. The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity. *Small GTPases*. 2014;5(2):10.

18. Park JH, Lee KH, Jeon B, et al. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome: a systematic review. *Autoimmun Rev*. 2020; 19(6):102526.

19. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2007;178(1):280-290.

20. Pleines I, Eckly A, Elvers M, et al. Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood*. 2010;115(16):3364-3373.

21. Pula G, Poole AW. Critical roles for the actin cytoskeleton and cdc42 in regulating platelet integrin alpha2beta1. *Platelets*. 2008;19(3): 199-210.

22. Nelson VS, Jolink A-TC, Amini SN, et al. Platelets in ITP: victims in charge of their own fate? *Cells*. 2021;10(11):3235.

23. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(9): 534-542.

24. Dupré L, Boztug K, Pfajfer L. Actin dynamics at the T cell synapse as revealed by immune-related actinopathies. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:1046.

25. Gadea G, Blangy A. Dock-family exchange factors in cell migration and disease. *Eur J Cell Biol*. 2014;93(10-12):466-477.

26. Tangye SG, Pillay B, Randall KL, et al. Dedicator of cytokinesis 8-deficient CD4+ T cells are biased to a TH2 effector fate at the expense of TH1 and TH17 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):933-949.

27. Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunol Rev*. 2013; 256(1):282-299.

28. Papa R, Penco F, Volpi S, Gattorno M. Actin remodeling defects leading to autoinflammation and immune dysregulation. *Front Immunol*. 2020;11:604206.

29. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;36: 103-112.

30. Sakabe I, Asai A, Iijima J, Maruyama M. Age-related guanine nucleotide exchange factor, mouse Zizimin2, induces filopodia in bone marrow-derived dendritic cells. *Immun Ageing*. 2012;9:2.

31. Ma K, Du W, Wang X, et al. Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(23):E6021.

32. Matsuda T, Yanase S, Takaoka A, Maruyama M. The immunosenescence-related gene Zizimin2 is associated with early bone marrow B cell development and marginal zone B cell formation. *Immun Ageing*. 2015;12:1.

33. Tesch VK, Abolhassani H, Shadur B, et al. Long-term outcome of LRBA deficiency in 76 patients after various treatment modalities as evaluated by the immune deficiency and dysregulation activity (IDDA) score. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(5): 1452-1463.

34. Gámez-Díaz L, Neumann J, Jäger F, et al. Immunological phenotype of the murine Lrba knockout. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(9): 789-802.

35. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3+ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity*. 2019;50(2):302-316.

36. Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science*. 2015;350(6258):334-339.

37. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol*. 2016;17(11): 1322-1333.

38. Kanai T, Jenks J, Nadeau KC. The STAT5b pathway defect and autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:234.

39. Su HC. Insights into the pathogenesis of allergic disease from dedicator of cytokinesis 8 deficiency. *Curr Opin Immunol*. 2023;80: 102277.

40. Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, et al. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. 2012;119(19): 4451-4461.

41. Keles S, Charbonnier LM, Kabaleeswaran V, et al. DOCK8 regulates STAT3 activation and promotes Th17 cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5): 1384-1394.e2.

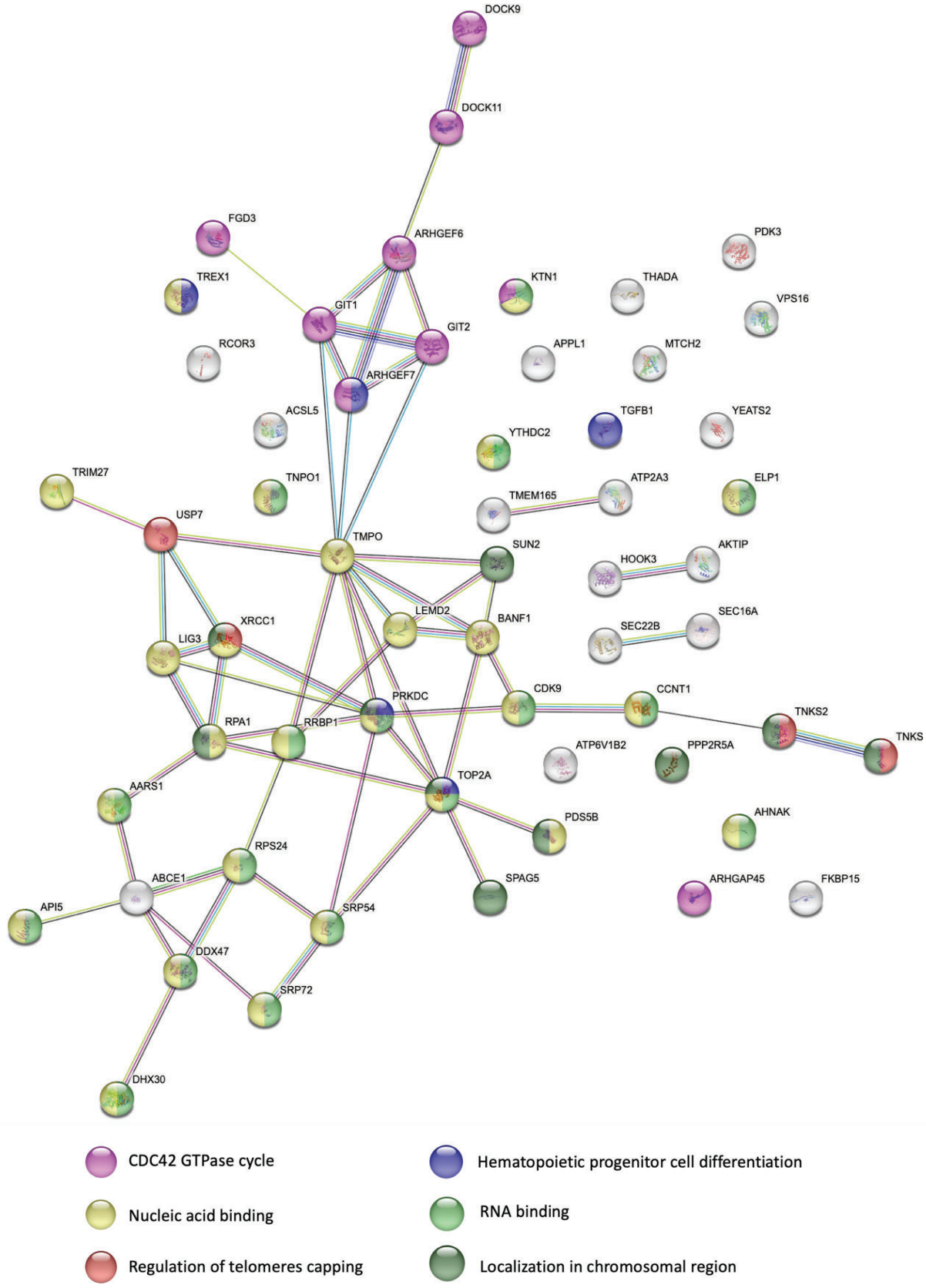
42. Janssen E, Morbach H, Ullas S, et al. Dedicator of cytokinesis 8-deficient patients have a breakdown in peripheral B-cell tolerance and defective regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(6): 1365-1374.

43. Janssen E, Kumari S, Tohme M, et al. DOCK8 enforces immunological tolerance by promoting IL-2 signaling and immune synapse formation in Tregs. *JCI Insight*. 2017; 2(19):e94298.

44. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010;28(12): 1248-1250.

45. Ide M, Tabata N, Yonemura Y, et al. Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication. *J Biol Chem*. 2022;298(7): 102097.

© 2023 by The American Society of Hematology



Interactome de DOCK11 dans les lymphocytes T primaires de contrôles (n=3)

INHERITED DOCK9 MUTATIONS LEAD TO SEVERE EARLY-ONSET AUTO-IMMUNE LIPODYSTROPHY, VITILIGO AND ALOPECIA *AERATA*

Après la publication du déficit en DOCK11, nous nous sommes intéressés à une patiente atteinte d'une auto-immunité cutanéo-graisseuse sévère et chez laquelle nous avons identifiée deux variants hétérozygotes composites de *DOCK9.*
La patiente présente une atrophie auto-immune des cellules graisseuses ou lipodystrophie auto-immune associée à un vitiligo et une pelade depuis l'enfance. Une cause monogénique est suspectée chez cette patiente devant l'apparition très précoce de la maladie et sa sévérité. Les causes de lipodystrophies sont classées en deux groupes : congénitales et auto-immunes. A notre connaissance, aucune cause génétique de lipodystrophie d'origine auto-immune n'a été identifiée à ce jour.

DOCK9 est une protéine très peu décrite dans la littérature. Nous avons pour le moment débuté les explorations dans les cellules de la patiente afin de mettre en évidence un défaut fonctionnel de DOCK9. Nous avons également poursuivi les collaborations déjà établies pour le projet DOCK11 et utilisé les outils développés dans les cellules de la patiente DOCK9 et les cellules déficientes en DOCK9.
Nous suspectons un déficit en DOCK9 chez la patiente. Cependant, nous avons rencontré des difficultés pour générer des cellules T primaires KO DOCK9 à partir de donneurs sains ce qui limite pour le moment l'interprétation des résultats obtenus dans les cellules de la patiente.
En parallèle, nous avons également généré un modèle murin dépourvu de DOCK9 en partenariat avec Claire Soudais dans l'équipe de Sylvain Latour à Imagine. Ce modèle murin a pour objectif d'étudier le rôle de DOCK9 dans le système immunitaire, les cellules graisseuses et les cellules cutanés.
J'ai conceptualisé la quasi-totalité du projet et j'ai co-encadré trois étudiants qui ont participé aux explorations. J'ai reçu le soutien technique de Marie-Claude Stolzenberg, ingénieure du laboratoire d'accueil depuis le début du projet.
Nous avons également établi de nouvelles collaborations pour l'étude du tissu adipeux et recruté en janvier 2025, Camille Lefèvre, qui est une post-doctorante spécialisée en métabolisme. Camille Lefèvre étudie le modèle murin sur le plan métabolique et immunologique.
Par ailleurs, nous avons constitué une cohorte de patients atteints de lipodystrophie auto-immune en partenariat avec le centre de référence nationale des lipodystrophies situé à l'hôpital Saint-Antoine. Nous espérons identifier d'autres patients avec des variants DOCK9 ou des variants dans des protéines partenaires de DOCK9.
Les résultats sont pour l'instant très préliminaires. Nous avons présenté les résultats sous forme d'article pour montrer les différentes explorations réalisées et les réflexions scientifiques autour de ce projet. Nous devons reproduire les résultats pour pouvoir confirmer ou infirmer nos hypothèses avant de soumettre un article pour publication.

Inherited DOCK9 mutations lead to severe early-onset auto-immune lipodystrophy, vitiligo and alopecia *aerata*

Charlotte Boussard[1*], Marie-Claude Stolzenberg[1*], Orianne Debeaupuis[1], Martine Auclair[6,7,8], Olivier Pelle[1], Camille Brunaud[1], Louise Gioja [1], Lucie Longe[2] , Peter Chen[1], Alicia Verhelle[1], Isabelle Callebault[15], Patricia Panikulam[14] , Linda Diedhou[14], Fernando Sepulveda[14], Christelle Le noir[2], Phillipe Drabent[13], Sylvie Fraitag[13] , Quentin Riller[1], Laure Delage[1], Maxime Batignes[12] , Faris Zeco[1], Béatrice Durel[11], Emmanuelle Bourrat[10] ,Alain Fischer[4,5] , Bader Meunier Brigitte[1,3], Bénédicte Neven[1,3], Vincent Jachiet[9] , Claire Soudais[2] , Frédéric Adam[8], , Camille Vatier[6,7,8], Corinne Vigouroux[6,7,8] , Camille Lefevre[1], Frédéric Rieux-Laucat[1]
*Dr Charlotte Boussard and Dr Stolzenberg contributed equally to this work

Affiliations:
1.Université Paris Cité, Institut Imagine, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163; F-75015 Paris, France.
2. Université Paris Cité, Laboratory of Lymphocyte Activation and Susceptibility to EBV infection, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France
3. Pediatric Immunology, Hematology and Rheumatology Department, Hôpital Necker Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP); F-75015 Paris, France.
4. Université Paris Cité, Imagine Institute, INSERM UMR 1163 ; F-75015 Paris, France
5.Department of Pediatric Immuno-Haematology and Rheumatology, Reference Center for Rheumatic, AutoImmune and Systemic Diseases in Children (RAISE), Hôpital Necker Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP); F-75015 Paris, France.
6.Sorbonne Universite, Inserm UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut Hospitalo-Universitaire de Cardio-metabolisme et Nutrition (ICAN), Paris, France; 7.Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hopital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Genetique Moleculaires, Paris, France ; Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hopital Saint-Antoine, Centre National de Reference des Pathologies Rares de l'Insulino-Secretion et de l'Insulino-Sensibilite (PRISIS), Service d'Endocrinologie, Diabetologie et Endocrinologie de la Reproduction, Paris, France
8. INSERM, UMR_S1176, Université Paris-Saclay, F- 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
9.Service de médecine interne, AP-HP, hôpital Saint-Antoine, Sorbonne université, 184, rue du faubourg, 75012 Paris, France.
10. Department of Dermatology Pathology, Hôpital Robert-Debré, Hôpital Universitaire Robert Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.
11. Cell Imaging Platform, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24, CNRS 42 UMS3633, F-75015 Paris, France.
12. Université Paris Cité, Institut Imagine, Laboratory of Inflammatory Responses and 33 Transcriptomic Networks in Diseases, Atip-Avenir Team, INSERM UMR 1163; F-75015 34 Paris, France.
13. Department of Anatomopathology, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hôpital Necker103 Enfants Malades, F-75015, Paris, France.
14. Université Paris Cité, Institut Imagine, Laboratory of Molecular Basis of Altered Immune 28 Homeostasis, INSERM UMR 1163; F-75015 Paris, France.
15. Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, F-75005 Paris, France

Introduction:

The cytoskeleton is a highly conserved complex network composed of three main structures: actin, microtubules, and intermediate filaments[396]. Mutations in the *LMNA* gene, encoding the nuclear protein Lamine A/C which belongs to intermediate filament family, cause a broad range of clinical syndromes that show tissue-restricted abnormalities[78]. These mutations are responsible for the most frequent genetic form of congenital generalized lipodystrophy, an extremely rare disease characterized by loss of body fat affecting almost all parts of the body. Recently, auto-antibodies against adipocytes were identified in patients with acquired lipodystrophy and immune dysregulation suggesting auto-immune fat loss[397].

Immune cell functionality is highly dependent on the actin cytoskeleton[398]. Immune-related actinopathies are inborn errors of immunity owing to gene defects affecting actin cytoskeleton remodeling with more than 30 entities discovered to date[95].
Cytoskeleton remodeling is a dynamic and tightly regulated process crucial for cell shape, motility, cell adhesion, cell protrusions and many other main cellular functions. Germline mutations in genes encoding cytoskeleton proteins can disrupt the integrity of cytoskeleton, leading sometimes to severe disease.

RHO-GTPases (Ras Homologue guanosine triphosphate hydrolases) such as RAC, CDC42, and RHO, are key players in the intracellular actin reorganization[120]. RHO-GTPases are activated by guanine exchange factors (GEFs), such as dedicator of cytokinesis (DOCK) family members like DOCK2, DOCK8 and DOCK11[246]. DOCK2 deficiency results in early-onset invasive infections and T cell lymphopenia[279]. DOCK8 deficiency also results in severe infections, as well as eczema and severe environmental allergies[330]. We recently described 8 patients with early-onset autoimmunity, including autoimmune cytopenia, skin inflammation and enteropathy due to X-linked loss-of-function mutations in *DOCK11*[399]. Since then, other patients have been identified with severe pediatric systemic inflammation and anemia associated with DOCK11 deficiency[400]. DOCK11 and DOCK9 are members of the DOCK-D subfamily, widely expressed in the immune system, and both GEF of CDC42. A role of DOCK9 in human immune disease has been long suspected but never described so far. Here we have identified heterozygous compound mutations of *DOCK9* in a patient with infancy onset severe autoimmune generalized lipodystrophy, vitiligo and alopecia and performed a knockout (KO) *Dock9* mouse model.

Materials and methods:

Before the study, the patient signed informed consent approved by the CERAPH211 Centre (IRB: #00011928). The biological samples are part of Inserm UMR1163/Imagine collection declared to the French Ministère de la recherche (CODECOH n° DC-2020-3994).

Exome sequencing:
As previously described, Exome libraries were performed with the Twist Bioscience kits (Twist Human RefSeq Exome Kit, 36 Mb). Briefly, genomic DNA (from 500 ng to 100 ng) was sheared with an Ultrasonicator (Covaris). A total amount of 50ng of the fragmented and purified double strand DNA was used to prepare Twist Exome libraries as recommended by the manufacturer, but with no initial enzymatic shearing 4 109 and using adaptators with Unique Molecular Identifier barcodes (IDT). Barcoded exome libraries were pooled and sequenced with the NovaSeq 6000 system (Illumina) generating paired end reads (100 bases + 100 bases). [About ~40 millions of clusters per exome library was produced] After demultiplexing, sequences were aligned to the reference human genome hg19 using the Burrows Wheeler Aligner. The mean depth of coverage per sample was approximately 156.2. Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard, following documented best practices. (http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices). The annotation process was based on the latest release of the Gencode database, Gnomad, Clinvar, CADD. Variants were annotated and filtered using the Polyweb software interface designed by the Bioinformatics platform of University Paris Cité.

DNA extraction and sanger sequencing:
DNA was extracted from T cells by using QIamp DNA blood (Qiagen, Courtaboeuf, France). Sanger sequencing was performed to confirm the next-generation sequencing results and to analyze each mutation's familial segregation. Purified PCR products were directly sequenced using BigDye Terminators (version 1.1) and a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Mass cytometry

Antibodies coupling
Anti-FAS (#555670, BD Biosciences) antibody was coupled to 116Cd using the kit # 201116A (Fluidigm) according to manufacturer protocol.

Samples staining
Immune phenotyping on whole blood was carried out using the Maxpar Direct Immune Profiling kit 216 (Fluidigm, Cat# 201325) with an antibody panel of 30 markers for CyTOF (Cytometry by Time Of Flight) analysis. To these 30 markers, 8 additional antibodies were added to detect FAS and certain immune checkpoints (TIM3, TIGIT, ICOS, GITR, PD-1). 300 µL of heparinized whole blood were used per labeling. The cells were incubated for 20 min at

room temperature (RT) with 3µL of heparin (Sigma Aldrich, Cat# H3149-10KU) at 10,000 U/mL and 5µL of Human TruStain FcX (Biolegend, Cat# 422302), then incubated for 30 min at RT with the antibody cocktail for extracellular labeling (except CTLA-4 for which intracellular labeling was necessary). Blood lysis was perfomed using Cell Cal-lyse buffer (Thermofisher, GAS-010S100) according to manufacturer instructions. Finally, cells were incubated in the Fix&Perm buffer (Fluidigm, Cat# 201325) with the Iridium intercalator at 1:1000 dilution (Fluidigm, Cat# 201325) overnight at 4°C. Cell solutions were frozen at -80°C prior to acquisition.

Acquisition

As previously described, acquisitions were performed on Helios mass cytometer[401]. For acquisition, cells were washed and resuspended at a concentration of 1.106/mL in Maxpar Cell Acquisition Solution, a high ion concentration solution, and mixed with 10% EQ beads (allowing for calibration automatic device) immediately before the acquisition. The acquisition of the events was carried out on the Helios mass cytometer (Fluidigm) coupled with the CyTOF software version 6.7.1014 (Fluidigm) at the Pitié-792 Salpetrière Cytometry Platform (CyPS). The acquired data were normalized using the Fluidigm normalization algorithm. Cells were selected by cell selection (Ir191+Ir193+), cell doublets were removed (Time/offset, Time/width, Time/Centre, and Time/residual) and dead cells were removed (Ir193+Rh103+). This selection is done automatically with the Pathsetter software.

Data analysis

FCS files containing viable singlet cells were uploaded in R version 4.0.3 using the flowCore package. All files were concatenated in a Single Cell Experiment (SCE) with the SingleCellExperiment package. After quality control (number of cells per sample, expression pattern of all markers across samples), all cells were submitted to clustering using the cluster function (FlowSOM and ConsensusMetaClustering) following recommendation from the CATALYST packages [402]. For clustering, k parameter was set to 60 to detect small immune populations. Clusters were then identified based on their expression of type markers according to previous knowledge of immune cell phenotype and following manufacturer instruction from Fluidigm Maxpar Immune Profiling. Clusters expressing the same type markers were merged into one single immune cell population. Proportion of clusters among all intact viable cells were then defined using appropriate function from CATALYST and compared between groups using Mann-Whitney test in R. To go further in the detail of memory CD4 T cells they were submitted to subclustering using CXCR3, CXCR5, CCR6 and CCR4 as type markers defining Th1-like, Th2-like, Th17-like and Tfh-like cells. Median expression intensity of markers of interest was assessed using the plotPbExprs from CATALYST package. Dimension reduction in UMAPs was performed using runDR function from CATALYST with neighbors set to 15 and minimum distance to 0.4. Marker intensity visualization on UMAPs was performed upon data normalization between 0 and 1. All other visualization was performed using in-house and ggplot2 functions.

Cytokines dosages in patients' plasma

Cytokines concentrations have been measured with the Olink Target 96 Inflammation (Olink) according to the manufacturer instructions. The results have been analyzed on GraphPad Prism v.9.2.0 software

Preparation of washed platelets

Venous blood from healthy donors or patients was collected in 10% ACD/A buffer (75 mM sodium citrate, 44 mM citric acid, 136 mM dextrose, pH 4.5). Briefly, platelets were washed as previously described [403] in the presence of apyrase (100 mU/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and prostaglandin E1 (1 µM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to minimize platelet activation, before to be resuspended in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM NaH2PO4, 1 mM MgCl2, 5.5 mM glucose, 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid, 12 mM NaHCO3 and 2 mM CaCl2, pH 7.3).

Western blotting for platelet expression of DOCK9

Washed platelets (3×10^8 /mL) were lysed in Laemmli sample buffer (10 mM HEPES, 2% SDS, 10% glycerol and 5 mM EDTA). The proteins were reduced by incubation with 25 mM dithiothreitol (DTT) then separated by electrophoresis using NuPageTM 4-12% Bis-Tris Protein gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane, which were incubated with the primary antibodies rabbit anti-DOCK9 (dilution 1/750) (#ab204421, Abcam) and mouse anti-β-actin (dilution 1/10000) (R&D Systems), used as loading control for normalization. Immunoreactive bands were visualized with enhanced chemiluminescence detection reagents (Enhanced chemiluminescence detection reagents ECL, Perbio Science, ThermoFisher Scientific) using a G: BOX Chemi XT16 Image System and then quantified using Gene Tools version 4.03.05.0 (Syngene, Cambridge, UK)

CDC42 activity

CDC42 activity was evaluated by CDC42 G-LISA kit (#BK127, Cytoskeleton) according to supplier instruction. Briefly, washed platelets (10^8) were activated with 500 mU/mL thrombin (bovine thrombin, Sigma-Aldrich) for 60 seconds, then lysed using lysis buffer provided in the G-LISA kit, supplemented with inhibitor cocktail. Platelet lysates were then immediately immerged in nitrogen bath and store at -80°C until analysis.

Immunofluorescence analysis for platelet spreading

Glass coverslips were coated with 100 µ g/mL human fibrinogen (HYPHEN BioMed SAS Andresy, France) or with 50ng/mL anti-CD44 (#103046, BioLegend) in PBS at 4°C overnight. Washed platelets ($3x10^6$ platelets) were plated for 30 minutes at 37°C to fibrinogen-coated glass coverslips in presence of apyrase (5 U/mL) and indomethacin (4.5 µM) or to anti-CD44 coating. After washing, platelets were fixed for 15 minutes with 4%paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, blocked with 1% BSA, and platelet morphology was detected by labeling cytoskeletal F-actin using Alexa Fluor 488-phalloidin (0.3 µM, Invitrogen).

Finally, the coverslips were mounted to slides and immunofluorescence images were acquired on an epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse 600). Recorded images were analyzed using the ImageJ software.

Activated T cells generation and expansion:
Expansion of T cell blasts was obtained by incubating PBMCs for 72 h with anti CD3/CD28 beads in complete Panserin 401 medium. After 72h, T-cell blasts were expanded in complete Panserin supplemented with IL-2 (100 IU/ml) and cultured in complete Panserin medium and IL-2 (100 IU/ml) adding every 48h.

Immunoblotting T cells
Proteins were extracted from T blast of patient. Cells were washed with cold 1X PBS and lysed in RIPA lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (ThermoFisher Scientific). The extracted proteins were quantified using a Pierce BCA assay kit (ThermoFisher Scientific). After quantification, extracted proteins were denaturated and reduced at 95°C for 5 minutes using NuPAGE LDS sample Buffer 4X and NuPAGE reducing agent 10X (ThermoFisher 421 Scientific). Denaturated proteins were separated on 3 to 8% TRIS-acetate gels (Invitrogen) and transferred onto PVDF membranes. Blocking was performed in TBS tween 0,01% and BSA 5% for 2h at RT. The membranes were incubated overnight with monoclonal rabbit anti-DOCK9 antibodies dilution 1/750 (#ab204421, Abcam,) or mouse Ku 70 (clone N3H10, sigma aldrich) dilution 1/10000 antibodies (Sigma-Aldrich) primary antibodies. Secondary antibodies (anti-rabbit dilution 1/10000 and anti- mouse 1/10000 in TBS tween 0,01% + BSA 5%) (sigma Aldrich) after washing were incubated during 1 hour in room temperature. Blots were revealed with chemiluminescence using species-specific HRP-linked secondary antibodies.

Patient cells for migration assays
For migration assays PBMC from patients and healthy donor were activated with 5µg/ml of phytohemagglutinin (PHA, Sigma) and 100 Units/ml of IL-2 for 3 days and cultured in Panserin supplemented with 5% Serum AB and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Thermofisher). Activated T cells were used between days 8-14 post activation, stained with Hoechst 33342 and resuspended at $20x10^6$ cell/ml to load into the devices.

Cell migration assays
Microdevices were prepared as previously described[404]. Briefly, devices were fabricated using PDMS and custom-made molds, coated with 10ug/ml fibronectin from bovine plasma (Sigma) for 1h. Migration was recorded using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope, with a time-lapse of 2 min using a 10X (N.A. 0.45) dry objective. The image analysis was done using ImageJ (NIH). Kymographs for each channel were generated using a semi-automatic macro and single cell trajectories were manually isolated. Trajectories were then analyzed with a custom-made Matlab (Mathworks) code to determine the cell speed.

Membrane expression of cytokines receptors and CD44

Activated T cells were washed with cold PBS. Viability dye (ThermoFisher, # 65-0863-18) was used to stain the dead cells according to manufacturer instructions. Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD3-AF700; CD4 149 BV510; CD8a BV711, CD218a PE-Cy7 IL-18Rα (#313811, BioLegend), CD127 FITC IL-7Rα (#351312, BioLegend)., CD44 Pacific Blue (#338823, BioLegend). Intracellular staining was performed 1h on ice using antibodies anti-IL-15Rα (#330209, BioLegend) after cell permeabilization and fixation with the kit Perfix EXPOSE (Beckman Coulter #B26976), according to manufacturer instructions. Cells were resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer

pSTAT5 assays

Activated T cells were washed with cold PBS and then stimulated by IL7 or IL15 100ng/ml for 15 min and 120 min.

In cytometry

Viability dye (ThermoFisher, # 65-0863-18) was used to stain the dead cells according to manufacturer instructions. Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD3-AF700; CD4 149 BV510; CD8a BV711. Cells were permeabilized and fixed with the kit Perfix EXPOSE (Beckman Coulter #B26976), according to manufacturer instructions. Intracellular staining was performed 1h on ice using antibodies anti-pSTAT5 BV421 (pY694, BD #562984). Cells were resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer.

In western blot:

After stimulation, Proteins were extracted from T blast of patient. Cells were washed with cold 1X PBS and lysed in RIPA lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (ThermoFisher Scientific). The extracted proteins were quantified using a Pierce BCA assay kit (ThermoFisher Scientific). After quantification, extracted proteins were denaturated and reduced at 95°C for 5 minutes using NuPAGE LDS sample Buffer 4X and NuPAGE reducing agent 10X (ThermoFisher 421 Scientific). Denaturated proteins were separated on 3 to 8% TRIS-acetate gels (Invitrogen) and transferred onto PVDF membranes. Blocking was performed in TBS tween 0,01% and BSA 5% for 2h at RT. The membranes were incubated overnight with monoclonal rabbit anti-pSTAT5(Tyr964) antibodies dilution 1/1000 (#9359, Ozyme, anti-STAT5 antibodies dilution 1/1000 (#94205, clone D206Y, Ozyme or rabbit GAPDH (#5174, clone D16H11, sigma aldrich) dilution 1/10000 antibodies (Sigma-Aldrich) primary antibodies. Secondary antibodies (anti-rabbit dilution 1/10000 and anti- mouse 1/10000 in TBS tween 0,01% + BSA 5%) (sigma Aldrich) after washing were incubated during 1 hour in room temperature. Blots were revealed with chemiluminescence using species-specific HRP-linked secondary antibodies.

CRISPR/Cas9 genome editing

Primary activated T cells were knocked out for *DOCK9* gene using CRISPR/Cas9 genome editing protocol. CRISPR RNAs (crRNAs) were designed using either Crispor tefor internet tool or IDT design tool. We selected two crRNA targeting *DOCK9* exon 8 (3'-CTCTTCGAACTCCCGCTCGA-5'), exon 9 (3'-CCACTCTATGAGGATAGTCA-5') Equivalent volumes of crRNA (100 µM) and TracrRNA (100 µM) (IDT) were mixed and annealed for 5 min at 95°C and cooled to RT (15–25°C) on the bench top to obtain two different single guide RNA (sgRNA) at 50 µM final concentration. RNP complex was then prepared by mixing 1 µl of each sgRNA with 2 µM of 62 µM Cas9 enzyme (IDT) and incubating at RT for 20 min. Activated T cells were prepared for electroporation according to P3 Primary Cell 4D-Nucleofector Kit recommendation. Briefly, 1 million cells per condition were washed once in PBS buffer and pellet was resuspended in appropriate buffer. 5 µl of RNP complex and 1.5 µl of electroporation enhancer solution (IDT) were added to the cells. The mixture was transferred to a nucleofector cuvette for electroporation using 4D-Nucleofector Core Unit (Lonza).75 µl of warm medium was added to the cuvette and cells were transferred in 12-well plates and amplified with IL2 10^3UI/ml. The DOCK9 KO efficiency was determined by quantitative western blot and confirmed by Sanger sequencing (Genewiz).

Mouse model:

Generation of mouse model

All animal procedures were conducted in accordance with institutional and European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the ethics committee. C57BL/6J mice were maintained under specific-pathogen-free conditions in solid-bottom cages with a 12 h light/dark cycle and fed a chow diet and water ad libitum. Enrichment was ensured through the furniture of nesting material and shelter**.**

Using the CRISPOR website, we designed two guide oligonucleotides targeting intronic regions flanking exon 4 of *Dock9* 3'- GCTGAACTTTTATGTCTCTAGGG-5' and 3'-TTGTCTGCTGGCCGTGTGGGAGG -5', enabling a deletion encompassing exon 4. Notably, exon 4 is shared among most predicted *Dock9* transcripts**.** Briefly, guides and CRISPR ribonucleoprotein (RNP) complexes were directly delivered into zygote pronuclei by electroporation**.** F0 founders were genotyped, and the presence of the deletion was confirmed by PCR and sequencing. Founders were then backcrossed with C57BL/6J mice to eliminate potential off-target effects and segregate the mutated allele. Heterozygous breeding is maintained to generate both heterozygous ($Dock9^{+/-}$) and homozygous ($Dock9^{-/-}$) animals for experimental use.

Genotyping

Genotyping was performed on deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from ear biopsies using extraction buffer (E7526; Sigma-Aldrich). The DNA extracted was amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR products were then separated by 1.5% agarose, tris acetate EDTA,

gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide (Invitrogen) with UV using E-BOX (Vilber).

Body weight and fat mass measure

Each week, mice were weighed to monitor their body weight changes. To go further, lean and fat mass were measured using a Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) scanner. Mice were anesthetized with ketamine (140 mg/kg, 25 µL/10g) and xylazine (10 mg/kg, 25 µL/10g) administered by intraperitoneal injection during the measurement.
Subcutaneous (SAT) were collected and stored at -80°C.

RNA extraction and Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

Ribonucleic acid (RNA) was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen) from fibroblasts that had been differentiated into adipocytes or not, following the provider instructions. The RNA concentration was determined using NanoDrop Microvolume Spectrophotometer.
The reverse transcription was performed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) including a gDNA wipeout step.

RT-qPCR was performed using SYBER green (Applied Biosystems). Samples were run in duplicate. Gene expression levels were calculated using the Rotor-Gene Q series software and normalized using the ribosomal protein L6 (*Rpl6*) gene as the housekeeping gene.
The primers sequences are :

Gene	Forward sequence (5' → 3')	Reverse sequence (5' → 3')
Rpl6	CTTGTGACTGGGCCTCTTGT	GCGTCAGTCAGGTGTTTGG
Atgl	ACAGCTCCACCAACATCCAC	AGCCCTGTTTGCACATCTCT
Hsl	GCTAGCCAGGCTCATCTCCT	GTTCTTGAGGTAGGGCTCGT
Ppary	CTGCTCAAGTATGGTGTCCATGA	TGAGATGAGGACTCCATCTTTATTCA
Il6	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	TTGCCATTGCACAACTCTTTTC
Tnf	TCGAGTGACAAGCCTGTAGCC	TTGAGATCCATGCCGTTGG
Fasn	CAGGCCCCTCTGTTAATTGG	TCCAGGGATAACAGCACCTT
Leptine	AGAAGATCCCAGGGAGGAAA	ATACCGACTGCGTGTGTGAA
Glut4	CTGTGCCATCTTGATGACCG	CTCTGCCACAATGAACCAGG

Cell culture and adipocytes differentiation

Primary dermal fibroblasts were isolated from mouse skin biopsies and cultured in basal medium made of high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.
To induce differentiation into adipocytes, fibroblasts were maintained for 2 days at confluence in basal medium. Then, they were induced to differentiate with basal medium supplemented with 10 µg/ml human insulin (Actarapid, Novonordisk), 0.5 mM 3-isobuthyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma I5879), 0.5 µM dexamethasone (Sigma D1756), 2 nM Triiodo-L-Thyronine 3 (T3)

and 2 µM rosiglitazone (Sigma R2408). Two days later, medium was changed to basal medium supplemented with 10 µg/ml human insulin for 48 h. Then cells were maintained in basal medium for 10 days refreshed every 2 days.

Murine T cells

Spleen were harvested and crushed through a 70-µm filter (n=3 mouse). T cells were isolated with the EasySep Mouse Total T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies) following the manufacturer's instructions. Isolated T cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM l-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 ng/ml), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM Hepes, 1% nonessential amino acids, and 5 µM 2-mercaptoethanol (complete RPMI 1640) at 2.5×10^6 cells/ml. For activation, T cells were supplemented with anti-CD28 (2 µg/ml, 37.51; BioLegend); seeded in an F-bottom 96-well plate precoated with anti-CD3 (3 µg/ml, 145-2C11; BioLegend) using 5×10^5 cells (200 µl) per well; and incubated at 37°C, 5% CO_2. Two days after seeding, the cells were centrifuged at 300*g* for 5 min at 4°C and cultured in flasks at 10^6 cells/ml in complete RMPI 1640 with recombinant mouse interleukin-2 (IL-2) (rmIL-2, 20 ng/ml; BioLegend).

Viability dye EF80 was used to stain the dead cells according to manufacturer instructions. Blockage with True Fc staining was performed. Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD62L-FITC (#1122030, Sony); TCRaβ-BV510 (#1092234, Biolegend); B220-BV650(#563708), CD25-BV650(#102037, Biolegend), CD4-BV786(#563727, BD horizon), CD8-APC (#100712, Biolegend), CD44-PC7 (#103030, Biolegend). Cells were washed and then resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer.

Confocal microscopy

After washing and without prior permeabilization, the fixation of adipocytes was done with paraformaldehyde 4% for 20 minutes.

Cells were stained in PBS 2% BSA for 30 minutes at room temperature with 0,4 µM phalloidin AF647 (Thermo Fisher Scientific A30107) and 5 µg/mL DAPI (ThermoFisher Scientific D1306). To highlight lipid droplets in adipocytes, 1 µg/mL Bodipy 493/503 was added to the staining mix. Then, slides were mounted with Mowiol.

Images were acquired using a Nikon confocal microscope with 40x objective and analyzed with Fiji.

Immunoprecipitation

Anti-DOCK9 (#ab204421, Abcam) or normal rabbit IgG (#2729, cell signaling technology) antibodies were coupled to magnetic beads using the Pierce Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit (ThermoFisher, ref 88805) according to supplier's instructions. Briefly, beads were washed two times with 1X Modified Coupling Buffer. the antibody was bound to beads for 15 minutes. Then beads were washed three times with 1X Modified Coupling Buffer. The antibody was crosslinked to beads with DSS for 30 minutes. Beads were washed three times with Elution Buffer followed by two washes with IP Lysis/Wash Buffer. Cell lysate from controls' T blast (n=3)

or patient's fibroblast (n=1, 5 replicates) or control's fibroblast (n=1, 5 replicates) was incubated with the antibody-crosslinked beads for 1-2 hours at room temperature or overnight at 4°C. Beads were washed two times with IP Lysis/Wash Buffer and one time with ultrapure water. Bound antigen was eluted. Samples were reduced with β-mercaptoethanol (Biorad, ref #1610710) and analyzed either by immunoblotting or mass spectrometry.

Mass spectrometry analysis

DOCK9 immunoprecipitation fractions were separated by SDS-PAGE (4–20%) under reducing conditions. Gel bands were excised, reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and in-gel digested overnight with trypsin. Peptides were extracted with 50 mM ammonium bicarbonate and 50% acetonitrile in 0.2% formic acid, dried by evaporation in a speed-vac concentrator and resuspended in 0.2% formic acid. LC-MS/MS analyses were performed using a nano-ACQUITY Ultra-Performance LC system coupled to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a post-hoc test, or unpaired non-parametric Mann-Whitney tests or Kruskal-Wallis' tests as indicated in the figure legends. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results:

Clinical and biological manifestations

We identified a female patient (P), currently aged 24, born to unrelated parents, who presented with severe early-onset auto-immunity. She suffered from generalized auto-immune lipodystrophy, lipoatrophic diabetes, muscle hypertrophy, severe vitiligo and alopecia *aerata* (Fig.1.A.a and b).

At 4 years of age, she developed a rapidly spreading and refractory vitiligo. Then, she presented with alopecia areata, rapidly worsening at the age of 6.

Initially overweighted, the patient P began to lose weight rapidly from the age of 10. One year later, insulin-resistant diabetes with generalized lipodystrophy was diagnosed. Investigation of this lipoatrophic diabetes revealed the presence of anti-adipocytes autoantibodies (anti-perilipin 1) but the absence of autoantibodies associated with type 1 diabetes (Fig. 1.A.d, Supplemental figure S1). Genetic testing to detect known congenital causes of lipodystrophy was performed and proved negative. She was treated with high doses of insulin, metformin, and leptin with limited therapeutic effectiveness. Several immunosuppressive treatments have been tried unsuccessfully on autoimmunity in adipose or skin tissue (Mycophenolate Mofetil, Rituximab, Ruxolitinib, Intravenous Immunoglobulins at immunomodulatory doses). Due to chronic hypertriglyceridemia, she had an episode of acute pancreatis with rapidly favorable progress under medical treatment. During a suspected second episode of pancreatitis at the age of 16, a large hepatic mass was discovered, raising suspicion of a liver tumor (Figure 1.A.c). The patient developed a fulminant hepatic failure after surgical resection of the mass. Anatomopathological examination revealed that the pseudotumor was a large nodular regenerative hyperplasia (NRH) associated with hepatic steatosis. The patient underwent an emergency liver transplant with progressive recurrence of hepatic steatosis without signs of rejection under dual immunosuppressive therapy (Mycophenolate Mofetil, Tacrolimus). The post-transplant period was complicated by an Epstein Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-PTLD) and pulmonary aspergillosis, which subsequently progressed favorably. Other clinical manifestations include early-onset atopic dermatitis and drug-induced urticarial vasculitis following treatment with antihypertensive drugs.

Given the severity and early onset of the clinical phenotype, genetic testing to detect known congenital causes of lipodystrophy was performed but failed to identify causative variants. Then, whole exome sequencing was performed and identified two compound heterozygous mutations of the gene *DOCK9* confirmed by sanger sequencing (Fig.1.A.e). The missense mutation c.161T>A (p.L54Q) in the exon 1, inherited from her father is a private variant (CADD 11,3, Polyphen score Benign score: 0.04, Sift score Benign score: 0.19). The missense mutation c.1224C>G (p.F408L) in the exon 12, inherited from the mother, has a low allele frequency (AF: 1,4 $x10^{-5}$) without homozygous variant detected in GnomAD (v3.1.2) data base (CADD 28,4, Polyphen score: Probably Damaging score: 0.995, Sift score: Deleterious score: 0). The mutations are located on either side of the PH domain, whose function is to anchor DOCK9 to

the membrane (Fig.1.A.f). Her father recently developed rheumatoid polyarthritis and type 2 diabetes, and her mother is being monitored for meningioma.
Auto-immune disorders led to immune exploration in the patient. The immune cell phenotype by mass cytometry (CyTOF: Cytometry by Time of Flight) showed alterations in circulating lymphoid compartment with an excess in circulating CD8+ memory T cells and reduction in Natural Killer cell (NK) (Figure 1.B). Broad autoantibody testing was negative except for anti-PLIN1 antibodies and antinuclear antibodies (ANA) (supplemental Fig. 1). Three different plasmas from patient (P) were analyzed using Olink technology, two of which were taken before the liver transplant. Levels of soluble cytokines receptors such as IL-15R, IL-18R and IL-20R were increased in patient (P) plasma samples, compared to healthy donors (HDs) or control with insulin-dependent diabetes (CTRL DID) and DOCK11 deficient patients' plasma (Figure 1.C). The level of the pro-inflammatory cytokine IL-18 and the soluble glycoprotein CDCP1 (CUB domain-containing protein 1) were elevated compared to others controls groups (p-value <0,05). CCL19, CXCL19 and CXCL10, cytokines belonging the chemokines family and involved in T cells migration were also increased (p-value <0,05). Soluble Stem Cell Factor (SCF), mainly produced by adipocytes in bone marrow, is a *local factor for hematopoietic stem and progenitor cells. SCF level was* reduced in the patient plasma and in the control DID compared to HDs and almost all DOCK11 deficient patients (p-value <0,05). The Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) is a metabolic hormone produce by several tissue including the muscle. FGF21 level was significantly increased in the patient's plasma compared to other groups (p-value <0,05).

DOCK9 protein dysfunction and impaired actin cytoskeleton regulation

The DOCK9 protein is expressed in the activated T cells and the platelets from the patient (Fig.2 A). The main known function of DOCK9 is the activation of CDC42. The CDC42 activity was significantly reduced in the patient's platelets after thrombin stimulation at early time-point compared to controls, including HDs and one DID control (Fig.2.B, p<0,05). Consistent with reduced CDC42 activity, PAK2 phosphorylation (a downstream target of CDC42) was also diminished after thrombin stimulation at early time-point (Fig.2.B). Others RHO-GTPases activities were not measured. But the phosphorylation of MLC2 (Myosin regulatory light chain 2), a protein downstream of RHOA-GTP, was not impacted suggesting a normal RHOA activity in the patient's platelets after stimulation. These results suggested a disrupted DOCK9 function in the patient's platelets.

CDC42 activity is involved in cell shape, spreading and migration through its role in actin remodeling. Actin is essential for the maintenance of platelet morphology and for the rapid change in shape following platelet activation.
In routine biological tests, the patient's mean platelets' size was always elevated compared to standard values (13,1 fL versus 7 – 11 fL). Accordingly, we observed macroplatelets, as showed by the increased size platelets, in the patient compared to controls including the DID control (Fig.2.C.a).

After spreading on fibrinogen matrix, we observed that the patient's platelets surface was increased compared controls including DID control associated with the lower CDC42 activity (Fig.2.C.b). CDC42 participates to the formation of actin filament (F-actin) via the Arp2/3complex. Actin nodule is a F-actin structure during early adhesion and spreading on extracellular matrix. On the matrix coated with anti-hyaluronan receptor antibodies, the patient's platelets are widely spread, without the typical actin nodules observed in the control platelets (Fig.2.C.c). These results suggest an impaired actin cytoskeleton dynamic in the patient's platelets.

Impact in the actin remodeling was evaluated in activated patient's T cells with mechanic 2D migration assays (Fig.2.D). Patient's activated T cells are faster in microchannel than controls ($p<0,05$). DOCK9 knockout (KO) T cells were generated with combination of two guides (A+B) of CRISPR gene editing (Fig.2.E). We obtained only activated T cells lacking the DOCK9 protein from one healthy donor. KO DOCK9 T cells are also faster than scramble (SCR) T cells which express DOCK9 (Fig.2.D).

Lamine A is a major protein of nucleoskeleton and mutation in the gene LMNA encoding for this protein is associated with lipodystrophy syndrome. Constricted migration requires the deformation of the nucleus which involves nucleoskeleton. Less patient's T cells passed through the constricted micro-channel suggesting a lower ability to remodel the nucleus ($p<0,05$) (Fig.2.F).

Dysregulation of membrane receptors expression and impaired of downstream activation of STAT5

As soluble cytokines receptors such as IL-15R, IL-18R and IL-20R were elevated in the plasma of the patient (Fig 1.C), we tested the membrane expression of cytokines receptors involved in important activation pathways in T cells (Fig.3.A). While IL-7R was significantly increased in CD3+T patient's cells, IL-18R was significantly reduced in CD8+ T patient's cells at basal state ($p<0,05$). Without stimulation, IL-15R exhibited low expression at the membrane, so we performed an intracellular staining. Total IL-15R expression in patient's T cells was comparable to the controls.

The soluble glycoprotein CDCP1 concentration was significantly elevated in the plasma of the patient (Fig. 1C). In addition, the formation of actin nodules in platelets on a matrix containing antibody against hyaluronan, a receptor belonging to the glycoprotein family, was impaired (Fig.2.C.c). We measured the expression of CD44+ belonging to hyaluronan receptor on the T cell membrane. Membrane CD44 expression was mainly reduced on CD8+ T patient's cells ($p<0,05$). In contrast, the expression of CD44+ seemed to be reduced in CD3+, CD4+ and CD8+ in KO DOCK9 T cells compared to SCR T cells.

Signaling of IL-15R and IL-7R receptors involves the activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). After IL-7 or IL-15 stimulations, we observed, on Western Blot analysis, a stronger phosphorylation of STAT5, reflecting the STAT5 activation, in patient's T cell compared to control T cells (Fig.3.B). By flow cytometry analysis, we observed a stronger STAT5

phosphorylation predominantly on CD8+ T patient's cells as compared to controls after short IL-7 or IL-15 stimulation (Fig.3.C). Similar to the patient's T cells, The STAT5 phosphorylation was also stronger in KO DOCK9 T cells compared to DOCK9 expressing T cells after IL7 and IL15 stimulation (Fig.3.D.E). These results suggested STAT5 hyperactivation downstream of upregulated IL7-R and IL15-R in the patient's T cells or in KO DOCK9 T cells from controls.

Reduced fat mass and expansion of central memory T cell in DOCK9 KO mouse

We generated DOCK9-deficient (KO) mouse model with CRISPR genome editing using combination of two guides deleting exon 4 (Fig.4.A). We obtained homozygous *Dock9* $^{-/-}$, heterozygous *Dock9* $^{+/-}$ or wild-type *Dock9* $^{+/+}$ male and female mice (Fig.4.A). We observed a virtually absent DOCK9 protein expression in the fibroblasts of *Dock9* $^{-/-}$ mouse (Fig.4.A).
The body weight loss started from the 20th week of age in *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ males (Fig.4.B). At 37 weeks of age, the weight of *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ males were significantly lower compared to wild-type mice with a difference of 10 gr representing nearly 25% of the weight of WT mice ($p<0,05$). In females, no difference was observed between mice.
The total body weight includes fat mass and lean mass which can be measured separately by the dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). Fat mass of *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ males is reduced and lean mass is increased compared to wild-type mouse (Fig.4.C).
In subcutaneous adipose tissue (SAT), the expression of inflammation markers was measured at the RNA level (Fig.4.D). TNF-α mRNA was slightly increased in *Dock9* $^{-/-}$ males compared to other groups. IL-6 mRNA was elevated in both *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ males.
Leptin is an important adipose cytokine or adipokine and is greatly reduced at mRNA level in *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ males compared to WT mice. The lower expression of Leptin and higher expression of inflammation markers could be related to impaired adipocytes function in *Dock9* $^{-/-}$.
Fibroblasts obtained from skin biopsies of mouse ears were differentiated *in vitro* into adipocytes (Fig.4.E). The accumulation of lipids droplets is an essential step in the adipocyte differentiation. After 14 days of differentiation, the accumulation of lipids droplets, stained in immune-fluorescence (IF), was partially reduced in *Dock9* $^{-/-}$ and *Dock9* $^{+/-}$ differentiated adipocytes. Adipocytes functions were measured with the mRNA expression of adipogenesis, *de novo* lipogenesis, lipolysis and glucose transport markers. The nuclear Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), a key regulator of adipogenesis, was significantly reduced in Dock9 $^{-/-}$ differentiated adipocytes compared to WT ones at RNA level ($p<0,05$). The RNA of fatty acid synthase (FASN), a marker of *de novo* lipogenesis, was significantly decreased in *Dock9* $^{-/-}$ differentiated adipocytes ($p<0,05$). Lipolysis markers such as Hormone-sensitive lipase (HSL) and Adipose triglyceride lipase (ATGL) were significantly reduced in *Dock9* $^{-/-}$ differentiated adipocytes compared to ones at RNA level ($p<0,05$). The Glucose transporter 4 (GLUT4), highly expressed in adipose and muscle tissue, enables glucose transport across the plasma membrane after stimulation by Insulin**.** GLUT4 mRNA was significantly decreased in

Dock9 $^{-/-}$ differentiated adipocytes compared to WT mice suggesting impaired glucose transport in adipocytes lacking the Dock9 protein ($p<0,05$).
The IL6 mRNA tended to be slightly elevated but not significantly elevated in contrast to its level in the subcutaneous adipose tissue composed of adipocytes and immune cells ($p>0,05$).
The distribution of CD4+ and CD8+ sub-population was assessed after extraction and culture of T lymphocytes from mouse spleen (Fig.4F). The $CD8^+$ population was increased in the *Dock9* $^{-/-}$ mice compared to WT littermates (56,6% versus 45,2%). *Dock9* $^{-/-}$ mice exhibited increased proportion of Central Memory T cells (CM: CD44+CD62L+) and lower proportion of Effector Memory T cells (EM : CD44+CD62L-) in both CD4+ and CD8+ populations compared to WT (CD4+ : CM 61,1% versus 45,7%, EM 19,2% versus 28,4%; CD8+ : CM 47,3% versus 37,7%, EM 18,1% versus 24,8%). Although the interpretation of the results for activated T cells *Dock9* $^{+/-}$ appears limited, their CM and EM distribution resembles to that of deficient-DOCK9 T cells.

DOCK9 interacts with DOCK11, DOCK10 and others cytoskeleton proteins including nuclear proteins in human primary T cells

After DOCK9 protein immunoprecipitation in activated T cells from 3 HDs, mass spectrometry analyzes identified 132 proteins partners of DOCK9 in these cells (Fig.5.A).
The others DOCK-D members, DOCK11 and DOCK10, interact with DOCK9. We also found 25 additional involved in signaling of RHO GTPases. Many proteins are involved in cytoskeleton organization particularly in the organization of intermediate filament such as keratin proteins (KRT) (Fig.5.B). 50/132 proteins could be localized in the nucleus and 39/132 are proteins involved in the component of extracellular exosomes.

Identification of new proteins partners and loss of membrane proteins in the DOCK9 interactome in primary fibroblasts from the patient

After DOCK9 protein immunoprecipitation in primary fibroblasts from one HD and the patient (five replicates), mass spectrometry analyzes identified 29 novels proteins partners of the patient DOCK9 protein in these cells (Fig.6.A). Among these proteins, 16 proteins belonged to the glycoproteins and 4 are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-anchored proteins). GPI-anchored proteins are associated with membrane microdomains or lipids rafts [405]. Mass spectrometry analyzes identified 116 proteins only present in the interactome of the control DOCK9 protein (Fig.6.B) compared to mutated DOCK9 protein. In the fibroblasts from the patient, DOCK9 protein lost the interaction with 65 membrane proteins and with 45 glycoproteins compared to the DOCK9 protein in HD fibroblasts. Mutated DOCK9 seems to lose its interaction with the lysosomal trafficking regulator (LYST) which is involved in skin and hair pigmentation[406].

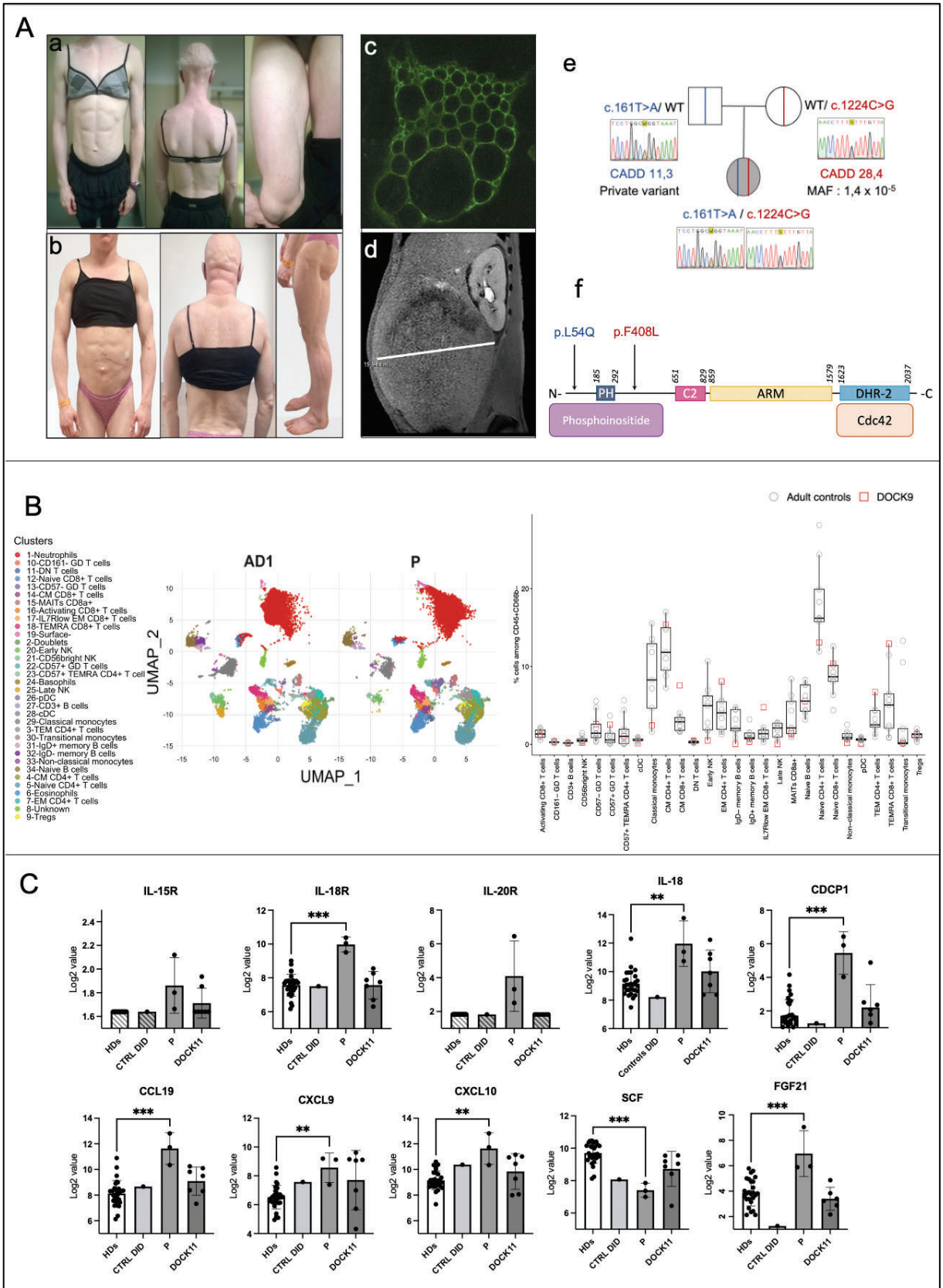


Figure 1. DOCK9 compound heterozygous mutations : clinical-radiological features, immunophenotype and plasma cytokines.

Figure 1. DOCK9 compound heterozygous mutations: clinical-radiological features, immune phenotype and plasma cytokines.

A. (a) clinical findings of patient P with DOCK9 compound heterozygous mutations at 14 years old: generalized lipodystrophy and vitiligo, alopecia *aerata* (front view of the body, rear view of the body, photo of the right thigh). **(b)** Evolution of the clinical findings of patient P at 24 years old: severe generalized lipodystrophy and vitiligo, alopecia *aerata*, muscle hypertrophy (front view of the body, back view of the body, side view of the left thigh). **(c)** Image of Immunofluorescence microscopy showing staining of autoantibodies against adipocytes after incubation of cultured human adipose stem cells with patient serum (green color). **(d)** Sagittal abdominal and pelvic MRI (Magnetic Resonance Imaging) cut showing large mass in the liver (measured with the white line). **(e)** Genetic family tree of the patient presenting compound heterozygous mutations of *DOCK9* gene confirmed by sanger sequencing. Private missense mutation c.161T>A (p.L54Q) in the exon 1, inherited from her father with prediction score: CADD 11,3, Polyphen score Benign (score: 0.04), Sift score Benign (score: 0.19). Missense mutation c.1224C>G (p.F408L) in the exon 12, inherited from the mother, low allele frequency (MAF: 1,4 $x10^{-5}$) with prediction score: CADD 28,4, Polyphen score: Probably Damaging (score: 0.995), Sift score: Deleterious (score: 0). **(f)** Schematic overview of DOCK9 protein with the positions of patient's DOCK9 mutations and the main four domains (PH, C2, ARM, DHR2). Molecular partners described to interact with DOCK9 are mentioned below the domain they bind to.

B. UMAP (Unifolm Manifold Approximation and Projection) of immune cell subsets clusters analyzed by mass cytometry on whole blood samples from DOCK9 patient (n= 1) and age-matched healthy donors (AD1, n=7). Each cluster is color coded. Cell cluster biases observed between DOCK9 patient (red square) and healthy donors (grey circle) among CD45+CD66b- population. DOCK9 patients has a higher percentage of Central Memory CD8+ T cells (CM CD8+ T), IL7Rlow effector memory CD8+ T cells and effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA) CD8+ T cells. DOCK9 patients has lower percentage of early and late NK. **C.** Cytokines dosages in plasma**:** dosage of cytokines (IL15-R, IL18-R, IL20-R, IL18, CDCP1, CCL19, CXCL9, CXCL10, SCF, FGF21) in plasma from DOCK9 mutated patient (P, n=3, at the ages of 13, 14, and 23, gray) , age- matched healthy donors (HDs, n=29, white), control with diabetes treated with Insulin (CTRL DID, n=1, light gray) and DOCK11 deficient patients (n =7, dark gray). The histograms with hatching represent values below the threshold. Unit log2 value with SD. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-Whitney test. (*) *p*-value < 0.05; (**) *p*-value < 0.01; (***) *p*-value < 0.005.

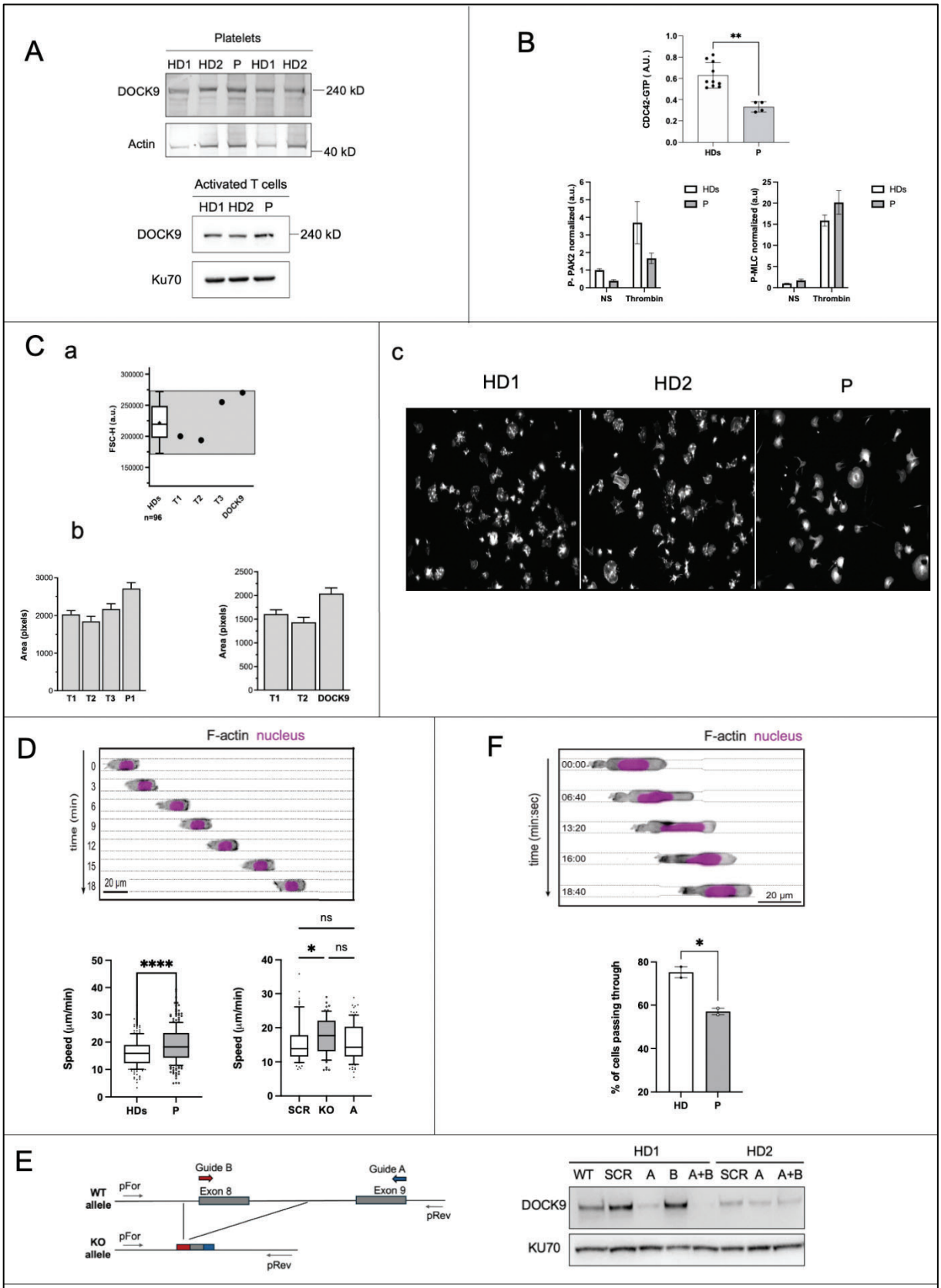


Figure 2. DOCK9 protein expression, impaired CDC42 activity and abnormal actin cytoskeleton in primary T cells and platelets

Figure 2. DOCK9 protein expression, impaired CDC42 activation and abnormal actin cytoskeleton in primary T cells and platelets

A. DOCK9 protein expression was evaluated in platelets and activated T cells of healthy donors (HDs) and patients by Western blotting. Expression of housekeeping protein actin and Ku70. B. CDC42 activity evaluated in HDs' platelets and patient's platelets by G-LISA after stimulation by 0.5 U/mL thrombin for 5 minutes in unstirred conditions. Graph represents the absorbance (A.U unit) of CDC42 activity (CDC42-GTP) of the patient compared to that of HDs. Data are from two independent experiments in duplicates with HDs (n=5). Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-Whitney test. (**) *p*-value < 0.01. Quantification of phosphorylation of target protein of active CDC42, PAK2, and of active RHOA, MLC2 at basal state (NS) after stimulation with 0.5 U/mL thrombin (Thr) for 5 minutes by western blotting. **B. (a)** Platelet size was evaluated by flow cytometry. Each dot represents the mean size measured by the mean forward scatter height (FSC-H; a.u., arbitrary units) of washed platelets from healthy donors (HDs) and patient. The box-and-whisker plot shows the normal range, determined from HDs. Whiskers represent the 5-95 percentiles, the box correspond to the interquartile range, the center line is the median and the cross indicates the mean of 96 platelets. In total two independent experiments. **(b)** Transmission electron microscopy (TEM) analysis of platelet spreading onto fibrinogen matrix during 10 min. Platelet surface which is defined as the ratio between the largest diameter and the smallest diameter are derived from the TEM images. Two Graphs of two independent experiments represent the mean ± SEM of at least 1100 HDs' platelets, control with DID (T3) and 100 patient's platelets, unit area (pixels). **(c)** Spreading of HD and patients' platelets onto anti-CD44 matrix for 30 minutes was analyzed by immunofluorescence microscopy. Platelet morphology was visualized using F-actin detection by fluorescently labeled-phalloidin. The patient's platelets are widely spread, without the typical actin nodules observed in the control platelets. **D**. Schema adapted from Shen et al[348,406] representing migration in microchannels with nucleus in purple and F-actin in grey. Mean instantaneous speed of HD and DOCK9 T cell blasts migrating in 4 x 5µm microchannels. Results from n=3 independent experiments with each condition. Unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance between the mean speeds of controls and patient (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Mean instantaneous speed of Scramble CRISPR T cells (SCR), DOCK9 Knockout (KO) T cell blasts with CRISPR gene editing and CRISPR T cells only with one guide (A) migrating in 4 x 5µm microchannels. Results from n=1 experiment. **E**. Schema showing the CRISPR strategy with combination of two guides. Guide A located in Exon 8 and guide B located in Exon 9. DOCK9 protein expression of activated T cells, seven days after electroporation with guides and Cas9, evaluated by western blotting. CRISPR gene editing was performed on two HDs with scramble guide (SCR), guide A (A), guide B (B) or guides A+B (A+B). Ku70 housekeeping protein. **F**. Schema adapted from Shen et al [348]representing constricted migration with nucleus in purple and F-actin in grey. Measure of the percentage of cells that pass from one side to the other (1 µm constriction). Results for 2 independent experiments with the same T cells batch and HD=1. Unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance between the percentage of passed cells between HD and patient T cells (* $p < 0.05$).

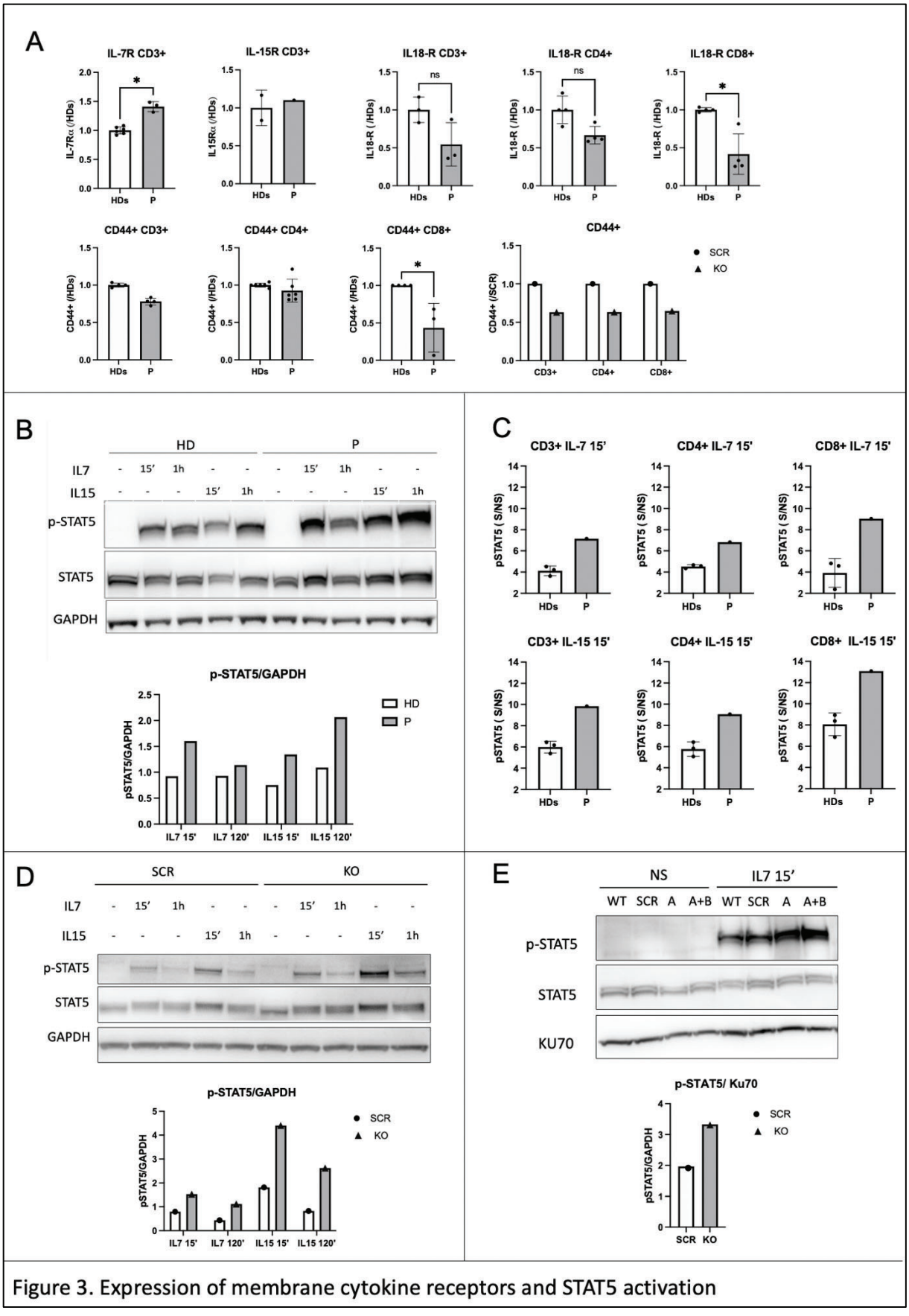


Figure 3. Expression of membrane cytokine receptors and STAT5 activation

Figure 3. Expression of membrane cytokine receptors and STAT5 activation.

A. Graphs represent the relative membrane expression of IL-7R, IL-18R and CD44 measured by flow cytometry of patient activated T cells compared to that of HD (set to1). Total expression of IL-15R. IL-18R and CD44 membrane expression in sub-population CD3+, CD4+ and CD8+. Results from three independent experiment expect for membrane expression of IL15-R (n=1). Unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used to evaluate statistical significance between the mean speeds of controls and patient (* $p < 0.05$). The expression of CD44 in SCR (round) and KO (triangle) activated T cells was measured in one experiment**. B.** Phosphorylation of STAT5 measured by western blotting in basal state, after stimulation with IL-7 or IL-15 after 15 min and 120 min in patient activated T cells (P) and HD. Total STAT5 and housekeeping protein GAPDH was measured also. Representative histogram of the ratio p-STAT5/GAPDH for HD and P activated T cells in each condition. Results for n=1 experiment. **C**. Representative histograms of the ratio between the p-STAT5 mean fluorescence intensity (MFI) after stimulation with IL-7 or I-L15 for 15 min and at basal state (S/NS) in HDs (n =3) and patient. Ratio of p-STAT5 MFI in CD3+, CD4+ and in CD8+. Results from one experiment performed with a different batch of cells than the one used for the Western blot experiment. **D.** Phosphorylation of STAT5 measured by western blotting in basal state, after stimulation with IL-7 or IL-15 after 15 min and 1h in DOCK9 KO (KO) and scramble (SCR) activated T cells from one HD. Total STAT5 and housekeeping protein GAPDH was measured also. Representative histogram of the ratio p-STAT5/GAPDH for SCR (triangle) and KO (round) activated T cells in each condition. Results for n=1 experiment. **E.** Phosphorylation of STAT5 measured by western blotting in basal state, after stimulation with IL7 after 15 min and 1h in wild-type, scramble (SCR), guide A and DOCK9 KO (KO) activated T cells from one HD. Total STAT5 and housekeeping protein Ku70 was measured also. Representative histogram of the ratio p-STAT5/Ku70 for SCR (triangle) and KO (round) activated T cells in each condition. Results for n=1 experiment.

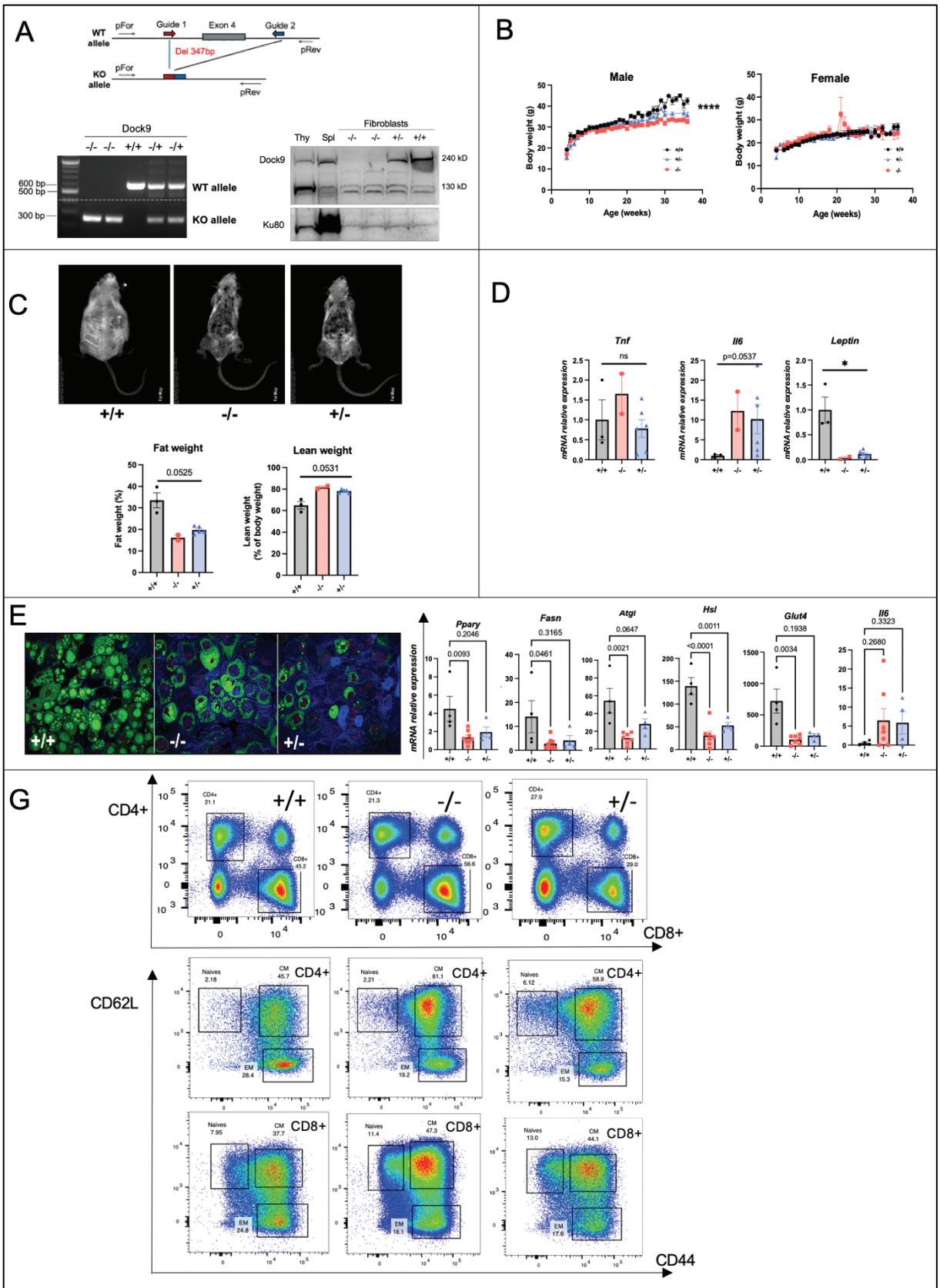


Figure 4. Body weight, fat mass measure, immune phenotype, inflammation and adipocyte functions markers in Dock9 KO mouse model

Figure 4. Body weight, fat mass measure, immune phenotype, inflammation and adipocyte functions markers in Dock9 KO mouse model

A. Schema of CRISPR gene editing strategy with deletion of exon 4. PCR-based genotypic verification from ear biopsies. Representative PCR gel showing the presence of a 600 bp band for the wild-type (WT) allele and a 300 bp band for the knockout (KO) allele. Heterozygous animals display both bands. DNA was extracted from ear biopsies and amplified with primers flanking the targeted genomic region. Dock9 protein expression was evaluated in WT thymocytes, spleen and in *Dock9* $^{-/-}$, *Dock9* $^{+/-}$ and *Dock9*$^{+/+}$ murine fibroblasts by Western blotting. Ku80, housekeeping protein**. B.** Body weight (gr) evolution (weeks) in male (A) and female (B) in *Dock9* $^{-/-}$ (n=12 male, n=6 female)**,** *Dock9* $^{+/-}$ (n=21 male, n=7 female) and *Dock9*$^{+/+}$ (n=21 male, n=6 female) mice**.** Each point corresponds to the mean ± SEM of each group. **** $p < 0.0001$). **C.** Representative fat mass X-ray images with dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) of 26-week-old *Dock9* $^{-/-}$ (n=1), *Dock9* $^{+/-}$ (n=1), Dock9 $^{+/+}$ (n=1) male mice. Quantification of the percentage of fat weight and lean mass measured in 26-week-old Dock9 $^{-/-}$ (n=2), Dock9 $^{+/-}$ (n=5), Dock9 $^{+/+}$ (n=3) mice**.** Data are presented as the mean ± SEM. Each point corresponds to one mouse. **D**. Relative mRNA expression levels of TNF, IL6 and leptin in subcutaneous adipose tissue (SAT) from 26-week-old Dock9 $^{-/-}$ (n=2), Dock9 $^{+/-}$ (n=6), Dock9 $^{+/+}$ (n=3) male mice. Gene expression was quantified by RT-qPCR and normalized to *Rpl6*. Data are presented as the mean ± SEM. Each point corresponds to one mouse**. E.** Representative images of differentiated adipocytes from *Dock9*$^{-/-}$ (n=1), *Dock9*$^{+/-}$ (n=1), *Dock9*$^{+/+}$ (n=1) fibroblasts with confocal microscopy ((immunofluorescence**,** stained with Bodipy (green), phalloidin (blue), and dapi (red) for neutral lipids, actin and nucleous respectively)**.** Relative mRNA expression levels of lipid metabolism-related genes *Pparγ*, *Fasn*, *Atgl*, *Hsl*, *Glut4* and *IL6* i from 23 weeks old *Dock9*$^{-/-}$ (n=2), *Dock9*$^{+/-}$ (n=1), *Dock9*$^{+/+}$ (n=1) male mice. Gene expression was quantified by RT-qPCR and normalized to *Rpl6* . Data are presented as the mean ± SEM. Each point corresponds to one replicate **F**. Representative dotplots of CD4+ and CD8+ repartition in activated T cell generated from splenocytes (D+4 of *in vitro* culture) of Dock9 $^{-/-}$ (n=1), Dock9 $^{+/-}$ (n=1), Dock9 $^{+/+}$ (n=1) male mice. Representative dotplots of percentage naive (CD62L+CD44-), central memory (CM, CD62L+ CD44+) and effector memory (EM, CD62L-CD44+) in CD4+ and CD8+ population. Results from n=1 experiment.

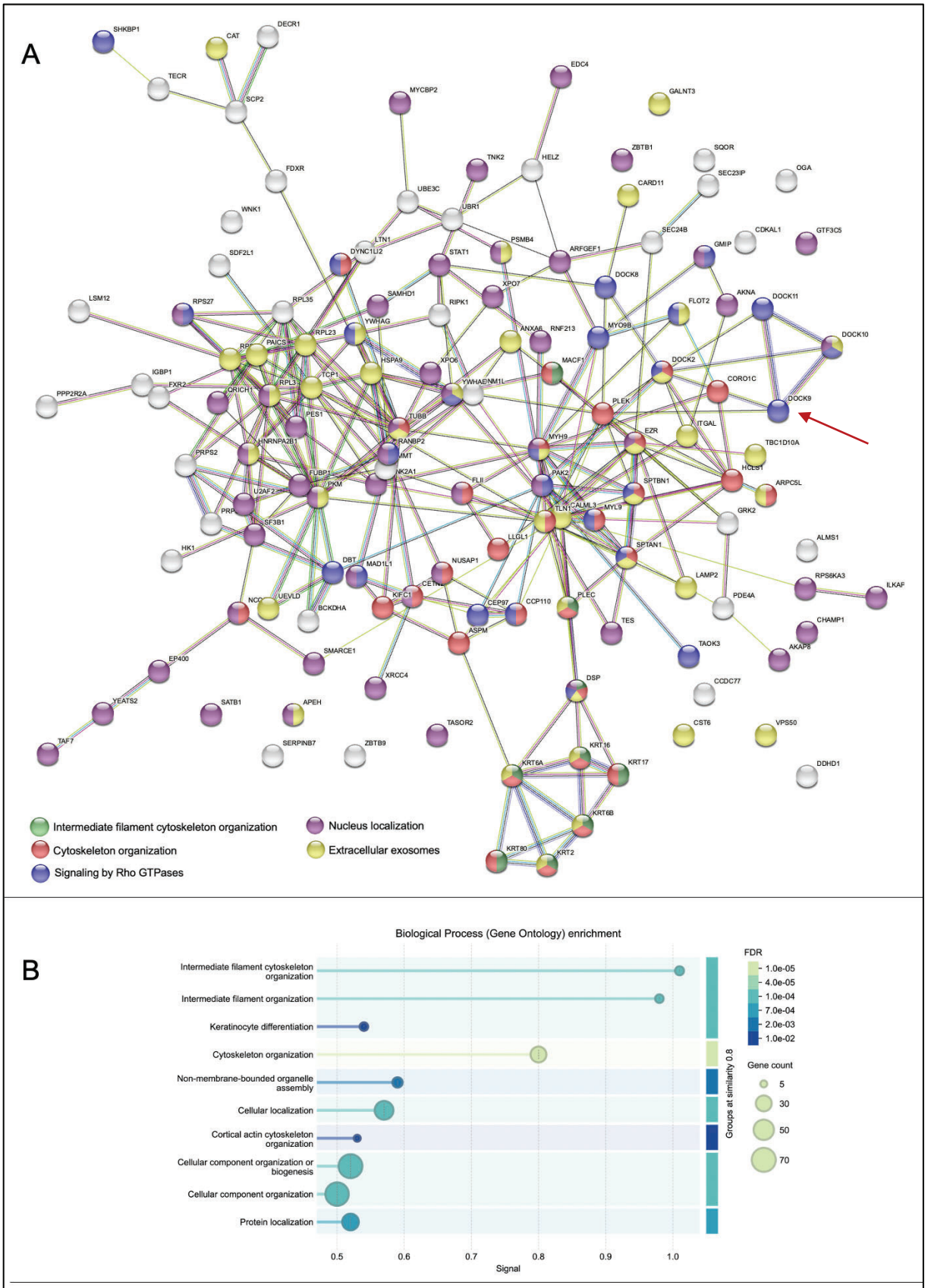


Figure 5. Interactome of DOCK9 protein in human primary T cells

Figure 5. Interactome of DOCK9 protein in human primary T cells

A. STRING network analysis of the 132 proteins and node coloring per function. The network edges indicate both functional and physical protein associations: proteins jointly contribute to a shared function. However, the network edges do not necessarily mean proteins are physically binding to each other. The line thickness indicates the strength of data support. **B.** Biological process enrichment represented by a graph with data classified according to gene count and false discovery rate (FDR).

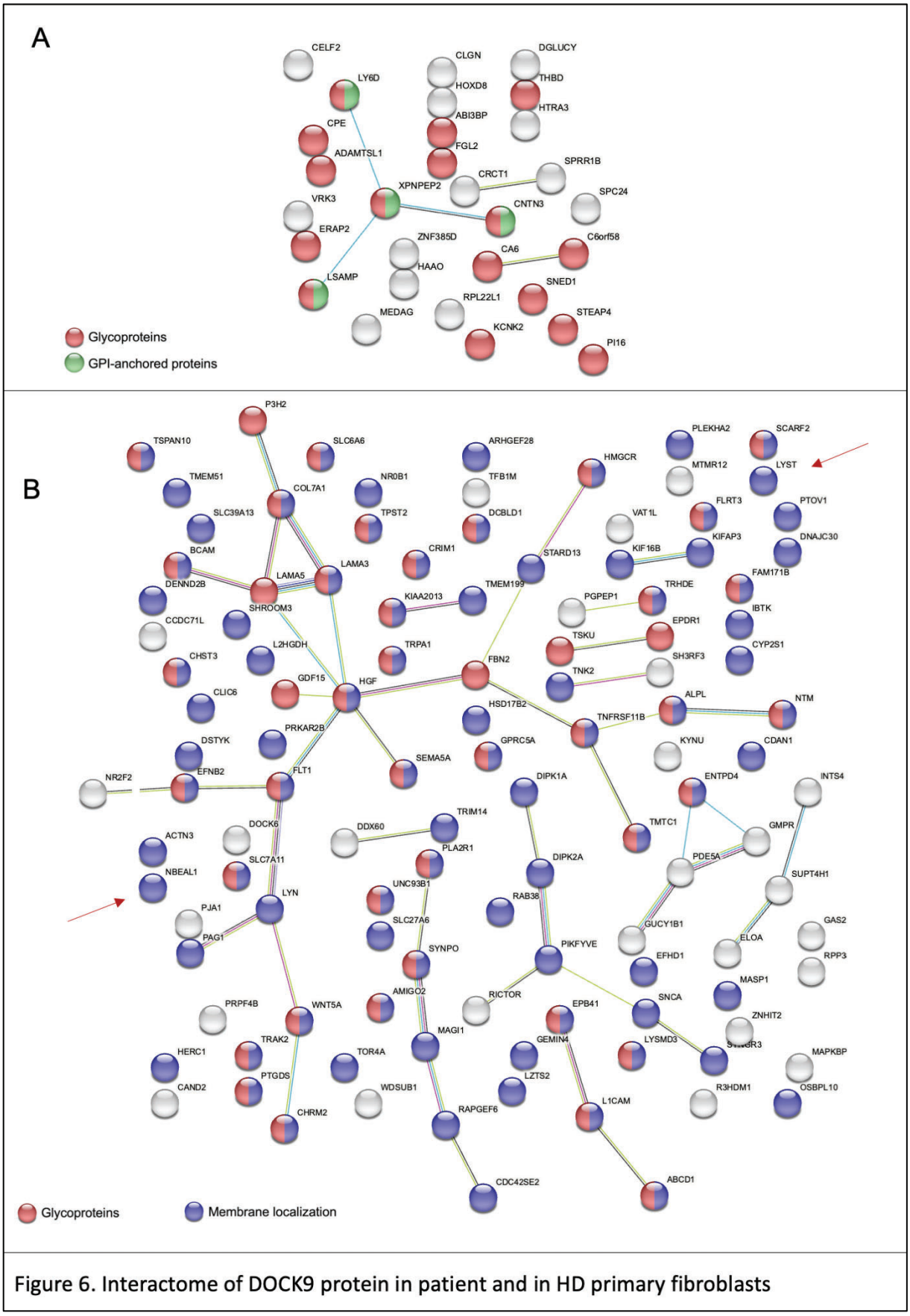


Figure 6. Interactome of DOCK9 protein in patient and in HD primary fibroblasts

Figure 6. Interactome of DOCK9 protein in patient and in HD primary fibroblasts.
A. STRING network analysis of the 29 proteins and node coloring per function. The network edges indicate both functional and physical protein associations: proteins jointly contribute to a shared function. However, the network edges do not necessarily mean proteins are physically binding to each other. The line thickness indicates the strength of data support. Interactome of DOCK9 in the primary fibroblast of the patient and only proteins that are not present in the interactome of DOCK9 in the primary fibroblast of the HD are represented.
B. STRING network analysis of the 116 proteins and node coloring per function. The network edges indicate both functional and physical protein associations: proteins jointly contribute to a shared function. However, the network edges do not necessarily mean proteins are physically binding to each other. The line thickness indicates the strength of data support. Interactome of DOCK9 in the primary fibroblast of the HD and only proteins that are not present in the interactome of DOCK9 in the primary fibroblast of the patient are represented.

Antibodies	Dosage (biologic standards)
Anti-ZNT8	0,03 (<0.63)
Anti-GAD	<0.2 (<1.0)
Anti-IA2	<0.2 (<1.0)
Anti-Langerhans islets	Negative
Anti-Insulin	6.7% (<8.2)
Anti-RNP	<0.2 (<1.0)
Anti-Sm	<0.2 (<1.0)
Anti-SSA	<0.2 (<1.0)
Anti-SSB	<0.2 (<1.0)
Anti-Scl70	<0.2 (<1.0)
Anti-Jo1	<0.2 (<1.0)
Anti-RNA Pol3	2 (<20)
Anti-Fibrillarin	0.7 (< 7)
Anti-histone	Negative
Anti-adrenal glands	Negative
Anti-ribosome	<0.2 (<1.0)
Anti-phospholipids	<1.6 (<20.0)
Anti-cardiolipins	<1.5 (<20.0)
Anti-B2GP1	<1.4 (<20.0)
Anti-Tissues	<1/80 (<1/80)
Antinuclear antibodies	<1/80 (<1/80)
Anti-LMK1	<1/40 (<1/40)
Anti-LC1	<1/40 (<1/40)
Anti-smooth muscle	<1/80 (<1/80)
ANCA	Negative
ASCA	Negative
Anti-MBG	<0.2 (<1.0)
Anti-TGT	<0.5 (<15)
Anti-Gliadins	<0.2 (<15)
Anti-Endomysium	Negative
Anti-Thyroperoxydase	<1 (< 40)
TRAK	<0.5 (<1)
Anti-Thyroglobulin	4 (<120)
Anti-THSD7A	Negative
Anti-CCP	<15 (<20)

Figure S1. Table showing the antibodies sought in the patient

DISCUSSION

La discussion porte autour de trois axes : DOCK11, DOCK9 et le lien entre DOCK9/DOCK11 et DOCK8.

DOCK11

Nous avons identifié, chez huit garçons, sept mutations faux-sens hémizygotes privées du gène *DOCK11* associées à une auto-immunité de sévérité variable [399].
Block et al ont décrit par la suite une cohorte autrichienne de quatre patients de sexe masculin atteints d'un syndrome auto-inflammatoire sévère d'apparition précoce associé à des mutations hémizygotes perte de fonction du gène *DOCK11*[400]. Pour faciliter la comparaison entre les deux cohortes de patients, l'ensemble des patients que nous avons étudiés sont désignés par une lettre (P-A à P-G) et les quatre patients décrits par Block et al sont désignés par un chiffre (P-1 à P-4). Les différences principales entre les deux cohortes sont représentées dans le tableau 2.

	Cohorte française (n=8)	Cohorte autrichienne (n=4)
Age de survenue	>1 an	<6 mois
Présentation clinique	Auto-immunité Syndrome auto-inflammatoire(n=1)	Syndrome auto-inflammatoire
Cytopénies	PTI (n=4) AHAI (n=4) NAI (n=1)	Anémie normocytaire (n=3)
Atteinte digestive	MICI (n=4)	MICI (n=1)
Atteinte cutanée	Inflammation (n=3) Lupus bulleux (n=1) Lupus discoïde (n=1)	Inflammation (n=2)
Infections sévères	Non	Oui (n=2)
Autres atteintes	Retard de croissance (n=3) Polyarthrite juvénile (n=1)	Neurologique (n=2) Retard de croissance (n=3)
Type de mutations	Faux-sens (n=8)	Faux-sens (n=2) Codon stop (n=1) Délétion (n=1)
Expression de DOCK11	Oui (n=3) Oui diminuée (n=4)	Non (n=2) Oui diminuée (n=2)
Activation de CDC42 (% activation)	Variable (0,85-77%)	10 %
Migration T (Vitesse)	Rapide	Rapide
Morphologies T	Très étalés et protrusions aberrantes	Absence de filopodes, rondes

Tableau 2.Tableau résumé de la présentation clinique, les types de mutations et leurs conséquences fonctionnelles des cohortes françaises et autrichiennes des patients avec un déficit en DOCK11

PTI : Purpura thrombopénique immunologique, AHAI : anémie hémolytique auto-immune, NAI : neutropénie auto-immune, MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Comparaison clinique et biologique des deux cohortes de patients

Dans ce paragraphe, nous mettrons en regard les deux cohortes de patients atteints de déficit en DOCK11.

Pour la majorité des patients P-1 à P-4, l'atteinte auto-inflammatoire s'est manifestée avant l'âge de 6 mois et a entrainé un décès par défaillance multiviscérale des patients P-2 et P-3 à l'âge de 2 ans et 6 ans. Le patient P-1 est décédé à l'âge de 6 ans de complications post-splénectomie. Des atteintes inflammatoires sont retrouvées chez deux patients. Un seul patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif (P-4). Des épisodes d'infections bronchopulmonaires, ORL et digestives ont été identifiés chez l'ensemble des patients, probablement en lien avec un déficit humoral. Une atteinte neurologique est présente chez deux patients (P-1 et P-2). Chez l'ensemble des patients, le bilan biologique montrait une grande variabilité de taille des globules rouges circulants (anisocytose) associée à une anémie de sévérité variable chez trois patients. Seul le patient P-1 présente une thrombocytopénie sans saignement rapporté. La recherche d'auto-anticorps plus ou moins étendue était négative chez ces patients.

La répartition des populations immunitaires était variable avec un nombre normal de lymphocytes Tregs. Les anomalies des lymphocytes B comprennent une réduction de la proportion de lymphocytes B de type zone marginale et des cellules B mémoires chez le patient P-1. Une augmentation intermittente de la proportion de lymphocytes B CD21lowCD38low (enrichis en LB auto-réactifs) est retrouvée chez l'ensemble des patients. De nombreux traitements immunosuppresseurs et biothérapies anti-inflammatoires ont été utilisés chez les patients avec une efficacité partielle ou sans efficacité.

L'âge de survenu de la maladie dans la cohorte de patients (A, B, C, D1/D2, E, F, G) était supérieur à l'âge de 3 ans à l'exception du patient A qui est l'un des plus sévère. Aucun de ces patients n'est décédé à ce jour à notre connaissance. Les patients présentent des manifestations plus auto-immunes qu'auto-inflammatoires à l'exception du patient P-F. On retrouve également des manifestations inflammatoires cutanées chez cinq des patients de la cohorte (A, C, D1, D2, F) et une inflammation digestive sévère chez quatre patients (A, B, D1, F). Les patients de cette cohorte ne présentent pas d'infections particulières. Les cytopénies auto-immunes, notamment la thrombopénie immunologique et l'anémie hémolytique auto-immune, sont présentes chez la majorité des patients et elles sont associées à des auto-anticorps. Un excès de lymphocytes B auto-réactifs est observé chez 5 patients et un défaut de lymphocytes B mémoires est présent chez 3 patients. Une diminution des NK et MAIT circulants est observée chez la majorité des patients.

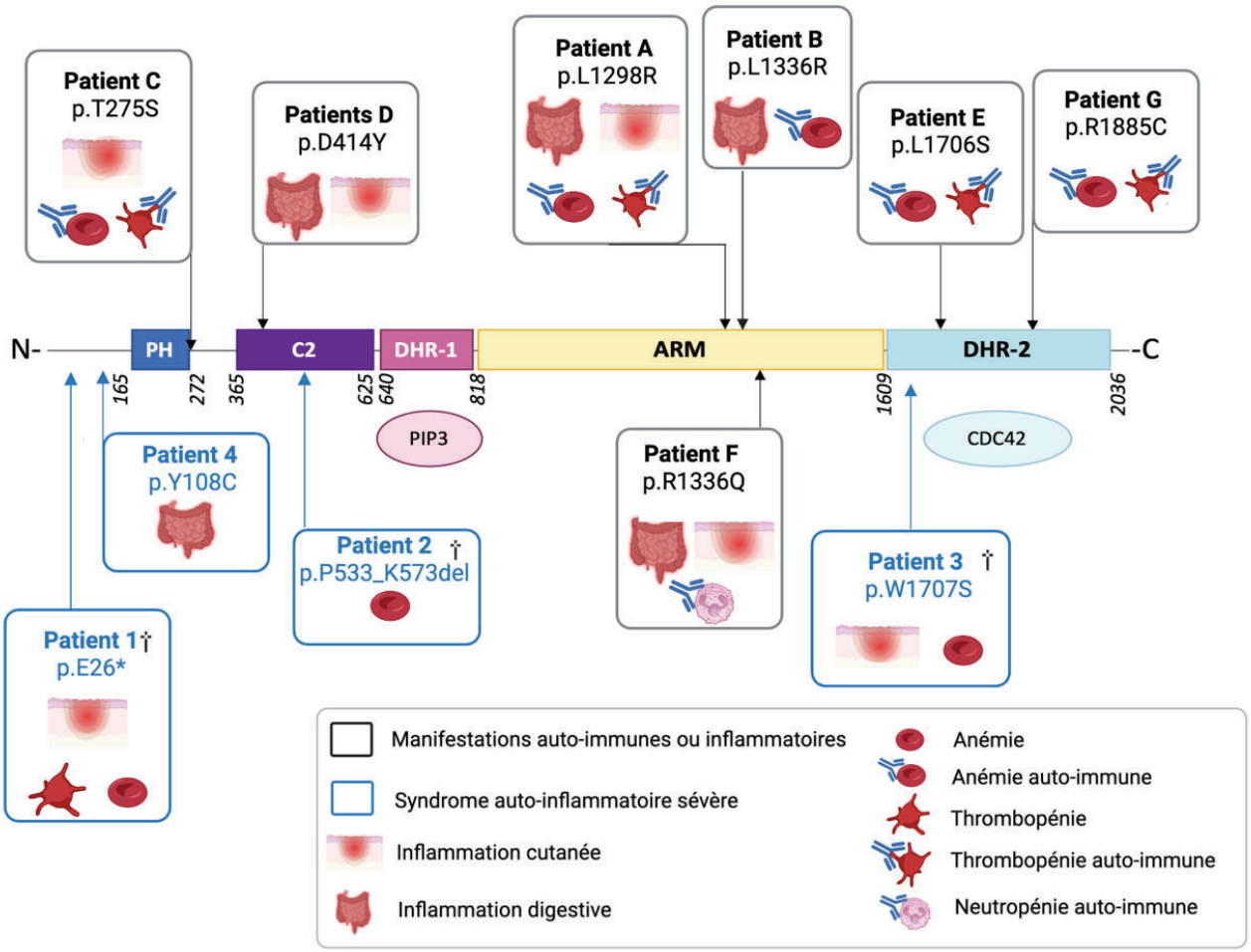


Figure 29. Manifestations cliniques des patients et position des mutations de DOCK11 associées
Les patients (P-1 à P-4) avec un encadré bleu présentent un syndrome auto-inflammatoire sévère avec une anémie ou inflammatoire cutanée et digestive. Les patients (P-A à P-G) avec un encadré noir présentent une auto-immunité avec une ou plusieurs cytopénies auto-immunes et des manifestations inflammatoires cutanées et digestives. Les mutations sont réparties en fonction de leur type et leur position protéique. La croix indique le décès du patient.

Les patients des deux cohortes divergent sur la présentation clinique, mais également sur la nature et la localisation des mutations de DOCK11 (Fig.29).

Types de mutations et impact sur la fonction GEF de DOCK11

Parmi toutes les mutations décrites, seules les mutations des patients P-1 et P-2 sont associées à l'absence d'expression de DOCK11. Une autre équipe a récemment identifié une mutation non-sens (c.3754C > T, p.(Q1252*)) conduisant à l'absence d'expression de DOCK11 chez un patient présentant une pneumopathie inflammatoire pseudo-infectieuse[407]. L'absence de la protéine semble être associée à un syndrome auto-inflammatoire très sévère de survenue précoce avant l'âge de 2 mois.
Les autres variants identifiés sont des mutations de type faux-sens et conduisent à une expression résiduelle de DOCK11 détectée par un anticorps anti-DOCK11 ciblant la partie C-terminale. A ce jour, la fonction principale de la protéine DOCK11 réside dans l'activation de CDC42, via l'interaction entre son domaine DHR2 et CDC42. Une diminution de l'activation de CDC42 est observée chez tous les patients décrits, et cette diminution semble corrélée au niveau d'expression de DOCK11. Le phénotype clinique est plus sévère chez les patients avec une expression réduite de DOCK11 associée à une faible activation de CDC42.

Les mutations faux-sens sont réparties dans les différents domaines de la protéine (Fig.29). Elles peuvent avoir des conséquences sur la conformation 3D et donc sur la fonction GEF (Fig.30).

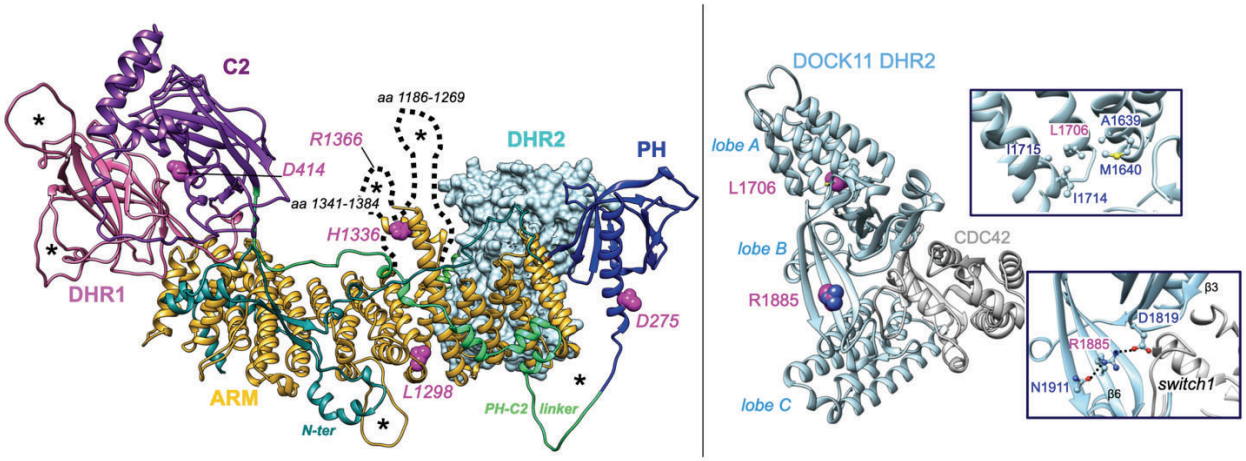


Figure 30. Modélisation 3D de la molécule DOCK11 avec position des mutations
Modélisation de la molécule DOCK11 en 3D à gauche avec la position des mutations des patients P-A, P-B, P-C, P-D1, P-D2 et P-F. Modélisation en 3D du domaine DHR2 de la protéine DOCK11 constituée des trois lobes A, B, C et du domaine switch I de CDC42 à droite. Cette dernière modélisation comprend les lutations des patients P-E et P-G. *Extrait de la Fig.1.C.D du papier DOCK11*[399].

Les mutations des patients P-3 (p.W1707S) et P-4 (p.Y108C) sont situées respectivement dans le domaine DHR2 et juste avant le domaine PH. Ces mutations conduisent à une activation de CDC42 comparable à celle des patients P-1 et P-2 associées à une absence d'expression de DOCK11. La localisation des mutations participe probablement à la baisse de la fonction GEF de DOCK11. D'après la modélisation 3D de DOCK11, le domaine PH est à proximité immédiate du domaine DHR2. La capacité d'auto-inhibition par l'interaction entre les extrémités N et C terminales a été observée dans d'autres protéines DOCK, en particulier DOCK2. Si une forme auto-inhibée de DOCK11 existe, il est possible que des mutations localisées avant le domaine PH ou dans le domaine DHR2 favorise cette forme empêchant l'activation de sa fonction GEF.
La mutation p.W1707S du patient P-3 est localisée à proximité de la mutation p.L1706S du P-E (Fig.29). Malgré la proximité de leurs mutations, les manifestations cliniques sont très différentes. Le patient P-3 est décédé d'une défaillance multiviscérale sévère dans un contexte de syndrome auto-inflammatoire sévère contrastant avec le patient P-E actuellement en rémission d'une cytopénie auto-immune peu sévère. La mutation p.L1706S et probablement la mutation p.W1707S se situent dans une poche hydrophobe localisée dans le lobe A du DHR2, site de dimérisation de la protéine DOCK11. Nous pouvons supposer que leurs répercussions dans cette poche est probablement différente pour expliquer une telle différence de phénotype. Cependant d'autres hypothèses existent pour expliquer cette différence. A l'instar des réversions somatiques de DOCK8 qui atténuent la pathologie associée, il est possible que des événements similaires interviennent chez les patients de notre cohorte dont les atteintes sont notoirement moins sévères. Il faudrait donc trier différentes sous-populations lymphocytaires pour rechercher de tels événements. Alternativement, nous ne pouvons pas exclure que des mutations sur un autre gène viennent aggraver le phénotype des patients de la cohorte autrichienne (hypothèse digénique). Enfin, il reste possible que des infections par des pathogènes expliquent les différences de phénotypes observés entre les patients porteurs de mutations faux-sens.

Les mutations p.R1885C du patient P-G, p.L1298R du patient P-A, et p.D414Y des patients jumeaux P-D1 et P-D2 sont associées aux activations de CDC42 les plus faibles de notre cohorte. La mutation p.R1885C du patient G est située au site de contact entre le DHR2 et la région switch I de CDC42, qui joue un rôle majeur dans son activation, ce qui explique possiblement la perte de plus de 60% de l'activation de CDC42. L'activation des DOCKs conduisant à l'interaction entre le domaine DHR2 des DOCKs et CDC42 après stimulation reste peu décrite dans la littérature.

La mutation p.D414Y des patients P-D1 et P-D2 est localisée à l'interface du domaine C2-DHR1, domaine d'interaction potentielle avec des protéines partenaires de DOCK11. Ces mutations pourraient perturber l'interaction de DOCK11 avec les protéines partenaires impliquées dans son activation ou sa fonction GEF. Dans l'interactome de DOCK11 réalisé dans les lymphocytes T primaires à l'état basal, CDC42 n'est pas retrouvé parmi les partenaires protéiques. Bien qu'il puisse s'agir d'un biais technique, il est possible que DOCK11 et CDC42 n'interagissent

physiquement qu'après stimulation. La participation de protéines partenaires à l'activation de cette interaction est possible. Deux protéines GEF de la famille Dbl sont retrouvées parmi les protéines partenaires de DOCK11 (ARHGEF6 et ARHGEF7). L'interaction entre ces deux types de GEF n'a jamais été identifiée dans la littérature. Cette interaction potentielle pourrait contribuer à leurs fonctions GEF ou participer à leurs régulations respectives. DOCK11 semble interagir également avec une protéine GAP dont la fonction est le maintien de l'activation de CDC42 (ARHGAP45). La perte d'interaction de DOCK11 avec une protéine GAP pourrait favoriser la baisse de l'activation de CDC42.

Le domaine Armadillo (ARM) constitue une plateforme dynamique d'interaction avec plusieurs protéines en fonction des voies de signalisation activées[408]. Les séquences répétitives dans ce domaine permettent la flexibilité de la protéine qui contribue au dynamisme des interactions protéiques. Les fonctions du domaine ARM de DOCK11 n'ont pas été identifiées à ce jour. La mutation p.L1298R du patient P-A se situe dans le noyau hydrophobe des répétitions du domaine ARM. Cette mutation pourrait diminuer la flexibilité de la protéine limitant l'interaction dynamique avec les partenaires. Les mutations p.R1366Q du patient P-F et p.H1336R du patient P-B sont également localisés dans le domaine ARM. Si l'activation de CDC42 dans les plaquettes du patient P-B n'a pas pu être mesurée, celle du patient P-F est modérément diminuée de 20%. La taille des plaquettes est dans la fourchette haute de celle des contrôles, suggérant un impact modéré de la baisse d'activation de CDC42. Devant la présentation inflammatoire du patient et la prédominance de lamellipodes dans ses plaquettes, nous avons mesuré l'activation de RHOA qui est fortement augmentée dans ses plaquettes. L'activité RHOA est également augmentée chez le patient P-A dont la mutation se trouve dans le domaine ARM. Dans la littérature, l'interaction directe ou indirecte entre la GTPase RHOA et le domaine ARM via des partenaires a été décrite pour certaines protéines Armadillo[409]. Le domaine ARM de la protéine DOCK11 mutée pourrait induire une perturbation de l'équilibre CDC42/RHOA au profit d'une hyperactivation RHOA associée à une inflammation digestive. Chez ces patients, le développement des manifestations inflammatoires serait davantage associé à un déséquilibre entre CDC42/RHOA qu'à la baisse de l'activation CDC42 seule. Il est possible que la sévérité du syndrome auto-inflammatoire des patients de la cohorte autrichienne soit liée à la baisse de l'activation de CDC42 et une hyperactivation RHOA non contrôlée.

L'équilibre spatio-temporel de GTPases RHO est finement régulé et est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. La sévérité du phénotype des patients porteurs de mutations de CDC42 peut-être indépendante du niveau d'activation de CDC42 et suggère un rôle de de la localisation de la forme activée de CDC42. Harada et al ont montré une activation de CDC42 totale normale mais un défaut de l'activation de CDC42 localisée à l'avant des cellules dendritiques murines *Dock8* $^{-/-}$ dans des expériences de migration dans un environnement confiné[342] . Chez un patient avec un syndrome inflammatoire sévère, Delon et al ont montré que la rétention du variant CDC42 p.R186C dans l'appareil de Golgi était la

conséquence d'une modification post-traductionnelle anormale sans impact sur son activation *in vitro* par les GEF[129]. Le domaine PH de DOCK11 permet son ancrage à la membrane plasmique. La fonction GEF de DOCK11 est probablement importante au voisinage de la membrane plasmique. La mutation du patient P-C (p.T275S) est située à la fin du domaine PH qui permet l'ancrage de DOCK11 à la membrane plasmique. Une mutation dans ce domaine pourrait perturber la localisation de DOCK11 et conduirait à la baisse de l'activation de CDC42 à la membrane.
L'activité de CDC42 en aval de son activation perturbe l'organisation du cytosquelette dans les cellules des patients. Mais l'implication de son activation, de sa localisation et de l'équilibre entre les GTPases RHO dans la physiopathologie des patients avec un déficit en DOCK11 reste à déterminer.

Anomalies du remodelage de l'actine dans les cellules des patients

Le déséquilibre de l'activation des GTPases RHO conduit à des anomalies du remodelage de l'actine dans les lymphocytes T, les lymphocytes B immortalisés par l'EBV et les plaquettes des patients.
Dans les lymphocytes T des patients, l'activation de CDC42 n'a pas été mesurée de manière directe. La migration plus rapide à travers les micro-canaux et la polarisation de la polymérisation de l'actine à l'arrière de la cellule sont des observations en faveur d'une diminution de l'activité CDC42 localisée à l'avant des cellules. La même observation a été faite dans les deux cohortes suggérant le même impact des mutations sur la localisation spatio-temporelle de l'activité CDC42 pendant la migration des cellules T.
La morphologie des cellules T des patients semble être différente entre les deux cohortes. Cependant les matrices utilisées pour étaler les cellules et apprécier leurs morphologies ne sont pas les mêmes (Tableau.2). Dans l'étude de la cohorte autrichienne, la matrice d'adhésion est composée de fibronectine et stimule l'activation des intégrines. Le défaut de polarisation des lymphocytes T observé pourrait impliquer un défaut d'activation des intégrines également retrouvé dans les plaquettes des patients de notre cohorte. Dans notre cohorte, la matrice d'étalement est constitué de poly-L-Lysine et des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 qui stimulent l'activation du TCR. Les cellules B-EBV sont étalées sur une matrice qui contient des anticorps reconnaissant les récepteurs de la hyaluronane. Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage de l'actine dépendent du récepteur stimulé et conduisent à des anomalies du cytosquelette différentes dans les cellules des patients.
Le modèle de Knock-Down (KD) de DOCK11 dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC DOCK11-KD) met en évidence des anomalies du cytosquelette avec des protrusions aberrantes et des repliements de membrane anormaux. La présence de structures cytosquelettiques anormales pourrait résulter de la dérégulation de l'équilibre des GTPases RHO dans ces cellules plutôt que d'une baisse isolée de l'activation de CDC42.

Le lien direct entre le défaut de la fonction GEF de DOCK11 et les anomalies du cytosquelette n'a pas été démontré. Si CDC42 est un régulateur clef de l'organisation de l'actine, on ne peut exclure un rôle de DOCK11 indépendant de sa fonction GEF.

Le déficit en DOCK11 semble conduire à des anomalies du cytosquelette dans les cellules immunitaires et hématopoïétiques. La désorganisation du cytosquelette peut perturber des voies d'activation cruciales dans les cellules qui participent au développement de l'auto-immunité et de l'auto-inflammation chez ces patients. Dans le paragraphe suivant, nous discuterons des mécanismes possibles impliqués dans le développement de l'auto-immunité et de l'inflammation chez ces patients.

Mécanismes physiopathologiques conduisant à l'auto-immunité et l'inflammation dans le déficit en DOCK11

Un défaut de régulation du système immunitaire est suspecté devant la présentation auto-inflammatoire ou auto-immune sévère et précoce des patients atteints d'un déficit en DOCK11 (Fig.31).

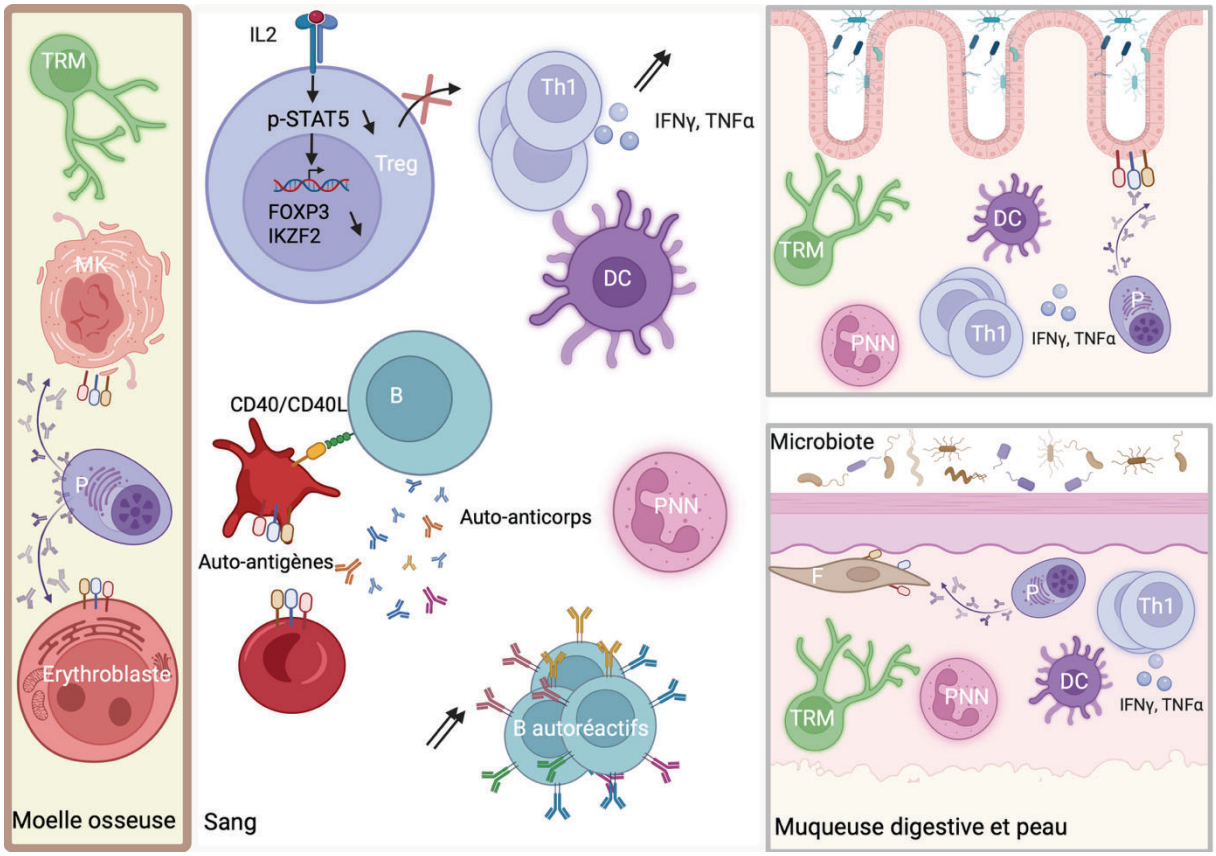


Figure 31.<u>Mécanismes pouvant conduire au développement de l'auto-immunité et de l'inflammation chez les patients avec un déficit en DOCK11.</u>

Le déficit en DOCK11 pourrait aboutir à une rupture de tolérance centrale et périphérique y compris tissulaire. Une rupture de tolérance centrale dans la moelle osseuse pourrait impliquer une dérégulation des lymphocytes T résidents mémoires (TRM) ou la production d'auto-anticorps par les plasmocytes (P) médullaires. Les érythroblastes ou les mégacaryocytes pourraient exposer des auto-antigènes à leur surface et médieraient la production d'autoanticorps. La rupture de tolérance périphérique dans le sang pourrait impliquer les Tregs, les polynucléaires neutrophiles, les DCs, une polarisation Th1, l'exposition d'auto-antigènes à la surface des plaquettes et des érythrocytes et l'expansion de lymphocytes B-autoréactifs. En l'absence de DOCK11 fonctionnel, le défaut de la voie IL-2/STAT5 dans les Tregs pourrait conduire à une diminution d'expression des facteurs de transcription FOXP3 et IKZF2. La baisse de ces facteurs de transcription pourrait entraîner la diminution des capacités suppressives des Tregs qui aboutirait à une expansion T effectrice. Une polarisation de la réponse effectrice Th1 produirait des cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNFα). Les anomalies du cytosquelette des plaquettes et des érythrocytes pourraient conduire à une exposition d'autoantigènes et de points de contrôles immunitaires comme CD40L à leur surface qui pourraient médier la réponse B. Une augmentation de la réponse B auto-réactive participerait à la rupture de tolérance périphérique. L'infiltration de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes T de type Th1 pourrait participer à l'inflammation tissulaire. Une présentation accrue par les DCs d'antigènes provenant du microbiote ou des auto-antigènes exposés à la surface des cellules tissulaires pourrait participer à l'inflammation locale. Les cellules TRM et P pourraient participer à la rupture de tolérance tissulaire.

La perturbation du cytosquelette dans les cellules immunitaires et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFNγ, IL1-β, IL-6, TNF-α, IL-18) suggèrent une rupture de l'homéostasie du système immunitaire inné et adaptatif.
La neutropénie auto-immune, l'infiltration inflammatoire cutanée et digestive de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans les biopsies de certains patients suggèrent la participation des PNN à la physiopathologie auto inflammatoire et auto-immune. Les PNN pourraient présenter également des anomalies du cytosquelette qui perturberaient leur migration et leur recrutement dans les tissus.

De nombreuses études décrivent le rôle des GTPases RHO, en particulier RHOA et CDC42, dans l'activation des inflammasomes, complexes essentiels de l'immunité innée[144,187,193,410]. L'activation de l'inflammasome conduit à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Block et al. ont montré que l'absence de DOCK11 dans la lignée THP1 n'a pas d'impact sur l'activation de l'inflammasome NLRP3[400]. Il est difficile d'exclure une activation de l'inflammasome dans les cellules primaires des patients.

Les MDDC DOCK11-KD présentent un cytosquelette remanié et produisent des quantités plus importantes d'IL-1β *in vitro* que les MDDC contrôles. La sécrétion anormalement élevée de cytokines inflammatoires, conjuguée à une morphologie aberrante, pourraient contribuer à un contrôle défaillant de la réponse immunitaire adaptative.

La dérégulation de la réponse immunitaire adaptative peut induire une réponse T effectrice inadaptée. Le biais de polarisation vers une réponse TH1 chez les patients participent à la dérégulation de la réponse immunitaire des lymphocytes T. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type TH1 est probablement impliquée dans le développement de l'inflammation chez ces patients[207,411]. L'augmentation de la translocation dans le noyau du facteur nucléaire des cellules T activées (NFATC1) dans les lymphocytes T est associée à la transcription de cytokines pro-inflammatoires par NFATC1 dans les lymphocytes T CD8+ de deux patients[400]. Une augmentation de la fonction de transcription de NFATc1 peut conduire à un mécanisme pro-inflammatoire des lymphocytes T CD8+ [412].

La régulation de la réponse inflammatoire implique les lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4+. Les manifestations auto-immunes associées à l'entéropathie des patients avec un déficit en DOCK11 sont similaires à celles des patients atteints du syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX) associé aux mutations du gène *FOXP3*[362]. Ce gène code pour le facteur de transcription FOXP3 qui est essentiel au développement, à l'établissement et au maintien du phénotype des Tregs. Son expression forcée dans des lymphocytes T CD4+ conduit à l'extinction de l'expression de l'IL-2, l'IL-4, IFNγ et des facteurs de transcriptions tels que NF-kb et NFATC1[413]. L'expression de FOXP3 étant diminuée dans les Tregs CD4+ circulants de trois patients il est possible qu'un défaut

fonctionnel de ces cellules soient, au moins en partie, responsable du défaut de tolérance immunitaire chez ces patients.
L'expression du facteur de transcription IKZF2 (Ikaros-family Zinc Finger2, ou HELIOS), essentiel au maintien des fonctions et la stabilité des T régulateurs [414], est également diminuée chez ces patients. Chez l'Homme, les mutations pertes de fonction dans le gène *IKZF2* sont associées à des manifestations auto-immunes, notamment des cytopénies auto-immunes, comme chez les patients atteints d'un déficit en DOCK11 [415]. Il serait intéressant de tester les capacités suppressives des Tregs des patients *in vitro.* Une diminution des capacités suppressives des Tregs permettrait de confirmer que la baisse d'expression de ces deux facteurs de transcription est suffisante pour altérer les fonctions T régulatrices et la rupture de tolérance immunologique chez ces patients. L'expression réduite de FOXP3 et IKZF2 pourrait déréguler l'expression de leurs gènes cibles comme l'expression de l'IL-2, l'IL-4 et IFNγ. Ceci pourrait se vérifier par analyse transcriptomique ou par dosage de ces cytokines dans le plasma des patients (avant traitement immunosuppresseur) ou dans des modèles cellulaires. Le cytosquelette est également impliqué dans la fonction suppressive par trogocytose des Tregs [416]. Lors de la trogocytose, les Tregs sont capables de retirer des molécules d'activation à la surface des cellules présentatrices d'antigènes pour supprimer leur activation. Cette fonction implique une régulation étroite du cytosquelette et pourrait être diminuée dans les T régulateurs des patients atteints de déficit en DOCK11.

Les liens entre les facteurs de transcription IKZF2, FOXP3, DOCK11 et le cytosquelette n'ont pas été décrits dans la littérature. Kim et al ont montré que les Tregs dépourvues de IKZF2 présentaient une expression instable de FOXP3 via un défaut d'activation de la voie de signalisation IL-2/STAT5 [414]. Les auteurs suggèrent l'implication de IKZF2 dans la signalisation la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-2. L'activation de la voie IL-2/STAT5 est diminuée dans les lymphocytes T des patients atteints d'un déficit en DOCK11 avec une expression du récepteur de l'IL-2 (IL-2R) normale. Ces résultats sont réimmiscent du défaut d'activation de voie IL-2/STAT5 dans les Tregs dépourvus de l'expression de DOCK8[417,345]. Il serait pertinent de tester les conséquences de cette diminution sur la translocation nucléaire de p-STAT5 et son activité transcriptionnelle. Le KO conditionnel de DOCK8 dans les Tregs murins conduit à un phénotype inflammatoire et auto-immun avec des cytopénies et une entéropathie similaire à celles des patients présentant un déficit en DOCK11. Chez les patients, la diminution de l'activation IL-2/STAT5 dans les lymphocytes T conventionnels et probablement dans les Tregs pourrait ainsi contribuer au défaut de tolérance périphérique observé.

Le rôle des protéines DOCK sur la régulation des voies JAK/STAT a été étudié dans les cellules des patients atteints d'un déficit en DOCK8. DOCK8 interagit directement et STAT5 et les active indépendamment de son activité GEF[20,22]. Contrairement à DOCK8, DOCK11 ne semble pas interagir physiquement à l'état basal avec STAT5 d'après les données d'interactome réalisé dans les lymphocytes T activés. DOCK11 pourrait interagir indirectement avec STAT5 par le

biais de partenaires après activation. Il n'est pas exclu que la protéine DOCK11 active la protéine DOCK8 qui pourrait à son tour activer STAT5.
L'activation de STAT5 pourrait être également dépendante de l'activité GEF de DOCK11. Les anomalies de cytosquelette peuvent perturber le changement de conformation de protéines membranaires. Les protéines STAT sont phosphorylées via la fonction tyrosine kinase des protéines kinase Janus (JAK)[418]. Les protéines JAK sont localisées à la membrane et associées de manière non covalente aux récepteurs de cytokines. Après une stimulation, la conformation de la protéine JAK se modifie en conformation ouverte pour phosphoryler le récepteur, permettant alors le recrutement et la phosphorylation des protéines STATs. Une dérégulation du cytosquelette en particulier proche de la membrane pourrait perturber le changement de conformation nécessaire à l'activation de certaines protéines membranaires dont les protéines JAK.

Les lymphocytes B jouent également un rôle essentiel dans le développement des maladies auto-immunes.
L'activation des lymphocytes B auto-réactifs peut déclencher la sécrétion d'anticorps (auto-réactifs) qui peuvent participer au développement de l'auto-immunité[419]. L'augmentation de lymphocytes B $CD19^{+}$ $CD21_{low}CD38_{low}$ circulants (enrichis en Lymphocytes B auto-réactifs) est associée à de nombreuses maladies auto-immunes. Un excès de cette sous population lymphocytaire B circulante est retrouvé chez la majorité des patients dans les deux cohortes.
Les cytokines APRIL et BAFF sécrétées entre autres par les cellules dendritiques sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules B auto-réactives en plasmocytes à longue durée de vie tissulaire[420]. L'augmentation de ces cytokines solubles pourrait contribuer à la présence de plasmocytes auto-réactifs à longue durée de vie tissulaire sécrétant des auto-anticorps chez les patients.
La proportion de lymphocytes B mémoires circulants est diminuée chez la quasi-totalité des patients. Les traitements ciblant les lymphocytes B peuvent altérer à long terme le nombre de lymphocytes B mémoires en particulier chez les patients présentant un déficit immunitaire combiné[421]. Cependant, certains patients n'avaient pas reçu de traitement visant à dépléter les lymphocytes B, ce qui suggère un rôle de DOCK11 dans les cellules B mémoires. Les dosages pondéraux des immunoglobulines sont fluctuants et les lymphocytes B ne semblent pas présenter de défaut de prolifération ou de commutation isotypique *in vitro*. A l'exception de deux patients, les patients atteints de déficit en DOCK11 n'ont pas présenté d'infections sévères récurrentes malgré une forte pression immunosuppressive suggérant une absence de défaut humoral sévère.

Les agents infectieux peuvent participer au déclenchement de manifestations inflammatoires et auto-immunes dites post infectieuses[422]. Un défaut des réponses B pourrait contribuer à la dérégulation du système immunitaire post-infectieux.

Les données dans le modèle murin KO (Knockout) DOCK11 montrent un défaut léger de la réponse humorale secondaire, une augmentation du développement précoce des lymphocytes B de la moelle osseuse et une diminution des lymphocytes B de la zone marginale (MZ)[423,391]. La proportion des cellules MZB circulantes est également diminuée chez certains patients. Les lymphocytes MZB sont situés à l'interface entre la circulation sanguine et la pulpe blanche de la rate et ils constituent une première ligne de défense en produisant rapidement des anticorps IgM et IgG en réponse à une infection[424]. Ils sont également impliqués dans la réponse humorale de type innée en produisant des anticorps en réponse à des antigènes commensaux de la muqueuse intestinale. Si DOCK11 joue un rôle dans l'homéostasie des cellules M B, une dysfonction de cette protéine pourrait altérer l'immunité innée tissulaire impliquant les lymphocytes B.

Les atteintes dysimmunes des tissus des patients en particulier de la peau et de la muqueuse digestive suggèrent une perturbation de l'immunité tissulaire. La migration de cellules immunitaires et la persistance de cellules lymphocytaires et macrophagiques résidentes dans les tissus participent à l'homéostasie tissulaire[425–427]. La diminution des proportions des cellules NK et des MAITs circulants peut s'expliquer par une augmentation de leur localisation tissulaire chez les patients. Dans les biopsies cutanées et digestives, on retrouve des infiltrats inflammatoires suggérant une rupture de l'équilibre immunitaire tissulaire. L'interaction entre le microbiote et les barrières tissulaires joue un rôle majeur dans l'établissement de la tolérance immunologique [428]. DOCK11 pourrait donc jouer un rôle dans le système immunitaire intra-tissulaire mais également dans les cellules tissulaires dites « non immunitaires ».

D'après les bases de données, la protéine DOCK11 est exprimée dans les cellules hématopoïétiques mais également dans d'autres types cellulaires[429]. Les images de microscopies des fibroblastes du patient P-A montrent une morphologie cellulaire particulière avec des protrusions aberrantes. Si les anomalies du cytosquelette se confirment dans les fibroblastes des autres patients, ces cellules altérées pourraient participer à la perte de la perméabilité et de l'homéostasie tissulaire.
Le défaut de régulation du cytosquelette des cellules non immunitaires pourrait conduire à l'exposition d'auto-antigènes à leurs surfaces ou à leurs sécrétions. L'exposition de ces auto-antigènes pourrait causer et/ou renforcer la production d'auto-anticorps.
La perturbation des fonctions inhérentes aux cellules tissulaires par dysfonction de DOCK11 pourrait précéder le développement de l'inflammation et de l'auto-immunité.

Les mécanismes impliqués dans le développement des manifestations auto-immunes et inflammatoires peuvent être multiples. Ils varient probablement en fonction des conséquences des mutations sur les cellules immunitaires et tissulaires.
Les cellules hématopoïétiques non immunitaires des patients présentent des anomalies morphologiques et pourraient être impliquées dans le développement de la maladie.

Compréhension des anomalies des plaquettes et des globules rouges

La thrombopénie associée à une anomalie de la taille des plaquettes est souvent présente chez les patients atteints d'actinopathies[95].

La macro-thrombocytopénie des patients avec un déficit en DOCK11 est similaire à celle associée aux mutations de CDC42 localisée dans le domaine switch I d'activation[134,430]. Des travaux suggèrent l'implication d'un défaut de cytosquelette dans les mégacaryocytes qui conduit à la formation de plaquettes de taille anormale et en plus faible nombre chez les patients porteurs de mutations de CDC42[138]. Les mégacaryocytes avec une dysfonction de DOCK11 pourraient participer au développement d'une macro-thrombocytopénie ainsi qu'à une rupture de tolérance.

Le caractère fluctuant de la thrombopénie, l'association avec une autre cytopénie auto-immune et la réponse aux thérapies immunomodulatrices évoquent une thrombopénie immunologique. Sereni et al ont montré le rôle autonome des plaquettes dans le développement de l'auto-immunité antiplaquettaire dans un modèle murin de KO conditionnel de WASP dans la lignée mégacaryocytaire[102]. L'expression anormale du ligand de CD40 (CD40L) conduirait à une suractivation des lymphocytes B et possiblement à la production d'anticorps contre les auto-antigènes plaquettaires. Les mégacaryocytes et les plaquettes avec des anomalies du remodelage de l'actine pourraient conduire à un défaut de tolérance centrale et périphérique aboutissant à une auto-immunité anti plaquettaire.

Les anomalies du cytosquelette, la thrombopénie et le défaut de l'activation de l'intégrine αIIBβIII ne perturbent pas les fonctions hémostatiques. Les plaquettes expriment certains points de contrôles immunitaires et des voies d'activation présentes dans les cellules immunitaires qui font suspecter un rôle immunologique[431]. La dérégulation du rôle immunologique des plaquettes pourrait ainsi participer aux mécanismes d'auto-immunité et d'inflammation chez ces patients.

La majorité des patients présente une atteinte érythrocytaire qui se manifeste par une anémie et des anomalies fluctuante de taille de globules rouges. Le caractère fluctuant de l'anémie, la taille variable des globules rouges et la présence aléatoire d'auto-anticorps anti-globules rouges révèlent la complexité des mécanismes de l'anémie qui est probablement multifactorielle.

Un mécanisme non immunologique de l'anémie est suspecté chez les patients avec un syndrome auto-inflammatoire. CDC42 joue un rôle majeur dans l'équilibre entre la différenciation érythrocytaire et myélocytaire dans la moelle[166]. Les explorations menées chez un des patients présentant une absence d'expression de DOCK11 montrent une diminution de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse et une augmentation de l'hématopoïèse extra-médullaire dans la rate. Ces résultats suggèrent que DOCK11 pourrait jouer un rôle dans l'érythropoïèse et la morphologie des progéniteurs érythrocytaires.

L'anémie hémolytique auto-immune se manifeste également dans d'autres pathologies du cytosquelette[95]. L'exposition d'auto-antigènes à la surface des progéniteurs érythrocytaires ou des globules rouges pourrait conduire au développement ou au maintien de la réponse auto-immune. Par exemple, les pathologies de membrane du globule rouge comme la drépanocytose peuvent s'associer à des maladies auto-immunes[432]. Les progéniteurs érythrocytaires et les globules rouges pourraient être impliqués dans la tolérance immunitaire périphérique et centrale et DOCK11 y jouerait un rôle dépendant ou indépendant de son activité GEF.

Un modèle murin dépourvu de DOCK11 serait nécessaire pour mieux comprendre les anomalies plaquettaires et l'anémie associées au déficit en DOCK11. Cependant les souris KO DOCK11 décrites dans la littérature ne semblent pas développer de phénotype.

Un modèle murin qui ne récapitule pas le phénotype clinique ?

Des dosages des cytokines pro-inflammatoires fluctuants et des anomalies de répartition des populations lymphocytaires B ont été identifiés chez les souris KO DOCK11 qui ne développent cependant pas de manifestations cliniques[391,392,400].
L'absence de phénotype clinique des souris KO DOCK11 contraste avec les manifestations sévères et précoces des patients. L'évolution des souris dans un environnement faiblement exposé aux antigènes pourrait limiter le déclenchement de l'auto-immunité. L'absence de phénotype dans le modèle murin KO DOCK11 devrait être vérifiée après stimulations antigéniques ou après colonisation microbienne des muqueuses digestives et de la peau.
Matsuda et al ont identifié une plus faible expression de DOCK11 chez les souris âgées par rapport aux souris plus jeunes dans les lymphocytes B[391]. Les auteurs suggèrent le rôle protecteur de DOCK11 contre le vieillissement ou immunosénescence des lymphocytes B. Une étude très récente décrit au contraire l'augmentation de l'expression de DOCK11 dans les CSH avec l'âge[433]. Xu et al suggère le rôle de l'accumulation de DOCK11 dans la sénescence des CSH. L'expression du marqueur de senescence CD57 est augmenté dans certaines sous-populations lymphocytaires des patients qui développent de l'auto-immunité. L'altération progressive du système immunitaire avec l'âge participe au développement de l'auto-immunité et l'inflammation chez les sujets âgés[434,435]. Les dommages à l'ADN participent aux mécanismes d'immunosénescence. Des études décrivant les mécanismes d'infection par le virus de l'hépatite B mettent en évidence l'implication de DOCK11 dans la réplication de l'ADN viral [393].
DOCK11 semble jouer un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN comme le suggère la présence de partenaires impliqués dans la réparation de l'ADN dans l'interactome de DOCK11 (XRCC1).

Parmi les partenaires, des protéines impliquées dans la régulation des télomères (TNKS, USP7) ont été identifiées. La taille des télomères diminue avec l'âge et est impliquée dans le

vieillissement cellulaire[436]. Si les interactions entre la protéine DOCK11 et les protéines de régulation des télomères sont confirmées, l'immunosénescence pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques du déficit en DOCK11. Les souris ont des télomères plus longs que chez l'Homme[437]. Certaines maladies des télomères chez l'Homme ne sont pas reproduites dans le modèle murin car le raccourcissement des télomères n'y est pas aussi important. Si la dérégulation des télomères est impliquée dans le développement de l'auto-immunité et de l'inflammation, le modèle murin ne serait pas adéquat dans l'étude de la rupture de tolérance dans le déficit en DOCK11.

Le modèle murin actuel semble insuffisant pour avancer dans la compréhension des rôles de DOCK11.
L'élargissement de la cohorte de patients atteints de déficit en DOCK11 permettrait de confirmer les anomalies cellulaires déjà décrites et leurs implications potentielles dans le développement de la maladie.

Constitution d'une cohorte de patients atteints de déficit en DOCK11

Depuis la première description, nous avons collecté une trentaine de patients masculins avec des variants de *DOCK11* associés à des scores de prédictions variables. Certains patients présentent des phénotypes similaires à ceux déjà décrits ou des phénotypes différents.
En l'état actuel de nos connaissances, le diagnostic du déficit en DOCK11 repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et cellulaires. La survenue précoce de cytopénies auto-immunes, d'atteintes cutanées et de manifestations digestives inflammatoires chez des garçons peut faire penser à un déficit en DOCK11, mais ces manifestations ne sont pas spécifiques. Un excès de lymphocytes B auto-réactifs et un défaut B mémoire peuvent être un argument supplémentaire. Si l'expression de la protéine DOCK11 est normale, une diminution de l'activité de CDC42 et des anomalies du cytosquelette de plusieurs types cellulaires orientent vers le caractère délétère d'un variant DOCK11. Une baisse d'activation de la voie IL-2/STAT5 et la baisse d'expression de FOXP3 et IKZF2 dans les T régulateurs constituent des arguments supplémentaires pour un déficit en DOCK11. L'ensemble de ces tests ne constituent pas un test diagnostic spécifique rapide et reproductible disponible en laboratoire pour diagnostiquer un déficit en DOCK11.

L'étude de cette cohorte grandissante nous permettra d'étayer les connaissances sur les anomalies cliniques, biologiques et cellulaires associées à une dysfonction de la protéine.
Pour affirmer ou infirmer la pathogénicité d'un variant, des modèles d'expression ectopique sont fréquemment utilisés dans des lignées cellulaires immortalisés *in vitro*. Cependant, le caractère immortalisé de ces cellules induit des remaniements du cytosquelette et une perturbation des GTPases RHO. De plus, l'expression des partenaires protéiques potentiels de

DOCK11 n'étant pas connue, il est possible que la lignée choisie ne soit pas pertinente pour valider un variant de DOCK11.
Cependant, la mesure de l'activité CDC42 dans un modèle de cellules immortalisées dans laquelle les mutations de DOCK11 sont introduites par editing pourrait être une première étape de caractérisation des variants. Les contrôles positifs seraient : un variant déjà décrit avec perte d'expression de la protéine DOCK11 et un variant associé à une expression de la protéine DOCK11 et une faible activation de CDC42.

Chez les mères vectrices, l'inactivation de l'X porteur de la mutation du gène *DOCK11* est aléatoire. Parmi les mères vectrices, certaines ont eu des antécédents de cancers dont l'incidence est élevée en population générale. L'élargissement de la cohorte permettra d'étudier un éventuel biais d'inactivation dans les sous-populations cellulaires qui présentent des anomalies chez leurs enfants.

Le continuum du caractère auto-immun et inflammatoire des patients décrits est un biais de recrutement de nos laboratoires et on ne peut exclure la possibilité d'un phénotype différent associé à un déficit en DOCK11. Un défaut d'une des fonctions non liées à CDC42 de DOCK11 pourrait également être associé à un déficit en DOCK11.
Une meilleure connaissance des rôles de DOCK11 dans les différents types cellulaires est essentielle pour améliorer le diagnostic de ces patients et proposer des thérapeutiques adaptées.

DOCK9 est un des partenaires privilégiés de DOCK11 et appartient à la même famille DOCK-D. L'implication de DOCK9 dans le système immunitaire n'a jamais été décrite. L'étude du rôle de DOCK9 permettrait d'élargir les connaissances sur les membres de la famille DOCK-D.

DOCK9

Chez une patiente atteinte de lipodystrophie auto-immune généralisée, d'un vitiligo sévère et d'une pelade, nous avons identifié deux mutations faux sens hétérozygotes composites de *DOCK9*. Le rôle de DOCK9 est très peu décrit dans la littérature et aucune mutation de *DOCK9* n'a été rapportée à ce jour chez l'Homme. Il est important de confirmer le caractère délétère des mutations.

Comment évaluer le caractère délétère des mutations ?

Les mutations n'affectent pas l'expression de la protéine DOCK9 dans les plaquettes et les lymphocytes T de la patiente. L'activation de CDC42 est basse dans les plaquettes de la patiente faisant suspecter un défaut de la fonction GEF de DOCK9.
Plus de dix-neuf isoformes de DOCK9 sont décrites dans les bases de données mais il n'existe pas d'information quant à leurs fonctions potentielles. Certaines ont des poids moléculaires similaires et leurs séquences se distinguent principalement au niveau de l'exon 1 et de l'intron 1-2[438]. La mutation faux sens (p.L54Q) héritée du père se situe dans l'exon 1 ou dans l'intron 1-2 en fonction de l'isoforme. Si cette mutation est délétère, il est possible que parmi les isoformes de même poids moléculaire, certaines soient affectées et pas d'autres. La deuxième mutation faux sens (p.F408L) héritée de la mère est située dans l'exon 12. L'exon 12 semble être partagé par de nombreuses isoformes. Si les mutations sont délétères, les cellules de la patiente pourraient exprimer certaines isoformes ou des isoformes aberrantes par rapport aux cellules contrôles.
Si la pénétrance des variants est complète, l'association de deux variants hérités de chacun des deux parents est nécessaire pour développer la maladie. La mesure de l'activation de CDC42 après introduction de chaque variant dans un modèle cellulaire *in vitro* permettrait de déterminer le caractère délétère des variants seuls ou en association. La correction des anomalies cellulaires identifiées chez la patiente après apport de la forme sauvage de la protéine DOCK9 confirmerait la dysfonction de la protéine DOCK9 mutée.

La connaissance des isoformes ciblées par les mutations est nécessaire pour l'introduction des variants potentiellement délétères *in vitro* et la complémentation par la forme sauvage de l'isoforme déficiente. L'analyse transcriptomique par séquençage long read permettra une analyse quantitative des différents transcrits de DOCK9 exprimés dans les cellules de la patiente et de contrôles.

Le caractère délétère des mutations de DOCK9 n'est pour l'instant pas confirmé. Cependant une dysfonction de DOCK9 est probable devant la baisse de l'activation de CDC42 et les anomalies du remodelage de l'actine dans les cellules primaires de la patiente.

Comment définir un défaut fonctionnel de DOCK9 ?

La fonction GEF de DOCK9 est l'activation de CDC42 qui est diminuée dans les plaquettes de la patiente. Des anomalies du cytosquelette des plaquettes résultent probablement du défaut d'activité CDC42 en aval de son activation. La formation de nodule d'actine dans les plaquettes implique la voie ARP2/3/WASP et semble altérée dans les plaquettes de la patiente. Les lymphocytes T de la patiente et du KO DOCK9 ont une vitesse de migration élevée. Ces résultats préliminaires suggèrent un défaut de la fonction GEF de DOCK9 chez la patiente. A ce jour, nous n'avons réussi à générer des cellules T primaires KO DOCK9 seulement chez un seul donneur. La connaissance des isoformes exprimées dans ce type cellulaire permettrait de concevoir des guides de CRISPR qui cibleront le maximum d'isoformes pour obtenir des cellules T KO DOCK9 chez plusieurs donneurs.
Le défaut de remodelage de l'actine dans les cellules la patiente semble être similaire à celui retrouvé dans les cellules déficientes en DOCK11. DOCK9 contient également un domaine PH qui permet son ancrage à la membrane. La fonction GEF de DOCK9 et de DOCK11 sont probablement redondantes et localisées à proximité de la membrane plasmique.
Compte-tenu de la différence de présentation clinique entre la patiente et les patients de déficit en DOCK11, les fonctions de DOCK9 et de DOCK11 sont probablement différentes, en particulier les fonctions indépendantes de l'activité GEF.

Même s'il reste difficile de conclure sur des résultats préliminaires sur les cellules d'un seul patient, les explorations réalisées permettent de formuler quelques hypothèses sur les rôles de DOCK9.

Rôle de DOCK9 dans l'activation de STAT5

Les stimulations par l'IL-7 ou l'IL-15 induisent une hyperactivation de STAT5 dans les cellules T de la patiente et les cellules KO DOCK9. L'hyperactivation des voies IL-7/STAT5 et IL-15/STAT5 est importante dans les lymphocytes T CD8+ de la patiente et est plus modérée dans les lymphocytes T CD4+. Là encore il faudrait voir si les différentes isoformes de DOCK9 sont aussi bien exprimées dans les T CD8+ que dans les TCD4+.
DOCK9 semble participer à la régulation de l'activation de STAT5 médiée par l'IL-7 et l'Il-15. La mise en évidence de la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de STAT5 et la transcription de gènes cibles de p-STAT5 permettrait de confirmer l'hyperactivité des voies IL-7/STAT5 et IL-15/STAT5[439].
Le rôle de DOCK9 dans l'activation de STAT5 n'est pas décrit dans la littérature et STAT5 n'est pas une protéine partenaire identifiée dans l'interactome de DOCK9 dans les lymphocytes T. L'absence d'interaction physique entre DOCK9 et STAT5 devra être confirmée par immunoprécipitation pour s'affranchir d'un biais technique de la spectrométrie de masse.

L'augmentation de l'expression soluble et membranaire de l'IL-7R et de la fraction soluble de l'IL-15R pourrait participer à l'hyperactivation des voies IL-7/STAT5 et IL-15/STAT5.
Une activation normale de STAT5 après stimulation par une autre cytokine orienterait vers un rôle spécifique de DOCK9 dans la régulation des voies IL-7/STAT5 et IL-15/STAT5.
La mesure de l'activation d'autres STATs stimulée par IL-7 et IL-15 comme STAT1 et STAT3 permettrait de préciser la fonction de DOCK9 dans les voies de signalisations activées par IL-7 et IL-15.
Comme discuté précédemment dans la partie DOCK11, une dysfonction de DOCK11 ou DOCK8 altère négativement la voie IL-2/STAT5 et DOCK8 interagit physiquement avec STAT5.
DOCK8, DOCK9 et DOCK11 sont probablement impliqués dans la régulation de STAT5 mais les rôles spécifiques de DOCK9 et de DOCK11 restent à déterminer.
La signalisation de STAT5 est impliquée dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8+. lors d'une exposition chronique à l'antigène[440]. Beltra et al ont récemment montré le rôle de STAT5 dans la reconfiguration de lymphocytes T CD8+ épuisés en lymphocytes T CD8+ effecteurs de durée prolongée. L'immunophénotypage montre une expansion de lymphocytes T CD8+ effecteurs et centraux mémoires circulants chez la patiente. DOCK9 pourrait participer à la régulation de l'activité de STAT5. Une dysfonction de DOCK9 conduirait à une hyperactivation de STAT5 et une expansion de T CD8+ effecteurs et mémoires chez la patiente.
La différenciation des TCD8 mémoires en TCD8+ résidents mémoires des tissus implique la diminution de l'expression de l'IL-18R[441]. L'expression membranaire d'IL-18R semble être diminuée *in vitro* dans la population CD8+ des lymphocytes T de la patiente. Cette diminution suggère une possible différenciation d'une partie de la population TCD8+ vers une population TCD8+ mémoire résidente.

<u>Le défaut fonctionnel de DOCK9 favorise-t 'il l'expansion des T CD8+ dans les tissus ?</u>

Les chimiokines CCL19, CXCL10 et CXCL9 sont impliquées dans la migration des cellules immunitaires, en particulier la migration de lymphocytes T CD8+ dans la peau chez les patients atteints de vitiligo[442]. L'augmentation de ces chimiokines et le vitiligo généralisé sévère de la patiente suggère une auto-immunité tissulaire médiée par les lymphocytes T CD8+ . Les lipodystrophies peuvent être associées à une expansion de T CD8+ dans le tissu adipeux[443,444]. Les cellules T CD8+ sont également impliquées dans la stéatose hépatique non alcoolique[445]. Une infiltration de T CD8+ est retrouvée dans le cuir chevelu des patients atteints de pelade[446]. L'analyse des biopsies cutanées et hépatiques pré-greffe permettraient de confirmer la présence d'un infiltrat T CD8+ dans ces tissus. L'analyse transcriptomique des tissus aiderait à distinguer les différentes populations immunitaires, en particulier T CD8+, présentes et les voies activées dans ces populations. L'analyse des cellules non immunitaires permettrait quant à elle d'évaluer les voies dérégulées dans ces cellules tissulaires. L'expression de DOCK9 dans les cellules de la peau, du foie et dans les adipocytes et les atteintes sévères de ces tissus chez la patiente sont en faveur d'un rôle intrinsèque de la dysfonction de DOCK9 dans ces cellules.

Un déficit en DOCK9 peut-il conduire à un vitiligo sévère et une alopécie ?

Le vitiligo est un défaut de pigmentation de la peau induit par une destruction auto-immune des mélanocytes[447]. La dérégulation des fonctions CD8+ chez la patiente pourrait participer au développement du vitiligo. Cependant l'évolution du vitiligo généralisée d'emblée très sévère, et l'expression de DOCK9 dans les cellules cutanées suggèrent une dysfonction intrinsèque des cellules tissulaires (Fig.32).

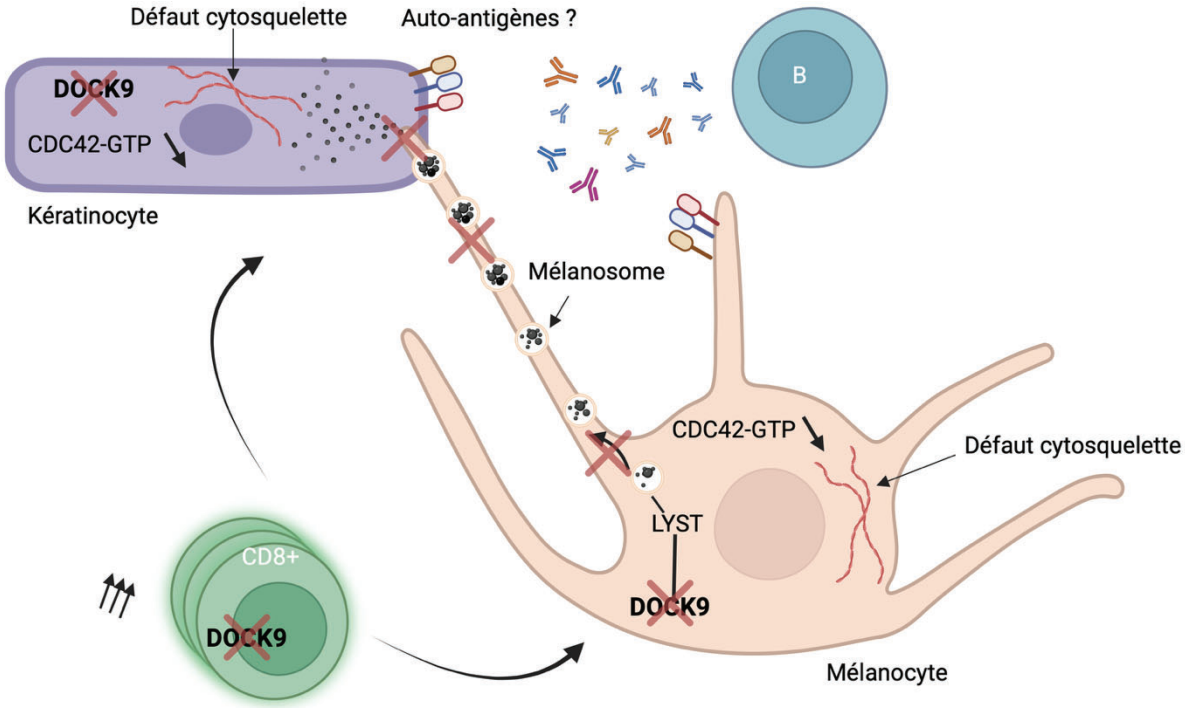


Figure 32. Mécanismes potentiels impliqués dans le développement du vitiligo en cas de déficit en DOCK9 dans la peau.
Un déficit en DOCK9 pourrait favoriser une expansion de TCD8+ dans la peau qui participerait à la destruction des mélanocytes et ou des kératinocytes. Un défaut fonctionnel de DOCK9 dans le mélanocyte entrainerait un défaut d'activation de CDC42 et des anomalies de cytosquelette. Le défaut de remodelage de l'actine et la perte d'interaction de DOCK9 avec la protéine de transport LYST pourrait empêcher le transport des mélanosomes qui contiennent la mélanine vers le kératinocyte. Une diminution du transport des mélanosomes entrainerait une baisse de pigmentation du kératinocyte. Un déficit en DOCK9 pourrait conduire également à un défaut d'activation de CDC42 et de régulation du cytosquelette dans le kératinocyte. Les anomalies du cytosquelette du kératinocyte et du mélanocyte pourraient modifier l'interface de communication entre le mélanocyte et le kératinocyte nécessaire à la pigmentation. L'exposition d'auto-antigènes à la surface du mélanocyte et du kératinocyte pourrait médier une réponse auto-réactive B et participer à leur destruction. L'ensemble de ces mécanismes pourrait contribuer au développement d'un vitiligo généralisé sévère.

CDC42 régule des fonctions importantes des mélanocytes dont la migration, la polarisation et la formation de dendrites mélanocytaires[227,228]. Un défaut de la fonction GEF de DOCK9 entrainerait un défaut de remodelage de l'actine dans les mélanocytes. La protéine DOCK9 dans les fibroblastes de la patiente semble perdre l'interaction avec la protéine LYST impliquée dans le transport des mélanosomes essentiel à la pigmentation de la peau[448].
Un dysfonctionnement de DOCK9 intrinsèque aux mélanocytes pourrait perturber les fonctions des mélanocytes et le transport des mélanosomes et participerait au développement du vitiligo.
La pelade est une maladie auto-immune chronique touchant les follicules pileux. Les follicules pileux sont constitués de kératinocytes et de mélanocytes. CDC42 participe à la régulation des follicules pileux et aux fonctions des kératinocytes[233,234].
Un défaut d'activation de CDC42 par DOCK9 pourrait ainsi altérer le follicule pileux et les kératinocytes. Parmi les protéines partenaires de DOCK9 associées aux filaments intermédiaires, on retrouve des protéines associées aux kératines (KRT). Ces protéines jouent un rôle crucial dans l'homéostasie des cheveux[449]. Une dysfonction de DOCK9 pourrait donc contribuer à l'alopécie.

Par ailleurs, les anomalies de cytosquelette des mélanocytes et des kératinocytes pourraient entrainer une exposition accrue d'auto-antigènes qui participerait à la destruction de ces cellules.

Les atteintes cutanées de la patiente ont débuté à partir de l'âge de 4 ans ce qui suggère un mécanisme mixte à la fois auto-immun et intrinsèque aux cellules cutanées et impliquerait une dysfonction DOCK9. Un rôle de DOCK9 est également suspecté dans le développement de l'atrophie du tissu adipeux apparue secondairement chez la patiente.

<u>Un déficit en DOCK9 peut-il conduire à une lipodystrophie?</u>

La perturbation de l'activité CDC42 et du cytosquelette des adipocytes pourrait altérer le tissu adipeux (Fig.33).

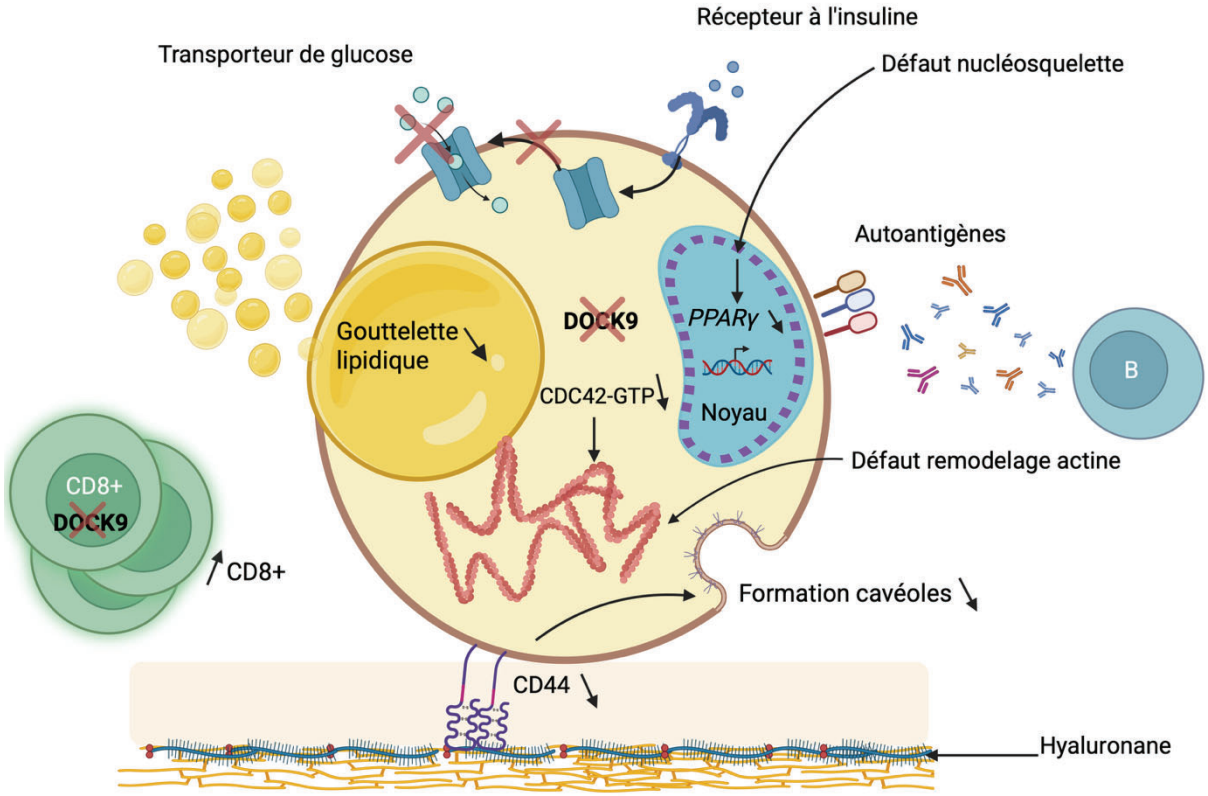


Figure 33. Mécanismes potentiels impliqués dans l'altération du tissu adipeux en cas de déficit en DOCK9

Un déficit en DOCK9 pourrait favoriser une expansion de TCD8+ dans le tissu adipeux participant à l'inflammation et à la destruction des adipocytes. Un défaut de DOCK9 dans l'adipocyte conduirait à une diminution de l'activation de CDC42, des anomalies du cytosquelette et du nucléosquelette. Un défaut de remodelage du cytosquelette pourrait conduire à une diminution de l'expression membranaire de CD44, une dérégulation de la formation des cavéoles, un défaut de transport des transporteurs de glucose et une diminution des gouttelettes lipidiques de l'adipocyte. L'exposition à la surface d'auto-antigènes pourrait médier la réponse B et pourrait participer à l'auto-immunité anti-adipocytaire. Un défaut de remodelage de nucléosquelette pourrait conduire à une diminution de transcription de gène impliqués dans l'adipogénèse comme PPARγ.

L'activité CDC42 est impliquée dans la différenciation adipocytaire et dans l'équilibre entre l'adipogénèse et la myogénèse[221]. Un défaut d'activité GEF de DOCK9 pourrait alors perturber l'adipogénèse au profit de la myogènese et participer à l'atrophie du tissu adipeux et l'hypertrophie musculaire observées chez la patiente.

CD44 est une glycoprotéine membranaire exprimée notamment par les lymphocytes, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules musculaires[450]. L'expression membranaire de CD44 est diminuée dans les lymphocytes T de la patiente et dans les cellules KO DOCK9 ce qui suggère un rôle de DOCK9 dans la régulation de CD44. CD44 comprend un domaine cytoplasmique possédant des motifs de liaison pour les protéines liées au cytosquelette, un

domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire. Le domaine extracellulaire de CD44 se lie à l'acide hyaluronique (HA), composant majeur de la matrice extracellulaire [450]. Lors d'une contrainte mécanique, le complexe CD44/HA permet l'interaction avec des protéines du cytosquelette, l'activation des GTPases RHO et la formation de radeaux lipidiques à la membrane plasmique qui forment une plateforme de signalisation. Cette plateforme permet le recrutement de molécules de signalisation intracellulaire vers la membrane plasmique et déclenche de nombreuses cascades de signalisation. Les cavéoles, qui sont des invaginations membranaires spécialisées, sont impliquées dans un processus de mécanotransduction [66,68]. Des mutations perte de fonction du gène *CAV1,* codant la protéine cavéoline-1, sont associées à des lipodystrophies généralisées chez l'humain et la souris [451,452]. La diminution de l'expression membranaire de CD44 dans les adipocytes pourrait altérer la formation des cavéoles et participer au développement de la lipodystrophie chez la patiente.

La dérégulation de l'expression membranaire de différents récepteurs suggère une déstabilisation de la membrane plasmique, des anomalies de transport à la membrane ou du recyclage des molécules. L'expression de l'IL-6R semble dérégulée dans les cellules déficientes en ARPC5[118]*.* DOCK10 pourrait réguler l'expression du récepteur CD23 à la surface des lymphocytes B[385]. L'expression membranaire de certains récepteurs semble donc être régulée par des protéines impliquée dans la dynamique du cytosquelette. DOCK9 pourrait réguler l'expression de points de contrôles immunitaires et de certains récepteurs à la membrane dont CD44 et des récepteurs de cytokines.

L'absence de nombreuses protéines membranaires dans l'interactome de DOCK9 analysé dans les fibroblastes de la patiente par comparaison à celui des fibroblastes issus d'un donneur sain pourrait contribuer aux anomalies membranaires. La présence de nouvelles protéines partenaires de DOCK9 de la famille des glycoprotéines dans les fibroblastes de la patiente pourrait perturber les fonctions de la membrane plasmique de ces cellules. De plus, les deux mutations faux-sens de la patiente se situent de part et d'autre du domaine PH qui permet l'ancrage à la membrane de DOCK9. Si les mutations sont délétères, elles pourraient altérer probablement la fonction du domaine PH et l'ancrage de DOCK9 à la membrane ou aux vésicules de transport. L'étude des cellules en microscopie de haute résolution permettra de déterminer les localisations cellulaires de DOCK9.

Parmi les partenaires de DOCK9 dans les lymphocytes T, on retrouve des protéines nucléaires et des protéines associées à l'organisation des filaments intermédiaires. Certaines mutations du gène *LMNA* codant la Lamine A sont associées à une lipodystrophie généralisée chez l'homme [78]. La lamine A est une protéine nucléaire de filaments intermédiaires qui est impliquée dans la dynamique du nucléosquelette. DOCK9 pourrait participer à la régulation du nucléosquelette. La reproduction des résultats de migration par constriction dans les cellules de la patiente et dans les cellules KO DOCK9 renforcerait cette hypothèse. Une dysfonction de

DOCK9 pourrait ainsi entraîner un défaut de remodelage du nucléosquelette des cellules adipocytaires ce qui contribuerait à l'atrophie du tissu adipeux.

La lipodystrophie sévère de la patiente s'est développée après les manifestations cutanées. Des études suggèrent le rôle des cellules de la peau dans la régulation des adipocytes sous cutanés[225]. La dysfonction du tissu cutané pourrait également participer à l'atrophie du tissu adipeux sous-jacent.

La présence d'auto-anticorps anti-adipocytes suggère un mécanisme mixte dont une auto-immunité dirigée contre le tissu adipeux.

L'atrophie du tissu graisseux entraine l'accumulation des acides gras dans le foie, le pancréas et les muscles. La lipodystrophie sévère se complique donc de stéatose hépatique, de diabète insulino-résistant et d'une hypertrophie musculaire[453]. Une dysfonction de DOCK9 dans ces organes pourrait donc contribuer à la sévérité de ces complications chez la patiente.

<u>Un défaut de DOCK9 peut-elle conduire à un diabète et une stéatose hépatique sévère ?</u>

La récidive de la stéatose hépatique après la greffe hépatique élimine probablement un rôle intrinsèque de DOCK9 dans le foie. La stéatose du foie de la patiente s'est compliquée d'une volumineuse hyperplasie nodulaire régénérative (HNR). Cette entité est classifiée comme une maladie vasculaire hépatique qui entraine la formation de nodule de parenchyme hépatique[454]. Abraham et al suggèrent un rôle de DOCK9 en interaction avec DOCK4 dans l'endothélium[297]. Une dysfonction de DOCK9 pourrait alors conduire à des lésions vasculaires dans le foie qui participerait à la sévérité de l'HNR.

L'insulino-résistance se définit par une diminution de l'absorption de glucose par les cellules en réponse à une stimulation à l'insuline. La signalisation de l'insuline active l'expression membranaire des transporteurs du glucose qui permettent l'entrée du glucose dans la cellule[215,455]. Un défaut de remodelage de l'actine pourrait altérer le transport à la membrane des transporteurs (Fig.33). Une anomalie de la fonction GEF de DOCK9 entrainerait une diminution de la réponse à l'insuline qui participerait à l'insulino-résistance chez cette patiente.

Un déficit en DOCK9 pourrait être responsable des manifestations cliniques sévères à début précoce chez la patiente. Les mécanismes impliquent une auto-immunité médiée par les CD8+ et des anomalies intrinsèques aux cellules tissulaires. L'absence d'auto-anticorps en dehors des anticorps anti-adipocytaires contraste avec la présentation clinique sévère. DOCK9 n'est pas exprimée dans les lymphocytes B contrairement à DOCK11 ce qui pourrait limiter une production étendue d'auto-anticorps[370].
Le modèle murin KO DOCK9 aidera à déterminer les fonctions cellulaires de DOCK9 et éventuellement récapituler le phénotype de la patiente.

Quel est l'apport du modèle murin dans la compréhension des fonctions de DOCK9 ?

Nous avons généré un modèle murin avec une perte d'expression de DOCK9 pour reproduire le phénotype de la patiente, s'affranchir de l'effet des multiples traitements pris par la patiente et étudier plus précisément les mécanismes physiopathologiques impliqués.
Les mâles *Dock9*$^{-/-}$ et *Dock9* $^{-/+}$ développent une stagnation de la prise pondérale à partir de 20 semaines de vie avec un défaut de masse grasse. Les femelles *Dock9*$^{-/-}$ ne présentent pas de stagnation pondérale y compris après 30 semaines de vie et n'ont pas de défaut de masse grasse.
L'augmentation de l'expression ARN des marqueurs inflammatoires IL-6 et TNF-α suggère une inflammation du tissu adipeux chez les mâles. Les cytokines adipocytaires semblent être altérées dans le tissu adipeux avec la diminution de l'expression ARN de la leptine.
Ces résultats préliminaires suggèrent une dérégulation du tissu adipeux chez les souris mâles *Dock9*$^{-/-}$ et *Dock9* $^{-/+}$.
Les résultats des souris mâles *Dock9* $^{-/+}$ semblent montrer un phénotype clinique et cellulaire intermédiaire. Une diminution d'expression protéique de DOCK9 chez les mâles *Dock9* $^{-/+}$ permettrait d'expliquer ce phénotype intermédiaire. Nous allons donc contrôler l'expression protéique de DOCK9 chez ces mâles.
Des marqueurs liés au métabolisme gluco-lipidique dans les adipocytes murins différenciés sont perturbés en l'absence d'expression de DOCK9. Ces résultats suggèrent un rôle de DOCK9 dans l'homéostasie lipidique des adipocytes.

Sur le plan immunologique, les splénocytes cultivés des souris *Dock9*$^{-/-}$ montrent une expansion des lymphocytes T CD8^{+} et des sous population cellulaires TCD4^{+} et TCD8^{+} centraux mémoires. Nous prévoyons d'effectuer un immunophénotypage des cellules circulantes et des tissus des souris pour évaluer le rôle de DOCK9 dans la répartition et la localisation des différentes populations immunitaires.
Le développement d'une insulino-résistance liée à la lipodystrophie chez les souris KO DOCK9 n'a pas encore été exploré.

Les mâles *Dock9*$^{-/-}$ et *Dock9* $^{-/+}$ présentent une lipodystrophie de survenue tardive mais ne développent pas de vitiligo ni d'alopécie dans un environnement propre. Les femelles *Dock9*$^{-/-}$

ne semblent pas présenter de phénotype. Les guides de CRISPR peuvent éventuellement cibler des gènes en dehors du gène d'intérêt. Une vérification par séquençage de l'exome entier est nécessaire pour écarter l'effet d'un gène hors cible dans le phénotype.

Ces résultats contrastent avec le sexe de la patiente, l'âge précoce de survenue de sa maladie et la sévérité de son atteinte cutanée.
Des modèles murins de lipodystrophie publiés dans la littérature montrent chez les femelles une lipodystrophie atténuée voir absente et une tolérance au glucose parfois augmentée contrairement aux mâles [456]. L'accumulation de lipides peut être plus importante dans le foie des femelles et augmente le poids du foie. Il serait intéressant de peser le foie des femelles pour évaluer la présence de stéatose hépatique pouvant fausser la prise de poids.
Le vitiligo est la première manifestation de la maladie de la patiente qui s'est développée après une période d'exposition aux infections virales de la petite enfance. Dans les modèles murins publiés dans la littérature, le développement du vitiligo nécessite souvent une stimulation antigénique locale, systémique ou la modification du fonds génétique[457,458].
La stimulation antigénique ou un fonds génétique particulier pourraient être nécessaires pour déclencher le vitiligo et l'alopécie chez les souris mâles et femelles KO DOCK9.
Si le phénotype lipodystrophique de la patiente implique une composante auto-immune, la stimulation antigénique pourrait accélérer la survenue de la lipodystrophie chez les souris mâles voire femelles KO DOCK9.
Le dosage des cytokines circulantes, la présence d'anticorps anti-adipocytaires, l'expression membranaire des récepteurs de cytokines et l'activation de STAT5 vont nous permettre d'évaluer la contribution du système immunitaire chez les souris déficientes en DOCK9.
La délétion conditionnelle de DOCK9 dans les progéniteurs adipocytaires, dans les lymphocytes T ou les lymphocytes T $CD8^+$ permettrait d'étudier le rôle intrinsèque des adipocytes, des cellules de la peau et du système immunitaire dans le développement de la maladie.
Les résultats préliminaires du modèle murin KO DOCK9 suggère un rôle de DOCK9 dans le tissu adipeux des souris mâles.

<u>Comment identifier de nouveaux variants DOCK9 ?</u>

Le recrutement d'autres patients atteints de déficit en DOCK9 est important pour pouvoir confirmer les résultats obtenus dans les cellules de la première patiente. Afin de pouvoir cibler les patients candidats, il faut définir des critères cliniques et biologiques permettant d'envisager un déficit en DOCK9 ou un déficit dans une protéine partenaire de DOCK9. Au vu de la présentation clinique de la patiente et des souris, la présence d'une lipodystrophie auto-immune associée à d'autres manifestations dysimmunes notamment cutanées pourrait faire rechercher des variants délétères de DOCK9.

Les protéines DOCKs peuvent partager la même fonction GEF et leurs rôles peuvent être redondants. L'étude des déficits en DOCK chez l'Homme et dans les modèles murins permettent une meilleure compréhension des fonctions des protéines DOCK.

DOCK9/DOCK11 et DOCK8

Dans ce dernier chapitre, nous discuterons des rôles spécifiques de DOCK8 et des DOCK9/DOCK11 dans le système immunitaire.

Rôles redondants ou opposés de DOCK8 et de DOCK9/ DOCK11

DOCK8, DOCK9 et DOCK11 partagent la même fonction d'activation de CDC42.
Bien que leur activité GEF semble redondante, les patients atteints de déficit en DOCK8 présentent des infections cutanéo-muqueuses récurrentes et une maladie allergique sévère contrairement aux patients atteints de déficit en DOCK11[330].
La localisation spatio-temporelle de l'activation de CDC42 joue un rôle crucial dans la régulation du cytosquelette. DOCK8 ne contient pas de domaine PH qui permet l'ancrage à la membrane plasmique. La différence de localisation entre les DOCK-9/10/11 et DOCK8 suggère une activation de CDC42 spatio-temporelle distincte.

En dehors de leurs rôles de GEF, les protéines DOCK8, DOCK9 et DOCK11 interagissent avec des partenaires différents. La perturbation des interactions protéiques participe à la dysfonction des protéines DOCK et peut altérer des fonctions différentes selon les protéines ciblées.
Les voies JAK/STAT impliquant STAT5 semblent être altérées chez les patients avec un déficit en DOCK8, en DOCK9 ou en DOCK11. DOCK8 et DOCK11 jouent probablement un rôle redondant dans les T régulateurs dans la voie d'activation IL-2/STAT5 comme le suggère le phénotype auto-immun de la souris KO DOCK8 uniquement dans les T régulateurs [417]. Le défaut de la réponse T effectrice chez les patients atteints de déficit en DOCK8 et la souris *Dock8*$^{-/-}$ prévient probablement le développement d'une auto-immunité sévère.

Les atteintes cutanéo-muqueuses se retrouvent chez les patients avec un défaut en DOCK8, DOCK11 ou DOCK9. L'atteinte tissulaire est infectieuse et allergique en l'absence de DOCK8 ou bien auto-immune et inflammatoire si les protéines DOCK11 ou DOCK9 sont dysfonctionnelles. L'homéostasie de l'immunité tissulaire semble perturbée par le déficit en DOCK8 ou en DOCK-D.
Les cellules T KO DOCK8 ont une survie limitée lors de leurs migrations en milieu confiné[332]. La mort cellulaire anormale au cours de la migration des cellules déficientes en DOCK8 empêche la génération de lymphocytes T CD8 mémoires résidents (TRM) de la peau, impliqués dans le

contrôle des infections cutanées virales. Les TRM activés de manière aberrante sont associés à des maladies auto-immunes et inflammatoires comme dans les maladies inflammatoires du tube digestif et le vitiligo[427,459]. L'activation probable des lymphocytes TRM chez les patients atteints de déficit en DOCK9 ou DOCK11 suggère un rôle opposé entre les protéines DOCK8 et DOCK-D dans cette population lymphocytaire. DOCK8 participerait à l'activation de la population TRM tandis que DOCK9/DOCK11 participerait à leur inhibition dans les tissus.
Une dysbiose de la muqueuse digestive médiée par un défaut de la réponse TH17 participe au développement de la maladie allergique chez les souris KO DOCK8[343]. Le déséquilibre du microbiote a été identifié dans de nombreuses pathologies inflammatoires et digestives[428]. Une augmentation des réponses effectrices TH1 et TH17 locales chez les patients atteints de déficit en DOCK11 pourrait entraîner une dysbiose digestive et cutanée qui participerait à l'atteinte cutanéo-muqueuse inflammatoire.
La balance entre DOCK8 et DOCK11 pourrait également être impliquée dans la régulation des réponses effectrices tissulaires et l'homéostasie tissulaire (Fig.34).
La comparaison des analyses transcriptomiques des tissus cutanés et digestifs des patients atteints de déficit en DOCK8, DOCK11 et de DOCK9 permettrait de mieux connaitre le rôle de ces protéines DOCK dans l'immunité tissulaire.

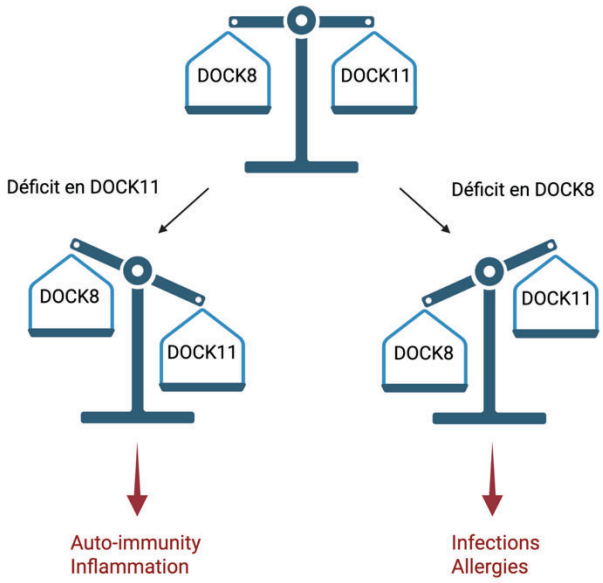


Figure 34. Équilibre entre DOCK8 et DOCK11 dans les lymphocytes T
Un équilibre entre les fonctions de DOCK8 et de DOCK11 est probable dans les lymphocytes T effecteurs et mémoires. Un déficit en DOCK11 conduirait à une augmentation de DOCK8 qui participerait à un excès de la réponse T effectrice et des T résidents mémoires dans les tissus. Un déficit en DOCK8 conduirait à une augmentation de DOCK11 qui participerait à une diminution de la réponse T effectrice et des T résidents mémoires dans les tissus.

La protéine DOCK11 est impliquée dans les mécanismes d'infections à VHB[393]. Ce virus semble utiliser la protéine DOCK11 de l'hôte pour empêcher sa dégradation intracellulaire et favoriser la réplication de son ADN viral dans les hépatocytes. Bien que le rôle de DOCK11 n'ait pas été étudié dans d'autres infections virales, la protéine DOCK11 semble participer à l'échappement du pathogène aux mécanismes de défense intracellulaire. Le blocage des interactions entre DOCK11 et ses partenaires *in vitro* diminue la charge virale du VHB. La dysfonction de la protéine DOCK11 chez les patients atteints de déficit en DOCK11 conférerait une résistance à certaines infections virales.
S'il existe un équilibre entre DOCK8 et DOCK11 dans les cellules hôtes, un déficit en DOCK8 conduirait à une fonction plus importante de DOCK11 favorisant l'infection de ces cellules et la diminution de la défense intracellulaire anti-virale.
En présence d'une stimulation infectieuse ou inflammatoire, l'activation de protéines DOCK pourrait réguler celles d'autres protéines DOCK en aval.

Phosphorylation des DOCK en cascade ?

Les bases de données sur les sites des modifications post-traductionnelles des protéines répertorient plusieurs sites de phosphorylation possible sur les protéines DOCK[460,461]. Les formes phosphorylées des protéines DOCK3 et de DOCK7 ont été identifiées dans la littérature[302,322]. La forme phosphorylée d'une protéine DOCK pourrait constituer la forme active ou inactive de la protéine. Une organisation en plusieurs cascades de phosphorylation des protéines DOCK de la membrane au noyau est une hypothèse à considérer au regard de leur probable interaction. Ces cascades de phosphorylation pourraient être différentes d'un type cellulaire à l'autre en fonction de l'expression des protéines DOCK (Fig.3.).
Par exemple DOCK2, DOCK3, DOCK5, DOCK7 et DOCK9 semblent jouer un rôle dans le métabolisme. Ils pourraient interagir entre eux dans le tissu adipeux ou participer à la régulation de l'activation des uns et des autres.

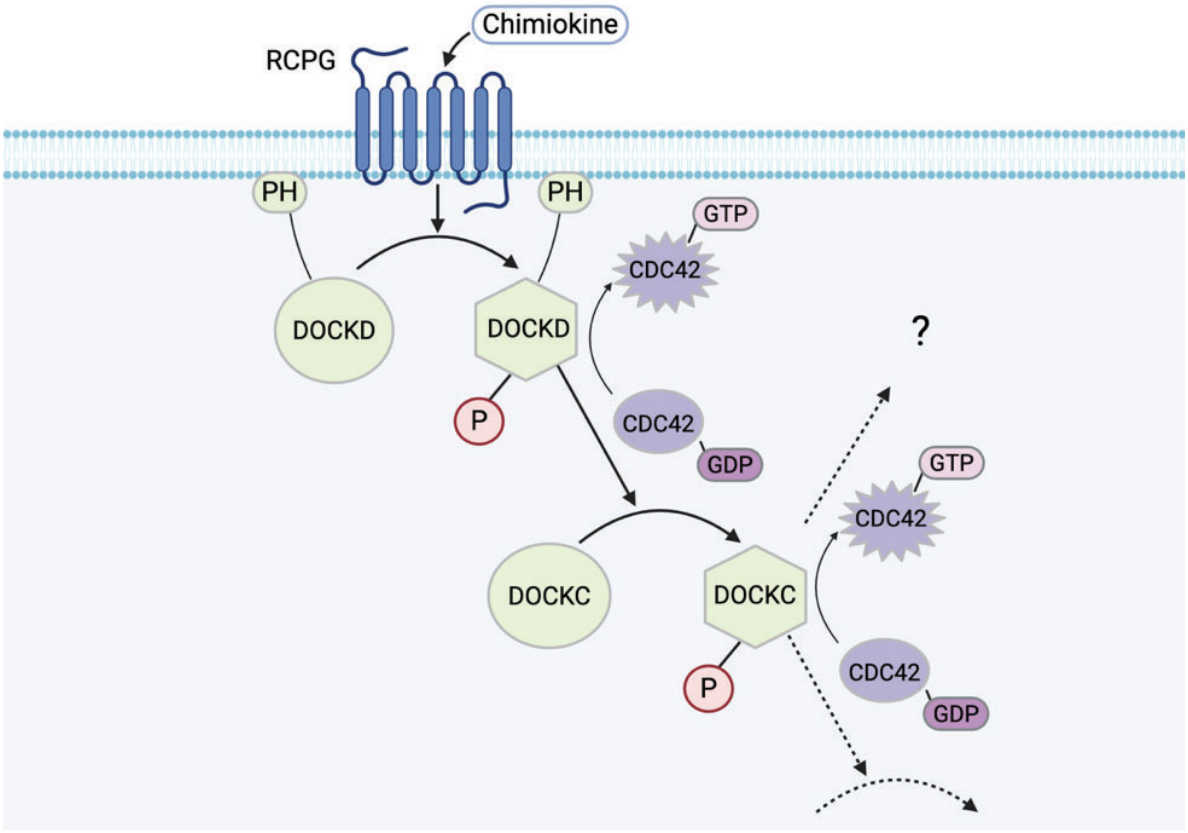


Figure 35.Modèle de la phosphorylation en cascade des protéines DOCKs

Après une stimulation par chimiokine d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), les protéines DOCK de la sous-famille DOCK-D s'activent. L'activation de la première protéine DOCK ancrée à la membrane par son domaine PH conduit à sa phosphorylation et à l'activation de CDC42. La forme phosphorylée de cette première protéine DOCK active à son tour une autre protéine DOCK non ancrée à la membrane. La deuxième protéine DOCK membre par exemple de la sous-famille DOCK-C s'active par phosphorylation et active CDC42. La phosphorylation de la deuxième protéine DOCK pourrait conduire au rapprochement de cette protéine à la membrane pour y activer CDC42.

CONCLUSION

Dans ce travail de thèse, nous avons identifié une nouvelle actinopathie liée au système immunitaire, le déficit en DOCK11. Ce déficit lié au chromosome X est associé à un spectre de phénotype variable allant d'un syndrome auto-inflammatoire sévère à une auto-immunité précoce et des manifestations inflammatoires. Le déficit en DOCK11 entraîne une altération de l'activation de CDC42 et de STAT5 qui sont respectivement associées à un remodelage anormal du cytosquelette d'actine ainsi qu'à un phénotype Tregs anormal, possiblement en lien avec une dérégulation immunitaire et à une auto-immunité sévère d'apparition précoce.
L'étude des partenaires protéiques de DOCK11 a permis d'identifier une interaction physique entre DOCK11 et DOCK9, tous les deux membres de la même sous-famille DOCK-D. Nous suspectons un déficit en DOCK9 chez une patiente qui présente une auto-immunité des tissus graisseux et cutanés associée à deux mutations hétérozygotes composites de DOCK9.
L'étude de patients avec un déficit en DOCK11 et en DOCK9 et celle des modèles murins permettront une meilleure compréhension de leurs rôles respectifs dans le système immunitaire.

ANNEXES

JCI

The Journal of Clinical Investigation

September 2024
Volume 134
Number 17
jci.org



RAP1B variants alter platelet integrin activation and lymphocyte trafficking

Somatic *RAP1B* gain-of-function variant underlies isolated thrombocytopenia and immunodeficiency

Marta Benavides-Nieto,[1,2,3] Frédéric Adam,[4] Emmanuel Martin,[5] Charlotte Boussard,[1,6,7] Chantal Lagresle-Peyrou,[8,9] Isabelle Callebaut,[10] Alexandre Kauskot,[4] Christelle Repérant,[4] Miao Feng,[4] Jean-Claude Bordet,[11] Martin Castelle,[6] Guillaume Morelle,[1,6] Chantal Brouzes,[12] Mohammed Zarhrate,[13] Patricia Panikulam,[1,14] Nathalie Lambert,[15] Capucine Picard,[1,5,15,16] Damien Bodet,[17] Jérémie Rouger-Gaudichon,[17] Patrick Revy,[1,2] Jean-Pierre de Villartay,[1,2] and Despina Moshous[1,2,6,16]

[1]Université Paris Cité, Paris, France. [2]Imagine Institute, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Ligue 2023, INSERM UMR 1163, Paris, France. [3]General Pediatrics–Infectious Diseases and Internal Medicine, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) Nord, Paris, France. [4]INSERM UMR S 1176, Laboratory for Hemostasis, Inflammation and Thrombosis (HITh), Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France. [5]Laboratory Lymphocyte Activation and Susceptibility to EBV infection, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France. [6]Pediatric Immunology, Hematology and Rheumatology, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France. [7]Laboratory Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France. [8]Biotherapy Clinical Investigation Center, AP-HP, Paris, France. [9]Laboratory Human Lymphohematopoiesis, INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France. [10]Sorbonne University, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, Paris, France. [11]Laboratoire d'Hémostase, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. [12]Laboratory of Onco-Hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France, and INSERM U1151, Institut Necker-Enfants Malades, Paris, France. [13]Genomics Core Facility, Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 and INSERM US24/CNRS UAR3633, Paris Descartes Sorbonne Paris Cité University, Paris, France. [14]Laboratory "Molecular basis of altered immune homeostasis," INSERM UMR 1163, Imagine Institute, Paris, France. [15]Study Center for Primary Immunodeficiencies, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France. [16]Centre de Référence des Déficits Immunitaires Héréditaires (CEREDIH), Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France. [17]CHU de Caen Normandie, Onco-Immunohématologie Pédiatrique, Caen, France.

The ubiquitously expressed small GTPase Ras-related protein 1B (*RAP1B*) acts as a molecular switch that regulates cell signaling, cytoskeletal remodeling, and cell trafficking and activates integrins in platelets and lymphocytes. The residue G12 in the P-loop is required for the RAP1B-GTPase conformational switch. Heterozygous germline *RAP1B* variants have been described in patients with syndromic thrombocytopenia. However, the causality and pathophysiological impact remained unexplored. We report a boy with neonatal thrombocytopenia, combined immunodeficiency, neutropenia, and monocytopenia caused by a heterozygous de novo single nucleotide substitution, c.35G>A (p.G12E) in *RAP1B*. We demonstrate that G12E and the previously described G12V and G60R were gain-of-function variants that increased RAP1B activation, talin recruitment, and integrin activation, thereby modifying late responses such as platelet activation, T cell proliferation, and migration. We show that in our patient, G12E was a somatic variant whose allele frequency decreased over time in the peripheral immune compartment, but remained stable in bone marrow cells, suggesting a differential effect in distinct cell populations. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation fully restored the patient's hemato-immunological phenotype. Our findings define monoallelic *RAP1B* gain-of-function variants as a cause for constitutive immunodeficiency and thrombocytopenia. The phenotypic spectrum ranged from isolated hematological manifestations in our patient with somatic mosaicism to complex syndromic features in patients with reported germline *RAP1B* variants.

Introduction

Thanks to next-generation sequencing (NGS) approaches, the list of genetic syndromes that cause thrombocytopenia has grown in recent years and now includes over 40 genes (1). However, there are still patients with presumed constitutional thrombocytopenia who lack a molecular etiology despite extensive genetic testing. Within this group, an increasing number of human pathologies have highlighted the interplay between the actin cytoskeleton and Ras homology (Rho) GTPases, signaling proteins with crucial roles in triggering multiple immune functions. Through their interactions with a broad range of effectors and kinases, they regulate cytoskeletal dynamics, cell polarity, and immune cell trafficking and proliferation. Defects in Rho GTPases lead to various immune pathologies, including combined immune deficiencies (2). Variants in genes encoding Rho GTPase effectors, such as MYH9, a member of the ARP2/3 complex, WASP, and DIAPH1, are associated with inherited human thrombocyte disorders (3), Wiskott-Aldrich syndrome and its clinical triad comprising microthrombocytopenia, eczema, and immunodeficiency being the most prominent example (4).

Authorship note: MBN and FA are co–first authors and contributed equally to this work. EM and C Boussard contributed equally to this work.
Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.
Copyright: © 2024, Benavides-Nieto et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Submitted: March 7, 2023; **Accepted:** July 10, 2024; **Published:** September 3, 2024.
Reference information: *J Clin Invest*. 2024;134(17):e169994.
https://doi.org/10.1172/JCI169994.

Table 1. P1's hematological features

	Before HSCT															HSCT	After HSCT		
Age	3 d	9 d	2 wk	3 wk	Ref. values	5 wk	4 mo	6 mo	8 mo	12 mo	Ref. values	13 mo	15 mo	18 mo	23 mo	Ref. values	24 mo	49 mo	56 mo	Ref. values
Hemoglobin (g/dl)	18	17.3	14.6	13.1	13–20	9.1	9.5	9.6	10.2	11.9	9.5–13.5	9.6	9.8	9.9	7.6	11–14		11	11.5	11–14
Platelets $\times 10^3$ (/μl)	18	21	20	12	150–450	15	20	22	26	26	150–450	20	15	27	16	150–450		243	296	150–450
MPV (fl)										10.7	8.4–10.7	8.4				8.4–10.7		9.1	9.1	8.4–10.7
Leukocytes (/μl)	5,900	4,330	1,860	1,360	6,000–21,000	1,290	880	2,340	2,140	2,100	6,000–17,500	850	1,100	1,000	1,000	5,000–17,000		8,200	8,800	5,000–17,000
Neutrophils (/μl)		2,620	580	500	1,500–5,000	320	260	1,690	1,170	1,190	1,500–8,500	320	600	500	400	1,500–8,500		4,400	4,400	1,500–8,500
Monocytes (/μl)		440	390	250	400–3,000	310	120	330	410	270	300–1,500	180	200	100	200	300–1,500				300–1,000
Lymphocytes (/μl)		990	800	650	4,054–7,048	640	510	360	540	130	3,320–7,006	350	384	400	400	3,873–6,141		2,700	3,130	2,340–5,028

P1's hematological parameters before and after HSCT at different ages compared with age-matched hospital reference values. MPV, mean platelet volume; Ref., reference.

Here we report a patient with neonatal thrombocytopenia and bleeding diathesis associated with neutropenia, monocytopenia, and combined immunodeficiency (CID). Whole-exome sequencing (WES) analysis identified a monoallelic de novo RAS-related protein 1b (*RAP1B*) variant, a gene encoding a factor of the cytoskeleton/Rho-GTPase network. Heterozygous *RAP1B* germline variants have been recently described in patients with syndromic thrombocytopenia (ST) associated with multiple clinical features ranging from facial dysmorphia, microcephaly, and neurodevelopmental delay to organ involvement, particularly brain, heart, kidney, and skeletal abnormalities (5, 6). While these patients developed mild neutro- and lymphopenia, they had no clinical history suggesting an associated immunodeficiency. However, neither their immune nor platelet function had been investigated. It has been speculated that germline gain-of-function (GOF) *RAP1B* variants may be causative, but so far, no comprehensive functional studies have been performed.

Our study provides evidence that the *RAP1B* variant in our patient as well as two recently described *RAP1B* variants in patients with ST were GOF variants impairing platelet activation. Thus, our study defines monoallelic GOF *RAP1B* variants as cause for primary immunodeficiency associated with thrombocytopenia.

Results

Clinical and immune-hematological phenotype. A full-term eutrophic boy (patient 1 [P1]), born to nonrelated White parents, presented neonatal petechiae without any other clinical features. Whole blood count (WBC) revealed severe thrombocytopenia, lymphopenia, neutropenia, and monocytopenia (Table 1). At 1 week of age, bone marrow (BM) smear was hypocellular, displaying rare megakaryocytes. BM biopsy at the age of 3 months (M3) showed megakaryocyte maturation defects and granular hypoplasia, while BM immune phenotype and karyotype were normal. Extensive etiological investigations were negative (Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; https://doi.org/10.1172/JCI169994DS1). Intriguingly, hemorrhagic manifestations were more important than expected, given platelet counts requiring repeated platelet transfusions. At M8, neutropenia persisted. Hypogammaglobulinemia and low $CD4^+$, $CD8^+$, and naive T cell counts (Table 2) were consistent with CID. However, P1 did not suffer from severe infections under antimicrobial prophylaxis (trimethoprim-sulfamethoxazole, valacyclovir) and immunoglobulin substitution. BM smear at M18 showed decreased cellularity for age and only rare, abnormal, hypolobed megakaryocytes (Figure 1A).

Given the severe immunohematological condition, P1 received a 10/10 HLA allele-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) at the age of 2 years after myeloablative conditioning with busulfan, fludarabine, and antithymocyte globulin. He achieved 100% donor chimerism and excellent hematological and immunological reconstitution (Table 1 and Table 2). At last follow-up 62 months after HSCT, P1, aged 7.2 years, was alive and well and off treatment.

Overall, the association of severe early onset thrombocytopenia, neutropenia, monocytopenia, and CID, corrected by allogenic HSCT, was consistent with an inborn hematopoietic and immune disorder.

P1 carries a monoallelic de novo RAP1B c.35G>A p.G12E variant. WES on genomic DNA (gDNA) from PBMCs revealed the heterozygous single nucleotide substitution c.35G>A in the ubiquitously expressed *RAP1B* gene (NCBI ID, NM_001010942.3, Chr12:68648759) causing p.G12E in P1, but not in his parents. Sanger sequencing confirmed that this variant was de novo (Figure 1B). *RAP1B* RNA was present in P1 PBMCs, which carried the c.35G>A variant in a heterozygous state. We considered RAP1B a strong candidate, as its GTP-bound active form mediates integrin activation in platelets and lymphocytes (7–10). RAP1B-G12E variant (hereafter referred to as G12E) was absent in public (Genome Aggregation Database [gnomAD]) (11) and in-house databases and had not been described in patients, to our knowledge, at the time we started our investigations. It was predicted deleterious according to in silico tools including Combined Annotation Dependent Depletion

Table 2. P1's immunological phenotype

				Before HSCT						HSCT	After HSCT		
Age	6 mo	8 mo	Ref. values	13 mo	15 mo	18 mo	21 mo	23 mo	Ref. values	24 mo	49 mo	56 mo	Ref. values
$CD3^+$ (/μl)		261	1,900–5,900	230	234	239	281	212	2,542–4,933		2,207	2,191	1578–3,707
$CD4^+$ (/μl)		140	1,400–4,300	126	123	123	135	122	1,573–2,949		1,207	1,114	870–2,144
$CD8^+$ (/μl)		80	500–1,700	85	88	89	110	68	656–1,432		665	703	472–1,107
$CD31^+CD45RA^+/CD4^+$ (%) RTE		33	60–72			32	22	59	57–65		60	56.6	57–65
$CD45RO^+/CD4^+$ (%) memory		28				28	44.5	35.1			27		15.6–27.5
$CD45RA^+CCR7^+/CD8^+$ (%) naive		1.5	52–68			40	35	72.1	52–68		61		57–92.4
$CD45RA^-CCR7^+/CD8^+$ (%) central memory		58.5	3–4			5.5	0.5	19.4	3–4		5.5		5.9–22.3
$CD45RA^-CCR7^-/CD8^+$ (%) effector memory		10	11–20			36	7.5	3.8	11–20		25		11–20
$CD45RA^+CCR7^-/CD8^+$ (%) TEMRA		30	16–28			18.5	57	3.5	16–28		8.5		16–28
$CD19^+$ (/μl)		100	776–2,238	85	111	92	110	70	733–1,338		665	528	434–1,274
$CD16^+CD56^+$ (/μl)		125	230–801	26	31	50	110	27	186–724		121	135	155–565
Nonstimulated proliferation ($cpm/10^3$)					0.63				0.7–2				
PHA induced proliferation ($cpm/10^3$)					48				>50				
IgG (g/L)	1.92	Start IRT	2.4–4.4	4.89		6.38	7.04	10.1	4.82–8.96		5.84	Stop IRT 7.64	4.8–9
IgA (g/L)	0.09		0.27–0.86	0.43		0.08	0.13	0.33	0.33–1.22		0.34	1.06	0.41–1.41
IgM (g/L)	<0.2		0.34–1.14	0.29		0.14	0.16	0.18	0.25–1.53		0.58	1.19	0.54–1.53
TCRgd $CD3^+$ (%)								1.7	0.2–14				
$CD127^{lo}CD25^+/CD4^+$ (%) regulatory								4.9	2.9–7.4				
$Va7^+CD161^+/CD3^+$ (%) MAIT								1.39	0.5–10				
$Va24^+Vb11^+CD161^+/CD3^+$ (%) NKT								0.65	>0.1				
$CD21^+CD27^+/CD19^+$ (%) memory B								17.3	>10				
$IgD^+IgM^+/CD19^+CD21^+CD27^+$ (%) marginal zone B								36	31–51				
$IgD^-IgM^-/CD19^+CD21^+CD27^+$ (%) switched B								51.4	21–49				
$CD14^+CD16^-$ (%) classical monocytes								9.7	2.5–11				
$CD14^+CD16^+$ (%) intermediate monocytes								1.9	0.7–2				
$CD14^+CD16^{++}$ (%) nonclassical monocytes								1.6	1–6.5				
$CD11c^+CD123^{lo}HLADR^+$ (%) myeloid DC								1.41	1.4–8.4				
$CD11c^-CD123^{hi}HLADR^+$ (%) plasmacytoid DC								0.60	0.3–6				

P1's immunological parameters before and after HSCT at different ages compared with age-matched hospital reference values. IRT, immunoglobulin replacement therapy; RTE, recent thymic emigrants; TEMRA, T effector memory RA cells; MAIT, mucosal-associated invariant T cells.

(CADD) score (12) (score 31), PolyPhen-2 (13) (score 1), and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (14) (score 0). G12 is located in the RAP1B active site within the P-loop (Figure 1C), in which only 2 other missense variants have been reported in gnomAD (11) (Figure 1, D and E). RAP1B is highly evolutionary conserved from yeast to humans (Figure 1F) and among other human GTPases (Figure 1G).

RAP1B c.35G>A is a somatic variant in P1. WES raw data revealed that among the 257 reads covering the region of interest, only 108 (42%) carried the *RAP1B* c.35G>A variant in P1 gDNA from PBMCs at M12. This suggested a slight imbalance between WT and mutated alleles. Sanger sequencing showed that P1 primary fibroblasts did not carry the variant, while microsatellite analysis confirmed their identity (Supplemental Figure 1, A and B), arguing for a somatic mutation.

Variant allele frequency (VAF) analysis by high-throughput sequencing in different cell types from P1 (Supplemental Table 2) indicated that all PBMC samples prior to HSCT as well as hair follicle and buccal swab cells (obtained 7 months after HSCT) carried the *RAP1B* c.35G>A variant (Figure 2A). As buccal swab may not contain only recipient oral mucosal epithelial cells, but also donor-derived circulating leukocytes from saliva, VAF in buccal swab may be underestimated. NGS confirmed that the *RAP1B* variant was absent in P1 primary fibroblasts and both parents' peripheral blood (Figure 2A), with VAFs below the established cutoff for somatic variants (15, 16).

Collectively, these results indicate that *RAP1B* c.35G>A is a de novo somatic variant, present in cells and tissues originating from different embryonic layers (Figure 2, A and B) such as ectoderm (oral mucosal epithelial cells and hair follicles) and mesoderm (hematopoietic cells), but absent in mesoderm-derived primary fibroblasts.

VAF in P1 PBMCs and cultured cells decreased over time, but remained stable in BM cells. The earliest available DNA sample from peripheral blood at M8 revealed a VAF of 39.8% corresponding to

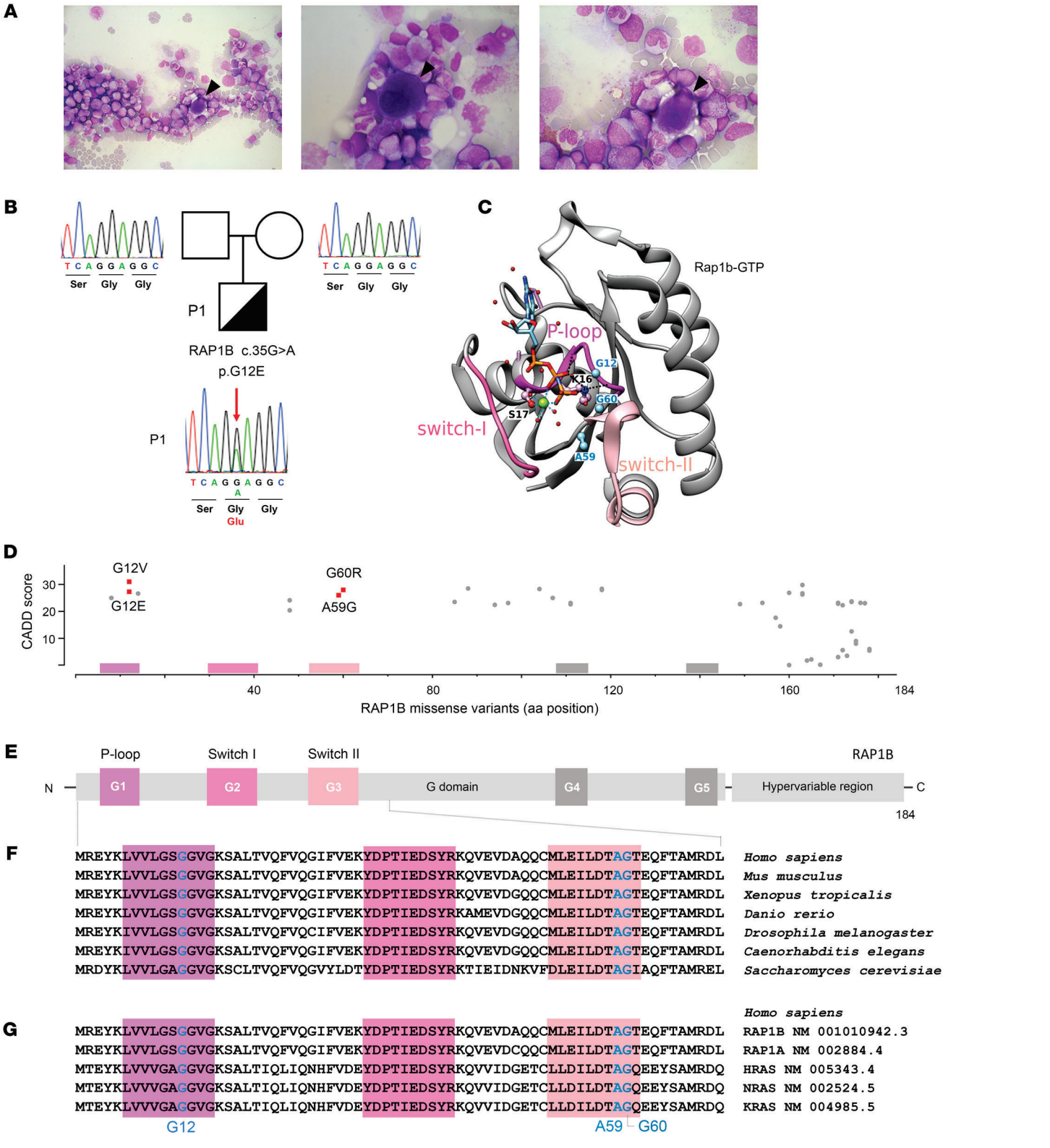

A
B
T C A G G A G G C
Ser Gly Gly
P1
RAP1B c.35G>A
p.G12E
T C A G G A G G C
Ser Gly Gly
P1
T C A G G A G G C
A
Ser Gly Gly
Glu
C
Rap1b-GTP
P-loop
G12
K16
G60
S17
switch-I
A59
switch-II
D
CADD score
30
20
10
G12V
G12E
G60R
A59G
40
80
120
160
184
RAP1B missense variants (aa position)
E
P-loop
Switch I
Switch II
RAP1B
N
G1
G2
G3
G domain
G4
G5
Hypervariable region
C
184
F
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Homo sapiens
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Mus musculus
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDGQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Xenopus tropicalis
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKAMEVDGQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Danio rerio
MREYKIVVLGSGGVGKSALTVQFVQCIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDGQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Drosophila melanogaster
MREYKIVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDGQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL Caenorhabditis elegans
MRDYKLVVLGAGGVGKSCLTVQFVQGVYLDTYDPTIEDSYRKTIEIDNKVFDLEILDTAGIAQFTAMREL Saccharomyces cerevisiae
G
Homo sapiens
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL RAP1B NM 001010942.3
MREYKLVVLGSGGVGKSALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEILDTAGTEQFTAMRDL RAP1A NM 002884.4
MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQ HRAS NM 005343.4
MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQ NRAS NM 002524.5
MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQ KRAS NM 004985.5
G12
A59
G60

Figure 1. *RAP1B* variants and RAP1B protein structure. (**A**) May-Grünwald-Giemsa staining of P1 BM smear at age of M18 showing reduced richness for the patient's age, elements at all stages of maturation, predominance of the granular lineage, absence of atypical cells, and presence of rare hypolobed megakaryocytes (black arrowheads). Original magnification, ×500 (left); ×1,000 (center and right). (**B**) P1 pedigree and familial segregation. Sanger sequencing of *RAP1B* in whole peripheral blood from P1 and his parents shows the heterozygous *RAP1B* c.35G>A (p.G12E) variant in P1 (red arrow), but not in P1's parents, confirming its de novo nature. (**C**) Ribbon representation of the 3D structure of rat Rap1B bound to a nonhydrolyzable GTP analog (GppNHp, pdb 3X1X) (42). The sequences of rat Rap1B and human RAP1B are identical, except for C139 in the human sequence, which is replaced by serine in the rat sequence. This surface residue is far from the nucleotide-binding site. P-loop, switch I, and switch II regions are shown in pink. Magnesium ion is shown in green, water molecules in red, and the residues G12, A59, and G60, which have been found mutated in patients (Table 3), are in blue. (**D**) CADD score and amino acid position of all human RAP1B missense variants listed in gnomAD (11) as of February 6, 2023. RAP1B variants reported in patients are shown in red: G12E (P1) and G12V, A59G, and G60R (P2, P3, and P4) (5, 6). (**E**) Schematic representation of the secondary structure of human RAP1B with G domain–containing P-loop (G1), switch I and switch II (G2 and G3), G4, and G5 functional domains (33, 61), and hypervariable region. (**F**) Multiple sequence alignment of RAP1B G1–G3 functional domains from different species (62). (**G**) Multiple sequence alignment of G1–G3 functional domains of human small GTPases: RAP1B, RAP1A, HRAS, NRAS, and KRAS (62).

79.6% cells carrying the *RAP1B* c.35G>A variant in a heterozygous state, compared with 43.9% at M24 (Figure 2A), suggesting a deleterious effect of the somatic variant, with progressive loss of cells carrying this variant in peripheral blood. There were no significant WBC modifications (Table 1) concomitant to this decrease. We studied the percentages of *RAP1B* c.35G>A positive cells in different FACS-sorted immune subpopulations. At M21, 75.7% of $CD19^+$ B cells carried the variant, but only 36.6% to 38.8% of $CD4^+$, $CD8^+$, and NK cells (Figure 2C), suggesting that *RAP1B* c.35G>A had a distinct deleterious impact on different cell populations. The T cell receptor (TCR) rearrangement profiles of P1 T lymphocytes at M8, M12, and M23 did not show major differences, arguing against a clonal selection process underlying the decreased VAF in the T cell compartment (data not shown).

We next studied the VAF in P1 B lymphoblastoid cell line (B-LCL) cells. The percentages of B-LCL cells carrying the variant progressively decreased from 74.9% to 19.5% after 40 days of culture (Figure 2D), suggesting a counterselection of B-LCL cells carrying *RAP1B* c.35G>A, as observed in peripheral blood (Figure 2A). In contrast to the progressive decrease of the variant in P1 peripheral blood cells (Figure 2A), the percentages remained stable in BM samples obtained at age 1 week and M7 (Figure 2E), arguing against a deleterious impact of the variant in this cell compartment. To confirm this observation, we sorted and cultured P1 $CD34^+$ cells for 2 weeks as previously described (17). We did not observe any significant decrease in *RAP1B* c.35G>A VAF (Figure 2F).

RAP1B-G12E is associated with severe thrombocytopenia and abnormal platelet function. Since RAP1B is essential to platelet function (8, 18, 19), we next studied P1 platelets. From birth until HSCT, P1 presented platelet counts ranging between 15,000 and 30,000/μL, also when treated with the thrombopoietin receptor agonist romiplostim (Figure 3, A and B). P1 platelets had normal size, as evaluated by flow cytometry (Figure 3C) and automated platelet counter (Table 1). However, ultrastructure analysis by transmission electron microscopy (TEM) revealed abnormal platelet morphology, with platelet shape being more round than discoid (Figure 3D). RAP1B protein expression in P1 platelets was decreased by 35% compared with controls ($P < 0.001$), but recovered normal levels following HSCT (Figure 3E).

Due to P1's young age and severe thrombocytopenia, extensive studies of platelet function were not feasible. The activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is essential for platelet aggregation. We evaluated its activation by flow cytometry using PAC1 antibody, which recognizes its active conformation (Figure 3F). P1 had a distinct platelet population (10%) with unusual integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in unstimulated conditions, confirmed in 2 independent experiments. After HSCT, $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in P1 resting platelets was normal. To confirm this unusual integrin activation, we plated unstimulated washed platelets onto fibrinogen matrix in order to analyze platelet morphology (Figure 3G). In this assay, the engagement of activated integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with fibrinogen, its ligand, induces an outside-in signaling responsible for platelet activation, cytoskeleton reorganization, and morphological changes, including membrane extensions named filopodia occurring prior to full platelet spreading. In the control, 28.4% ± 2.0% platelets showed a discoid shape (corresponding to resting platelets) and only 2.4% ± 1.2% platelets a spread shape (corresponding to platelets at the last step of activation). While P1 had a significant decrease in the percentage of nonactivated platelets (7.5% ± 1.1% discoid platelets, $P < 0.001$), for the benefit of fully activated ones (21.4% ± 2.0% spread platelets; $P < 0.001$), there was no overexpression of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ or other key platelet receptors such as glycoprotein (GP)VI, GPIbα, or GPIX (data not shown). Together, these results confirm the presence of an unusual spontaneously active conformation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in P1 unstimulated platelets.

RAP1B-G12E is a GOF variant. To explore the impact of RAP1B-G12E in P1 cells, we performed migration assays. P1 primary fibroblasts migrated normally (Supplemental Figure 1C), a result consistent with the absence of the *RAP1B* variant in these cells. We next evaluated spontaneous and SDF-1α–mediated in vitro migration of freshly isolated PBMCs. SDF-1α (or CXCL12) chemoattractant is the canonical ligand of the CXCR4 receptor. The activation of the CXCL12/CXCR4 axis is involved in migration, chemotaxis, and proliferation in lymphocytes (20) and contributes, through inside-out signaling, to increase lymphocyte integrin affinity (21). Fibronectin is the ligand of VLA-4 (α_4/β_1 CD49d/CD29) integrin. Its interaction with the high-affinity integrin could, in turn, through outside-in signaling, activate downstream cascades modifying actin dynamics and mediating cell migration (22).

P1 and control PBMCs showed no significant difference in cell migration assays. Nonetheless, upon fibronectin coating, P1 PBMCs migrated more than control cells in all conditions (Figure 4A), while WBC distribution, LFA-1, and VLA-4 integrin subunit expression were roughly similar in P1 and control PBMCs (Table 1 and data not shown). These findings suggest a basal overactivation of the VLA-4/fibronectin axis in P1 lymphocytes that may increase migration through outside-in signaling, supporting that RAP1B-G12E is a GOF variant.

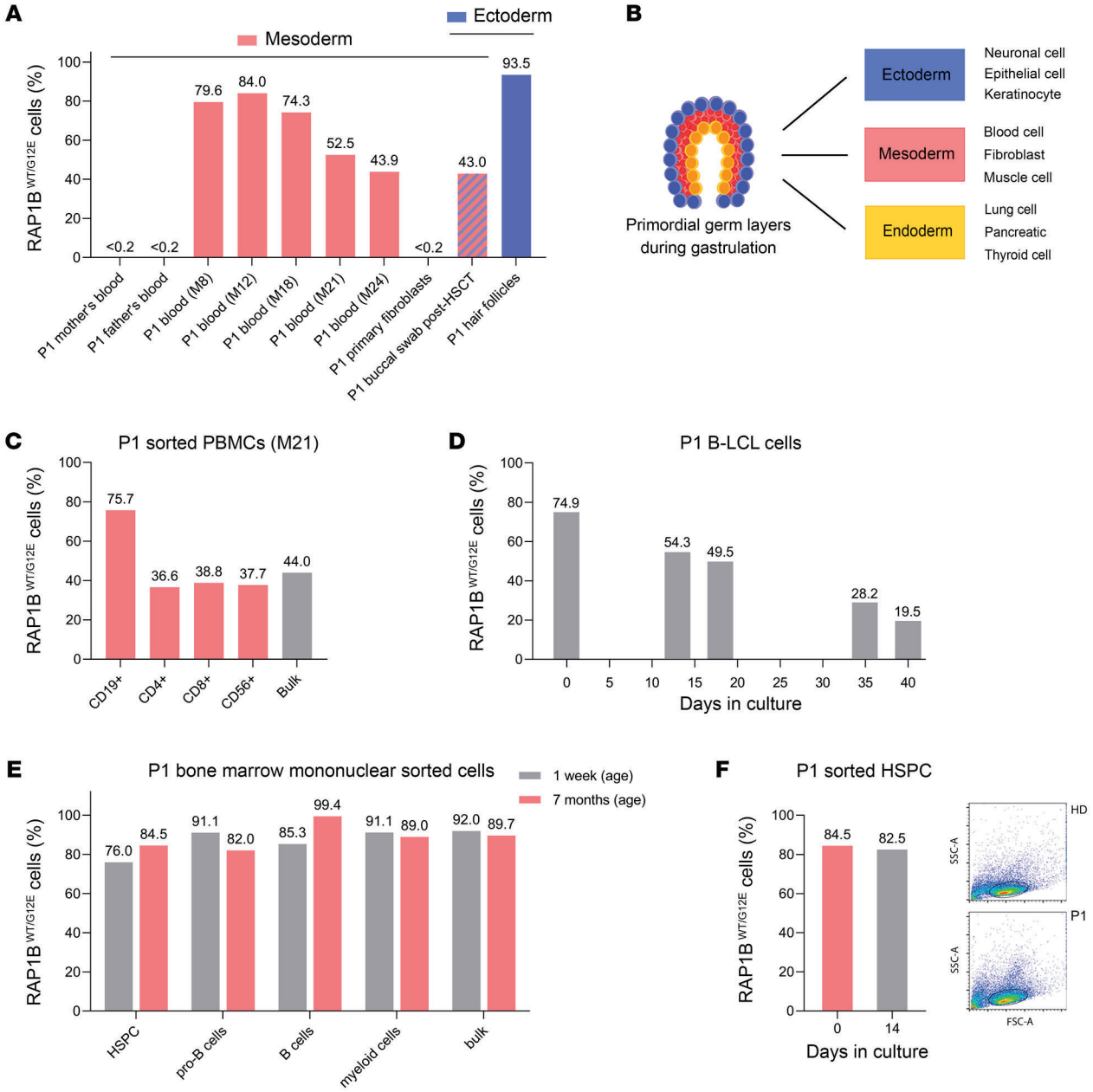


Figure 2. Characterization of P1 RAP1B G12E somatic variant. (**A**) Proportion of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (%) in gDNA samples determined by *RAP1B* c.35G > A (RAP1B G12E) VAF analysis using NGS (Supplemental Table 2). Absence of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells in P1's parents' peripheral blood (16). RAP1B$^{WT/G12E}$ cells are absent in P1 mesoderm-derived primary fibroblasts, but present in P1 mesoderm–derived peripheral blood (before HSCT), ectoderm-derived hair follicles, and buccal swab (obtained 7 months after HSCT). (**B**) Schematic representation of the process of gastrulation generating the 3 primary germ layers (ectoderm, endoderm, mesoderm). (**C**) Quantification of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (%) using NGS in P1 PBMCs (at M21) sorted into CD19$^+$ B cells, CD3$^+$CD4$^+$ T cells, CD3$^+$CD8$^+$ T cells, and CD56$^+$ NK cells (Supplemental Table 2). (**D**) Quantification of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (%) in P1 B-LCL cells cultured over 40 days. B-LCL cells were established from P1 PBMCs obtained at M18. VAF was analyzed using EditR (63) (Supplemental Table 2). (**E**) Quantification of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (%) using NGS in sorted P1 BM mononuclear cells harvested at the ages of 1 week and M7: B cells (CD45$^+$CD34$^-$CD19$^+$), pro–B cells (CD45$^+$CD34$^+$ CD19$^+$), myeloid cells (CD45$^+$CD11b$^+$), and hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs) (CD45$^+$CD34$^+$CD19$^-$) (Supplemental Table 2). (**F**) Quantification of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (%) by NGS (Supplemental Table 2) in sorted P1 HSPCs harvested at M7 after 14 days in culture. FACS images of P1 and control HSCP cells after 14 days in culture. numbers above bars indicate the percentages of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells.

To confirm this hypothesis, we analyzed RAP1B activity through pull-down assays in order to determine the amount of active GTP-RAP1B among total RAP1B protein. RAP1B activation was increased in P1 B-LCL cells containing 80% of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells compared with control and P1 B-LCL cell populations harboring low percentages of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells (Figure 4B), confirming that RAP1B-G12E is a GOF variant. P1 B-LCL RAP1B$^{WT/G12E}$ showed increased percentages of cells in S-phase compared with healthy donor (HD) B-LCL cells (Figure 4, C and D). P1 B-LCL cells with high percentages of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells proliferated more than 4 HD B-LCL cells or P1 B-LCL cells with low percentages of RAP1B$^{WT/G12E}$ (Figure 4E). P1 RAP1B$^{WT/G12E}$ B-LCL cells in culture

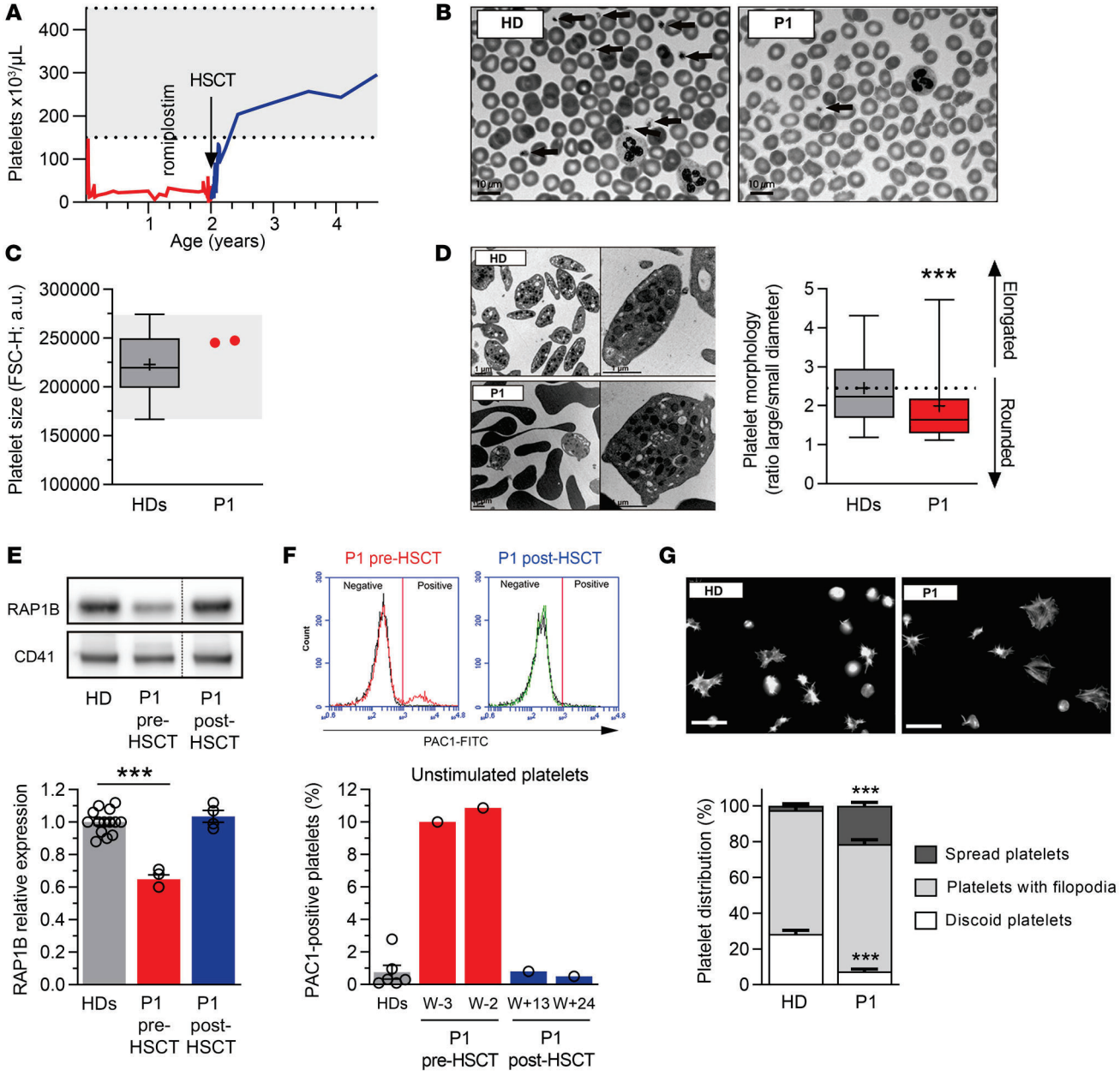
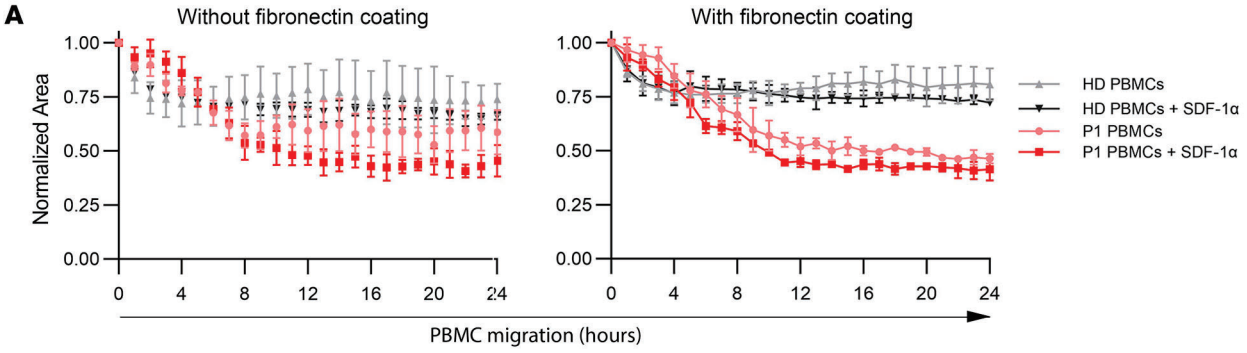
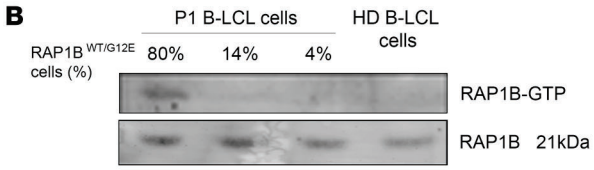


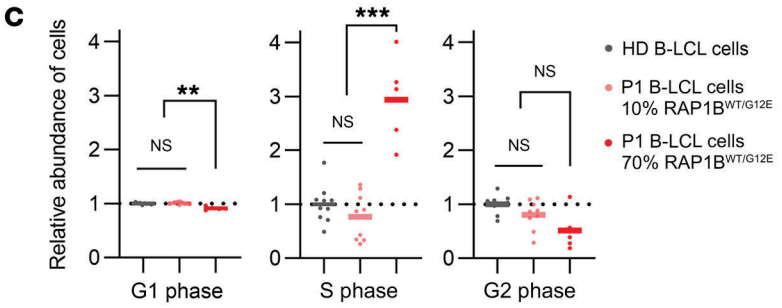
Figure 3. Characterization of P1 platelets. (**A**) P1 platelet counts before and after HSCT. (**B**) Representative blood smears of HD and P1 after May-Grünwald-Giemsa staining. Arrows indicate platelets. (**C**) Platelet size evaluated by flow cytometry. Each dot represents the mean forward scatter (FSC-H) of washed platelets. HDs, $n = 65$; P1, $n = 2$. (**D**) Platelet ultrastructure analyzed by TEM. The box-and-whisker plots represent platelet morphology ($n = 100$) defined by the ratio between the large and the small cell diameter. In **C** and **D**, whiskers represent the 5th to 95th percentiles, the box corresponds to the interquartile range, the center line indicates the median, and the cross indicates the mean. (**E**) RAP1B expression evaluated by Western blotting (representative of at least 4 experiments). Graph (lower panel) represents RAP1B expression after normalization by CD41 expression. Data are represented as mean of the relative expression (HDs set to 1) ± SEM. HDs, $n = 14$; P1, before HSCT and after HSCT, $n = 4$. Dashed lines indicate that the samples were derived from the same gel but were noncontiguous. (**F**) Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation evaluated in unstimulated platelets by flow cytometry using PAC1 antibody, which recognizes the active conformation of the integrin. The cytograms represent the traces of HD (black line) and of P1 before (red) and after HSCT (green). Graph (lower panel) represents the percentage ± SEM of PAC1-positive platelets. HDs, $n = 6$; P1, $n = 1$. W, weeks before HSCT; W+, weeks after HSCT. (**G**) Spreading of HD and P1 platelets before HSCT onto fibrinogen matrix analyzed by epifluorescence microscopy using fluorescently labeled phalloidin. Graph (lower panel) represents the percentage of discoid platelets (white), platelets with filopodia (light gray), and spread platelets (dark gray). Scale bars: 10 µm. Statistical significance was determined for **D** by 2-tailed Student's *t* test and for **E** and **G** by 1-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparisons test. $^{***}P < 0.001$.

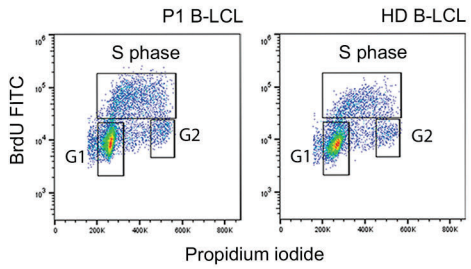
exhibited higher proportions of apoptotic cells compared with HD B-LCL cells (Figure 4F). Taken together, data for cell cycle, cell division, and cell apoptosis indicated enhanced proliferation in P1 RAP1B$^{WT/G12E}$ B-LCL cells.

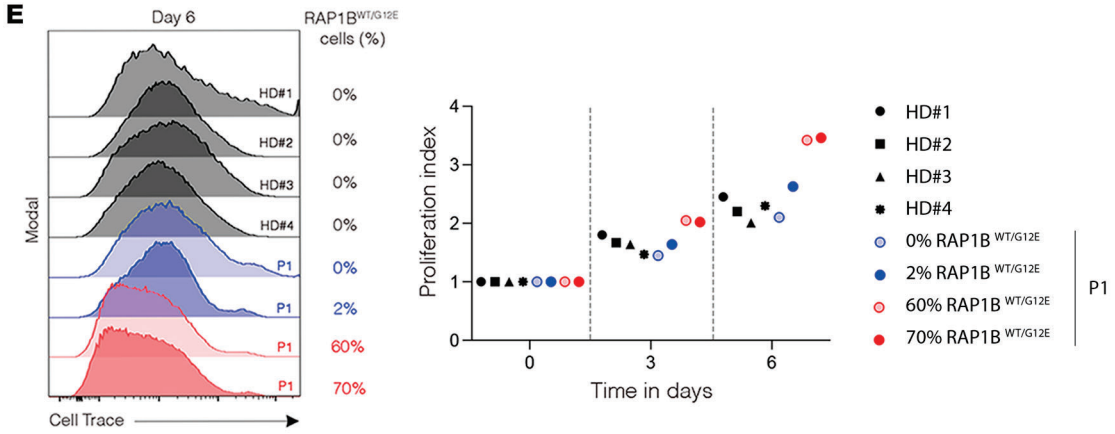
B-LCL cells carrying the RAP1B-G12E variant present abnormal morphological features. Given the observation that P1 PBMCs seem to migrate quite efficiently even without SDF-1α, we wanted to explore P1 cell morphology. It had been shown that activated Rap1


A
Without fibronectin coating
With fibronectin coating
Normalized Area
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
4
8
12
16
20
24
PBMC migration (hours)
HD PBMCs
HD PBMCs + SDF-1α
P1 PBMCs
P1 PBMCs + SDF-1α


B
P1 B-LCL cells
HD B-LCL cells
RAP1B WT/G12E cells (%)
80%
14%
4%
RAP1B-GTP
RAP1B 21kDa


C
Relative abundance of cells
**
***
NS
G1 phase
S phase
G2 phase
HD B-LCL cells
P1 B-LCL cells 10% RAP1B WT/G12E
P1 B-LCL cells 70% RAP1B WT/G12E


D
P1 B-LCL
HD B-LCL
S phase
G1
G2
BrdU FITC
Propidium iodide


E
Day 6
RAP1B WT/G12E cells (%)
HD#1
HD#2
HD#3
HD#4
P1
0%
0%
0%
0%
0%
2%
60%
70%
Modal
Cell Trace
Proliferation index
Time in days
HD#1
HD#2
HD#3
HD#4
0% RAP1B WT/G12E
2% RAP1B WT/G12E
60% RAP1B WT/G12E
70% RAP1B WT/G12E
P1

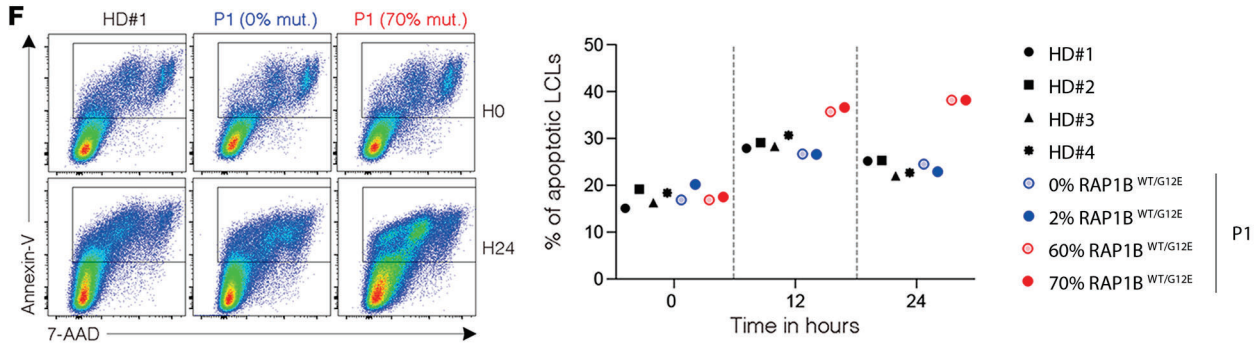

F
HD#1
P1 (0% mut.)
P1 (70% mut.)
H0
H24
Annexin-V
7-AAD
% of apoptotic LCLs
Time in hours
HD#1
HD#2
HD#3
HD#4
0% RAP1B WT/G12E
2% RAP1B WT/G12E
60% RAP1B WT/G12E
70% RAP1B WT/G12E
P1

Figure 4. P1 lymphocytes functional analysis. (**A**) Analysis of P1 PBMC spontaneous and chemoattractant-induced migration in the absence (left) or presence (right) of fibronectin coating (100 mg/ml) using Transwell devices. Experiments were repeated twice in triplicates. One representative of 2 independent experiments is shown. SDF-1α (CXCL12, 1,500 ng/mL) was used as chemoattractant. Means of triplicates (with SD) are represented for patient and control cells in the graphs. At the time of the test, P1 PBMCs carried 52.5%RAP1B$^{WT/G12E}$ cells. (**B**) RAP1B activation, calculated as the ratio RAP1B-GTP/RAP1B total expression, was evaluated in P1 and control B-LCL cells by Western blotting after pull-down assay. P1 B-LCL cell bulk populations used for the experiment contained 80%, 14%, and 4% RAP1B$^{WT/G12E}$ cells. The blot is representative of 2 independent experiments. (**C**) Analysis of the relative proportion of P1 and control B-LCL cells in G1, S, and G2 cell-cycle phases after double staining with anti-BrdU monoclonal antibody and PI. P1 B-LCL cell bulk populations contained 70% and 10% RAP1B$^{WT/G12E}$ cells. Two different healthy B-LCL cell unrelated controls (1 age matched) were used for normalization. Experiments were performed in triplicate for 2 independent experiments. The representative graph shows the gated populations. Statistical significance was determined by Mann-Whitney *U* test. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. (**D**) Percentages of RAP1B$^{WT/G12E}$ cells in sorted G1, S, and G2 phase populations after cell-cycle analysis. P1 B-LCL cell bulk population contained 70% RAP1B$^{WT/G12E}$ cells. (**E**) Representative histograms(left) showing cell divisions by CellTrace Violet staining of synchronized HDs (gray histograms) and P1 (blue and red histograms) B-LCL cells after 6 days of culture. P1 B-LCL cell bulk contained 0% (light blue), 2% (dark blue), 60% (light red), or 70% (dark red) RAP1B$^{WT/G12E}$ cells. Dot plots graph (right) showing index of proliferation of HD and P1 B-LCL cells calculated from FACS histograms shown in the left panel (with same color code) at indicated time of culture. Each symbol corresponds to 1 individual HD (black) or P1 (blue or red). Data are from 1 of 2 independent experiments. (**F**) Representative FACS dot plots (left) depicting annexin V and 7-AAD expressions of HD and P1 B-LCL cells containing 0% or 70% RAP1B$^{WT/G12E}$ cells for 0 and 24 hours. Dot plot graph (right) showing apoptotic cells (annexin V$^+$ and 7-AAD$^+$) of HD and P1 B-LCL cells calculated from FACS dot plots shown in the left panel with color code as in **E** at indicated time of culture. Each symbol corresponds to 1 individual HD (black) or P1 (blue and red). Data are from 1 of 2 independent experiments.

induced T cell polarity, also in the absence of chemokines (7, 23). When compared with immortalized B-LCL cells from HDs after spreading, P1 B-LCL cells showed altered microtubule organization (Figure 5A) as well as altered actin cytoskeleton (Figure 5B). P1 cells were also more rounded than HD cells.

Functional studies in human cell lines confirm the GOF nature of RAP1B variants. We next sought to study the impact of the G12E variant in human cell lines. We included also RAP1B-G12V and -G60R, which had been identified in patients with ST in the course of our investigations (5, 24). Of note, the G12V variant had been reported previously to lead to a constitutively activated protein (24). First, we determined RAP1B activation by measuring relative RAP1B-GTP abundance through pull-down assay. RAP1B activation was increased in HEK293T cells transfected with vectors containing G12E, G12V, or G60R or cotransfected with equimolar combinations of *RAP1B*-WT and 1 *RAP1B* variant when compared with cells transfected with *RAP1B*-WT (Figure 6A). These results suggest that the RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R variants exert a dominant GOF effect.

We next evaluated the impact of G12E, G12V, and G60R in the human erythroleukemia (HEL) cell line, which recapitulates megakaryocytic hallmarks (25, 26), including integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. HEL cells expressing G12E exhibited significantly increased RAP1B activation (by 4.4-fold, $P < 0.001$) compared with cells expressing RAP1B-WT (Figure 6B), higher than cells expressing G12V (2.8-fold of RAP1B-WT activation; $P < 0.01$) or G60R (2.4-fold, $P < 0.05$). We next investigated talin-1 recruitment to integrin β_3 in unstimulated HEL cells expressing G12E, G12V, or G60R by proximity ligation assay (PLA), which generates a fluorescent dot only when the 2 proteins are at a distance of 40 nm or less. The quantification of fluorescent dots per cell showed a significant increase in talin-1/β_3 association in HEL cells expressing G12E (2.2-fold; $P < 0.001$), G12V (1.9-fold; $P < 0.01$), and G60R (1.3-fold; $P < 0.05$) compared with RAP1B-WT, confirming that RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R were able to act on integrin activation without any stimulation (Figure 6C). Finally, to elucidate the consequences concerning integrin activation, we studied integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ conformation in HEL cells by flow cytometry in resting conditions. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in HEL cells expressing G12E and G12V was abnormally activated ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) compared with WT (Figure 6D). Taken together, these results indicate that RAP1B GOF variants G12E and G12V induce integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation due to expression of constitutively active RAP1B.

We next assessed the functional consequences of G12E in T cell function. We investigated proximal T cell activation as well as late responses. In P1 T cells, global tyrosine phosphorylation and MAPK pathway activation (Tyr, PLCγ, ZAP-70, ERK1/2) after TCR stimulation were comparable to those of healthy controls. Furthermore,

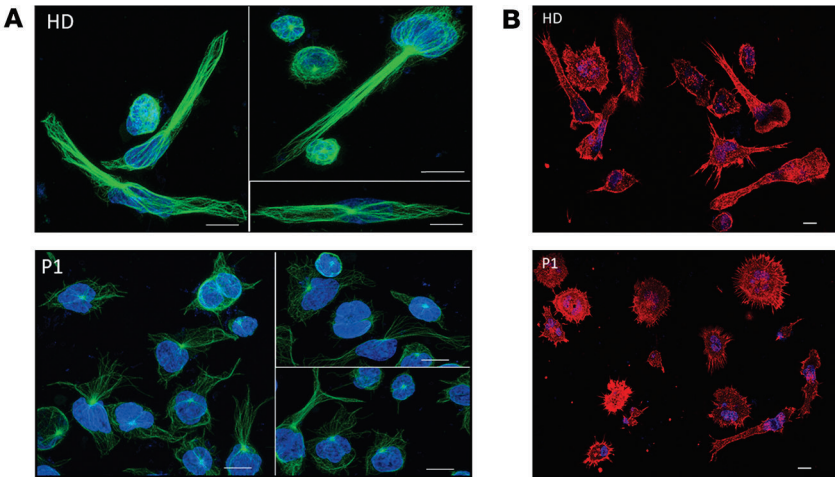


Figure 5. RAP1B G12E leads to altered cell morphology in B-LCL. (**A**) Altered microtubule organization of immortalized P1 B lymphoblastic cell lines after spreading. Green corresponds to microtubules staining. Blue corresponds to nucleus staining. Coverslips were coated with anti-CD44 antibody. Cells from P1 were rounder and had altered microtubule organization compared with HD cells. (**B**) Altered actin cytoskeleton in immortalized P1 B lymphoblastic cell lines after spreading. Red corresponds to actin staining. Blue corresponds to nucleus staining. P1 cells were more rounded than HD cells. Scale bars: 15 μm.

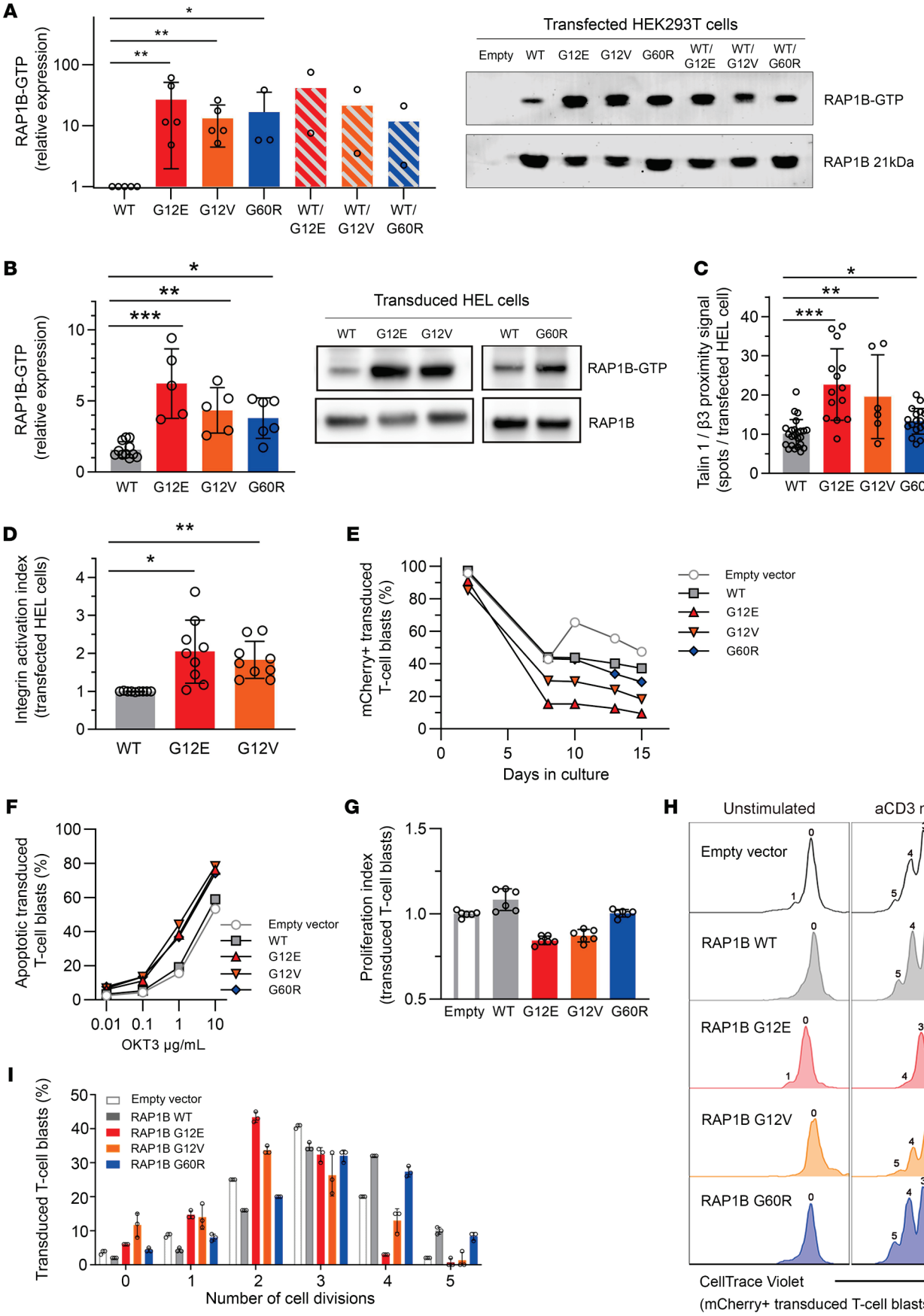

A
RAP1B-GTP (relative expression)
WT G12E G12V G60R WT/ G12E WT/ G12V WT/ G60R
Transfected HEK293T cells
Empty WT G12E G12V G60R WT/ G12E WT/ G12V WT/ G60R
RAP1B-GTP
RAP1B 21kDa
B
RAP1B-GTP (relative expression)
Transduced HEL cells
WT G12E G12V WT G60R
RAP1B-GTP
RAP1B
C
Talin 1 / β3 proximity signal (spots / transfected HEL cell)
WT G12E G12V G60R
D
Integrin activation index (transfected HEL cells)
WT G12E G12V
E
mCherry+ transduced T-cell blasts (%)
Days in culture
Empty vector
WT
G12E
G12V
G60R
F
Apoptotic transduced T-cell blasts (%)
OKT3 µg/mL
Empty vector
WT
G12E
G12V
G60R
G
Proliferation index (transduced T-cell blasts)
Empty WT G12E G12V G60R
H
Unstimulated
aCD3 mAb + IL-2
Empty vector
RAP1B WT
RAP1B G12E
RAP1B G12V
RAP1B G60R
CellTrace Violet
(mCherry+ transduced T-cell blasts)
I
Transduced T-cell blasts (%)
Empty vector
RAP1B WT
RAP1B G12E
RAP1B G12V
RAP1B G60R
Number of cell divisions

Figure 6. RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R variants in overexpression models. (**A**) RAP1B-GTP activation evaluated by Western blotting after pull-down assay. HEK293T cells were transfected with vectors containing *RAP1B*-WT, *RAP1B* variants, or equimolar *RAP1B*-WT and *RAP1B* variant combinations. Values were compared with *RAP1B*-WT transfected cells (set to 1). Data from 5 independent experiments. (**B**) RAP1B-GTP activation in *RAP1B*-transduced HEL cells compared with nontransduced HEL cells (set to 1). Data from 5 independent experiments. (**C**) Talin-1/β_3 integrin association was determined by Duolink proximity ligation assay in transfected HEL cells. Graph represents the relative number of fluorescent dots per cell in comparison with nontransfected HEL cells (set to 1). At least 50 transfected HEL cells per condition; data from 8 independent experiments. (**D**) Integrin activation in *RAP1B*-transfected HEL cells evaluated by flow cytometry measuring Oregon Green 488–labeled fibrinogen binding in unstimulated conditions. Graph represents the normalized integrin activation index, calculated as the ratio between MFI of each studied variant compared with *RAP1B*-WT transfected HEL cells. Data from 9 independent experiments. (**E**) Analysis of *RAP1B*-transduced T cell blasts over time. Cells were cultured in medium containing 15% DC-FBS and IL-2 at 100 U/ml. (**F**) Activation-induced cell death or apoptosis in *RAP1B*-transduced T cell blasts in response to increased concentrations of anti-CD3 antibody (OKT3) after 6 hours of stimulation. (**G**) Proliferation of *RAP1B*-transduced T cell blasts in the presence of 2.5 μg/ml coated anti-CD3 antibody and 100 U/ml IL-2, performed in triplicate. Graph represents the normalized proliferation index of transduced cells at days 3 and 4 compared with nontransduced and *RAP1B*-WT transduced cells. (**H**) Representative overlaid FACS histograms showing cell divisions by CellTrace Violet staining of transduced T cell blast with lentivirus expressing empty vector (light gray), RAP1B-WT (gray), RAP1B-G12E (red), RAP1B-G12V (orange), and RAP1B-G60R (blue) variants at day 4 after stimulation. (**I**) Graph corresponds to the distribution of transduced T cell blasts in different cell divisions calculated from FACS histograms in **H**. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined for **A** by Mann-Whitney *U* test and for **B**–**D** by 1-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

late responses such as proliferation and cytokine secretion were not altered after TCR stimulation (data not shown). Given the limited sample availability and the difficulty of maintaining the G12E somatic variant in cultured lymphocytes, we then transduced T cell blasts from HDs with lentiviral vectors expressing mCherry reporter gene and RAP1B-WT or -G12E, -G12V, and -G60R. The percentages of mCherry-expressing cells decreased over time in T cell blasts transduced with the different RAP1B GOF variants compared with WT-RAP1B or empty mCherry vector (Figure 6E), consistent with the results obtained in transduced HEL cells (Supplemental Figure 1D). This indicated that exogenous expression of RAP1B variants may impair survival and/or proliferation of cultured T cell blasts.

Activation-induced cell death, also referred to as restimulation-induced cell death, was increased in T cell blasts transduced with RAP1B-G12E, -G12V, or -G60R compared with RAP1B-WT and empty vector (Figure 6F). Cell proliferation in response to TCR stimulation was decreased in T cell blasts transduced with G12E and G12V ($P < 0.01$) or G60R ($P < 0.05$) compared with RAP1B-WT (Figure 6, G–I).

Collectively, these data demonstrate that P1's monoallelic de novo RAP1B-G12E variant as well as the reported G12V and G60R are GOF mutations. Our results suggest that increased basal RAP1B activation may lead, through inside-out signaling, to a high integrin-affinity conformation that triggers, upon ligand interaction, downstream signaling cascades, modifying thereby lymphocyte migration, proliferation, and apoptosis as well as platelet activation.

Discussion

We identified a de novo heterozygous single nucleotide substitution c.35G>A in *RAP1B*, p.G12E, in a 2-year-old boy with an undescribed hematological disorder associated with CID, neutropenia, and monocytopenia as well as severe thrombocytopenia and platelet dysfunction. The ubiquitously expressed and evolutionary conserved RAP1B was a strong candidate, as it mediates, through inside-out signaling, integrin activation (27), which is essential for platelet activation and lymphocyte migration (7, 8, 28). Rap1b-deficient mice present defective integrin activation, leading to abnormal platelet function and impaired development, adhesion, and homing in B cells (7, 8, 10, 28, 29). Deficiency of a single Rap1 protein is associated with an intermediate platelet phenotype, more severe for Rap1b than for Rap1a deficiency, whereas Rap1a/b–double-knockout in a murine megakaryocyte model leads to severe thrombocytopenia and platelet dysfunction (8). At the protein level, human RAP1B shares 95% sequence homology and similar intracellular and tissue distribution with RAP1A, which is encoded by a distinct gene (NCBI ID, NM_002884.4) at 1p13.3 (29, 30). However, in human hematopoietic cells, RAP1B expression is 2.5- to 4-fold higher than RAP1A expression (31, 32), and different post-translational modifications determine cellular localization (33), suggesting that the 2 proteins are not functionally redundant.

RAP1B belongs to the superfamily of GTPases, molecular switches that regulate a plethora of cellular events (34). These small (20–30 kDa) monomeric proteins switch between an inactive GDP-bound OFF state and an active GTP-bound ON state and require GTPase activating proteins to enhance intrinsic GTPase activity and guanine exchange factors to efficiently stimulate GDP dissociation and hence GTP entry to switch them on (35). The interaction between residues located in the P-loop and switch I and II functional regions with the γ-phosphate groups of GTP, GDP, and Mg^{2+} induces a conformational change in the GTPase, thereby modifying its affinity for putative effector molecules that, upon their interaction, trigger downstream pathways (33, 34). G12 is located in the P-loop within the GTP-binding active site (Figure 1, C–G) (24) and is highly conserved across species and other small GTPases that orchestrate cell signaling, trafficking, and morphology pathways with exquisite temporal and spatial specificity while sharing a high sequence similarity. The important structural and functional role of G12 is further supported by an in vitro model in which Rap1-G12V gives rise to a constitutively activated protein (7, 24). Any substitution of the highly conserved small amino acids within the GTP-binding active site by amino acids with longer side chains is predicted to have a substantial impact on GTPase activity. In particular, P1's G12E variant is expected to disturb the GTP-binding site. This may have important consequences for the position of the K16 lateral chain, which bonds with the nucleotide β and γ phosphates and on the interface that RAP1B may establish with effector proteins (24).

In public databases, only 2 missense variants had been reported in the P-loop and none in the switch I and II domains (Figure 1D) (11), highlighting the importance of these evolutionarily conserved RAP1B domains. During the course of our investigations, monoallelic germline *RAP1B* variants have been reported in patients who presented not only with thrombocytopenia, but also with additional clinical features ranging from facial dysmorphia/microcephaly and neurodevelopmental delay to abnormalities in brain, heart, kidney,

Figure 6. RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R variants in overexpression models. (**A**) RAP1B-GTP activation evaluated by Western blotting after pull-down assay. HEK293T cells were transfected with vectors containing *RAP1B*-WT, *RAP1B* variants, or equimolar *RAP1B*-WT and *RAP1B* variant combinations. Values were compared with *RAP1B*-WT transfected cells (set to 1). Data from 5 independent experiments. (**B**) RAP1B-GTP activation in *RAP1B*-transduced HEL cells compared with nontransduced HEL cells (set to 1). Data from 5 independent experiments. (**C**) Talin-1/β_3 integrin association was determined by Duolink proximity ligation assay in transfected HEL cells. Graph represents the relative number of fluorescent dots per cell in comparison with nontransfected HEL cells (set to 1). At least 50 transfected HEL cells per condition; data from 8 independent experiments. (**D**) Integrin activation in *RAP1B*-transfected HEL cells evaluated by flow cytometry measuring Oregon Green 488–labeled fibrinogen binding in unstimulated conditions. Graph represents the normalized integrin activation index, calculated as the ratio between MFI of each studied variant compared with *RAP1B*-WT transfected HEL cells. Data from 9 independent experiments. (**E**) Analysis of *RAP1B*-transduced T cell blasts over time. Cells were cultured in medium containing 15% DC-FBS and IL-2 at 100 U/ml. (**F**) Activation-induced cell death or apoptosis in *RAP1B*-transduced T cell blasts in response to increased concentrations of anti-CD3 antibody (OKT3) after 6 hours of stimulation. (**G**) Proliferation of *RAP1B*-transduced T cell blasts in the presence of 2.5 μg/ml coated anti-CD3 antibody and 100 U/ml IL-2, performed in triplicate. Graph represents the normalized proliferation index of transduced cells at days 3 and 4 compared with nontransduced and *RAP1B*-WT transduced cells. (**H**) Representative overlaid FACS histograms showing cell divisions by CellTrace Violet staining of transduced T cell blast with lentivirus expressing empty vector (light gray), RAP1B-WT (gray), RAP1B-G12E (red), RAP1B-G12V (orange), and RAP1B-G60R (blue) variants at day 4 after stimulation. (**I**) Graph corresponds to the distribution of transduced T cell blasts in different cell divisions calculated from FACS histograms in **H**. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined for **A** by Mann-Whitney *U* test and for **B**–**D** by 1-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple-comparisons test. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

late responses such as proliferation and cytokine secretion were not altered after TCR stimulation (data not shown). Given the limited sample availability and the difficulty of maintaining the G12E somatic variant in cultured lymphocytes, we then transduced T cell blasts from HDs with lentiviral vectors expressing mCherry reporter gene and RAP1B-WT or -G12E, -G12V, and -G60R. The percentages of mCherry-expressing cells decreased over time in T cell blasts transduced with the different RAP1B GOF variants compared with WT-RAP1B or empty mCherry vector (Figure 6E), consistent with the results obtained in transduced HEL cells (Supplemental Figure 1D). This indicated that exogenous expression of RAP1B variants may impair survival and/or proliferation of cultured T cell blasts.

Activation-induced cell death, also referred to as restimulation-induced cell death, was increased in T cell blasts transduced with RAP1B-G12E, -G12V, or -G60R compared with RAP1B-WT and empty vector (Figure 6F). Cell proliferation in response to TCR stimulation was decreased in T cell blasts transduced with G12E and G12V ($P < 0.01$) or G60R ($P < 0.05$) compared with RAP1B-WT (Figure 6, G–I).

Collectively, these data demonstrate that P1's monoallelic de novo RAP1B-G12E variant as well as the reported G12V and G60R are GOF mutations. Our results suggest that increased basal RAP1B activation may lead, through inside-out signaling, to a high integrin-affinity conformation that triggers, upon ligand interaction, downstream signaling cascades, modifying thereby lymphocyte migration, proliferation, and apoptosis as well as platelet activation.

Discussion

We identified a de novo heterozygous single nucleotide substitution c.35G>A in *RAP1B*, p.G12E, in a 2-year-old boy with an undescribed hematological disorder associated with CID, neutropenia, and monocytopenia as well as severe thrombocytopenia and platelet dysfunction. The ubiquitously expressed and evolutionary conserved RAP1B was a strong candidate, as it mediates, through inside-out signaling, integrin activation (27), which is essential for platelet activation and lymphocyte migration (7, 8, 28). Rap1b-deficient mice present defective integrin activation, leading to abnormal platelet function and impaired development, adhesion, and homing in B cells (7, 8, 10, 28, 29). Deficiency of a single Rap1 protein is associated with an intermediate platelet phenotype, more severe for Rap1b than for Rap1a deficiency, whereas Rap1a/b–double-knockout in a murine megakaryocyte model leads to severe thrombocytopenia and platelet dysfunction (8). At the protein level, human RAP1B shares 95% sequence homology and similar intracellular and tissue distribution with RAP1A, which is encoded by a distinct gene (NCBI ID, NM_002884.4) at 1p13.3 (29, 30). However, in human hematopoietic cells, RAP1B expression is 2.5- to 4-fold higher than RAP1A expression (31, 32), and different post-translational modifications determine cellular localization (33), suggesting that the 2 proteins are not functionally redundant.

RAP1B belongs to the superfamily of GTPases, molecular switches that regulate a plethora of cellular events (34). These small (20–30 kDa) monomeric proteins switch between an inactive GDP-bound OFF state and an active GTP-bound ON state and require GTPase activating proteins to enhance intrinsic GTPase activity and guanine exchange factors to efficiently stimulate GDP dissociation and hence GTP entry to switch them on (35). The interaction between residues located in the P-loop and switch I and II functional regions with the γ-phosphate groups of GTP, GDP, and Mg^{2+} induces a conformational change in the GTPase, thereby modifying its affinity for putative effector molecules that, upon their interaction, trigger downstream pathways (33, 34). G12 is located in the P-loop within the GTP-binding active site (Figure 1, C–G) (24) and is highly conserved across species and other small GTPases that orchestrate cell signaling, trafficking, and morphology pathways with exquisite temporal and spatial specificity while sharing a high sequence similarity. The important structural and functional role of G12 is further supported by an in vitro model in which Rap1-G12V gives rise to a constitutively activated protein (7, 24). Any substitution of the highly conserved small amino acids within the GTP-binding active site by amino acids with longer side chains is predicted to have a substantial impact on GTPase activity. In particular, P1's G12E variant is expected to disturb the GTP-binding site. This may have important consequences for the position of the K16 lateral chain, which bonds with the nucleotide β and γ phosphates and on the interface that RAP1B may establish with effector proteins (24).

In public databases, only 2 missense variants had been reported in the P-loop and none in the switch I and II domains (Figure 1D) (11), highlighting the importance of these evolutionarily conserved RAP1B domains. During the course of our investigations, monoallelic germline *RAP1B* variants have been reported in patients who presented not only with thrombocytopenia, but also with additional clinical features ranging from facial dysmorphia/microcephaly and neurodevelopmental delay to abnormalities in brain, heart, kidney,

Table 3. Clinical and immune-hematological phenotype of patients carrying *RAP1B* variants

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
RAP1B variant	c.35G>A, p.G12E$^{+/-}$	c.35G>A, p.G12E$^{+/-}$	c.35G>T, p.G12V$^{+/-}$	c.176C>G, p.A59G$^{+/-}$	c.178G>C, p.G60R$^{+/-}$	*RAP1B* c.178G>A, p.G60R$^{+/-}$
Proposed underlying mechanism	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF	GOF
Sex	M	F	F	M	M	M
Variant reported as	Somatic	Germinal	Germinal	Germinal	Germinal	Germinal
VAF in peripheral blood	26% to 46% (NGS)[A]	NA	46.5% (33/71 reads)	NA	43% (81/188 reads)	NA
Hematological phenotype						
Anemia	**Yes** (<10 g/dl)	**Yes** (NA)	**Yes** (NA)	**Yes** (NA)	No (NA)	NA
Neutropenia	**Yes** (350/μL)	**Yes** (NA)	NA	No (NA)	No (NA)	NA
Lymphopenia	**Yes** (800/μL)	**Yes** (NA)	**Yes** (NA)	**Yes** (600–1,000/μL)	**Yes** (1,300/μL)	NA
Thrombocytopenia	**Yes** (18,000/μL)	**Yes** (5 to 16,000/μL)	**Yes** (30 to 50,000/μL)	**Yes** (56 to 99 000/μL)	**Yes** (10 to 20,000/μL)	**Yes** (NA)
Bleeding severity	Moderate-severe	Mild-moderate	Minor	Minor	Minor-mild	NA
Lymphoproliferation	No	NA	Splenomegaly	NA	NA	NA
Karyotype and CGH	Normal	Normal karyotype	Normal	Normal	Normal	NA
Telomere length	Normal	NA	NA	NA	NA	NA
Clinical features						
Congenital anomalies	No	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple
Facial dysmorphism	No	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
Ocular malformations	No	**Yes**	NA	NA	NA	NA
Microcephaly	No	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	NA
Brain MRI abnormalities	No	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	NA
Seizures/abnormal EEG	No	NA	NA	NA	NA	NA
Neurodevelopmental disorders	No	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
Muscular hypotonia	No	**Yes**	**Yes**	**Yes**	NA	**Yes**
Congenital heart defects	No	**Yes**	No	**Yes**	**Yes**	NA
Renal anomalies	No	**Yes**	**Yes**	No	**Yes**	**Yes**
Skeletal malformations	No	NA	**Yes**	**Yes**	NA	NA
Endocrine manifestations	No	**Yes**	**Yes**	No	NA	NA
Treatment	Transfusions, HSCT	NA	NA	NA	NA	NA
Status at last follow-up	Alive (7 years)	Alive (16 years)	Alive (36 years)	Alive (23 years)	Alive (13 years)	Alive (5 years)

Abnormal findings are in bold. P3 and P5 were reported by Niemann et al. (5), P4 by Miller et al. (6), and P2 and P6 by Pardo et al. (36). [A]Variable VAF for *RAP1B* c.35G>A (see Figure 2). NA, not available; CGH, comparative genomic hybridization.

and skeleton, hereafter referred to as ST: first G12V and G60R, then A59G (5, 6), and most recently, G12E (36) (see P2 to P6; Table 3). It has been speculated that these RAP1B variants may be causative for ST, but to date, no comprehensive functional studies have confirmed their causality and pathophysiological impact. A59G and G60R result in substitutions of evolutionarily conserved amino acids in the switch II domain, which changes conformation upon RAP1B activation, allowing for downstream effector target interaction (35).

P1's hemato-immunological and bleeding phenotype is reminiscent of that of patients with mutations in genes involved in platelet and leukocyte integrin activation. For instance, mutations in *KINDLIN3*, which cause dysfunction in integrins necessary for platelet aggregation and leukocyte function, lead to severe bleeding and infections in leukocyte adhesion deficiency type III (37, 38). In platelets, engagement of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with fibrinogen, its ligand, triggers outside-in signaling that leads to platelet activation and cytoskeleton reorganization (28, 39). Increased activation pattern of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ resulted in abnormal spreading of unstimulated P1 platelets on fibrinogen matrix. Platelet dysfunction was also suspected due to increased bleeding susceptibility in P1, which was consistent with a quantitative and qualitative platelet impairment. The abnormal integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation pattern in P1 platelets prior to HSCT as well as the abnormal hematological and immunological parameters normalized after HSCT. This suggests that the underlying defect in P1 was intrinsic to the hematopoietic compartment. Increased RAP1B activation in P1 G12E cells suggested that G12E is a GOF variant, in line with reported in vitro data for G12V (24). Overexpression models using human HEK293T and HEL cell lines further confirmed that G12E, G12V, and G60R are GOF mutations. The activation of downstream signaling cascades (35) is enabled by active RAP1B through the recruitment of talin-1 and its subsequent binding to the cytoplasmic tail of β integrin, which results in integrin activation in hematopoietic cells (27, 39–41). When recapitulating the molecular steps required for integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in platelets in a RAP1B overexpression model in HEL cells, RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R showed increased talin-1 recruitment to the intracytoplasmic β_3 integrin domain.

Interestingly, in Rap1B, A59 and G60 form a peptide bond and are part of the conserved DxxG motif at the start of switch II (42). Although the recently described RAP1B-A59G variant was

not included in our assays, it can be assumed that this variant may have effects on RAP1B function similar to those that can be extrapolated from previous studies on other small GTPase proteins. The crystal structure conformations of H-Ras were subjected to multivariate clustering analysis. The results showed that H-Ras G12V in the P-loop and A59G in the switch II region facilitate faster sampling of large-scale conformational transitions (43). In syndromic patients with neurological and dysmorphic features and musculoskeletal abnormalities, Scala et al. identified 7 RAC3 variants, including A59G, in the switch II region, recognized as a mutational hot spot among the small GTPase proteins RAC1, RAC3, and CDC42. Suppression of GTP-hydrolysis activity was observed for A59G (44). Finally, a cluster analysis on conformational changes of the GDP/KRAS complex showed that A59G and D33E highly affected the structural flexibility and internal dynamics of the switch domains and changed the free energy profiles of KRAS (45). The exquisite specificity and high evolutionary conservation of small GTPases may explain why the same substitutions in conserved residues are involved in many diseases (2, 9, 34, 46, 47).

Although RAP1B is expressed ubiquitously, P1 did not present any associated syndromic features, unlike patients with syndromic thrombocytopenia, who also exhibit neurodevelopmental retardation, growth delay, and congenital birth defects, including cardiovascular, genitourinary, neurologic, and skeletal malformations as well as microcephaly and facial dysmorphia (Table 3) (5, 6). This highlights the somatic nature of the *RAP1B* variant in P1 in contrast to the germline variants in ST patients. Interestingly, in P1, the G12E somatic variant was present in cells and tissues originating from different embryonic layers such as ectoderm (oral mucosal epithelial cells and hair follicles) and mesoderm (hematopoietic cells). However, it was absent in primary fibroblasts, which also derive from mesoderm. This suggests that the postzygotic somatic mutation may have occurred during early embryogenesis prior to gastrulation, when the blastula reorganizes into the primary germ layers (48). The somatic mosaicism in P1 not only explains the discrepancy between the severe hemato-immunological phenotype and complete absence of syndromic features, but also provides an opportunity to observe the in vivo effect of the G12E variant in P1's various tissues and cell populations. We may speculate that a strong detrimental impact has prevented the presence of RAP1B-G12E mutated cells in diverse nonhematopoietic (neural, cardiac, musculoskeletal) tissues. The recent identification of a patient with syndromic thrombocytopenia due to a germline heterozygous RAP1B-G12E variant (P2 in Table 3) (36) clearly illustrates the deleterious effect of this variant in a wide range of tissues.

The observed GOF effect of RAP1B-G12E in P1's cells with regard to apoptosis, proliferation, and/or survival may explain the detrimental consequences in P1's different peripheral hemato-immunological cell compartments. Interestingly, RAP1B-G12E does not seem to have the same deleterious effect in P1's BM cells. In a Rap1b-knockout zebrafish model, Notch signaling and its mediated specification were necessary for hematopoietic stem cell development (31) and required integrin adhesion to fibronectin through Rap1b activation (49). This is reminiscent of dominant mutations in *CXCR4*, responsible for WHIM (warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, and myelokathexis) syndrome, that lead to enhanced and prolonged β integrin activation responsible for accumulation of mature and degenerating neutrophils in the BM (50). This may explain why RAP1B GOF variants may not be as deleterious in hematopoietic precursors.

The main shortcoming of our study resides in the fact that we could not perform in vitro megakaryopoiesis and platelet formation assays on patient cells due to restricted samples from our young thrombocytopenic patient undergoing HSCT. There were rare hypolobed megakaryocytes in BM smears and biopsy. We used a method adapted from Chen et al. (51) to evaluate in vitro the formation of proplatelet-like features in Dami cells, a human megakaryocytic cell line, by transfecting RAP1B-WT, -G12E, or -G12V. While our results suggested that RAP1B variants may act on proplatelet-like formation, as the percentages of Dami cells forming proplatelet-like extensions were significantly reduced in RAP1B-G12E ($P = 0.0011$) and -G12V ($P = 0.0057$) (data not shown), we cannot extrapolate to platelet formation in the patient from this nonphysiological model using a drug (myosin II inhibitor) instead of the patient's $CD34^+$ stem cells. Further studies are thus required to precisely determine the effect of RAP1B GOF variants on human megakaryopoiesis and platelet formation. Murine Rap1A and Rap1B share 95% identity, and yet the phenotype of the isoform-specific knockout is different in mice. Therefore, investigations in a knockin mouse model may not faithfully reproduce the human phenotype. The low yield of induced pluripotent stem cell–derived (iPSC-derived) platelet preparations is another limiting factor for more comprehensive functional studies.

In conclusion, we demonstrate that P1's monoallelic RAP1B-G12E is a de novo somatic mutation causing CID and severe thrombocytopenia associated with neutropenia and monocytopenia. We show that G12E and the previously reported RAP1B-G12V and -G60R are dominant GOF variants leading to increased RAP1B activation and integrin activation in hematopoietic cells. The activated integrin pattern may trigger, through outside-in signaling, downstream pathways involved in cytoskeletal remodeling and migration in hematopoietic cells, including platelets, lymphocytes, and BM precursors. The impact of this overactivation varies among distinct cell types and seems to have differential — beneficial, neutral, or detrimental — effects in the central hematopoietic or peripheral blood compartment.

De novo postzygotic variants that cause monogenic diseases may be underestimated and missed by genetic testing if the VAF in peripheral blood is low. If these variants appear early in embryogenesis, they may result in somatic mosaicism, which adds complexity to the clinical and biological phenotype. Our findings illustrate the phenotypic continuum of monoallelic *RAP1B* GOF variants ranging from isolated primary immunodeficiency and thrombocytopenia in a patient with somatic mosaicism to complex syndromic features in patients with germline mutations.

Methods

Sex as a biological variable. We report a single male patient. However, both male and female patients carrying *RAP1B* variants have been reported (Table 3). Sex was not considered as a biological variable.

Cells and cell culture. See Supplemental Methods.

Immunological analysis. For T cell blast proliferation assays, cells were cultured without IL-2 for 72 hours for synchronization. Lymphocytes were then cultured during 3 to 7 days in complete medium alone or with 100 U/ml IL-2 in the presence of 0.1, 1, or 10 μg/ml coated

anti-CD3 antibody (clone OKT3, Thermo Fisher Scientific, catalog 14-0037) or anti–CD3/CD28-coated beads (Invitrogen GmbH) as previously described (52, 53). Activation-induced cell death in response to anti-CD3 antibody (OKT3) stimulation was measured as previously described (54) in transduced T cell blasts. Apoptotic cells were analyzed after 6 hours of stimulation with increased concentrations of anti-CD3 antibody. Analyses of TCR stimulation, cytokine secretion, and calcium flux were performed as previously described (52, 53, 55). For B-LCL cell proliferation analysis, cells were washed 3 times in PBS and starved overnight for synchronization in RPMI medium supplemented with 0.1% FBS. Then, B-LCL cells were labeled with CellTrace Violet dye (Life Technologies, catalog C34557), cultured for 3 and 6 days in complete medium, and harvested. Cell proliferation was assessed using CellTrace Violet dilution by flow cytometry according to the manufacturer's instructions. Proliferation index was calculated using FlowJo2 software, version 10.7.1, as the total number of divisions/cell that went into division. B-LCL cell cycle assays were performed using double staining with an anti-BrdU monoclonal antibody and propidium iodide (PI) as previously described (56). For B-LCL cell apoptosis, cells were synchronized overnight in RPMI medium supplemented with 0.1% FBS. Afterwards, B-LCL cells were cultured for 6 hours, 12 hours, and 24 hours in complete RPMI medium. Then cells were harvested, and apoptotic and necrotic cells were assessed using annexin V^+ (BioLegend, catalog 640906) and 7-AAD^+ (BioLegend, catalog 420403) staining by flow cytometry according to the manufacturer's instructions.

Molecular genetic assays. See Supplemental Methods.

WES. WES was performed in trio on gDNA extracted from whole blood from P1 and his parents. For details, see Supplemental Methods.

Gene-targeted sequencing. *RAP1B* c.35G>A (G12E) VAF was determined by NGS in a targeted 2-PCR approach in gDNA samples as previously described (57). For details, see Supplemental Methods.

Immunostaining and cell sorting. Cell staining and flow cytometry–based phenotypic analyses of PBMCs were performed according to standard flow cytometry methods. For integrin subunit and CXCR4 receptor analysis, PBMCs were stained with anti-CD11a FITC (β2 subunit of LFA-1, clone HI111, BioLegend, catalog 301206), anti-CD18 phycoerythrin (PE) (α2L subunit of LFA-1, clone 1B4/CD18, BioLegend, catalog 373408), anti-CD29 PE (β1 subunit of VLA-4, clone TS2/16, BioLegend, catalog 303004), and/or anti-CD49d APC (α4 subunit of VLA-4, clone 9F10, BioLegend, catalog 304308) as previously described (58) and with anti-CXCR4 BV421 (clone 12G5, BD Biosciences, catalog 566282) fluorescent-conjugated antibodies. For cell-sorting details, see Supplemental Methods.

B-LCL cell spreading. For B-LCL cell spreading, B-EBV cells were cultivated in complete RPMI and activated with soluble IL-4 (10 ng/ml) for 24 hours. Coverslips were coated in PBS with anti-CD44 antibody for 3 hours (catalog 103046, BioLegend). Cells were placed in warm media and incubated on coverslips for 24 hours at 37°C. After incubation, cells were washed with PHEM buffer 1× and fixed in formaldehyde 4%/glutaraldehyde 0.2%/Triton X-100 0.5% in PHEM buffer 2× for 12 minutes at room temperature. PHEM buffer 1× was obtained after dilution of PHEM 2× (120 mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EGTA, 4 mM Mg acetate dissolve in Milli-Q H_2O adjusted to pH 7.3 with NaOH) with Milli-Q H_2O.

Cells were stained in PBS with 1% FBS for 30 minutes at room temperature using phalloidin AF647 (1:300, catalog A30107, Thermo Fisher) or anti–α-tubulin (1:500) with coupled secondary antibody (1:1,000, AF488, catalog 16-237, Sigma-Aldrich) and DAPI (1:1,000, catalog D1306, Thermo Fisher) for actin cytoskeleton. Mowiol mounting media (pH 7.4) was made with 6 g glycerol (analytical grade), 2.4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem, catalog 475904), 6 ml Aqua dest, 12 ml 0.2 M TRIS buffer pH 74, and 2.5% DABCO (anti-bleaching reagent 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan; Fluka, catalog 33480). The solution was stirred for 4 hours and incubated for 2 hours at room temperature, then 10 minutes at 50°C, centrifuged at 5,000 *g* for 15 minutes, and supernatant collected. Slides were mounted with Mowiol and analyzed by confocal microscopy (Leica SP8).

Image analysis was performed using Fiji, version 2.7.0, sing maximum intensity Z projection of confocal stacks with an applied γ of 0.6 for better cell shape visualization.

Migration assays. PBMC migration assay was performed using Incucyte ClearView 96-well Chemotaxis Plate (Essen BioScience, catalog 4582), 100 mg/ml fibronectin coating (Sigma-Aldrich, catalog P-4707), and 1,500 ng/mL SDF-1α (CXCL12) (R&D Bio-Techne, catalog 350-NS-050) according to the Chemotaxis Cell Migration General Protocol (Essen BioScience). Scheduled images were sequentially acquired every hour using ×10 magnification. Optimized definition parameters in IncuCyte S3 Live-Cell Analysis Instrument were used to generate masks, process images, and create graphs. Migration rate was evaluated with the IncuCyte Live Cell Analysis System (IncuCyte S3, Essen Bioscience) using the normalized area (0 to 1) corresponding to the cells in the upper reservoir over time. Primary fibroblast migration assay was performed using ImageLock 96-well microplate (Essen BioScience, catalog 4379) and IncuCyte S3 Live-Cell Analysis Instrument according to IncuCyte ZOOM 96-Well Scratch Wound protocol and the manufacturer's instructions. Age-matched controls and P1's primary fibroblasts were seeded in 96-well culture plates and cultured until confluency. A scratch was made, plates were then installed in the IncuCyte ZOOM system, and scheduled images at ×10 magnification were taken in each well every hour. Optimized scratch wound definition parameters in the IncuCyte S3 Live-Cell Analysis Instrument were used to generate masks, process images, and generate data. Scratch closure rate was evaluated with IncuCyte software, expressed as percentages of relative wound density and wound confluency.

Expression vectors. For cloning details, see Supplemental Methods.

Preparation of washed platelets. Venous blood from HDs or patient was collected in 10% ACD/A buffer (75 mM sodium citrate, 44 mM citric acid, 136 mM dextrose, pH 4.5). Platelets were washed as previously described (59) in the presence of apyrase (100 mU/Ml; Sigma-Aldrich, catalog A6535) and prostaglandin E1 (1 μM; Sigma-Aldrich, catalog P5515) to minimize platelet activation. Platelet counts were adjusted to 3×10^8 platelets/mL in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, 5 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid, 12 mM $NaHCO_3$ and 2 mM $CaCl_2$, pH 7.3).

Platelet spreading analysis. Glass coverslips were coated with 100 μg/mL human fibrinogen in PBS at 4°C overnight and then blocked with 5% BSA. Washed platelets (3×10^6 platelets) were plated to fibrinogen-coated glass coverslips in the presence of apyrase (5 U/mL) and indomethacin (4.5 μM) in order to prevent platelet amplification and incubated for 30 minutes at 37°C. After washing, platelets were fixed for 15 minutes with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and blocked with 1% BSA; platelet morphology was detected by labeling cytoskeletal F-actin using Alexa Fluor 488–phalloidin (0.3 μM). Finally, the coverslips were mounted to slides and

immunofluorescence images were acquired on an epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse 600). Recorded images were analyzed using ImageJ software (NIH).

Platelet TEM. Washed platelets were fixed by incubation for 1 hour at room temperature with 1.25% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, centrifuged for 10 minutes at 1,100 *g*, and washed once in phosphate buffer. Platelets were kept in 0.2% glutaraldehyde at 4°C until processing for standard TEM analysis of platelet morphology, as previously described (60).

Talin-1 to β_3 integrin association by PLA. 10^5 HEL cells expressing RAP1B-WT, -G12E, or -G12V were plated on fibrinogen-coated coverslips (10 μg/mL) for 30 minutes at 37°C. Adherent cells were fixed with 4% paraformaldehyde in cytoskeleton buffer (0.1 M PIPES, 2 M glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$ pH 6.9) for 15 minutes, then permeabilized for 5 minutes in the same buffer containing 0.2% Triton X-100. Fixed cells were incubated overnight at 4°C with the monoclonal antibody directed against integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (clone P2; 2 μg/mL) and the rabbit polyclonal antibody directed against talin-1 (5 μg/mL). PLAs were performed according to the manufacturer's instructions (Duolink InSitu, Sigma-Aldrich) using oligonucleotide-coupled secondary antibodies against mouse and rabbit primary antibodies (PLA probes). When a pair of PLA probes has bound to primary antibodies in close proximity (<40 nm), a fluorescent dot is observed by epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse 600). The number of fluorescent dots per cell was quantified using ImageJ software in at least 50 transfected mCherry-positive HEL cells.

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in platelets and HEL cells. Activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in platelets was evaluated in diluted whole blood (1/10 in Tyrode's buffer) after incubation with FITC anti-human activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (PAC1) and PE–anti-human CD42b (clone HIP1) for 20 minutes at room temperature according to the manufacturer's instructions. The samples were analyzed directly by flow cytometry (Accuri C6 Plus flow cytometer, BD Bioscience). Platelets were identified from other blood cells by their specific marker, CD42b. The activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in RAP1B-expressing HEL cells was evaluated by quantification of soluble fibrinogen binding to cells. Briefly, 5×10^5HEL cells were incubated for 10 minutes at room temperature with 20 μg/mL Oregon Green^{488}–labeled human fibrinogen (Invitrogen, catalog F-7496). After arrest of the labeling by dilution, fibrinogen binding was determined by flow cytometry (Accuri C6 Plus flow cytometer) in mCherry-positive cells.

RAP1B expression. Washed platelets (3×10^8/mL) were lysed in Laemmli sample buffer (10 mM HEPES, 2% SDS, 10% glycerol, and 5 mM EDTA). Proteins were reduced by incubation with 25 mM DTT, then separated by electrophoresis using NuPage 4%–12% Bis-Tris Protein gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane, which was incubated with the primary antibodies rabbit anti-human RAP1B (0.3 μg/mL) or mouse anti-CD41 (0.2 μg/mL, clone SZ22), used as loading controls for normalization. Immunoreactive bands were visualized with enhanced chemiluminescence detection reagents (ECL) using a G:BOX Chemi XT16 Image System and then quantified using Gene Tools, version 4.03.05.0 (Syngene).

RAP1B activation. RAP1B activation was analyzed in P1 and HD B-LCL, transfected HEK293T cells, and transduced HEL cells. HEK293T cells were transfected with pLVX-EF1α-IRES-mCherry RAP1B-WT, -G12E, -G12V, and -G60R vectors using the jetPRIME Transfection Kit (Polyplus, catalog 114-15). Cotransfections were performed using equimolar 1:1 combinations of RAP1B-WT with each RAP1B-G12E, -G12V, and -G60R vector. Forty-eight hours after transfection, more than 85% of HEK293T transfected cells were mCherry positive. HEL cells were transduced with viral supernatant containing vectors for RAP1B-WT, -G12E, or -G12V in the presence of 6 μg/mL polybrene. Two weeks after transduction and expansion, transduced HEL cells were sorted at the Flow Cytometry Core Facility of Institut Necker Enfants Malades (INEM). Transduction efficiency was evaluated by scoring mCherry transgene expression by flow cytometry (Accuri C6 flow cytometer). More than 90% of transduced cells were mCherry positive and remained stable over time. RAP1B activation (RAP1B-GTP/RAP1B) was determined in B-LCL, transfected HEK293T cells, and transduced HEL cells using active Rap1 Pull-Down and Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, catalog 1612). RAP1B was detected by Western blotting using rabbit polyclonal IgG anti-RAP1B antibody (0.3 μg/mL, Proteintech, catalog 10840-1-AP).

Statistics. Results are reported as mean ± SEM. Graphs and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 9.4.1 (GraphPad Software). Data were compared using 2-tailed Student's *t* test,Mann-Whitney *U* test, or 1-way ANOVA followed by post hoc test for multiple comparisons, as indicated in the figure legends. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Study approval. The institutional INSERM and Necker-Enfants Malades Hospital Review Boards approved this study. AP-HP obtained a favorable opinion from the Comité de Protection des Personnes for this research (CPP Ile de France II) on March 11, 2015. Written, informed consent was obtained from the patient's parents in accordance with the Helsinki Declaration. HD cells were obtained under agreement EFS C-CPSL-UNT N°20/EFS/005.

Data availability. Values for all data points in graphs are reported in the Supporting Data Values file.

Author contributions

DM identified the variant and conceived the project. MBN, FA, and DM designed the experiments. MBN, FA, and EM performed most of the experiments and analyzed the data. MBN performed HEK293T, B-LCL, PBMC, and T cell blast experiments, established primary fibroblast culture, performed cell sorting and NGS analysis, generated expression vectors, and produced lentiviral supernatants. C Boussard performed cell morphology in B-LCL. FA, helped by AK, CR, and MF, performed the experiments carried out in platelets and HEL cell lines. EM performed PBMC immunophenotype and T cell blast functional experiments. CLP helped to design BM cell-sorting experiments and performed functional experiments from $CD34^+$ cells. C Brouzes analyzed P1 BM smears. CP and NL performed immunophenotyping and microsatellite analysis. PP performed P1 B-LCL cell migration in microchannels. MZ performed WES. JCB performed TEM analysis of P1 platelets. DM, DB, JRG, MC, GM, and C Boussard provided medical care and treated P1. IC performed formal analysis and data visualization and contributed to writing. DM and MBN wrote the manuscript, with contributions from FA, PR, and JPDV. DM wrote the revised version of the manuscript, with contributions from MBN, FA, PR, and JPDV. All authors read and approved the manuscript. MBN and FA contributed equally to data production and are credited as co–first authors. MBN was chosen as the first name because she wrote the largest fraction of the manuscript.

Acknowledgments

We warmly thank the patient and his family for their contribution to this study and Odile Minckes for referring the patient to us. We thank the members of Genome Dynamics in the Immune System (DGSI) laboratory. We are grateful to Claire Hivroz, Sven Kracker, and Alain Fischer for helpful discussions. We thank Fernando E. Sepulveda, Mathieu Fusaro, Ludovic Lhermitte, and Aurore Touzart for their help. We thank Christine Bole-Feysot, Mélanie Parisot, Cécile Masson, and Patrick Nitschke from the Genomics Core Facility and Bioinformatics Platform (Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM U1163 and INSERM US24/CNRS UAR3633), Olivier Pellé and Jérome Mégret from the Cytometry Core Facility (Institut Imagine-Structure Fédérative de Recherche Necker), Centre de Ressources Biologiques de l'Hôpital Necker (CRB-ADN), the Vectorology Facility Vect'UB (TBMCore - CNRS UAR3427, INSERM US005, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France) for providing lentiviral particles for transducing T cell blasts and for technical support, and the CIQLE Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (France) for expert technical assistance with the electron microscopy studies. This work was funded in part by INSERM, Équipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer (Allocations Doctorales 1ère Année de Thèse to MBN), the European Society for Immunodeficiencies (ESID research grant 2021/2022 to MBN), Centre de Référence des Déficits Immunitaires Héréditaires (CEREDIH), state funding from the Agence Nationale de la Recherche under ANR-13-PRTS-0004 Immune-Rep (PRTSN1339005), and E-Rare Joint Transnational Call for Proposals 2015 EuroCID to DM.

Address correspondence to: Despina Moshous, Unité d'Immunologie, Hématologie et Rhumatologie Pédiatriques (UIHR), Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, Rue de Sèvres, F-75015 Paris, France, or INSERM UMR1163, Laboratory Genome Dynamics in the Immune System, Imagine Institute, 24 boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France. Phone: 33.1.44.49.48.23; Email: despina.moshous@inserm.fr.

1. Warren JT, Di Paola J. Genetics of inherited thrombocytopenias. *Blood*. 2022;139(22):3264–3277.
2. El Masri R, Delon J. RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):499–513.
3. Vainchenker W, et al. Role of Rho-GTPases in megakaryopoiesis. *Small GTPases*. 2021;12(5–6):399–415.
4. Tangye SG, et al. Human inborn errors of the actin cytoskeleton affecting immunity: way beyond WAS and WIP. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(4):389–402.
5. Niemann JH, et al. De novo missense variants in the RAP1B gene identified in two patients with syndromic thrombocytopenia. *Clin Genet*. 2020;98(4):374–378.
6. Miller D, et al. Third reported patient with RAP1B-related syndromic thrombocytopenia and novel clinical findings. *Am J Med Genet A*. 2022;188(9):2808–2814.
7. Shimonaka M, et al. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol*. 2003;161(2):417–427.
8. Stefanini L, et al. Functional redundancy between RAP1 isoforms in murine platelet production and function. *Blood*. 2018;132(18):1951–1962.
9. Chen K, et al. Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):116.
10. Chu H, et al. Rap1b regulates B cell development, homing, and T cell-dependent humoral immunity. *J Immunol*. 2008;181(5):3373–3383.
11. Karczewski KJ, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809):434–443.
12. Adzhubei IA, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248–249.
13. Kircher M, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310–315.
14. Kumar P, et al. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073–1081.
15. Dou Y, et al. Detecting somatic mutations in normal cells. *Trends Genet*. 2018;34(7):545–557.
16. Mensa-Vilaró A, et al. Unexpected relevant role of gene mosaicism in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):359–368.
17. Lagresle-Peyrou C, et al. Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat Genet*. 2009;41(1):106–111.
18. Franke B. Rapid Ca^{2+}-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J*. 1997;16(2):252–259.
19. Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(1):13–19.
20. Britton C, et al. Polyfunctionality of the CXCR4/CXCL12 axis in health and disease: Implications for therapeutic interventions in cancer and immune-mediated diseases. *FASEB J*. 2021;35(4):e21260.
21. Hartmann TN, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and $CD34^+$ cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):1130–1140.
22. Chan PY, Aruffo A. VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. *J Biol Chem*. 1993;268(33):24655–24664.
23. Ueda Y, et al. Rap1 organizes lymphocyte front-back polarity via RhoA signaling and talin1. *iScience*. 2023;26(8):107292.
24. Scrima A, et al. The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues. *EMBO J*. 2008;27(7):1145–1153.
25. Berrou E, et al. Gain-of-function mutation in filamin A potentiates platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(6):1087–1097.
26. Bialkowska K, et al. Site-specific phosphorylation of kindlin-3 protein regulates its capacity to control cellular responses mediated by integrin αIIbβ3. *J Biol Chem*. 2015;290(10):6226–6242.
27. Hogg N, et al. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):416–426.
28. Chrzanowska-Wodnicka M, et al. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J Clin Invest*. 2005;115(3):680–687.
29. Chen Y, et al. A critical role of Rap1b in B-cell trafficking and marginal zone B-cell development. *Blood*. 2008;111(9):4627–4636.
30. Li Y, et al. Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins. *J Immunol*. 2007;179(12):8322–8331.
31. Bagger FO, et al. BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(d1):D881–D885.
32. Uhlen M, et al. A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science*. 2019;366(6472):eaax9198.
33. Osaka N, et al. Divergent mechanisms activating RAS and small GTPases through post-translational modification. *Front Mol Biosci*. 2021;8:707439.
34. Cherfils J, Zeghouf M. Chronicles of the GTPase switch. *Nat Chem Biol*. 2011;7(8):493–495.
35. van Dam TJP, et al. Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases*. 2011;2(1):4–16.
36. Pardo LM, et al. Adding to the evidence of gene-disease association of RAP1B and syndromic thrombocytopenia. *Clin Genet*. 2024;105(2):196–201.
37. Crazzolara R, et al. A new mutation in the KINDLIN-3 gene ablates integrin-dependent leukocyte, platelet, and osteoclast function in a patient with leukocyte adhesion deficiency-III. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(9):1677–1679.
38. McDowall A, et al. Two mutations in the KINDLIN3 gene of a new leukocyte adhesion deficiency III patient reveal distinct effects on leukocyte function in vitro. *Blood*. 2010;115(23):4834–4842.
39. Shattil SJ, et al. The final steps of integrin acti-

vation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):288–300.
40. Calderwood DA. The Rap1-RIAM pathway prefers β2 integrins. *Blood*. 2015;126(25):2658–2659.
41. Han J, et al. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIbβ3. *Curr Biol*. 2006;16(18):1796–1806.
42. Noguchi H, et al. The structure and conformational switching of Rap1B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;462(1):46–51.
43. Lukman S, et al. The distinct conformational dynamics of K-Ras and H-Ras A59G. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(9):e1000922.
44. Scala M, et al. Variant-specific changes in RAC3 function disrupt corticogenesis in neurodevelopmental phenotypes. *Brain*. 2022;145(9):3308–3327.
45. Zhao J, et al. Cluster analysis on conformational changes of the GDP/KRAS complex induced by A59G and D33E. *Chem Phys Lett*. 2021;781:138995.
46. Bos JL. From Ras to Rap and back, a journey of 35 years. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(2):a031468.
47. Lougaris V, et al. RAC2 and primary human immune deficiencies. *J Leukoc Biol*. 2020;108(2):687–696.
48. Donovan MF, Cascella M. Embryology, Weeks 6-8. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; October 10, 2022.
49. Rho S-S, et al. Rap1b promotes notch-signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion. *Dev Cell*. 2019;49(5):681–696.
50. Heusinkveld LE, et al. WHIM syndrome: from pathogenesis towards personalized medicine and cure. *J Clin Immunol*. 2019;39(6):532–556.
51. Chen Y, et al. The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition. *J Thromb Haemost*. 2013;11(12):2163–2175.
52. Martin E, et al. Impaired lymphocyte function and differentiation in CTPS1-deficient patients result from a hypomorphic homozygous mutation. *JCI Insight*. 2020;5(5):e133880.
53. Martin E, et al. CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation. *Nature*. 2014;510(7504):288–292.
54. Gérart S, et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*. 2013;121(4):614–623.
55. Hauck F, et al. SYK expression endows human ZAP70-deficient CD8 T cells with residual TCR signaling. *Clin Immunol*. 2015;161(2):103–109.
56. Chansel-Da Cruz M, et al. A disease-causing single amino acid deletion in the coiled-coil domain of RAD50 impairs MRE11 complex functions in yeast and humans. *Cell Rep*. 2020;33(13):108559.
57. Berland A, et al. PROMIDISα: A T-cell receptor α signature associated with immunodeficiencies caused by V(D)J recombination defects. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):325–334.
58. Bouafia A, et al. Loss of ARHGEF1 causes a human primary antibody deficiency. *J Clin Invest*. 2019;129(3):1047–1060.
59. Adam F, et al. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost*. 2003;1(4):798–804.
60. Nurden P, et al. Platelet ultrastructural abnormalities in three patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2000;110(3):704–714.
61. Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*. 2004;2004(250):RE13.
62. Cunningham F, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(d1):D988–D995.
63. Kluesner MG, et al. EditR: a method to quantify base editing from Sanger sequencing. *CRISPR J*. 2018;1(3):239–250.

Supplementary Appendix

DOCK11 deficiency in patients with X-linked actinopathy and autoimmunity

This document includes

- Clinical cases
- Supplementary Materials and Methods
- Data sharing statement
- Supplementary figures
- Supplementary table 1
- Legend of the supplementary Table 2
- Supplementary table 3
- Supplementary references

Clinical cases

Patients:

Patient A, a boy born to nonconsanguineous Caucasian parents, presented at the age of 17 months with severe ulcerative colitis affecting left colon, refractory to multiple lines of treatment: aminosalicylates, azathioprine, sirolimus, everolimus, infliximab. Anatomo-pathological analysis of intestinal biopsies showed normal architecture in stomach, duodenum, ileum, and right colon but a dense inflammatory infiltrate composed of plasma cells, lymphocytes and numerous neutrophils and an aspect of pseudo-villous surface of the colonic mucosa. At 30 months of age, he developed severe anti-αIIbβ3 positive ITP, which partially responded to several lines of immunosuppressive treatment. ANA, anti-TPO and anti-thyroglobulin antibodies were positive with normal thyroid function. Stabilization of thrombocytopenia and inflammatory bowel disease (IBD) was obtained at the age of 8 years with sirolimus, 5-ASA, azathioprine, bi-monthly intravenous immunoglobulins (IVIG) and TPO analogs. He also suffered one episode of transient neutropenia. At the age of 10 years, after a mild viral infection, he presented with Sweet syndrome and was treated with oral corticosteroids. At 13 years old, he developed panniculitis confirmed on skin biopsy (FigS1) and treated with corticosteroids and immunoglobulins infusion. He had a persistent microcytic anemia. At 14 years of age, he was still using immunosuppressives, with control of gastrointestinal manifestation but ongoing highly fluctuating ITP. He was considered a candidate for bone marrow transplant. Of note, his older half-sister was not a carrier of the mutation.

Patient B, a 9-year-old boy was born to nonconsanguineous Caucasian parents. He presented at 5 years old with recurrent hemolytic anemia with positive Coombs test, requiring immunosuppressants and blood transfusions. It occurred one month after a mild episode of chickenpox. At 6 years old, he developed RF+ juvenile idiopathic arthritis, which responded to methotrexate and adalimumab. Both his hemolytic anemia and arthritis are currently in remission. Inflammation of descending colon was diagnosed by endoscopy performed for investigation of his anemia, but he has no gastrointestinal symptoms. Vaccine responses were tested and were sub-normal.

Patient C, a boy born to nonconsanguineous Caucasian parents, presented at 3 years of age with Evans syndrome with positive IgG Coombs test and IgA deficiency. From 3 to 11 years old, he had recurrent ITP and AIHA flares treated with corticosteroids for up to 3 months. From the age of 11, he had chronic ITP with 3 to 4 acute episodes per year, treated with corticosteroids. Chronic thrombocytopenia of 70,000/mm3 persisted between acute episodes, without bleeding disorders. He had progressive hypogammaglobulinemia. Vaccine responses were not tested. He had recurrent folliculitis and conjunctivitis.

Patients D1 and D2 were twin boys born to nonconsanguineous Reunionese parents.
Patient D1 presented at 14 years of age with asthenia, polyarthralgia, diarrhea and positivity of ANA, RF, anti-U1RNP and anti-Sm autoantibodies. He was treated with hydroxychloroquine and oral corticosteroids. At 16 years of age, he had pericarditis treated with glucocorticoid infusions and mycophenolate mofetil. Terminal ileitis with a high fecal calprotectin was also diagnosed. At 18 years of age, non-severe pulmonary interstitial disease with restrictive pattern appeared progressively. Pulmonary functional test showed diminished diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) and carbon monoxide transfer coefficient (KCO) with decreased total lung capacity. He was treated with subcutaneous belimumab injections. He had also oral

discoid LE. Diagnosis of SLE was made. At 19 years of age, he was in clinical and biological remission with hydroxychloroquine.
Patient D2 presented at 9 years of age with asthenia, polyarthralgia, diarrhea, pericarditis and positivity of ANA, RF, anti-U1RNP and anti-Sm autoantibodies. He was treated with hydroxychloroquine and oral corticosteroids. At 16 years old, he had a severe bullous cutaneous SLE with positive anti-collagen VII antibody treated with high dose of corticosteroids, hydroxychloroquine and dapsone. Diagnosis of SLE was made. At 19 years of age, he was in clinical and biological remission under hydroxychloroquine. Both twins had growth retardation with GH partial deficiency. D2 presented non severe osteopenia diagnosed by bone densitometry.

Patient E, a boy born to consanguineous Algerian parents, presented at 3 years old with ITP treated with corticosteroids. During the following two years, he had two ITP relapses once with positive IgG Coombs test, positive ANA and ASMA. He was treated with IVIG and oral corticosteroids. ITP was associated with non-severe AIHA leading to a diagnosis of Evans' syndrome. At 10 years of age, he had a relapse of ITP treated with IVIG and glucocorticoids for 3 months which led to remission.

Patient F, a boy born to nonconsanguineous Algerian and Moroccan parents, presented at 5 years of age with recurrent fever episodes with myalgias and diarrhea. Six months after, he had a localized ecthyma gangrenosum at the outer lateral edge of the right foot without any microbes identified. Concomitant anti-neutrophils antibody (anti-CD16) positive autoimmune neutropenia was diagnosed. Since then, he presented recurrent auto-inflammatory episodes with fever, myalgia, diarrhea, inflammatory syndrome without microbiologic identification. He had intercurrent acute otitis media and cellulitis after skin traumatic lesions which responded to antibiotics. He presented with oral ulcer, chronic gingivitis, a non-severe anal ulceration and weight retardation, which is still to be formally investigated. He had chronic neutropenia, hypergammaglobulinemia associated with lymphoproliferative syndrome (splenomegaly). A microcytic anemia with a positive Coombs (IgG) test once without others signs of hemolysis was observed.

Patient G, a boy born to nonconsanguinous North Africans parents, presented at 5 years old with a Coombs positive AIHA treated with one year of corticosteroids. At 7 years of age, a first relapse was treated with prolonged course of corticosteroids. At the second relapse at 8 years old, he was treated with four infusions of Rituximab and corticosteroids. Sirolimus was introduced and corticosteroids were stopped almost two years later. At 13 years of age, he had an ITP with positive platelets antibodies treated by two IVIG and TPO analogs with poor observance of sirolimus. Three months after, he had a relapse of AIHA and ITP under sirolimus treatment. He was successfully treated with four infusions of Rituximab, high dose of corticosteroids, and increasing dose of TPO analogs. Six months after the last relapse he was still in complete remission and corticosteroids were stopped. Vaccine responses were normal. Level of IgM were normal and decreased after treatment with Rituximab.

Supplemental Methods

Exome sequencing

As previously described, Exome libraries were performed with the Twist Bioscience kits (Twist Human RefSeq Exome Kit, 36 Mb). Briefly, genomic DNA (from 500 ng to 100 ng) was sheared with an Ultrasonicator (Covaris). A total amount of 50ng of the fragmented and purified double strand DNA was used to prepare Twist Exome libraries as recommended by the manufacturer, but with no initial enzymatic shearing

and using adaptators with Unique Molecular Identifier barcodes (IDT). Barcoded exome libraries were pooled and sequenced with the NovaSeq6000 system (Illumina) generating paired-end reads (100 bases + 100 bases). [About ~40 millions of clusters per exome library was produced]
After demultiplexing, sequences were aligned to the reference human genome hg19 using the Burrows-Wheeler Aligner. The mean depth of coverage per sample was approximately 156.2. Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard, following documented best practices. (http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices).
The annotation process was based on the latest release of the Gencode database, Gnomad, Clinvar, CADD. Variants were annotated and filtered using the Polyweb software interface designed by the Bioinformatics platform of University Paris Cité.

DNA extraction and sanger sequencing

DNA was extracted from T cells or PBMC by using QIamp DNA blood (Qiagen, Courtaboeuf, France). Sanger sequencing was performed to confirm the next-generation sequencing results and to analyze each mutation's familial segregation. Purified PCR products were directly sequenced using BigDye Terminators (version 1.1) and a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Protein structure prediction

3D structure prediction of human DOCK11 protein was performed considering information from literature described structures and AlphaFold2 model[1] (AF-Q5JSL3-F1-model_v1.pdb). Both the C2-like and ARM domains are common to all the DOCK subgroups, including the DOCK-A one for which cryo-EM 3D structures have been determined (DOCK2 [2], DOCK5 [3]), while the PH domain is specific for the DOCK-D subgroup to which DOCK11 belongs [4]. Analysis of the AlphaFold2 prediction made for the C2-like domain is detailed in Supplemental Figure 6, which also provides multiple sequence alignments of the C2-DHR1 and ARM domains from the DOCK-A subgroup.

3D structures were visualized using UCSF Chimera [5]. Multiple sequence alignment handling and rendering were made using SeaView [6] and EsPript [7], respectively.

Treg staining

PBMC were thawed, washed with PBS, and stained. Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD3-PerCP-Cy5.5; CD4 BV510; CD8a BV711 ;CD127-FITC ; CD45RA Pe-Cy5 ; CD25 PE-Cy7. Cells were permeabilized and fixed with the kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer (eBioscience™ #00-5523-00), according to manufacturer instructions. Intracellular staining was performed 1h on ice using antibodies anti-CTLA-4 PE; FoxP3 APC; Helios BV421. Cells were resuspended in PBS and analyzed on the BD LSRFortessa™ X-20 SORP Cell Analyzer cytometer.

pSTAT5 assays

PBMC or activated T cells were washed with cold PBS and then stimulated by IL2 10^4 UI/ml for 15 min 60 min. Viability dye (ThermoFisher, # 65-0863-18) was used to stain the dead cells according to manufacturer instructions. Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD3-AF700; CD4 BV510; CD8a BV711 ; CD127-FITC ; CD45RA Pe-Cy5 ; CD25 BV650 ; CD19 APC ; CD161 PE ; TCR-Vα2 Pe-Cy7. Cells were permeabilized and fixed with the kit Perfix EXPOSE (Beckman Coulter #B26976), according to manufacturer instructions. Intracellular staining was performed 1h on ice using antibodies anti-pSTAT5 BV421 (pY694, BD #562984). Cells were resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer.

pSTAT1 assays

Activated T cells were starved of IL-2 overnight. Cells were washed with cold PBS and then stimulated by IL-6 for 15-, 30-, 60- and 120-min. Viability dye (ThermoFisher, # 65-0863-18) was used to stain the dead cells according to manufacturer instructions. Extracellular staining was performed 20 min using antibodies anti-CD3-Pe-Cy7; CD4 BV510; CD8a BV711. Cells were permeabilized and fixed with the BD Cytofix Fixation Buffer (BD, # 554655) and BD Phosphoflow buffer III (BD, # 558050), according to manufacturer instructions. Intracellular staining was performed 2h on ice using antibodies anti-pSTAT3 PE. Cells were resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer.

Activated T cells staining

Expansion of T cell blasts was obtained by incubating PBMCs for 72 h with anti CD3/CD28 beads in complete Panserin 401 medium. After 72h, T-cell blasts were expanded in complete Panserin supplemented with IL-2 (100 IU/ml). After 10 days, cells were washed with PBS and stained with viability marker (ThermoFisher, #65-0863-18). Extracellular staining was performed 30 min on ice using antibodies anti-CD4 BV510; CD8 APC and anti-CD3 AF488. Cells were permeabilized and fixed with the kit Perfix EXPOSE (Beckman Coulter #B26976), according to manufacturer instructions. Intracellular staining was performed 1h on ice using antibodies anti-pSTAT5 BV421 (pY694, BD #562984). Cells were resuspended in PBS and analyzed on the Novocyte 3005 Agilent cytometer.

Proliferation assays

After 10 days of culture, activated T cells were starved of IL-2 for 72 h, washed, incubated with CellTrace violet reagent (Invitrogen) for 8 min at 37 °C in the dark, and washed twice more.

2×10^5 cells (per well) were seeded into 96-well plates, either coated with anti-CD3 antibody (OKT3 #Invitrogen) at 0,5 µg/ml and 1µg/ml, or with medium. The cells were cultured for 4 days, washed with PBS, and stained with anti-CD3 (PECy7), CD4 (PerCP/Cy5.5), CD8(APC), CD25(BV650), and CD69 (PE) antibodies prior to BD LSRFortessa™ X-20 SORP Cell Analyzer cytometer measurement.

Cytokines dosages in patients' plasma

Cytokines concentrations have been measured with the Legendplex Human Essential Immune Response Panel (Biolegend, #740930) according to the manufacturer instructions. BAFF, APRIL and sCD40L have been measured with the Legendplex B cell activator (Biolegend, 740535). The results have been analyzed on https://legendplex.qognit.com/ then on GraphPad Prism v.9.2.0 software.

shRNA knock-down in primary T cells

As previously described 15, 293FT cells (Invitrogen) were cultured in DMEM (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS, heat inactivated) (Sigma), 0.1 mM MEM non-essential Amino Acids, 6mM L-glutamine, 1mM MEM sodium pyruvate, and antibiotics (Gibco). 293FT cells were transfected in 10cm plate with 2,4 ml DMEM containing 36 µg of DNA (19,2 µg plasmid of interest, 12 µg pCMV-Δ8.91 and 4,8 µg pCMV-VSGg) and 48 µl TransIT-293 (Mirus Bio MIR2705). After 24 hours, supernatant was replaced with fresh DMEM 10% FBS medium. After 48 hours of cells transfection, viral supernatants were collected and filtered twice at 0,45µm.

Expansion of T cell blasts was obtained by incubating healthy donors' PBMCs for 72 h with PHA 25µg/ml in complete Panserin 401 medium. After 2,5 days, T-cell blasts were pre-activated with CD3/CD28 beads and IL2 100 UI/ml for 12 hours. Cells were transduced twice at day 3,5 and at day 4. Briefly, cells were plated into 96-well plates with 50000 cells per well at the concentration of 500 cells/µL in RPMI + 10 % SVF without antibiotics. After plate centrifugation at 1500 rpm for 5 min, filtered viral suspension was added with 1/200

of Lentiboost (Sirion tech) and 4µg/ml Polybrene in a final volume of 250 µL/ well. Plate was spinoculated for 1 hour at 2000 rpm at RT and incubated at 37°C for 12 hours. Second transduction followed the same procedure. After 8 hours of incubation, cells were briefly centrifugated, supernatant was removed and fresh complete RPMI with antibiotics was added with IL2 100 UI/ml. RNA, proteins were extracted at day 10. Migration and spreading assay were performed at day 14 and day 16.

Mass cytometry

Antibodies coupling

Anti-FAS (#555670, BD Biosciences) antibody was coupled to 116Cd using the kit # 201116A (Fluidigm) according to manufacturer protocol.

Samples staining

Immune phenotyping on whole blood was carried out using the Maxpar Direct Immune Profiling kit (Fluidigm, Cat# 201325) with an antibody panel of 30 markers for CyTOF (Cytometry by Time Of Flight) analysis. To these 30 markers, 8 additional antibodies were added to detect FAS and certain immune checkpoints (TIM3, TIGIT, ICOS, GITR, PD-1). 300 µL of heparinized whole blood were used per labeling. The cells were incubated for 20 min at room temperature (RT) with 3µL of heparin (Sigma Aldrich, Cat# H3149-10KU) at 10,000 U/mL and 5µL of Human TruStain FcX (Biolegend, Cat# 422302), then incubated for 30 min at RT with the antibody cocktail for extracellular labeling (except CTLA-4 for which intracellular labeling was necessary). Blood lysis was perfomed using Cell Cal-lyse buffer (Thermofischer, GAS-010S100) according to manufacturer instructions. Finally, cells were incubated in the Fix&Perm buffer (Fluidigm, Cat# 201325) with the Iridium intercalator at 1:1000 dilution (Fluidigm, Cat# 201325) overnight at 4°C. Cell solutions were frozen at -80°C prior to acquisition.

Acquisition

As previously described, acquisition were performed on Helios mass cytometer [8]. For acquisition, cells were washed and resuspended at a concentration of 1.106/mL in Maxpar Cell Acquisition Solution, a high ion concentration solution, and mixed with 10% EQ beads (allowing for calibration automatic device) immediately before the acquisition. The acquisition of the events was carried out on the Helios mass cytometer (Fluidigm) coupled with the CyTOF software version 6.7.1014 (Fluidigm) at the Pitié-792 Salpetrière Cytometry Platform (CyPS). The acquired data were normalized using the Fluidigm normalisation algorithm. Cells were selected by cell selection (Ir191+Ir193+), cell doublets were removed (Time/offset, Time/width, Time/Centre, and Time/residual) and dead cells were removed (Ir193+Rh103+). This selection is done automatically with the Pathsetter software.

Data analysis

FCS files containing viable singlet cells were uploaded in R version 4.0.3 using the flowCore package. All files were concatenated in a SingleCellExperiment (SCE) with the SingleCellExperiment package. After quality control (number of cells per sample, expression pattern of all markers across samples), all cells were submitted to clustering using the cluster function (FlowSOM and ConsensusMetaClustering) following recommendation from the CATALYST packages [9]. For clustering, k paramater was set to 60 to detect small immune populations. Clusters were then identified based on their expression of type markers according to previous knowledge of immune cell phenotype and following manufacturer instruction from Fluidigm Maxpar Immune Profiling[9] (See heatmap in Fig. S3B). Clusters expressing the same type markers were merged into

one single immune cell population. Proportion of clusters among all intact viable cells were then defined using appropriate function from CATALYST and compared between groups using Mann-Whitney test in R. To go further in the detail of memory CD4 T cells they were submitted to subclustering using CXCR3, CXCR5, CCR6 and CCR4 as type markers defining Th1-like, Th2-like, Th17-like and Tfh-like cells. Median expression intensity of markers of interest was assessed using the plotPbExprs from CATALYST package. Dimension reduction in UMAPs was performed using runDR function from CATALYST with neighbors set to 15 and minimum distance to 0.4. Marker intensity visualization on UMAPs was performed upon data normalization between 0 and 1. All other visualization was performed using in-house and ggplot2 functions.

Preparation of washed platelets

Venous blood from healthy donors or patients was collected in 10% ACD/A buffer (75 mM sodium citrate, 44 mM citric acid, 136 mM dextrose, pH 4.5). Briefly, platelets were washed as previously described [10] in the presence of apyrase (100 mU/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and prostaglandin E1 (1 µM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to minimize platelet activation, before to be resuspended in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid, 12 mM $NaHCO_3$ and 2 mM $CaCl_2$, pH 7.3).

Western blotting for platelet expression of DOCK11

Washed platelets (3×10^8/mL) were lysed in Laemmli sample buffer (10 mM HEPES, 2% SDS, 10% glycerol and 5 mM EDTA). The proteins were reduced by incubation with 25 mM dithiothreitol (DTT) then separated by electrophoresis using NuPage™ 4-12% Bis-Tris Protein gel (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane, which were incubated with the primary antibodies rabbit anti-DOCK11 (dilution 1/1000) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and mouse anti-β-actin (dilution 1/10000) (R&D Systems), used as loading control for normalization. Immunoreactive bands were visualized with enhanced chemiluminescence detection reagents (Enhanced chemiluminescence detection reagents ECL, Perbio Science, ThermoFisher Scientific) using a G:BOX Chemi XT16 Image System and then quantified using Gene Tools version 4.03.05.0 (Syngene, Cambridge, UK).

Transmission Electron Microscopy (TEM) of platelets

Platelet-rich plasma (PRP) was fixed by incubation for 1 hour at room temperature with 1.25% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, centrifuged for 10 minutes at 1100 g, and washed once in phosphate buffer. Platelets were kept in 0.2% glutaraldehyde at 4°C until processing for standard transmission electron microscopy analysis of platelet morphology, as previously described [11].

Flow cytometry of platelets

The expression of platelet receptors ant the activation of integrin αIIbβ3 were evaluated using washed platelets in Tyrode's buffer at a concentration of 2x108/mL after stimulation or not by thrombin or convulxin (Pentapharm, Basel, Switzerland). After 10 minutes without stirring, platelet stimulation was stopped by adding 1 mL Tyrode's buffer containing 2 mM CaCl2. Platelets were then incubated with APC(Allophycocyanin) recombinant anti-hCD41/CD61 (clone REA607, Miltenyl biotec), FITC (Fluorescein isothiocyanate) mouse anti-human CD42b (clone HIP1, Becton Dickinson), Alexa647 mouse anti-human GPVI (clone HY101, Becton Dickinson) or FITC anti human-activated αIIbβ3 integrin (clone PAC-1, Becton Dickinson) according to manufacturer's instructions for 20 minutes at room temperature. The samples were then analyzed directly with a BD Accuri C6 Plus flow cytometer (Becton Dickinson).
Platelet size was evaluated by recording the forward scatter (FSC-H) parameters.

CDC42 activity

CDC42 activity was evaluated by CDC42 G-LISA kit (#BK127, Cytoskeleton) according to supplier instruction. Briefly, washed platelets (10^8) were activated with 500 mU/mL thrombin (bovine thrombin, Sigma-Aldrich) for 60 seconds, then lysed using lysis buffer provided in the G-LISA kit, supplemented with inhibitor cocktail. Platelet lysates were then immediately immerged in nitrogen bath and store at -80°C until analysis.

RhoA activity

RhoA activity was evaluated by RhoA G-LISA kit (#BK124, Cytoskeleton) according to supplier instruction. Briefly, washed platelets (10^8) were activated with 500 mU/mL thrombin (bovine thrombin, Sigma-Aldrich) for two minutes or five minutes if platelets were treated before with RAC/CDC42 inhibitor (EHop-016, 10µM, #1380432-32-5, Calbiochem), then lysed using lysis buffer provided in the G-LISA kit, supplemented with inhibitor cocktail. Platelet lysates were then immediately immerged in nitrogen bath and store at -80°C until analysis.

Immunofluorescence analysis for platelet spreading

Glass coverslips were coated with 100 µ g/mL human fibrinogen (HYPHEN BioMed SAS Andresy, France). or 20 µg/mL von Willerband factor (VWF, LFB, Les Ulis, France) in PBS at 4°C overnight. Washed platelets ($3x10^6$platelets) were plated for 30 minutes at 37°C to fibrinogen-coated glass coverslips in presence of apyrase (5 U/mL) and indomethacin (4.5 µM) or to VWF-coated glass coverslips in presence of botrocetin (2 µg/mL, Kordia, Leiden, The Netherlands). After washing, platelets were fixed for 15 minutes with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, blocked with 1% BSA, and platelet morphology was detected by labeling cytoskeletal F-actin using Alexa Fluor 488-phalloidin (0.3 µM, Invitrogen). Finally, the coverslips were mounted to slides and immunofluorescence images were acquired on an epifluorescence microscope (Nikon, Eclipse 600). Recorded images were analyzed using the ImageJ software.

Platelet surface glycan expression profile

The expression of platelet surface glycans was determined using FITC-conjugated lectins RCA(Ricinus communis Agglutinin, Vector Labs, Burlingame, CA), ECL(Erythrina cristagalli Lectin, Vector Labs, Burlingame, CA.), SNA(Sambucus nigra, Vector Labs, Burlingame, CA.), PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin, Vector Labs, Burlingame, CA.) or LEL (Lycopersicon esculentum, Vector Labs, Burlingame, CA.) as previously described [12]. Briefly, PRP (5 µL) was incubated with the lectins (15 µg/mL) for 30 minutes at room temperature in a final volume of 100 µL. The reaction was stopped with PBS (400 µL) and then analyzed using a BD Accuri C6 Plus flow cytometer.

Spreading assays and actin staining

For T cell spreading, coverslips were coated overnight in PBS with poly-L-lysine, anti-CD28 (10µg/mL, # 302934, Biolegend) and anti-CD3 antibody (0,1µg/mL or 1µg/mL, #317326, Biolegend). For B-EBV cell spreading, coverslips were coated in PBS with anti-CD44 antibody for 3 hours (#103046, Biolegend). For primary fibroblast, no coating was used. Some Tblasts from patients and healthy controls, and primary fibroblasts of patient A were treated with a CDC42/RAC activator, CN02, at 1UI/ml for 10 min (Cat. #CN02, Cytoskeleton, Inc.)

Cells were placed in warm media and incubated on the coverslips for 30 min at 37°C. After the incubation, cells were washed with PHEM buffer 1X and fixed in formaldehyde 4%/ Glutaraldehyde 0,2%/ Triton 0,5% in PHEM buffer 2X for 12 min at room temperature. PHEM Buffer 1X was obtained after dilution of PHEM

2X (120mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EGTA, 4mM Mg actetate dissolve in milliQH2O adjusted to pH 7,3 with NaOH) with milliQH2O.
Cells were stained in PBS with 1% FBS for 30 min at room temperature using phalloidin AF647 (1:300, #A30107, Thermofisher) and DAPI (1:1000, # D1306, Thermofisher). Mowiol mouting media (pH 7,4) was made with 6gr of Glycerol (analytical grade), 2,4gr of Mowiol 4-88 (Calbiochem # 475904), 6ml of Aqua dest, 12 ml of 0.2 M TRIS Buffer pH74 and 2,5% of DABCO (Anti -Bleaching-Reagent 1,4-Diazabicyclo-82.2.29-octan; Fluka #33480). The solution was stired for 4 hours (magnetic stirrer) and incubated for 2 hours more at room temperature. The solution was incubated 10 min at 50°C and centrifugated at 5000 g for 15 min and supernatant collected. Slides were mounted with Mowiol and analyzed by confocal microscopy (Leica SP8).

Image analysis was performed using Fiji as described [13]. Shortly, the analysis was made using a Macro and the SCF MPI CB plugin. Semi-automatic segmentations of the cells were obtained and manually corrected if needed. Area, perimeter, Feret diameters, and circularity were measured. Figures 3A and 3B were done using FigureJ plugin [14]. Maximum intensity Z projection of confocal stacks with an applied gamma of 0.6 for a better cell shape visualization.

Monocytes derived dendritic cells (MDDC)

Bacterial amplification
shRNA DOCK11 (sh1 TRCN0000369611 and sh3 TRCN0000369590) were ordered on Bacterial Glycerol Stock (Merck). Sh1 and Sh3 were incubated 30 minutes at 37°C. 70 µl were plate on LB medium (Lennox, ref L3022-250G) + ampicillin (ref A9518-5G) agar and put at 37 °C for 12 hours. A colony for every plate of bacteria was selected and put in 1 ml of LB medium without antibiotics. It was incubated for 5 hours at 37°C. Then, 200 ml of LB medium enriched with antibiotic was added to bacterial amplification and incubated at 37°C for 12 hours at 200 rpm, bacterial selection was performed using ampicillin 100µg/ml. Other plasmids used for viral particles packaging or controls were produced similarly.

DNA extraction
Hipure midi column from Midi prep kit (Life technologies) were humidified with equilibration buffer (EQ1). After centrifugation of overnight LB culture, bacterial pellet was resuspended with R3 buffer with Rnase A. Bacteria were lysed with lysis buffer (L7). Precipitation buffer (N3) was added. Precipitated lysates were transferred into the column. Lysates were drained by gravity flow. Wash buffer (W8) was added to the column. Purified DNA was obtained after adding in column elution buffer (E8). DNA was precipitated after incubation with isopropanolol and centrifugation x 4000 g at 4°C for 50 minutes. After discarding supernatant, 70% ethanol was added to the pellet and tubes were centrifugated x1200G for 5 minutes at 4°C. Pellet were air-dried for 10 min. Purified DNA were resuspend in 100 µl of TE buffer stored at 4°C overnight. Plasmids concentrations were measured before storage at 20°C.

Viral particle production
As previously described[15], 293FT cells (Invitrogen) were cultured in DMEM (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS, heat inactivated) (Sigma), 0.1 mM MEM non-essential Amino Acids, 6mM L-glutamine, 1mM MEM sodium pyruvate, and antibiotics (Gibco). 293FT cells were transfected in 10cm plate with 1.2 ml DMEM containing 18 µg of DNA (9.6 µg plasmid of interest, 6 µg pCMV-Δ8.91 and 2.4 µg pCMV-VSGg) and 48 µl

TransIT-293 (Mirus Bio MIR2705). As described previously, viral accessory protein Vpx was added to ameliorate the transduction level[16]. Vpx protein was obtained with VSV-G-pseudotyped SIVmac239 virus-like particles generated with pSIV3+ and pCMV-VSVg were used for packaging and pseudotyping of viral particles [17]). 293FT cells were transfected in 15 cm plate with 1.122 ml Nuclease-free H2O (Promega kit) containing DNA (10 µg pCMV-VSVg plasmid + 50 µg pSIV3+), 168 µL CaCl2 (2M solution) and 1,35 ml 2X HEPES-buffered saline (2X HBS). After 24 hours, supernatant was replaced with fresh DMEM 10% FBS medium. After 48 hours of cells transfection, viral supernatants were collected and filtered twice at 0,45µm.

Monocytes derived dendritic cells (MDDC) transduction

Buffy coats were obtained from healthy human donors (French Blood agency). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll density gradient from buffy coats. Monocytes were obtained after cell sorting with anti-human CD14+ magnetic beads (Miltenyi). Sorted monocytes were resuspended in R10: RPMI, 10% FBS (heat inactivated), Hepes (Hyclone), β-mercaptoethanol with human recombinant GM-CSF at 10 ng/ ml, IL-4 at 50 ng/ml (eBioscience) and polybrene at 8 µg / ml (Merck).Per $5x10^6$ CD14+ cells, 2,5ml of viral particles containing Vpx and 4 ml of viral particles containing plasmid of interest were added to 10cm plates and completed with R10 to a working volume of 10ml. New media with cytokines (IL-4 50ng/ml and hGM-CSF 10ng/ml) were added 24h and 72h after transduction. Some CD14+ cells were transduced with pLKO-GFP coding plasmid to attest transduction efficiency. As a control, CD14+ cells were transduced with a plasmid coding for a sequence without targets in human further referred as “scramble” as previously described [15]. DC-SIGN expression was controlled by flow cytometry to control MDDC differentiation. At day 4, LPS stimulation (100ng/ml) were added on a set of MDDC for 24 hours. At day 5, we performed microscopy experiment, protein and RNA extractions.

Scanning electron microscopy (SEM)

Coverslips were coated with polylysine (PLL) for 30 minutes at 37°C. Coated coverslips were air-dried for 15 minutes and washed once with PBS. Cells were spread out on coated coverslips for 30 minutes at 37°C. Spread cells were first fixed with glutaraldehyde 2,5 % in warm media at room temperature for 1 hour, then secondly fixed with glutaraldehyde 2,5% in PHEM buffer 1X at 4°C for 12 hours. Samples were washed three times with PHEM 2 X, post-fixed with 1% osmium tetroxide at room temperature for 1 hour in the dark. Samples were dehydrated in a series of graded ethanol baths and dried using the critical point dryier (CPD300, Leica), coated with gold/palladium and observed with a SEM JEOL IT700HR microscope.

Immunoblotting

Proteins were extracted from T blast of patients and healthy controls and MDDC generated. Cells were washed with cold 1X PBS and lysed in RIPA lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (ThermoFisher Scientific). The extracted proteins were quantified using a Pierce BCA assay kit (ThermoFisher Scientific). After quantification, extracted proteins were denaturated and reduced at 95°C for 5 minutes using NuPAGE LDS sample Buffer 4X and NuPAGE reducing agent 10X (ThermoFisher Scientific). Denaturated proteins were separated on 3 to 8% TRIS-acetate gels (Invitrogen) and transferred onto PVDF membranes. Blocking was performed in TBS tween 0,01% and BSA 5% for 2h at RT. The membranes were incubated overnight with monoclonal rabbit anti-DOCK11 antibodies dilution 1/10000 (clone 1F11 ZooMAb, Sigma-Aldrich) or mouse Ku 70 (clone N3H10, sigma aldrich) dilution 1/10000 antibodies (Sigma-Aldrich) primary antibodies. Secondary antibodies (anti-rabbit dilution 1/10000 and anti-mouse 1/10000 in TBS tween 0,01% + BSA 5%) (sigma Aldrich) after washing were incubated during 1 hour in room temperature. Blots were revealed with chemiluminescence using species-specific HRP-linked secondary antibodies

RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR in MDDC

RNA was isolated from MDDC cultured cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified using a Nanodrop NP-1000 spectrometer. Reverse transcription was performed using the Quiagen kit. Subsequently, real-time PCR was performed using the LightCycler VIIA7 System (Roche) and SYBR Select Master Mix (Thermofischer) according to the manufacturer's protocol. GAPDH and HPRT served as control. RNA expression was analyzed using the ΔΔCt method. qPCR primer sequences (forward and reverse, respectively): DOCK11: ACTTGACCCAACTTCCTGACG and TGGGGCACTGAACAACATCA; GAPDH (control) and HPRT (control). The results were plotted as the fold-increase in expression, relative to GADPH and HPRT Then results were normalized on relative expression of DOCK11 in scramble controls. Each experiment was performed in triplicate in at least two independent experiments

Patient cells for migration assays

For migration assays PBMC from patients and healthy donor were activated with 5µg/ml of phytohemagglutinin (PHA, Sigma) and 100 Units/ml of IL-2 for 3 days and cultured in Panserin supplemented with 5% Serum AB and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Thermofisher). Cells (Blast and B-LCL) were used between days 8-14 post activation, stained with Hoechst 33342 and resuspended at $20x10^6$ cell/ml to load into the devices. Some T blasts from healthy donors and patients were treated before migration assay with RAC/CDC42 inhibitor (EHop-016, 10µM, #1380432-32-5, Calbiochem)

Cell migration assays

Microdevices were prepared as previously described[18]. Briefly, devices were fabricated using PDMS and custom-made molds, coated with 10ug/ml fibronectin from bovine plasma (Sigma) for 1h. Migration was recorded using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope, with a time-lapse of 2 min using a 10X (N.A. 0.45) dry objective. The image analysis was done using ImageJ (NIH). Kymographs for each channel were generated using a semi-automatic macro and single cell trajectories were manually isolated. Trajectories were then analyzed with a custom-made Matlab (Mathworks) code to determine the cell speed.

Immunofluorescence of activated T cells under confinement

T cell blast were allowed to migrate in 8µm width microchannels for 16 h and then fixed with 4% PFA in PBS for 45 min at RT. The PDMS block was removed from the coverslip containing migrating cells fixed in a polarized state. The cells in the coverslip were permeabilized for 2 min with PBS+0.1% of Triton X-100 at RT and blocked for 1 h with PBS + 2% BSA also at RT. 2 hours incubation with phalloidin Flash Green (Biolegend) and Hoechst 33342 (Molecular probes, Thermofischer) at RT. Washed and mounted using proGold anti-bleaching solution (Thermofisher). Image acquisition was performed in a Zeiss Axio Observer Z1 (Hamamatsu digital camera C11440, Carl Zeiss) microscope equipped with Yokogawa spinning disk technology and a 63x (NA. 1.46) oil objective.

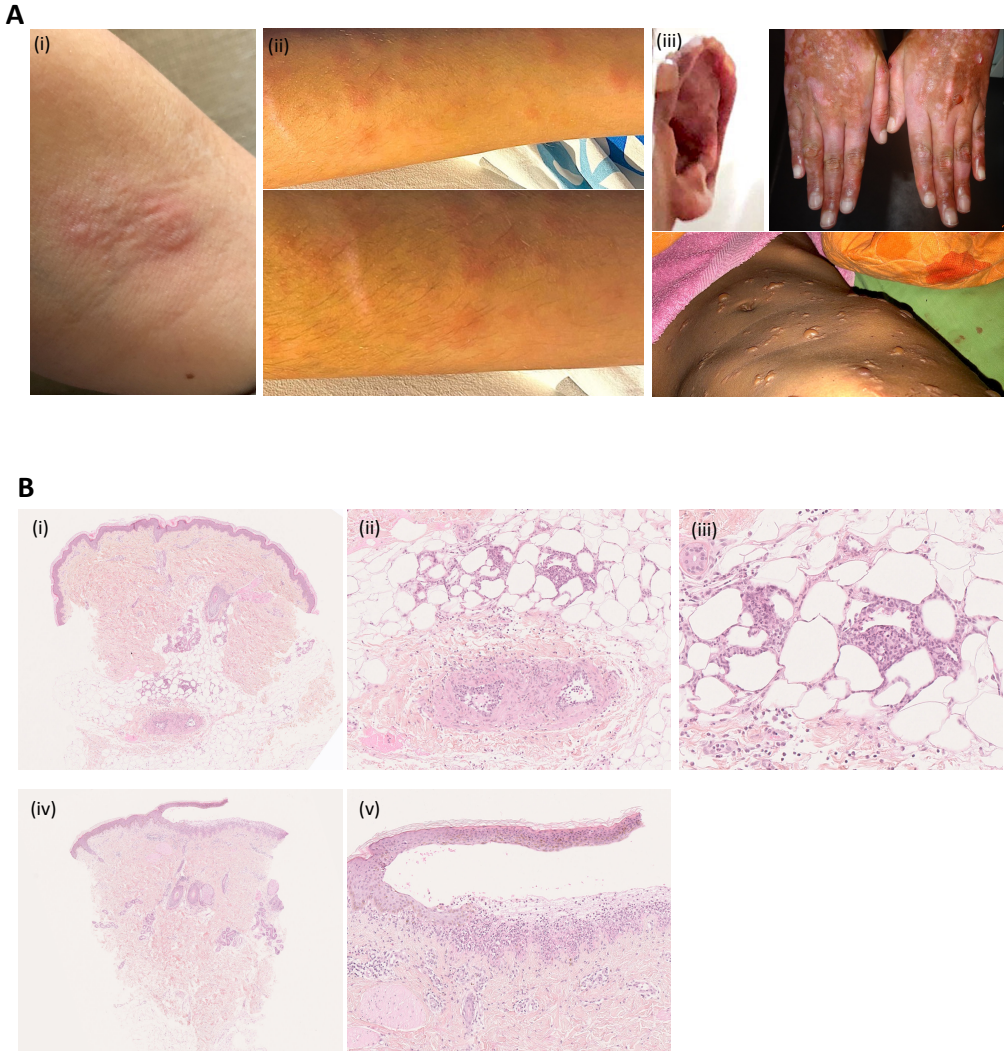
Immunofluorescence image analysis was done using ImageJ as described [19] . Shortly, cells were aligned, normalized by size and the average fluorescence intensity of the population was determined for each staining of interest. The values of the intensity of fluorescence were determined with a mask containing the back and front of the cell, excluding the nucleus using Icy.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a post-hoc test, or unpaired non-parametric Mann-Whitney tests or Kruskal-Wallis' tests as indicated in the figure legends. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

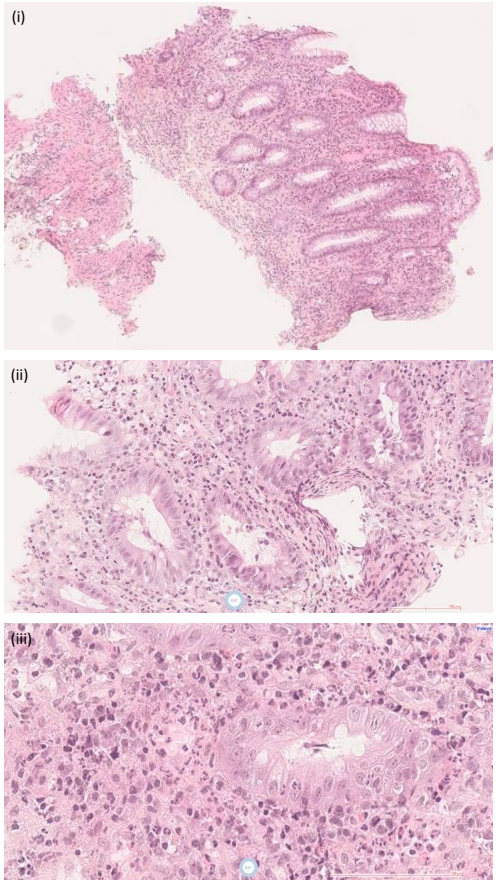
Supplemental figures

Supplemental figure 1 – Skin manifestations and biopsies.



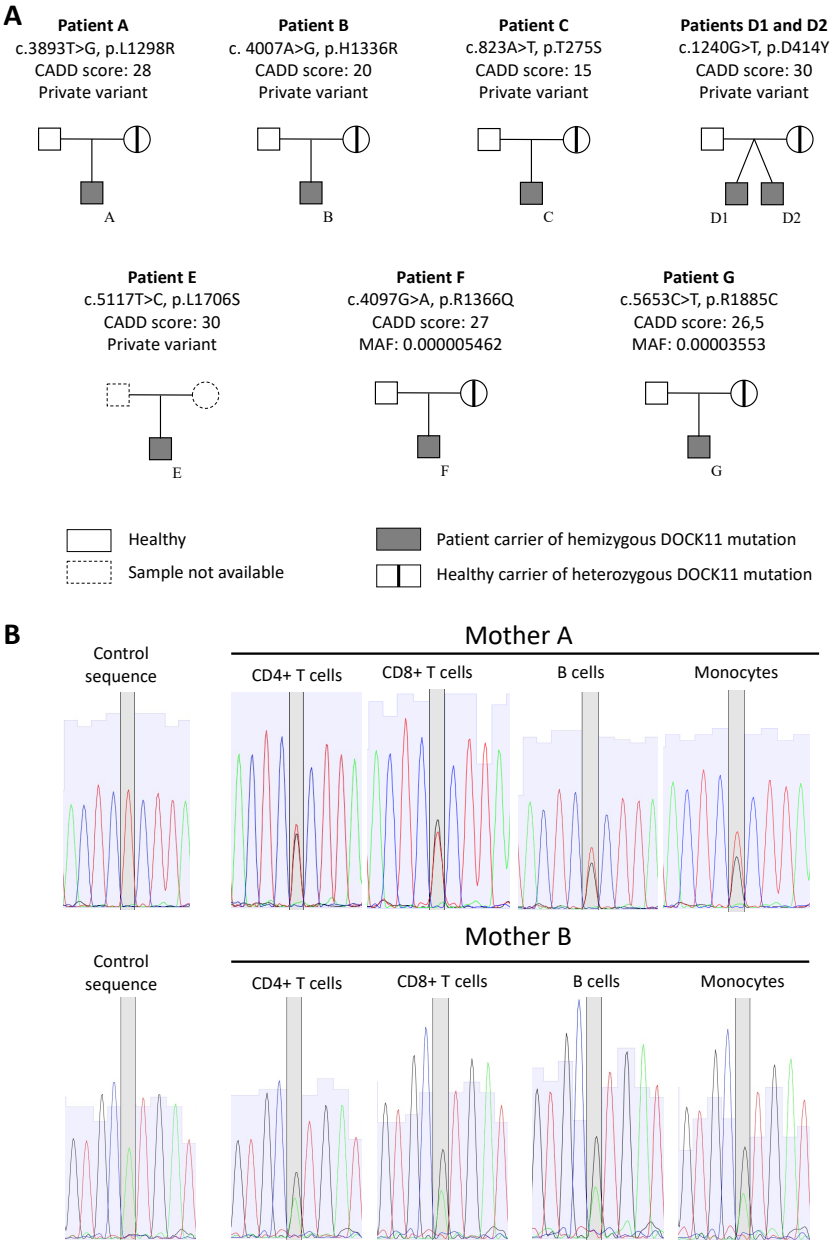
Supplemental figure 1 – Skin manifestations and biopsies: Panel (A) shows additional localizations of dermatological features of DOCK11 deficiency patients. (i) Lesions of Sweet syndrome (Patient A) in the elbow creased confirmed by skin biopsy. (ii) Lesions of panniculitis on legs (Patient A) confirmed with skin biopsy. (iii) Bullous cutaneous SLE (Patient D2) on ear, hands, and abdomen with visible hypopigmented scarring lesions on the hands. **Panel (B)** shows cutaneous biopsy of Patient's A lobular panniculitis ((i), (ii), (iii)) and Patient's D2 bullous cutaneous SLE ((iv), (v)). **(i)** Whole slide view of the skin biopsy showing, at low magnification, a somewhat normal epidermis and dermis, but inflammation in the superficial subcutis (Hematoxylin-eosin-saffron (HES) x 30). **(ii)** Inflammation in the subcutis is both lobular (panniculitis, upper half) and peri-vascular (lower half) with moderate venulitis (HES x 100). **(iii)** At higher magnification, the panniculitis is very neutrophilic (numerous neutrophils admixed with lymphocytes) and some adipocyte necrosis is observed (HES x 200). **(iv)** At low magnification, the epidermal bullous lesion is readily visible, with superficial dermal inflammatory infiltrate (HES x 25). **(v)** At higher magnification, the cleavage is at the dermal-epidermal junction. It is associated with vacuolar changes of the basal layer of the epidermis (left part) and a mixed inflammatory infiltrate composed of neutrophils immediately below the bullae, but more lymphocytic elsewhere (HES x 100).

Supplementary figure 2 – Colon biopsy.



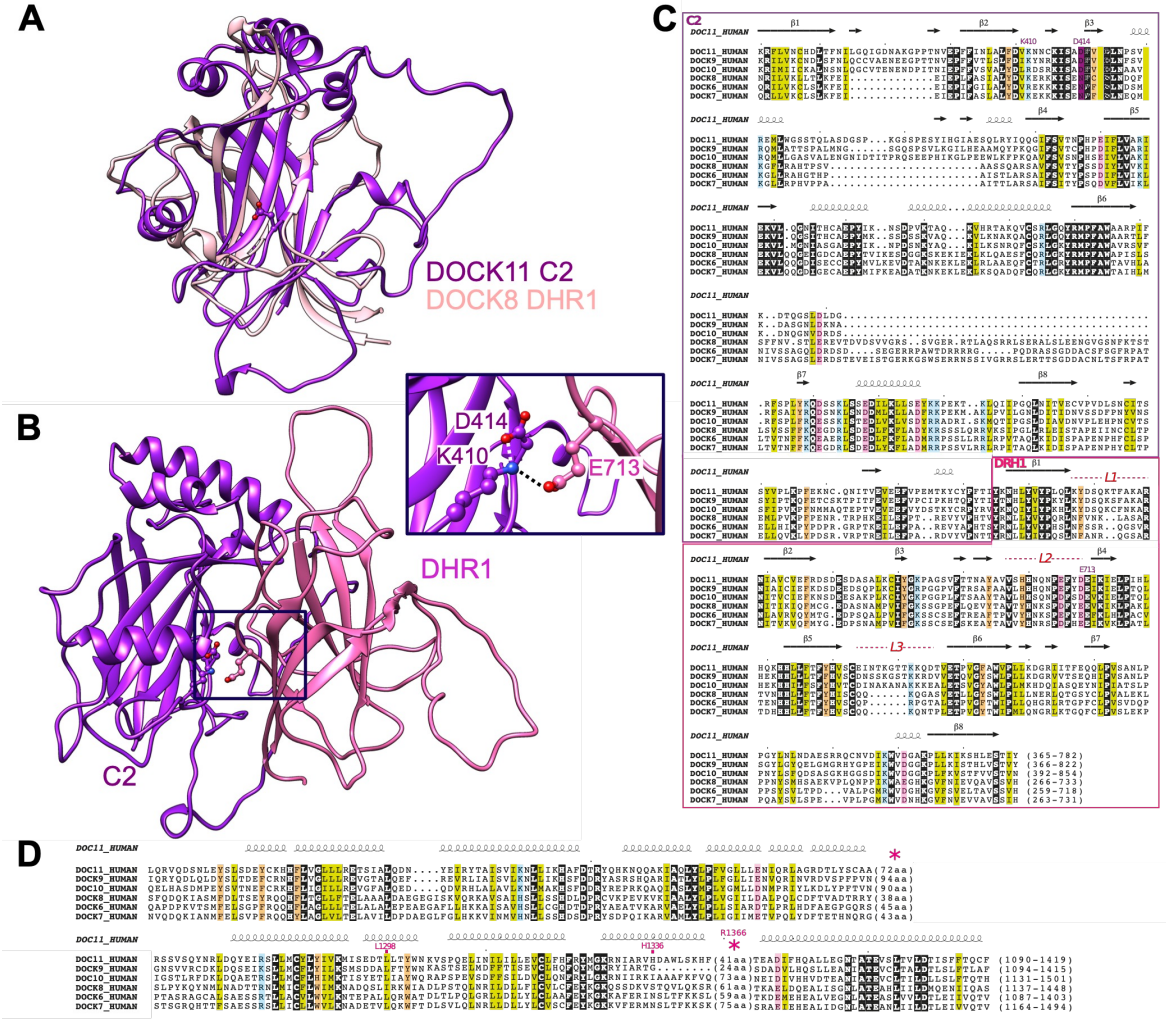
Supplementary figure 2 – Colon biopsy: Whole slide view of the Patient A colonic biopsy showing, at diverse magnification, dense inflammatory infiltrate of lamina propria composed of plasma cells, lymphocytes and numerous neutrophils infiltrating dedifferentiated crypts with some cryptic abscess. An aspect of pseudo-villous surface of the colonic mucosa is visible (HES original magnification x20 (i), x30 (ii), x40(iii)).

Supplemental figure 3 – Family trees of the cohort.



Supplemental figure 3 – Family trees of the cohort and sequencing of mothers' cDNA: (A) Genetic family trees of the patients with hemizygous DOCK11 mutations. The mothers, carriers of the *DOCK11* heterozygous mutation did not develop autoimmune or autoinflammatory manifestations. Five out of seven variants described were private. All variants presented deleterious CADD predictive score. For patient E, familial segregation was not possible as parent samples were unavailable. **(B)** Sanger sequencing of several immune cell types after sorting and cDNA extraction: CD4+ T cells, CD8+ T cells, double negative (DN) T cells (CD3+ CD4- CD8-), B cells and monocytes. Chromatograms for patient A and patient B mothers compared to a healthy donor sequence.

Supplemental figure 4 – DOCK11 protein structure prediction – C2 and ARM domains.



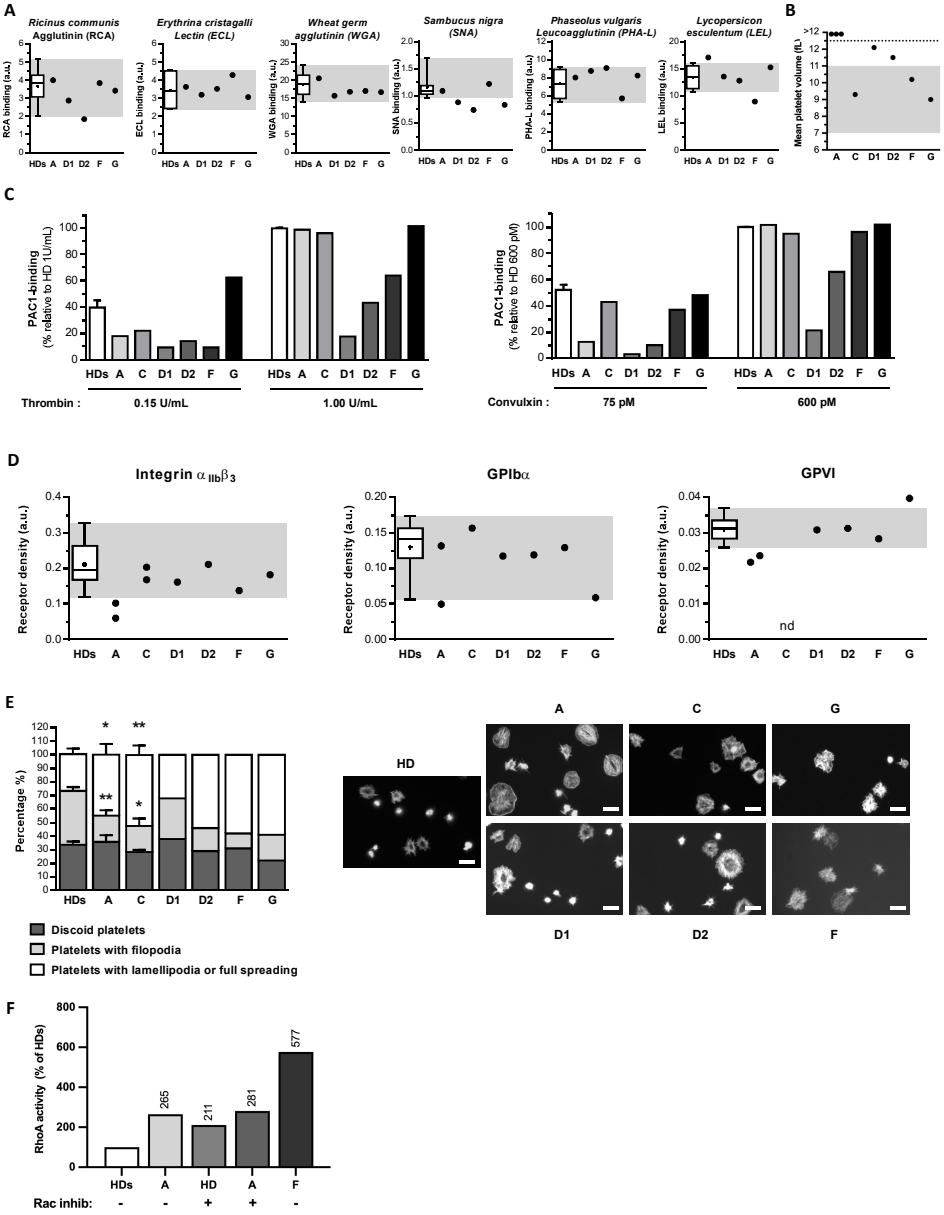
Supplemental figure 6 – DOCK11 protein structure prediction – C2 and ARM domains: (A-B) 3D structure of human DOCK11 C2 domain (ribbon representation). **(A)** The AlphaFold2 model of the human DOCK11 C2 domain (purple) is compared to the experimental 3D structure of human DOCK8 DRH1 (pdb 7CLX, light pink), highlighting the common type II topology of the beta-strands, and large loops in the DOCK11 C2 domain. D414 is depicted in atomic details. **(B)** The AlphaFold2 model of the human DOCK11 C2 domain (purple) is shown in complex with the DHR1 domain of the same protein (pink). Amino acids in the interface network, in which D414 participates, are depicted in atomic details in the box. **(C)** Multiple sequence alignment of sequences of the C2-DRH1 domain of the DOCK-C/-D subgroups. Secondary structures (top) are those predicted in the AlphaFold2 model of human DOCK11. Sequences are designated using their UniProt entry names. Color code for amino acid conservation: black: identical, green: strong hydrophobic, orange: aromatic, blue: basic, pink: acidic. The position of human DOCK11 D414 and interacting amino acids (K410 and E713) are indicated on top of the alignment.

De novo structure prediction by the recent AlphaFold2 approach[1] (AF-Q5JSL3-F1-model_v1.pdb) led to propose for the DOCK11 C2 domain a type II fold, as revealed by a subsequent DALI search [20] against PDB (highest rmsd value with the DOCK8 DHR1 domain (pdb 7CLX-A, see the superimposition on panel A), followed by various type II C2 fold (e.g. PI3K, pdb 1HE8-A; otoferlin, pdb 2L9B)). This contrasts with the *de novo* modelling made for the human DOCK5 C2 (aa 365 to 625), for fitting in the cryo-EM densities, which predicted it as a type I C2 fold [3]. Type I and type II C2 folds differ from each other by a circular permutation of their beta-strand topology [21]. The DOCK11 type II C2 fold is further supported by the AlphaFold2 pLDDT (per-residue confidence estimate) values, which are highly significant (> 90 for the core beta-strands, mean

value of 83 for the whole C2 domain), additional searches against PDB using Phyre2[22] prediction (sequence similarities with strands beta-6 of PLC-like and DOCK8 C2 domains). Strong sequence conservation is observed in the core beta-sandwich between the C2 domains of the DOCK-C subfamily, while variable and large loops are grafted onto this core (Panel C).

(D) Multiple sequence alignment of sequences of part of the ARM repeats of the DOCK-C/-D subgroups. Secondary structures (top) are those predicted in the AlphaFold2 model of human DOCK11. Sequences are designated using their UniProt entry names. Color code for amino acid conservation: black: identical, green: strong hydrophobic, orange: aromatic, blue: basic, pink: acidic. Asterisks indicate the positions of the large variable loops, also highlighted in Figure 1C. The positions of the three mutated amino acids are highlighted on top of the alignment.

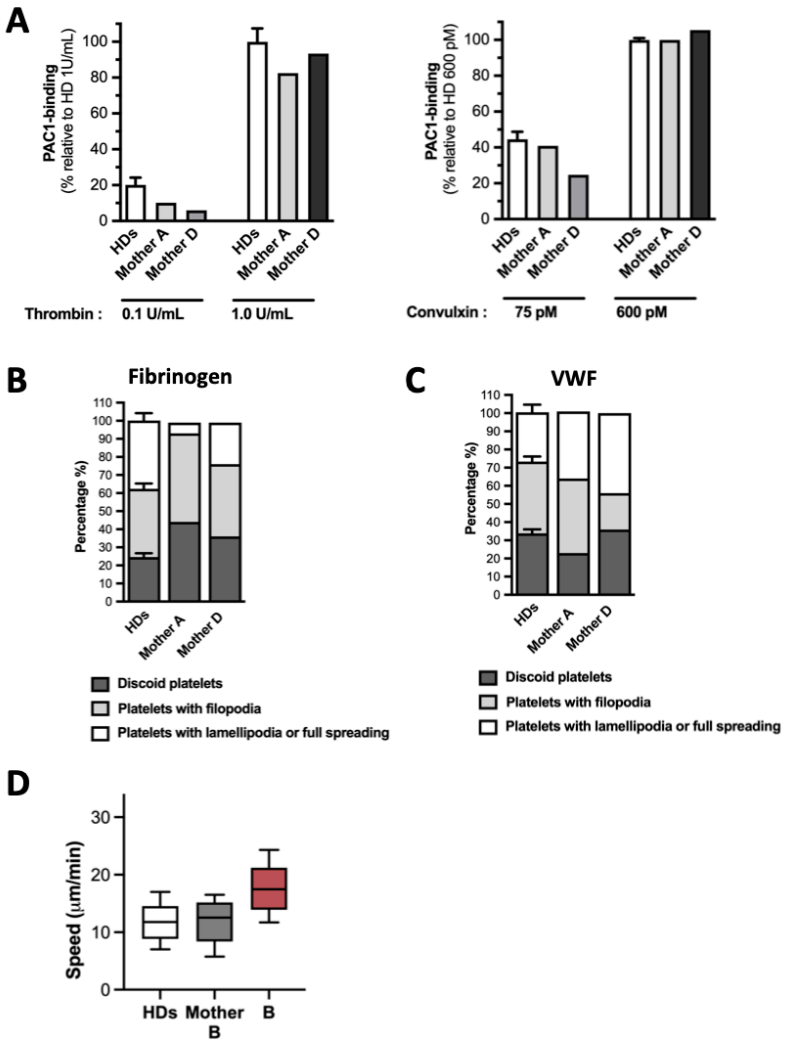
Supplemental figure 5 –Platelet study – complementary data.



Supplemental figure 5 –Platelet study – complementary data: (A) Platelet surface glycan expression profile in patients (A, D1, D2, F and G) was evaluated by flow cytometry using different lectins. The box-and-whisker plots show the normal range, determined from HDs. Whiskers represent the 5-95 percentiles, the box correspond to the interquartile range, the center line is the median and the cross indicates the mean of intensity fluorescence (MFI) in arbitrary unit of several independent experiments (RCA, n=28; ECL, n= 6; WGA and SNA, n=7; PHA-L and LEL, n=8). **(B)** Mean platelet volume (MPV) of DOCK11 patients. MPV for patient A was measured at three different timepoints. **(C)** Integrin αIIbβ3 activation was evaluated by flow cytometry, using a specific antibody, PAC1, which recognizes the active conformation of the integrin, after stimulation of platelets by thrombin (0.15 or 1.00 U/mL) or convulxin (75 or 600 pM). Graphs represent the relative percentage of PAC1-binding to patients' platelets compared to that of HDs' platelets at the highest dose of thrombin (1.0 U/mL) or convulxin (600 pM) that was set to 100%. **(D)** Expression of the platelet receptors such as integrin αIIbβ3, glycoprotein (GP)Ibα and GPVI was evaluated by flow cytometry. The box-and-whisker plots show the normal range, determined from HDs (n=20). Whiskers represent the 5-95 percentiles, the box correspond to the interquartile range, the center line is the median and the cross indicates

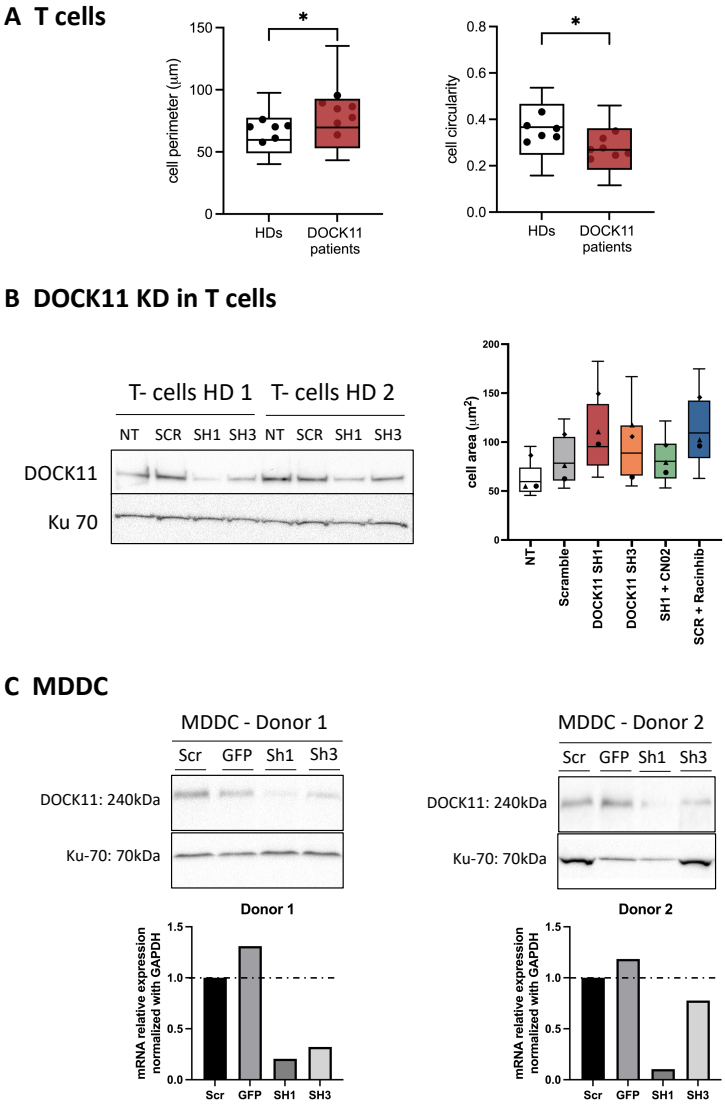
the mean receptor density obtained by the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of bound specific antibody to its receptor and the platelet size (FSC-H). Results are expressed in arbitrary unit (a.u.). **(E)** Spreading of HD's and patients' platelets onto von Willebrand factor (VWF) matrix for 30 minutes was analyzed by epifluorescence microscopy in the presence of botrocetin (2 µg/mL). Platelet morphology was visualized using F-actin detection by fluorescently labeled-phalloidin. Graph represents the mean percentage ± SEM of discoid platelets (dark grey), platelet with filopodia (light grey) and platelets with lamellipodia or full spreading (white) of at least 150 analyzed platelets from several independent experiments (HDs, n=15; patient A, n=4; patient C, n=3). Statistical significance was determined only for patients A and C compared to HDs in a one-way ANOVA with the Dunnett's post-test for multiple comparisons (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Patients D1, D2, F and G were not statistically analyzed since only one experiment was performed. Scale bar represents 10 µm. **(F)** RhoA activity evaluated in HDs' platelets and patients' platelets by G-LISA after stimulation by 0.5 U/mL thrombin for 2 or 5 minutes (if treated with RAC/CDC42 inhibitor before) in unstirred conditions. Graph represents the relative CDC42 activity of each patient compared to that of HD (set to 100%).

Supplementary figure 6 – functional assays on female carriers.



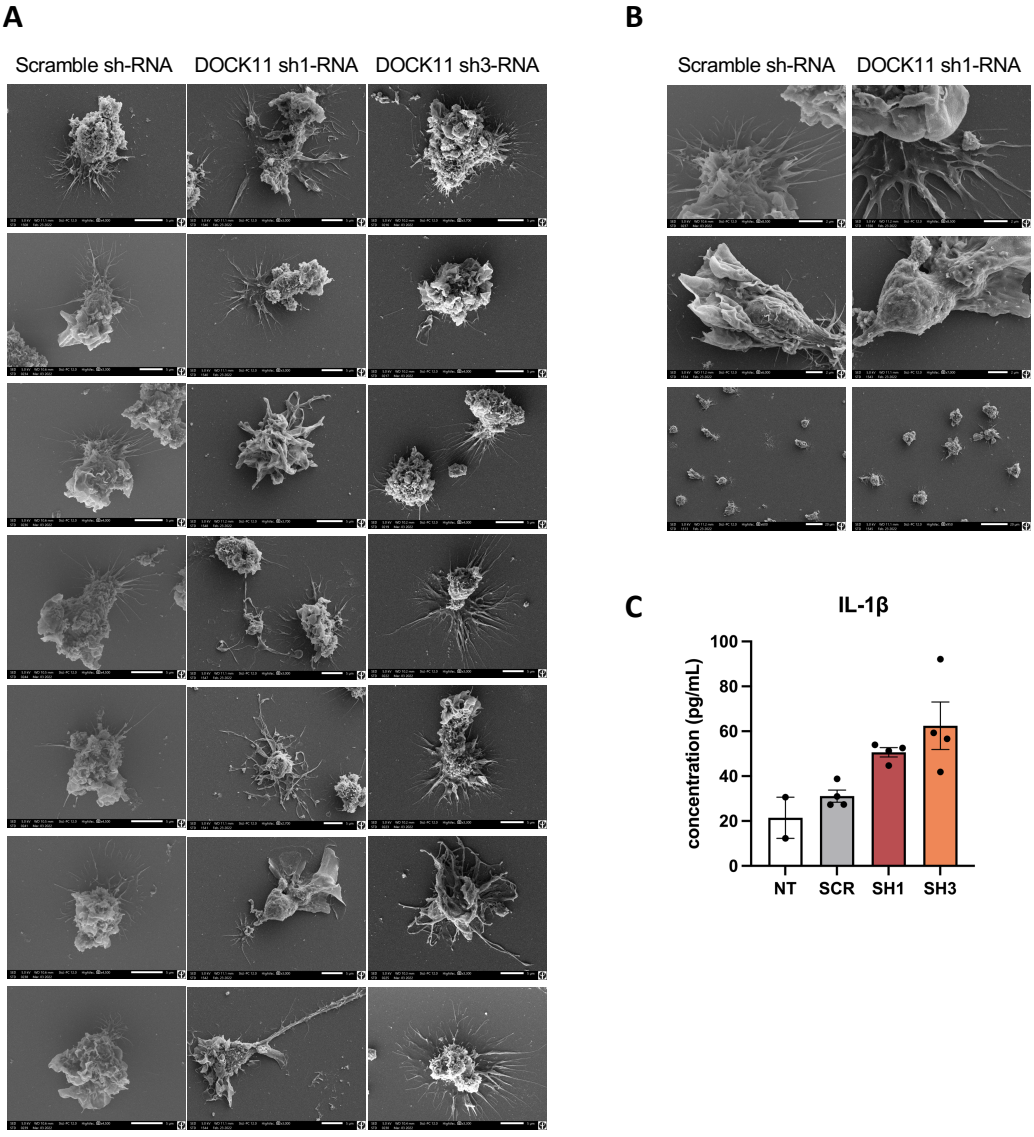
Supplementary figure 6 – functional assays on female carriers. (A) Integrin αIIbβ3 activation was evaluated by flow cytometry, using a specific antibody, PAC1, which recognizes the active conformation of the integrin, after stimulation of platelets by thrombin (0.15 or 1.00 U/mL) or convulxin (75 or 600 pM). Graphs represent the relative percentage of PAC1-binding to patients' platelets compared to that of HDs' platelets at the highest dose of thrombin (1.0 U/mL) or convulxin (600 pM) that was set to 100%. **(B)** Spreading of HD and mothers' platelets onto fibrinogen matrix for 30 minutes was analyzed by epifluorescence microscopy in the presence of apyrase (5 U/mL) and indomethacin (4.5 µM). Platelet morphology was visualized using F-actin detection by fluorescently labeled-phalloidin. Graph represents the mean percentage ± SEM of discoid platelets (dark grey), platelet with filopodia (light grey) and platelets with lamellipodia or full spreading (white) of at least 150 analyzed platelets. **(C)** Spreading of HD's and mothers' platelets onto von Willebrand factor (VWF) matrix for 30 minutes was analyzed by epifluorescence microscopy in the presence of botrocetin (2 µg/mL). Platelet morphology was visualized using F-actin detection by fluorescently labeled-phalloidin. Graph represents the mean percentage ± SEM of discoid platelets (dark grey), platelet with filopodia (light grey) and platelets with lamellipodia or full spreading (white) of at least 150 analyzed platelets. **(D)** Analysis of human healthy donors (HD), DOCK11-deficient T cell (patient B) and mother of patient B T cells migration in fibronectin-coated microchannels. Boxes include the 80% of the points and bars represent the higher and lower 10% of points. Mean instantaneous speed of HD and DOCK11 T cell blasts migrating in 4 x 5µm microchannels. Results from n=2 independent experiments with each condition

Supplemental figure 7– Cell morphologies after spreading – supplemental data.



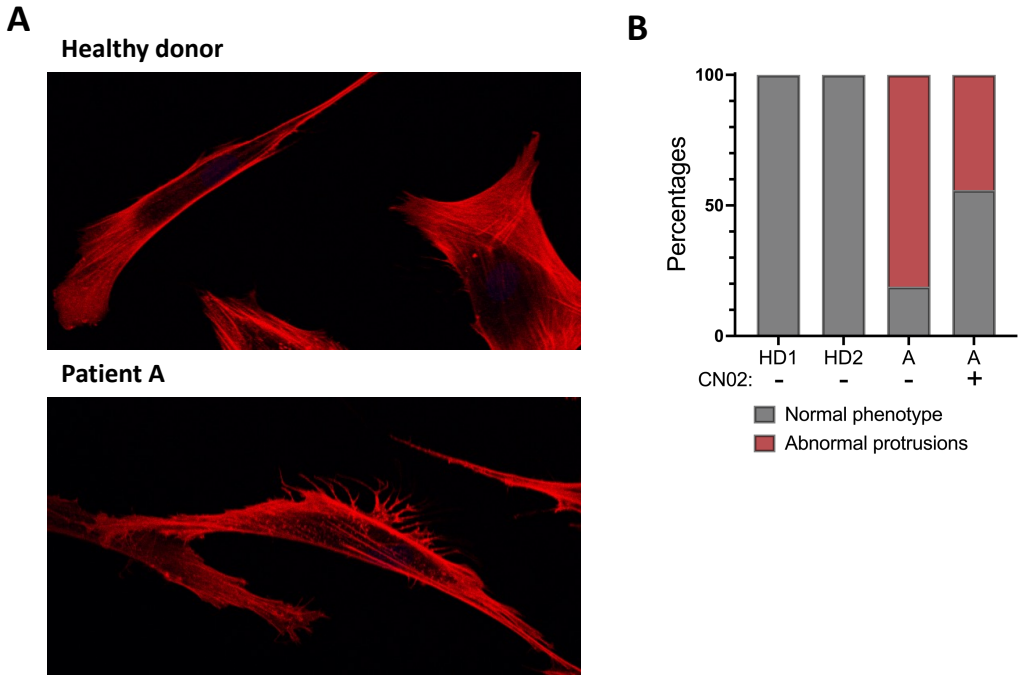
Supplemental figure 7 – Cell morphologies after spreading – supplemental data: (A) Cell perimeter and cell circularity of activated T cells after spreading on coverslips coated with poly-L-lysine, anti-CD28 (10 ug/mL) and anti-CD3 (0,1 ug/mL) antibodies. Unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used to estimate statistical significance between the mean perimeter (or mean circularity) of controls and patients (* $p < 0.05$). **(B)** DOCK11 protein expression in activated T cells with scramble (scr), or DOCK11 sh1 or DOCK11 sh3 RNA. Non transduced (NT) conditions are also shown. Activated T cell areas after spreading on OKT3 coated coverslips. Non transduced (NT) activated T cells are compared to activated T cells transduced with scramble, DOCK11 SH1 or DOCK11 SH3 RNA. T cells transduced with DOCK11 SH1 RNA were treated with CN02 (in green). T cells transduced with scramble (SCR) RNA were treated with Rac inhibitor (in blue). **(C)** DOCK11 protein expression and relative mRNA expression in MDDC with GFP, scramble (Scr), or DOCK11 SH1, DOCK11 SH3 RNA.

Supplemental figure 8 – SEM images of MDDC.



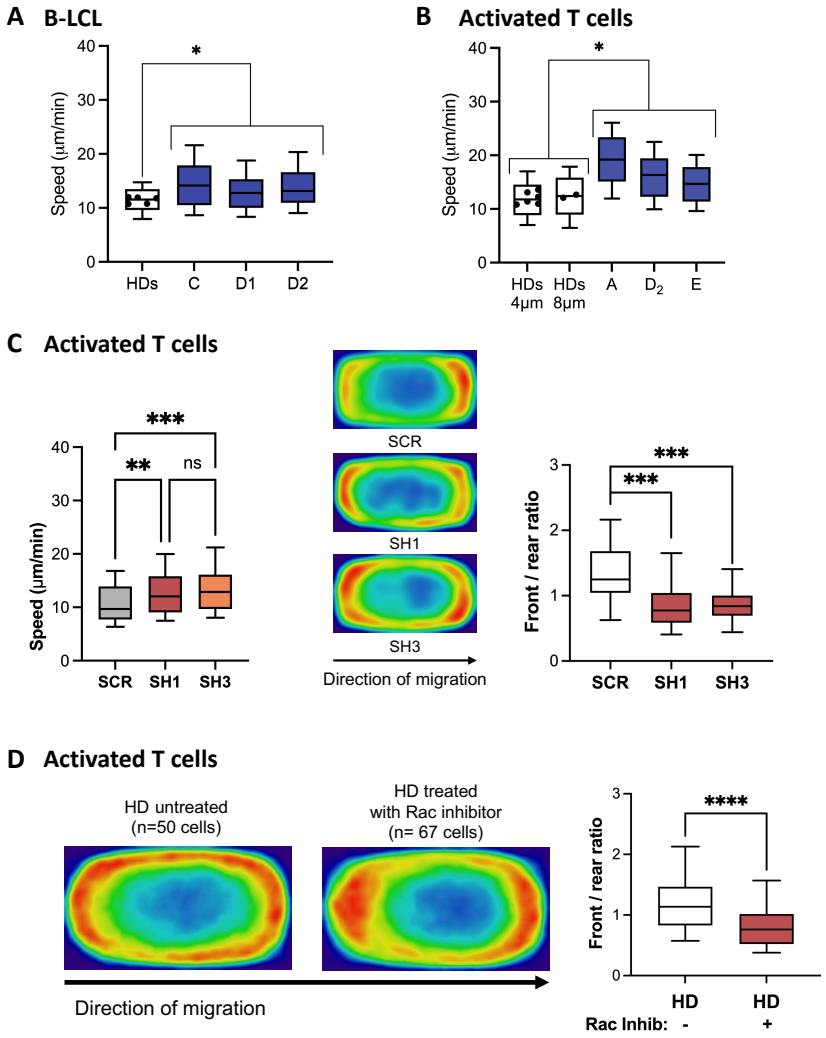
Supplemental figure 8 – SEM images of MDDC: Scanning electron microscopy (SEM) images of scramble and *DOCK11* knock-downs MDCC (sh1 and sh3). Panel **(A)** examples of MDDC images, scale set at 5µm. **(B)** Examples of MDDC images (detailed), scales set at 2µm. Examples of MDDC images (overview), scales set at 20µm. **(C)** Dosage of IL-1β in the supernatants of MDDC in culture, concentration (pg/ml).

Supplemental figure 9–Morphological impairment of primary fibroblasts in patient A.



Supplemental figure 9–Morphological impairment of primary fibroblasts in patient A: (A) Morphologies of primary fibroblasts from healthy donor and patient A after spreading on coverslip. **(B)** Two morphologies were observed: normal phenotype and abnormal protrusions. Repartition of each morphology types is shown. Primary fibroblasts from two healthy donors and patient A were analyzed. Primary fibroblasts from patient A with addition of CN02 activator for 10 min at 10µM were analyzed.

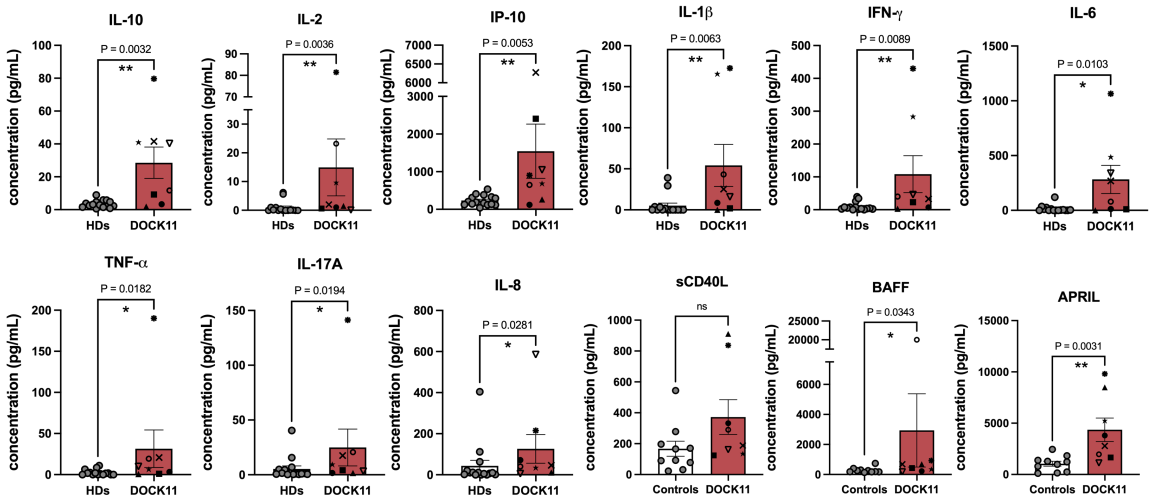
Supplemental figure 10 – Migration assays – complementary data.



Supplemental figure 10 – Migration assays – complementary data: Analysis of human Healthy donor (HD) and DOCK11-deficient T cell migration in fibronectin-coated microchannels. Boxes include the 80% of the points and bars represent the higher and lower 10% of points. **(A)** Mean instantaneous speed of HD and DOCK11-deficient (C, D1 and D2) B-LCL cells, migrating in 8µm x 5µm microchannels. Results from n=2 independent experiment with each condition. One-way ANOVA test was used to evaluate statistical significance. **(B)** Mean instantaneous speed of HD T cell blast migrating in 4x8 and 5x8µm microchannels and DOCK11 deficient T cell blast migrating in 5x8µm microchannels. All coated with fibronectin. One-way ANOVA test was used to evaluate statistical significance. **(C)** Mean instantaneous speed of HDs activated T cells with knock-downed expression of DOCK11 by shRNA (SH1 or SH3) or scramble control shRNA (SCR), migrating in 4x8 µm channels. All coated with fibronectin. On the middle panel, density maps representing the enrichment of actin in scramble, sh1 and sh3 conditions. On the right panel, Quantification of the signal intensity on density maps presented as front/rear ratio per cell. One-way ANOVA test was used to evaluate statistical significance. **(D)** Density maps representing the enrichment of actin in HD untreated and HD T cells treated with Rac inhinbitor, migrating in 8 x 5 µm microchannels. Cells were allowed to migrate and fixed with 4% PFA to maintain the polarized morphology and stained with phalloidin to visualize F-actin. The density maps were generated by averaging the signal from HD untreated n= 50 cells and HD treated with Rac

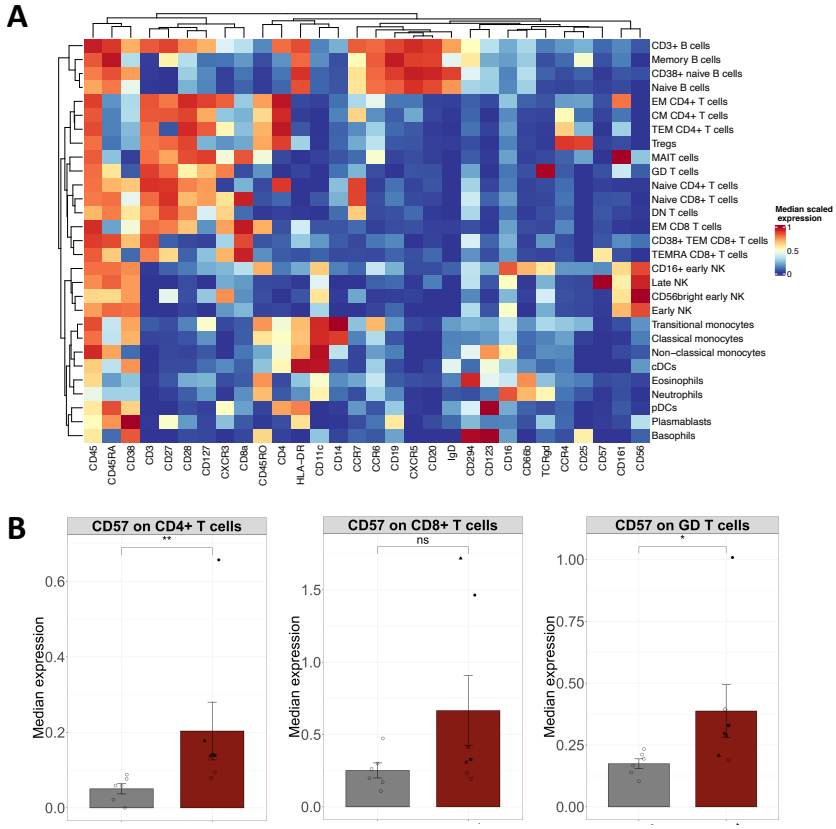
inhibitor n=67 cells. On the right panel, quantification of the signal intensity on density maps presented as front/rear ratio per cell. One-way ANOVA test was used to evaluate statistical significance.

Supplemental figure 11 - Cytokines dosages in plasma.



Supplemental figure 11- Cytokines dosages in plasma: Dosage of cytokines (IL-10, IL-2, IP-10, IL-1β, IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-17A, IL-8, sCD40L, BAFF and APRIL) in plasma from DOCK11 patients (n=8) and age-matched healthy donors (n=15). Each patient is represented by a different symbol: Patient A (✳), patient B (●), patient C (■), patient D1 (×), patient D2 (★), patient E (▲), patient F (▽), patient G (**o**). Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-Whitney test. (*) *p*-value < 0.05; (**) *p*-value < 0.01; (***) *p*-value < 0.005.

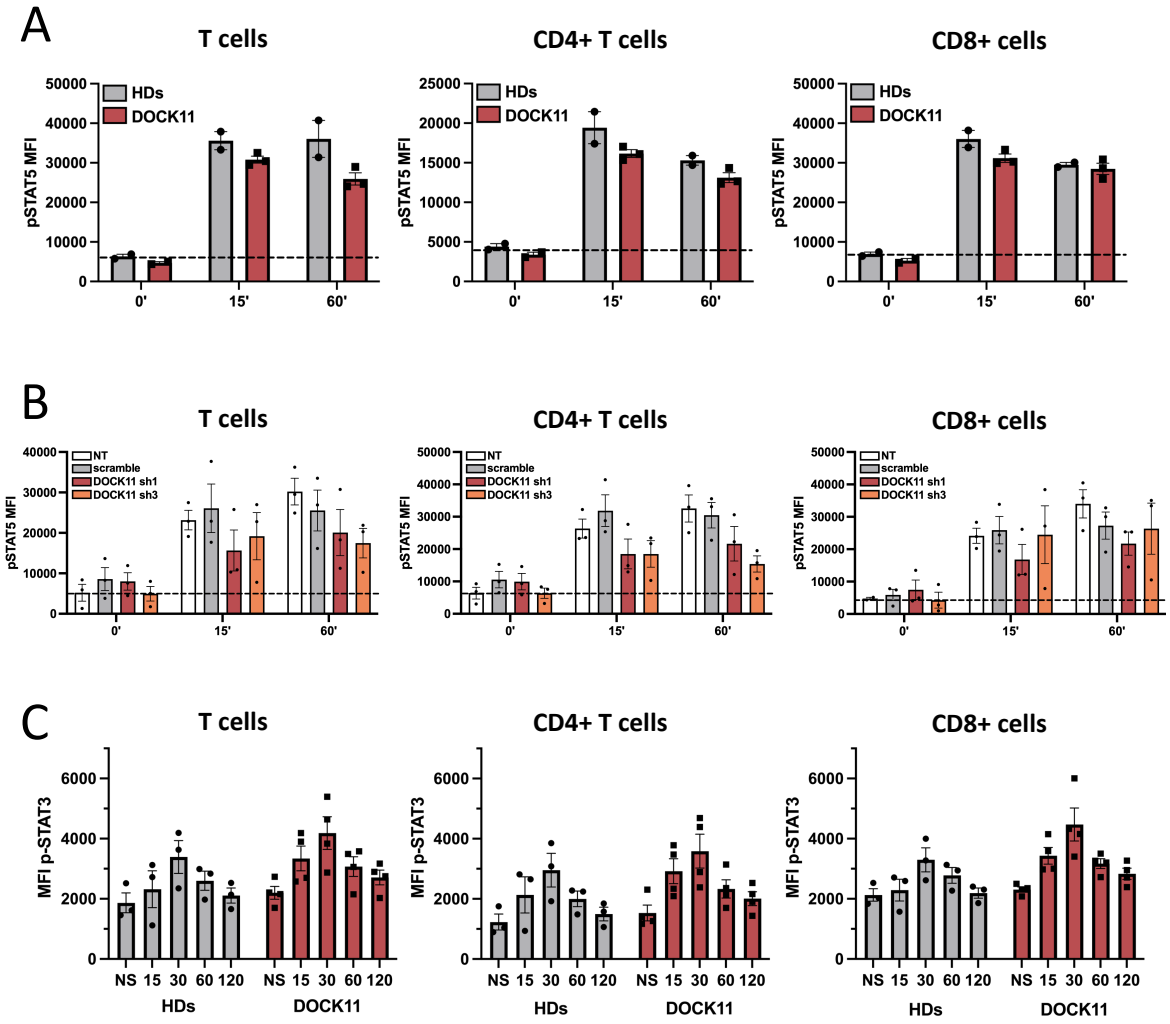
Supplemental figure 12 - Immune phenotype by mass cytometry.



Supplemental figure 12 - Immune phenotype by mass cytometry:

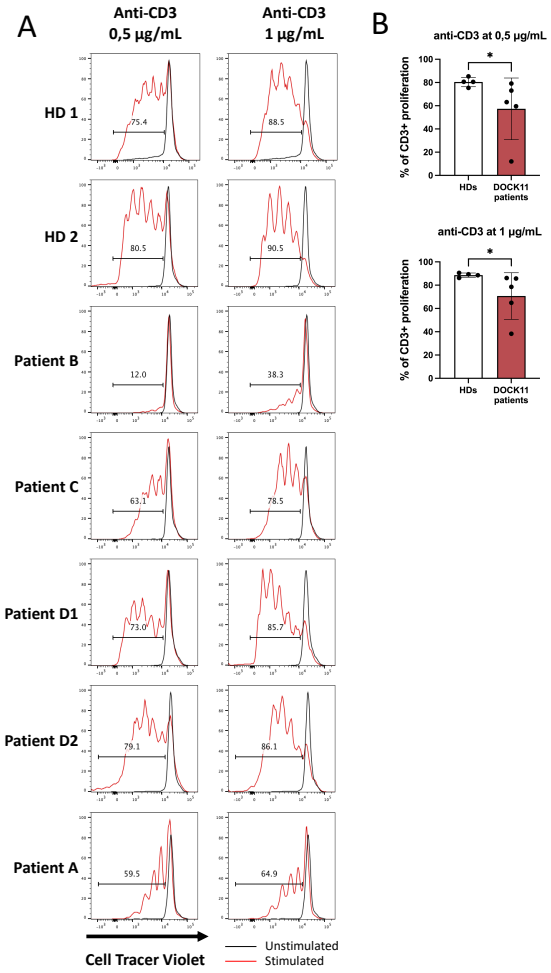
(A) Heatmap representing the intensities of each marker used to identify cell clusters after unsupervised clustering of the mass cytometry data. **(B)** Median expression of CD57 marker on CD4+ T cells, CD8+ T cells and gamma-delta T cells, in healthy donor cells or DOCK11 patients. Two-tailed p-values were determined with a nonparametric Mann-Whitney test. (*) p-value < 0.05; (**) p-value < 0.01; (***) p-value < 0.005.

Supplemental figure 13: phosphorylation of STAT5 in activated T cells and *DOCK11* knock-down T cells upon IL-2.



Supplemental figure 13: phosphorylation of STAT5 in activated T cells and *DOCK11* knock-down T cells upon IL-2 stimulation. (A) Mean fluorescence intensity (MFI) of phosphor-STAT5 in activated T cells from HDs or DOCK11 patients, upon IL-2 stimulation at 15 or 60 min, or unstimulated. **(B)** Mean fluorescence intensity (MFI) of phosphor-STAT5 upon IL-2 stimulation, in activated T cells from non-transduced (NT) activated T cells, and T cells transduced with scramble, DOCK11 sh1 or DOCK11 sh3 RNA. **(C)** Mean fluorescence intensity (MFI) of phosphor-STAT3 in activated T cells from HDs or DOCK11 patients, upon IL-6 stimulation at 15, 30, 60 or 120 min, or unstimulated (NS).

Supplemental figure 14: Proliferation assay on T cells.



Supplementary Figure 14. Proliferation assay on T cells. (A) Proliferation of activated T cells from healthy donors (HD) and DOCK11 patients. Proliferation was determined from the level of dilution of the CellTrace Violet dye. Red histograms show cell divisions of all activated T cells (CD3+). Unstimulated cells are shown by the peak in black. Different conditions of anti-CD3 coatings were used. The data are quoted as the percentage of cells having undergone at least one division. **(B)** Percentage of activated T cells that underwent at least one division with wells coated with anti-CD3 at 0,5 or 1 µg/mL of Healthy donors (HDs) or DOCK11 patients

Supplemental references

1. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. Nature 2021;596(7873):590–6.
2. Chang L, Yang J, Jo CH, et al. Structure of the DOCK2−ELMO1 complex provides insights into regulation of the auto-inhibited state. Nat Commun 2020;11(1):3464.
3. Kukimoto-Niino M, Katsura K, Kaushik R, et al. Cryo-EM structure of the human ELMO1-DOCK5-Rac1 complex. Sci Adv 2021;7(30):eabg3147.
4. Gadea G, Blangy A. Dock-family exchange factors in cell migration and disease. Eur J Cell Biol 2014;93(10–12):466–77.
5. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 2004;25(13):1605–12.
6. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 2010;27(2):221–4.
7. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Res 2014;42(Web Server issue):W320-324.
8. de Cevins C, Luka M, Smith N, et al. A monocyte/dendritic cell molecular signature of SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children with severe myocarditis. Med N Y N 2021;2(9):1072-1092.e7.
9. Nowicka M, Krieg C, Crowell HL, et al. CyTOF workflow: differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 1];Available from: https://f1000research.com/articles/6-748
10. Adam F, Verbeuren TJ, Fauchère J-L, Guillin M-C, Jandrot-Perrus M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. J Thromb Haemost 2003;1(4):798–804.
11. Berrou E, Soukaseum C, Favier R, et al. A mutation of the human EPHB2 gene leads to a major platelet functional defect. Blood 2018;132(19):2067–77.
12. Lasne D, Pascreau T, Darame S, et al. Measuring beta-galactose exposure on platelets: Standardization and healthy reference values. Res Pract Thromb Haemost 2020;4(5):813–22.
13. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 2012;9(7):676–82.
14. Mutterer J, Zinck E. Quick-and-clean article figures with FigureJ: ARTICLE FIGURES WITH FigureJ. J Microsc 2013;252(1):89–91.
15. Ménager MM, Littman DR. Actin Dynamics Regulates Dendritic Cell-Mediated Transfer of HIV-1 to T Cells. Cell 2016;164(4):695–709.
16. Goujon C, Jarrosson-Wuillème L, Bernaud J, Rigal D, Darlix J-L, Cimarelli A. With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV(MAC). Gene Ther 2006;13(12):991–4.
17. Manel N, Hogstad B, Wang Y, Levy DE, Unutmaz D, Littman DR. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. Nature 2010;467(7312):214–7.
18. Vargas P, Terriac E, Lennon-Duménil A-M, Piel M. Study of Cell Migration in Microfabricated Channels. JoVE J Vis Exp 2014;(84):e51099.
19. Heuzé ML, Vargas P, Chabaud M, et al. Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. Immunol Rev 2013;256(1):240–54.
20. Holm L. Using Dali for Protein Structure Comparison. Methods Mol Biol Clifton NJ 2020;2112:29–42.
21. Rizo J, Südhof TC. C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca2+-binding

767 Domain*. J Biol Chem 1998;273(26):15879–82.
768 22. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal
769 for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc 2015;10(6):845–58.
770
771

BIBLIOGRAPHIE

1. Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. Science *326*, 1208–1212. https://doi.org/10.1126/science.1175862.

2. Hohmann, T., and Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. Cells *8*, 362. https://doi.org/10.3390/cells8040362.

3. (PDF) La protéine kinase LegK2 de Legionella pneumophila et le complexe ARP2/3 de la cellule hôte : un nouveau paradigme dans le détournement du cytosquelette d'actine par un pathogène https://www.researchgate.net/publication/344678086_La_proteine_kinase_LegK2_de_Legionella_pneumophila_et_le_complexe_ARP23_de_la_cellule_hote_un_nouveau_paradigme_dans_le_detournement_du_cytosquelette_d'actine_par_un_pathogene?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoiX2RpcmVjdCJ9fQ.

4. Lee, S.H., and Dominguez, R. (2010). Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. Mol. Cells *29*, 311–325. https://doi.org/10.1007/s10059-010-0053-8.

5. Stradal, T.E.B., Boiero Sanders, M., and Bieling, P. (2025). Arp2/3-complex regulation – Novel insights and open questions. Curr. Opin. Cell Biol. *95*, 102565. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2025.102565.

6. Campellone, K.G., Lebek, N.M., and King, V.L. (2023). Branching out in different directions: Emerging cellular functions for the Arp2/3 complex and WASP-family actin nucleation factors. Eur. J. Cell Biol. *102*, 151301. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151301.

7. Shaaban, M., Chowdhury, S., and Nolen, B.J. (2020). Cryo-EM reveals the transition of Arp2/3 complex from inactive to nucleation-competent state. Nat. Struct. Mol. Biol. *27*, 1009–1016. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0481-x.

8. Figure 2: Model for activation and recycling of the ARP2/3 complex. | Nature Reviews Molecular Cell Biology.

9. Schäfer, C., Faust, U., Kirchgeßner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2011). The filopodium. Cell Adhes. Migr. *5*, 431–438. https://doi.org/10.4161/cam.5.5.17400.

10. Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 446–454. https://doi.org/10.1038/nrm2406.

11. Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M., and Bear, J.E. (2012). Arp2/3 Is Critical for Lamellipodia and Response to

Extracellular Matrix Cues but Is Dispensable for Chemotaxis. Cell *148*, 973–987. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.034.

12. Lamellipodium - an overview | ScienceDirect Topics https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/lamellipodium.

13. Mishra, Y.G., and Manavathi, B. (2021). Focal adhesion dynamics in cellular function and disease. Cell. Signal. *85*, 110046. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110046.

14. Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. médecine/sciences *19*, 743–752. https://doi.org/10.1051/medsci/20031967743.

15. Burridge, K., and Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. Exp. Cell Res. *343*, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029.

16. Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 56–68. https://doi.org/10.1038/nrm1549.

17. Gudimchuk, N.B., and McIntosh, J.R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *22*, 777–795. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x.

18. Dendooven, T., Yatskevich, S., Burt, A., Chen, Z.A., Bellini, D., Rappsilber, J., Kilmartin, J.V., and Barford, D. (2024). Structure of the native γ-tubulin ring complex capping spindle microtubules. Nat. Struct. Mol. Biol. *31*, 1134–1144. https://doi.org/10.1038/s41594-024-01281-y.

19. Brito, C., Serna, M., Guerra, P., Llorca, O., and Surrey, T. (2024). Transition of human γ-tubulin ring complex into a closed conformation during microtubule nucleation. Science *383*, 870–876. https://doi.org/10.1126/science.adk6160.

20. Valiron, O., Arnal, I., Caudron, N., and Job, D. (2010). GDP-Tubulin Incorporation into Growing Microtubules Modulates Polymer Stability. J. Biol. Chem. *285*, 17507–17513. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099515.

21. Inoue, D., Obino, D., Pineau, J., Farina, F., Gaillard, J., Guerin, C., Blanchoin, L., Lennon-Duménil, A., and Théry, M. (2019). Actin filaments regulate microtubule growth at the centrosome. EMBO J. *38*, e99630. https://doi.org/10.15252/embj.201899630.

22. Bowne-Anderson, H., Hibbel, A., and Howard, J. (2015). Regulation of Microtubule Growth and Catastrophe: Unifying Theory and Experiment. Trends Cell Biol. *25*, 769–779. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.009.

23. Goodson, H.V., and Jonasson, E.M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *10*, a022608. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608.

24. Kevenaar, J.T., Bianchi, S., van Spronsen, M., Olieric, N., Lipka, J., Frias, C.P., Mikhaylova, M., Harterink, M., Keijzer, N., Wulf, P.S., et al. (2016). Kinesin-Binding Protein Controls Microtubule Dynamics and Cargo Trafficking by Regulating Kinesin Motor Activity. Curr. Biol. *26*, 849–861. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.048.

25. Pal, L., Belausov, E., Dwivedi, V., Yechezkel, S., and Sadot, E. (2025). The mutual influence of microtubules and the cortical ER on their coordinated organisation. J. Microsc. *297*, 96–104. https://doi.org/10.1111/jmi.13356.

26. Tanaka, T.U., and Desai, A. (2008). Kinetochore-Microtubule Interactions: The Means to the End. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.005.

27. Adams, G., Zhou, J., Wang, W., Wu, H., Quan, J., Liu, Y., Xia, P., Wang, Z., Zhou, S., Jiang, J., et al. (2016). The Microtubule Plus End Tracking Protein TIP150 Interacts with Cortactin to Steer Directional Cell Migration. J. Biol. Chem. *291*, 20692–20706. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732719.

28. Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *8*, a018242. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242.

29. Li, D., Rebecca, P., Cruz, M.A., Molldrem, J.J., Champlin, R.E., and Ma, Q. (2015). Intermediate Filament (IF) Protein Vimentin Regulates T Cell Mediated Immune Response in Gvhd. Blood *126*, 3073. https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3073.3073.

30. Polari, L., Alam, C.M., Nyström, J.H., Heikkilä, T., Tayyab, M., Baghestani, S., and Toivola, D.M. (2020). Keratin intermediate filaments in the colon: guardians of epithelial homeostasis. Int. J. Biochem. Cell Biol. *129*, 105878. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105878.

31. Pérez-Sala, D., and Guo, M. (2022). Editorial: Intermediate filaments structure, function, and clinical significance. Front. Cell Dev. Biol. *10*, 1103110. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1103110.

32. Gerace, L., and Huber, M.D. (2012). Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. J. Struct. Biol. *177*, 24–31. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.007.

33. Legerstee, K., and Houtsmuller, A.B. (2021). A Layered View on Focal Adhesions. Biology *10*, 1189. https://doi.org/10.3390/biology10111189.

34. Pang, X., He, X., Qiu, Z., Zhang, H., Xie, R., Liu, Z., Gu, Y., Zhao, N., Xiang, Q., and Cui, Y. (2023). Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. Signal Transduct. Target. Ther. *8*, 1. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01259-6.

35. Alonso-Matilla, R., Provenzano, P.P., and Odde, D.J. (2025). Physical principles and mechanisms of cell migration. Npj Biol. Phys. Mech. *2*, 2. https://doi.org/10.1038/s44341-024-00008-w.

36. Merino-Casallo, F., Gomez-Benito, M.J., Hervas-Raluy, S., and Garcia-Aznar, J.M. (2022). Unravelling cell migration: defining movement from the cell surface. Cell Adhes. Migr. *16*, 25–64. https://doi.org/10.1080/19336918.2022.2055520.

37. Pawluchin, A., and Galic, M. (2022). Moving through a changing world: Single cell migration in 2D vs. 3D. Front. Cell Dev. Biol. *10*, 1080995. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1080995.

38. Kassianidou, E., and Kumar, S. (2015). A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. Biochim. Biophys. Acta *1853*, 3065–3074. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.006.

39. Paul, N.R., Jacquemet, G., and Caswell, P.T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. Curr. Biol. *25*, R1092–R1105. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.049.

40. Hetmanski, J.H.R., de Belly, H., Busnelli, I., Waring, T., Nair, R.V., Sokleva, V., Dobre, O., Cameron, A., Gauthier, N., Lamaze, C., et al. (2019). Membrane Tension Orchestrates Rear Retraction in Matrix-Directed Cell Migration. Dev. Cell *51*, 460-475.e10. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.09.006.

41. Liu, L., Luo, Q., Sun, J., and Song, G. (2016). Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. Exp. Cell Res. *348*, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.001.

42. Khatau, S.B., Bloom, R.J., Bajpai, S., Razafsky, D., Zang, S., Giri, A., Wu, P.-H., Marchand, J., Celedon, A., Hale, C.M., et al. (2012). The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration. Sci. Rep. *2*, 488. https://doi.org/10.1038/srep00488.

43. Hirano, S., Aoki, K., and Ueno, N. (2025). Dynamic behavior of cell-cell adhesion factors in collective cell migration. Cells Dev., 203995. https://doi.org/10.1016/j.cdev.2025.203995.

44. Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 802–812. https://doi.org/10.1038/nrm3896.

45. Reagan, M.R., and Rosen, C.J. (2016). Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. Nat. Rev. Rheumatol. *12*, 154–168. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.160.

46. Putra, V.D.L., Kilian, K.A., and Knothe Tate, M.L. (2023). Biomechanical, biophysical and biochemical modulators of cytoskeletal remodelling and emergent stem cell lineage commitment. Commun. Biol. *6*, 75. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04320-w.

47. Alcorta-Sevillano, N., Macías, I., Rodríguez, C.I., and Infante, A. (2020). Crucial Role of Lamin A/C in the Migration and Differentiation of MSCs in Bone. Cells *9*, 1330. https://doi.org/10.3390/cells9061330.

48. Momotyuk, E., Ebrahim, N., Shakirova, K., and Dashinimaev, E. (2025). Role of the cytoskeleton in cellular reprogramming: effects of biophysical and biochemical factors. Front. Mol. Biosci. *12*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2025.1538806.

49. Wollscheid, H.-P., and Ulrich, H.D. (2023). Chromatin meets the cytoskeleton: the importance of nuclear actin dynamics and associated motors for genome stability. DNA Repair *131*, 103571. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103571.

50. Shokrollahi, M., Stanic, M., Hundal, A., Chan, J.N.Y., Urman, D., Jordan, C.A., Hakem, A., Espin, R., Hao, J., Krishnan, R., et al. (2024). DNA double-strand break-capturing nuclear envelope tubules drive DNA repair. Nat. Struct. Mol. Biol. *31*, 1319–1330. https://doi.org/10.1038/s41594-024-01286-7.

51. Kim, J.M. (2022). Molecular Link between DNA Damage Response and Microtubule Dynamics. Int. J. Mol. Sci. *23*, 6986. https://doi.org/10.3390/ijms23136986.

52. Wollscheid, H.-P., and Ulrich, H.D. (2023). Chromatin meets the cytoskeleton: the importance of nuclear actin dynamics and associated motors for genome stability. DNA Repair *131*, 103571. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103571.

53. Hurst, V., Challa, K., Shimada, K., and Gasser, S.M. (2021). Cytoskeleton integrity influences XRCC1 and PCNA dynamics at DNA damage. Mol. Biol. Cell *32*, br6. https://doi.org/10.1091/mbc.E20-10-0680.

54. Deng, M., Lin, J., Nowsheen, S., Liu, T., Zhao, Y., Villalta, P.W., Sicard, D., Tschumperlin, D.J., Lee, S., Kim, J., et al. (2020). Extracellular matrix stiffness determines DNA repair efficiency and cellular sensitivity to genotoxic agents. Sci. Adv. *6*, eabb2630. https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2630.

55. Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane. In The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition (Sinauer Associates).

56. Gómez-Llobregat, J., Buceta, J., and Reigada, R. (2013). Interplay of cytoskeletal activity and lipid phase stability in dynamic protein recruitment and clustering. Sci. Rep. *3*, 2608. https://doi.org/10.1038/srep02608.

57. Edidin, M. (2006). Switching Sides: The Actin/Membrane Lipid Connection. Biophys. J. *91*, 3963. https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094078.

58. Li, C., Quintana Perez, Y., Lamaze, C., and Blouin, C.M. (2024). Lipid nanodomains and receptor signaling: From actin-based organization to membrane mechanics. Curr. Opin. Cell Biol. *86*, 102308. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102308.

59. Nebl, T., Pestonjamasp, K.N., Leszyk, J.D., Crowley, J.L., Oh, S.W., and Luna, E.J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. J. Biol. Chem. *277*, 43399–43409. https://doi.org/10.1074/jbc.M205386200.

60. Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., and Baldari, C.T. (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. Biochem. J. *369*, 301–309. https://doi.org/10.1042/BJ20020503.

61. von Haller, P.D., Donohoe, S., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Watts, J.D. (2001). Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. Proteomics *1*, 1010–1021. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200108)1:8%253C1010::AID-PROT1010%253E3.0.CO;2-L.

62. Yanagida, M., Nakayama, H., Yoshizaki, F., Fujimura, T., Takamori, K., Ogawa, H., and Iwabuchi, K. (2007). Proteomic analysis of plasma membrane lipid rafts of HL-60 cells. Proteomics *7*, 2398–2409. https://doi.org/10.1002/pmic.200700056.

63. MacLellan, D.L., Steen, H., Adam, R.M., Garlick, M., Zurakowski, D., Gygi, S.P., Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2005). A quantitative proteomic analysis of growth factor-induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle cells. Proteomics *5*, 4733–4742. https://doi.org/10.1002/pmic.200500044.

64. Simons, K., and Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 688–699. https://doi.org/10.1038/nrm2977.

65. Uray, I.P., and Uray, K. (2021). Mechanotransduction at the Plasma Membrane-Cytoskeleton Interface. Int. J. Mol. Sci. *22*, 11566. https://doi.org/10.3390/ijms222111566.

66. Lamaze, C., Tardif, N., Dewulf, M., Vassilopoulos, S., and Blouin, C.M. (2017). The caveolae dress code: structure and signaling. Curr. Opin. Cell Biol. *47*, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.014.

67. Parton, R.G., del Pozo, M.A., Vassilopoulos, S., Nabi, I.R., Le Lay, S., Lundmark, R., Kenworthy, A.K., Camus, A., Blouin, C.M., Sessa, W.C., et al. (2020). Caveolae: The FAQs. Traffic *21*, 181–185. https://doi.org/10.1111/tra.12689.

68. Echarri, A., and Del Pozo, M.A. (2015). Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. J. Cell Sci. *128*, 2747–2758. https://doi.org/10.1242/jcs.153940.

69. Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Vedie, B., Johannes, L., et al. (2011). Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. Cell *144*, 402–413. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031.

70. Blouin, C.M., Hamon, Y., Gonnord, P., Boularan, C., Kagan, J., Viaris de Lesegno, C., Ruez, R., Mailfert, S., Bertaux, N., Loew, D., et al. (2016). Glycosylation-Dependent IFN-γR Partitioning in Lipid and Actin Nanodomains Is Critical for JAK Activation. Cell *166*, 920–934. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.003.

71. Kalwat, M.A., and Thurmond, D.C. (2013). Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. Exp. Mol. Med. *45*, e37–e37. https://doi.org/10.1038/emm.2013.73.

72. Li, W., Li, A., Yu, B., Zhang, X., Liu, X., White, K.L., Stevens, R.C., Baumeister, W., Sali, A., Jasnin, M., et al. (2024). In situ structure of actin remodeling during glucose-stimulated insulin secretion using cryo-electron tomography. Nat. Commun. *15*, 1311. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45648-7.

73. Polino, A.J., Ng, X.W., Rooks, R., and Piston, D.W. (2023). Disrupting actin filaments enhances glucose-stimulated insulin secretion independent of the cortical actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. *299*, 105334. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105334.

74. DeWane, G., Salvi, A.M., and DeMali, K.A. (2021). Fueling the cytoskeleton – links between cell metabolism and actin remodeling. J. Cell Sci. *134*, jcs248385. https://doi.org/10.1242/jcs.248385.

75. Liang, Y., Zhu, Z., Lu, Y., Ma, C., Li, J., Yu, K., Wu, J., Che, X., Liu, X., Huang, X., et al. (2025). Cytoskeleton regulates lipid droplet fusion and lipid storage by controlling lipid droplet movement. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1870*, 159610. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2025.159610.

76. Apte, M.S., and Joshi, A.S. (2022). Membrane shaping proteins, lipids, and cytoskeleton: Recipe for nascent lipid droplet formation. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *44*, e2200038. https://doi.org/10.1002/bies.202200038.

77. Potolitsyna, E., Pickering, S.H., Bellanger, A., Germier, T., Collas, P., and Briand, N. (2024). Cytoskeletal rearrangement precedes nucleolar remodeling during adipogenesis. Commun. Biol. *7*, 458. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06153-1.

78. Vigouroux, C., Guénantin, A.-C., Vatier, C., Capel, E., Le Dour, C., Afonso, P., Bidault, G., Béréziat, V., Lascols, O., Capeau, J., et al. (2018). Lipodystrophic syndromes due to LMNA mutations: recent developments on biomolecular aspects, pathophysiological hypotheses and therapeutic perspectives. Nucleus *9*, 235–248. https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1456217.

79. Sprenkeler, E.G.G., Tool, A.T.J., Henriet, S.S.V., van Bruggen, R., and Kuijpers, T.W. (2022). Formation of neutrophil extracellular traps requires actin cytoskeleton rearrangements. Blood *139*, 3166–3180. https://doi.org/10.1182/blood.2021013565.

80. Kumar, B.V., Connors, T., and Farber, D.L. (2018). Human T cell development, localization, and function throughout life. Immunity *48*, 202–213. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007.

81. Moreau, H.D., Piel, M., Voituriez, R., and Lennon-Duménil, A.-M. (2018). Integrating Physical and Molecular Insights on Immune Cell Migration. Trends Immunol. *39*, 632–643. https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.007.

82. Farber, D.L., Yudanin, N.A., and Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. Nat. Rev. Immunol. *14*, 24–35. https://doi.org/10.1038/nri3567.

83. Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. Nat. Rev. Immunol. *17*, 30–48. https://doi.org/10.1038/nri.2016.116.

84. Bouchet, J., and Alcover, A. (2014). La synapse immunologique - Une plate-forme de signalisation dynamique pour l'activation des lymphocytes T. médecine/sciences *30*, 665–670. https://doi.org/10.1051/medsci/20143006017.

85. Hivroz, C., and Saitakis, M. (2016). Biophysical Aspects of T Lymphocyte Activation at the Immune Synapse. Front. Immunol. *7*, 46. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00046.

86. Fritzsche, M., Fernandes, R.A., Chang, V.T., Colin-York, H., Clausen, M.P., Felce, J.H., Galiani, S., Erlenkämper, C., Santos, A.M., Heddleston, J.M., et al. (2017). Cytoskeletal actin dynamics shape a ramifying actin network underpinning immunological synapse formation. Sci. Adv. *3*, e1603032. https://doi.org/10.1126/sciadv.1603032.

87. Paillon, N., Mouro, V., Dogniaux, S., Maurin, M., Saez Pons, J.-J., Ferran, H., Bataille, L., Zucchetti, A.E., and Hivroz, C. (2023). PD-1 inhibits T cell actin remodeling at the immunological synapse independently of its signaling motifs. Sci. Signal. *16*, eadh2456. https://doi.org/10.1126/scisignal.adh2456.

88. Zevolini, F., Onnis, A., Khazen, R., Müller, S., Marotta, G., Valitutti, S., Finetti, F., and Baldari, C.T. (2024). Polo-like kinase 1 regulates immune synapse assembly and cytotoxic T cell function by driving microtubule dynamics. J. Cell Sci. *137*, jcs261476. https://doi.org/10.1242/jcs.261476.

89. Lim, W.M., Ito, Y., Sakata-Sogawa, K., and Tokunaga, M. (2018). CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface. Sci. Rep. *8*, 17447. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35593-z.

90. Douanne, T., and Griffiths, G.M. (2021). Cytoskeletal control of the secretory immune synapse. Curr. Opin. Cell Biol. *71*, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.02.008.

91. Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. Nature *443*, 462–465. https://doi.org/10.1038/nature05071.

92. Seifert, J., Rheinlaender, J., Lang, F., Gawaz, M., and Schäffer, T.E. (2017). Thrombin-induced cytoskeleton dynamics in spread human platelets observed with fast scanning ion conductance microscopy. Sci. Rep. *7*, 4810. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04999-6.

93. Sim, X., Poncz, M., Gadue, P., and French, D.L. (2016). Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro–derived platelets. Blood *127*, 1227–1233. https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-607929.

94. Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Rozenvayn, N., and Woronowicz, K. (2008). The Platelet Actin Cytoskeleton Associates Directly with Syntaxin-4 and Participates in α-Granule Secretion. Blood *112*, 1839. https://doi.org/10.1182/blood.V112.11.1839.1839.

95. Dupré, L., Castanon, I., and Boztug, K. (2025). Immune-related actinopathies at the cross-road of immunodeficiency, autoimmunity and autoinflammation. Nat. Rev. Immunol. https://doi.org/10.1038/s41577-025-01214-w.

96. Dupré, L., Castanon, I., and Boztug, K. (2025). Immune-related actinopathies at the cross-road of immunodeficiency, autoimmunity and autoinflammation. Nat. Rev. Immunol., 1–23. https://doi.org/10.1038/s41577-025-01214-w.

97. Bosticardo, M., Marangoni, F., Aiuti, A., Villa, A., and Grazia Roncarolo, M. (2009). Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. Blood *113*, 6288–6295. https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-115253.

98. Kramer, D.A., Piper, H.K., and Chen, B. (2022). WASP family proteins: Molecular mechanisms and implications in human disease. Eur. J. Cell Biol. *101*, 151244. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151244.

99. Beel, K., Cotter, M.M., Blatny, J., Bond, J., Lucas, G., Green, F., Vanduppen, V., Leung, D.W., Rooney, S., Smith, O.P., et al. (2009). A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. Br. J. Haematol. *144*, 120–126. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07416.x.

100. Candotti, F. (2018). Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome. J. Clin. Immunol. *38*, 13–27. https://doi.org/10.1007/s10875-017-0453-z.

101. Vial, G., Gensous, N., and Duffau, P. (2021). L'axe CD40-CD40L : implications actuelles et futures en immunologie clinique. Rev. Médecine Interne *42*, 722–728. https://doi.org/10.1016/j.revmed.2021.02.005.

102. Sereni, L., Castiello, M.C., Marangoni, F., Anselmo, A., di Silvestre, D., Motta, S., Draghici, E., Mantero, S., Thrasher, A.J., Giliani, S., et al. (2018). Autonomous role of Wiskott-Aldrich syndrome platelet deficiency in inducing autoimmunity and inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. *142*, 1272–1284. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.1000.

103. Zhang, H., Schaff, U.Y., Green, C.E., Chen, H., Sarantos, M.R., Hu, Y., Wara, D., Simon, S.I., and Lowell, C.A. (2006). Impaired integrin-dependent function in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. Immunity *25*, 285–295. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.014.

104. Stabile, H., Carlino, C., Mazza, C., Giliani, S., Morrone, S., Notarangelo, L.D., Notarangelo, L.D., Santoni, A., and Gismondi, A. (2010). Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced beta2 integrin high-affinity state. Blood *115*, 2818–2826. https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235804.

105. Gismondi, A., Cifaldi, L., Mazza, C., Giliani, S., Parolini, S., Morrone, S., Jacobelli, J., Bandiera, E., Notarangelo, L., and Santoni, A. (2004). Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. Blood *104*, 436–443. https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2621.

106. Pulecio, J., Tagliani, E., Scholer, A., Prete, F., Fetler, L., Burrone, O.R., and Benvenuti, F. (2008). Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein in dendritic cells regulates synapse formation and activation of naive CD8+ T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 1135–1142. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1135.

107. Bouma, G., Mendoza-Naranjo, A., Blundell, M.P., de Falco, E., Parsley, K.L., Burns, S.O., and Thrasher, A.J. (2011). Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. Blood *118*, 2492–2501. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340265.

108. Molina, I.J., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F.S., and Remold-O'Donnell, E. (1993). T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *151*, 4383–4390.

109. Haddad, E., Zugaza, J.L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., and Bertoglio, J. (2001). The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. Blood *97*, 33–38. https://doi.org/10.1182/blood.v97.1.33.

110. Simon, K.L., Anderson, S.M., Garabedian, E.K., Moratto, D., Sokolic, R.A., and Candotti, F. (2014). Molecular and phenotypic abnormalities of B lymphocytes in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. J. Allergy Clin. Immunol. *133*, 896-899.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.050.

111. Crestani, E., Volpi, S., Candotti, F., Giliani, S., Notarangelo, L.D., Chu, J., Becerra, J.C.A., Buchbinder, D., Chou, J., Geha, R.S., et al. (2015). Broad spectrum of autoantibodies in Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) and X-linked Thrombocytopenia (XLT). J. Allergy Clin. Immunol. *136*, 1401-1404.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.010.

112. Kolhatkar, N.S., Brahmandam, A., Thouvenel, C.D., Becker-Herman, S., Jacobs, H.M., Schwartz, M.A., Allenspach, E.J., Khim, S., Panigrahi, A.K., Luning Prak, E.T., et al. (2015). Altered BCR and TLR signals promote enhanced positive selection of autoreactive transitional B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. J. Exp. Med. *212*, 1663–1677. https://doi.org/10.1084/jem.20150585.

113. Marangoni, F., Trifari, S., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Martino, S., Notarangelo, L.D., Baz, Z., Metin, A., Cattaneo, F., Villa, A., et al. (2007). WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. J. Exp. Med. *204*, 369–380. https://doi.org/10.1084/jem.20061334.

114. Somech, R., Lev, A., Lee, Y.N., Simon, A.J., Barel, O., Schiby, G., Avivi, C., Barshack, I., Rhodes, M., Yin, J., et al. (2017). Disruption of Thrombocyte and T Lymphocyte Development by a Mutation in ARPC1B. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *199*, 4036–4045. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700460.

115. Pluthero, F.G., and Kahr, W.H.A. (2019). Recent advances in inherited platelet disorders: Curr. Opin. Hematol. *26*, 313–319. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000525.

116. Kuijpers, T.W., Tool, A.T.J., Bijl, I. van der, Boer, M. de, Houdt, M. van, Cuyper, I.M. de, Roos, D., Alphen, F. van, Leeuwen, K. van, Cambridge, E.L., et al. (2017). Combined immunodeficiency with severe inflammation and allergy caused by ARPC1B deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 273-277.e10. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.061.

117. Brigida, I., Zoccolillo, M., Cicalese, M.P., Pfajfer, L., Barzaghi, F., Scala, S., Oleaga-Quintas, C., Álvarez-Álvarez, J.A., Sereni, L., Giannelli, S., et al. (2018). T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. Blood *132*, 2362–2374. https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-863431.

118. Nunes-Santos, C.J., Kuehn, H., Boast, B., Hwang, S., Kuhns, D.B., Stoddard, J., Niemela, J.E., Fink, D.L., Pittaluga, S., Abu-Asab, M., et al. (2023). Inherited ARPC5 mutations cause an actinopathy impairing cell motility and disrupting cytokine signaling. Nat. Commun. *14*, 3708. https://doi.org/10.1038/s41467-023-39272-0.

119. Mosaddeghzadeh, N., and Ahmadian, M.R. (2021). The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. Cells *10*, 1831. https://doi.org/10.3390/cells10071831.

120. El Masri, R., and Delon, J. (2021). RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. Nat. Rev. Immunol. *21*, 499–513. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00500-7.

121. Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol. *16*, 522–529. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.006.

122. Primeau, M., and Lamarche-Vane, N. (2008). Coup d'œil sur les petites GTPases Rho. médecine/sciences *24*, 157–162. https://doi.org/10.1051/medsci/2008242157.

123. Armstrong, M.C., Weiß, Y.R., Hoachlander-Hobby, L.E., Roy, A.A., Visco, I., Moe, A., Golding, A.E., Hansen, S.D., Bement, W.M., and Bieling, P. (2025). The biochemical mechanism of Rho GTPase membrane binding, activation and retention in activity patterning. EMBO J. *44*, 2620–2657. https://doi.org/10.1038/s44318-025-00418-z.

124. Liu, M., Bi, F., Zhou, X., and Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. Trends Cell Biol. *22*, 365–373. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.004.

125. Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. Biochem. J. *348 Pt 2*, 241–255.

126. Chemin, K., Bohineust, A., Dogniaux, S., Tourret, M., Guégan, S., Miro, F., and Hivroz, C. (2012). Cytokine Secretion by CD4+ T Cells at the Immunological Synapse Requires Cdc42-Dependent Local Actin Remodeling but Not Microtubule Organizing Center Polarity. J. Immunol. *189*, 2159–2168. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200156.

127. Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P., and Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. J. Cell Biol. *191*, 1261–1269. https://doi.org/10.1083/jcb.201003091.

128. Rougerie, P., and Delon, J. (2012). Rho GTPases: Masters of T lymphocyte migration and activation. Immunol. Lett. *142*, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.12.003.

129. El Masri, R., and Delon, J. (2020). Une palmitoylation de CDC42 causée par une mutation déclenche un syndrome auto-inflammatoire sévère. médecine/sciences *36*, 987–990. https://doi.org/10.1051/medsci/2020181.

130. Symons, M., Derry, J.M.J., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott–Aldrich Syndrome Protein, a Novel Effector for the GTPase CDC42Hs, Is Implicated in Actin Polymerization. Cell *84*, 723–734. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81050-8.

131. Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., and Laue, E.D. (2000). Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. Nat. Struct. Biol. *7*, 384–388. https://doi.org/10.1038/75158.

132. Johnstone, C.N., Castellví-Bel, S., Chang, L.M., Bessa, X., Nakagawa, H., Harada, H., Sung, R.K., Piqué, J.M., Castells, A., and Rustgi, A.K. (2004). ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers. Gene *336*, 59–71. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.025.

133. Stengel, K., and Zheng, Y. (2011). Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. Cell. Signal. *23*, 1415–1423. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.001.

134. Takenouchi, T., Kosaki, R., Niizuma, T., Hata, K., and Kosaki, K. (2015). Macrothrombocytopenia and developmental delay with a de novo CDC42 mutation: Yet another locus for thrombocytopenia and developmental delay. Am. J. Med. Genet. A. *167A*, 2822–2825. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37275.

135. Takenouchi, T., Okamoto, N., Ida, S., Uehara, T., and Kosaki, K. (2016). Further evidence of a mutation in CDC42 as a cause of a recognizable syndromic form of thrombocytopenia. Am. J. Med. Genet. A. *170A*, 852–855. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37526.

136. Motokawa, M., Watanabe, S., Nakatomi, A., Kondoh, T., Matsumoto, T., Morifuji, K., Sawada, H., Nishimura, T., Nunoi, H., Yoshiura, K.-I., et al. (2018). A hot-spot mutation in CDC42 (p.Tyr64Cys) and novel phenotypes in the third patient with Takenouchi-Kosaki syndrome. J. Hum. Genet. *63*, 387–390. https://doi.org/10.1038/s10038-017-0396-5.

137. Yasumi, T. (2025). CDC42 missense mutations and human diseases: from neurodevelopmental disorders to autoinflammation. J. Biochem. (Tokyo) *178*, 73–78. https://doi.org/10.1093/jb/mvaf021.

138. Thanasegaran, S., Daimon, E., Shibukawa, Y., Yamazaki, N., and Okamoto, N. (2023). Modelling Takenouchi-Kosaki syndrome using disease-specific iPSCs. Stem Cell Res. *73*, 103221. https://doi.org/10.1016/j.scr.2023.103221.

139. Martinelli, S., Krumbach, O.H.F., Pantaleoni, F., Coppola, S., Amin, E., Pannone, L., Nouri, K., Farina, L., Dvorsky, R., Lepri, F., et al. (2018). Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. Am. J. Hum. Genet. *102*, 309–320. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.12.015.

140. Hebron, K.E., Hernandez, E.R., and Yohe, M.E. (2022). The RASopathies: from pathogenetics to therapeutics. Dis. Model. Mech. *15*, dmm049107. https://doi.org/10.1242/dmm.049107.

141. Gernez, Y., de Jesus, A.A., Alsaleem, H., Macaubas, C., Roy, A., Lovell, D., Jagadeesh, K.A., Alehashemi, S., Erdman, L., Grimley, M., et al. (2019). Severe autoinflammation in 4 patients with C-terminal variants in cell division control protein 42 homolog (CDC42) successfully treated with IL-1β inhibition. J. Allergy Clin. Immunol. *144*, 1122-1125.e6. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.017.

142. Walliser, C., Tron, K., Clauss, K., Gutman, O., Kobitski, A.Yu., Retlich, M., Schade, A., Röcker, C., Henis, Y.I., Nienhaus, G.U., et al. (2015). Rac-mediated Stimulation of Phospholipase Cγ2 Amplifies B Cell Receptor-induced Calcium Signaling*♦. J. Biol. Chem. *290*, 17056–17072. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645739.

143. Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat. Cell Biol. *1*, 253–259. https://doi.org/10.1038/12963.

144. Doye, A., Chaintreuil, P., Lagresle-Peyrou, C., Batistic, L., Marion, V., Munro, P., Loubatier, C., Chirara, R., Sorel, N., Bessot, B., et al. (2024). RAC2 gain-of-function variants causing inborn error of immunity drive NLRP3 inflammasome activation. J. Exp. Med. *221*, e20231562. https://doi.org/10.1084/jem.20231562.

145. Donkó, Á., Sharapova, S.O., Kabat, J., Ganesan, S., Hauck, F.H., Bergerson, J.R.E., Marois, L., Abbott, J., Moshous, D., Williams, K.W., et al. (2024). Clinical and functional spectrum of RAC2-related immunodeficiency. Blood *143*, 1476–1487. https://doi.org/10.1182/blood.2023022098.

146. Lagresle-Peyrou, C., Olichon, A., Sadek, H., Roche, P., Tardy, C., Da Silva, C., Garrigue, A., Fischer, A., Moshous, D., Collette, Y., et al. (2021). A gain-of-function RAC2 mutation is associated with bone-marrow hypoplasia and an autosomal dominant form of severe combined immunodeficiency. Haematologica *106*, 404–411. https://doi.org/10.3324/haematol.2019.230250.

147. Bros, M., Haas, K., Moll, L., and Grabbe, S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. Cells *8*, 733. https://doi.org/10.3390/cells8070733.

148. Choi, E.-K., Kim, J.-G., Kim, H.-J., Cho, J.-Y., Jeong, H., Park, Y., Islam, R., Cap, C.K., and Park, J.-B. (2020). Regulation of RhoA GTPase and novel target proteins for ROCK. Small GTPases *11*, 95–102. https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1364831.

149. Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.-S., and Miki, T. (2006). Dissecting the Role of Rho-mediated Signaling in Contractile Ring Formation. Mol. Biol. Cell *17*, 43–55. https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0569.

150. Mullin, M., Lightfoot, K., Clarke, R., Miller, M., Lahesmaa, R., and Cantrell, D. (2007). The RhoA transcriptional program in pre-T cells. Febs Lett. *581*, 4309–4317. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.077.

151. Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. Biochim. Biophys. Acta *1796*, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.003.

152. Mulloy, J.C., Cancelas, J.A., Filippi, M.-D., Kalfa, T.A., Guo, F., and Zheng, Y. (2010). Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. Blood *115*, 936–947. https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-198127.

153. Bros, M., Haas, K., Moll, L., and Grabbe, S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. Cells *8*, 733. https://doi.org/10.3390/cells8070733.

154. Li, X., Zhang, M., Zhou, G., Xie, Z., Wang, Y., Han, J., Li, L., Wu, Q., and Zhang, S. (2023). Role of Rho GTPases in inflammatory bowel disease. Cell Death Discov. *9*, 24. https://doi.org/10.1038/s41420-023-01329-w.

155. Vabres, P., Sorlin, A., Kholmanskikh, S.S., Demeer, B., St-Onge, J., Duffourd, Y., Kuentz, P., Courcet, J.-B., Carmignac, V., Garret, P., et al. (2019). Postzygotic inactivating mutations of RHOA cause a mosaic neuroectodermal syndrome. Nat. Genet. *51*, 1438–1441. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0498-4.

156. Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 103–112. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005.

157. Lawson, C.D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. Small GTPases *5*, e27958. https://doi.org/10.4161/sgtp.27958.

158. Guan, X., Guan, X., Dong, C., and Jiao, Z. (2020). Rho GTPases and related signaling complexes in cell migration and invasion. Exp. Cell Res. *388*, 111824. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111824.

159. Warner, H., Wilson, B.J., and Caswell, P.T. (2019). Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. Curr. Opin. Cell Biol. *56*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.003.

160. Ravichandran, Y., Hänisch, J., Murray, K., Roca, V., Dingli, F., Loew, D., Sabatet, V., Boëda, B., Stradal, T.E., and Etienne-Manneville, S. (2024). The distinct localization of CDC42 isoforms is responsible for their specific functions during migration. J. Cell Biol. *223*, e202004092. https://doi.org/10.1083/jcb.202004092.

161. Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell–cell adhesion. J. Cell Biol. *178*, 517–527. https://doi.org/10.1083/jcb.200701058.

162. Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. Nature *461*, 99–103. https://doi.org/10.1038/nature08242.

163. Pasapera, A.M., Plotnikov, S.V., Fischer, R.S., Case, L.B., Egelhoff, T.T., and Waterman, C.M. (2015). Rac1-Dependent Phosphorylation and Focal Adhesion Recruitment of Myosin IIA Regulates Migration and Mechanosensing. Curr. Biol. *25*, 175–186. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.043.

164. Beaty, B.T., and Condeelis, J. (2014). Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. Eur. J. Cell Biol. *93*, 438–444. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.003.

165. Wang, L.D., and Wagers, A.J. (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 643–655. https://doi.org/10.1038/nrm3184.

166. Kalfa, T.A., and Zheng, Y. (2014). Rho GTPases in Erythroid Maturation. Curr. Opin. Hematol. *21*, 165–171. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000032.

167. Yang, L., Wang, L., Kalfa, T.A., Cancelas, J.A., Shang, X., Pushkaran, S., Mo, J., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2007). Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis. Blood *110*, 3853–3861. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079582.

168. Ubukawa, K., Goto, T., Asanuma, K., Sasaki, Y., Guo, Y.-M., Kobayashi, I., Sawada, K., Wakui, H., and Takahashi, N. (2020). Cdc42 regulates cell polarization and contractile actomyosin rings during terminal differentiation of human erythroblasts. Sci. Rep. *10*, 11806. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68799-1.

169. Konstantinidis, D.G., Pushkaran, S., Johnson, J.F., Cancelas, J.A., Manganaris, S., Harris, C.E., Williams, D.A., Zheng, Y., and Kalfa, T.A. (2012). Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. Blood *119*, 6118–6127. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379263.

170. Kalfa, T.A., Pushkaran, S., Mohandas, N., Hartwig, J.H., Fowler, V.M., Johnson, J.F., Joiner, C.H., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2006). Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. Blood *108*, 3637–3645. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-005942.

171. Vainchenker, W., Arkoun, B., Basso-Valentina, F., Lordier, L., Debili, N., and Raslova, H. (2021). Role of Rho-GTPases in megakaryopoiesis. Small GTPases *12*, 399–415. https://doi.org/10.1080/21541248.2021.1885134.

172. Antkowiak, A., Viaud, J., Severin, S., Zanoun, M., Ceccato, L., Chicanne, G., Strassel, C., Eckly, A., Leon, C., Gachet, C., et al. (2016). Cdc42-dependent F-actin dynamics drive

structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. J. Thromb. Haemost. JTH *14*, 1268–1284. https://doi.org/10.1111/jth.13318.

173. Pleines, I., Eckly, A., Elvers, M., Hagedorn, I., Eliautou, S., Bender, M., Wu, X., Lanza, F., Gachet, C., Brakebusch, C., et al. (2010). Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. Blood *115*, 3364–3373. https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-242271.

174. Heib, T., Hermanns, H.M., Manukjan, G., Englert, M., Kusch, C., Becker, I.C., Gerber, A., Wackerbarth, L.M., Burkard, P., Dandekar, T., et al. (2021). RhoA/Cdc42 signaling drives cytoplasmic maturation but not endomitosis in megakaryocytes. Cell Rep. *35*, 109102. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109102.

175. Aslan, J.E., and McCarty, O.J.T. (2013). Rho GTPases in Platelet Function. J. Thromb. Haemost. JTH *11*, 35–46. https://doi.org/10.1111/jth.12051.

176. Pleines, I., Cherpokova, D., and Bender, M. (2019). Rho GTPases and their downstream effectors in megakaryocyte biology. Platelets *30*, 9–16. https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1478071.

177. Pula, G., and Poole, A.W. (2008). Critical roles for the actin cytoskeleton and cdc42 in regulating platelet integrin α 2 β 1. Platelets *19*, 199–210. https://doi.org/10.1080/09537100701777303.

178. Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007). Immunité naturelle - Structure et fonction des Toll-like receptors. médecine/sciences *23*, 67–74. https://doi.org/10.1051/medsci/200723167.

179. Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A.C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T.J., Kracht, M., Rosseau, S., et al. (2006). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *290*, L730–L737. https://doi.org/10.1152/ajplung.00271.2005.

180. Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Nakamura, R., Yamada, H., Maeda, N., Ishikawa, T., Hoshino, K., Uruno, T., Cao, Q., et al. (2010). Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. J. Exp. Med. *207*, 721–730. https://doi.org/10.1084/jem.20091776.

181. Kumar, S., Xu, J., Perkins, C., Guo, F., Snapper, S., Finkelman, F.D., Zheng, Y., and Filippi, M.-D. (2012). Cdc42 regulates neutrophil migration via crosstalk between WASp, CD11b, and microtubules. Blood *120*, 3563–3574. https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-426981.

182. Bokoch, G.M. (2005). Regulation of innate immunity by Rho GTPases. Trends Cell Biol. *15*, 163–171. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.002.

183. Castellano, F., Montcourrier, P., and Chavrier, P. (2000). Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. J. Cell Sci. *113 (Pt 17)*, 2955–2961. https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.2955.

184. Diebold, B.A., Fowler, B., Lu, J., Dinauer, M.C., and Bokoch, G.M. (2004). Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. J. Biol. Chem. *279*, 28136–28142. https://doi.org/10.1074/jbc.M313891200.

185. McCormick, B., Chu, J.Y., and Vermeren, S. (2017). Cross-talk between Rho GTPases and PI3K in the neutrophil. Small GTPases *10*, 187–195. https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1304855.

186. Aktories, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 487–498. https://doi.org/10.1038/nrmicro2592.

187. Dufies, O., and Boyer, L. (2021). RhoGTPases and inflammasomes: Guardians of effector-triggered immunity. PLoS Pathog. *17*, e1009504. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009504.

188. Jamilloux, Y., Sève, P., and Henry, T. (2014). Les inflammasomes et les maladies humaines. Rev. Médecine Interne *35*, 730–741. https://doi.org/10.1016/j.revmed.2014.04.017.

189. Keestra, A.M., Winter, M.G., Auburger, J.J., Frässle, S.P., Xavier, M.N., Winter, S.E., Kim, A., Poon, V., Ravesloot, M.M., Waldenmaier, J.F.T., et al. (2013). Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. Nature *496*, 233–237. https://doi.org/10.1038/nature12025.

190. Marijke Keestra-Gounder, A., and Tsolis, R.M. (2017). NOD1 and NOD2: beyond peptidoglycan sensing. Trends Immunol. *38*, 758–767. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.004.

191. Acharya, D., Reis, R., Volcic, M., Liu, G., Wang, M.K., Chia, B.S., Nchioua, R., Groß, R., Münch, J., Kirchhoff, F., et al. (2022). Actin cytoskeleton remodeling primes RIG-I-like receptor activation. Cell *185*, 3588-3602.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.011.

192. Park, Y.H., Wood, G., Kastner, D.L., and Chae, J.J. (2016). Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. Nat. Immunol. *17*, 914–921. https://doi.org/10.1038/ni.3457.

193. Spel, L., Zaffalon, L., Hou, C., Nganko, N., Chapuis, C., and Martinon, F. (2022). CDC42 regulates PYRIN inflammasome assembly. Cell Rep. *41*. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111636.

194. Shurin, G.V., Tourkova, I.L., Chatta, G.S., Schmidt, G., Wei, S., Djeu, J.Y., and Shurin, M.R. (2005). Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 3394–3400. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3394.

195. Schulz, A.M., Stutte, S., Hogl, S., Luckashenak, N., Dudziak, D., Leroy, C., Forné, I., Imhof, A., Müller, S.A., Brakebusch, C.H., et al. (2015). Cdc42-dependent actin dynamics controls maturation and secretory activity of dendritic cells. J. Cell Biol. *211*, 553–567. https://doi.org/10.1083/jcb.201503128.

196. Bros, M., Haas, K., Moll, L., and Grabbe, S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. Cells *8*, 733. https://doi.org/10.3390/cells8070733.

197. Pulecio, J., Petrovic, J., Prete, F., Chiaruttini, G., Lennon-Dumenil, A.-M., Desdouets, C., Gasman, S., Burrone, O.R., and Benvenuti, F. (2010). Cdc42-mediated MTOC polarization in dendritic cells controls targeted delivery of cytokines at the immune synapse. J. Exp. Med. *207*, 2719–2732. https://doi.org/10.1084/jem.20100007.

198. Saoudi, A., Kassem, S., Dejean, A., and Gaud, G. (2014). Rho-GTPases as key regulators of T lymphocyte biology. Small GTPases *5*, e28208. https://doi.org/10.4161/sgtp.28208.

199. Dumont, C., Corsoni-Tadrzak, A., Ruf, S., de Boer, J., Williams, A., Turner, M., Kioussis, D., and Tybulewicz, V.L.J. (2009). Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. Blood *113*, 3990–3998. https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181180.

200. Guo, F., Zhang, S., Tripathi, P., Mattner, J., Phelan, J., Sproles, A., Mo, J., Wills-Karp, M., Grimes, H.L., Hildeman, D., et al. (2011). Distinct Roles of Cdc42 in Thymopoiesis and Effector and Memory T Cell Differentiation. PLoS ONE *6*, e18002. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018002.

201. Singleton, K.L., Roybal, K.T., Sun, Y., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., van Oers, N.S.C., and Wülfing, C. (2009). Spatiotemporal Patterning During T Cell Activation Is Highly Diverse. Sci. Signal. *2*, ra15. https://doi.org/10.1126/scisignal.2000199.

202. Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J.-J., Wang, X., Liu, C., Milkie, D.E., Moore, R.P., Tulu, U.S., et al. (2018). Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. Cell *175*, 1430-1442.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.057.

203. Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S., and Altman, A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. J. Cell Biol. *155*, 331–338. https://doi.org/10.1083/jcb.200107080.

204. Ghosh, S., Di Bartolo, V., Tubul, L., Shimoni, E., Kartvelishvily, E., Dadosh, T., Feigelson, S.W., Alon, R., Alcover, A., and Haran, G. (2020). ERM-Dependent Assembly

of T Cell Receptor Signaling and Co-stimulatory Molecules on Microvilli prior to Activation. Cell Rep. *30*, 3434-3447.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.069.

205. Faure, S., Salazar-Fontana, L.I., Semichon, M., Tybulewicz, V.L.J., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R.N., and Delon, J. (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. Nat. Immunol. *5*, 272–279. https://doi.org/10.1038/ni1039.

206. Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., and Kazi, J.U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. Signal Transduct. Target. Ther. *6*, 412. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w.

207. Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., and Hansbro, P.M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? Immunology *123*, 326–338. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x.

208. Yang, J.-Q., Kalim, K.W., Li, Y., Zhang, S., Hinge, A., Filippi, M.-D., Zheng, Y., and Guo, F. (2016). RhoA orchestrates glycolysis for TH2 cell differentiation and allergic airway inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 231-245.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.004.

209. Kalim, K.W., Yang, J.-Q., Wunderlich, M., Modur, V., Nguyen, P., Li, Y., Wen, T., Davis, A.K., Verma, R., Lu, Q.R., et al. (2022). Targeting of Cdc42 GTPase in regulatory T cells unleashes antitumor T-cell immunity. J. Immunother. Cancer *10*, e004806. https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004806.

210. Guo, F., Velu, C.S., Grimes, H.L., and Zheng, Y. (2009). Rho GTPase Cdc42 is essential for B-lymphocyte development and activation. Blood *114*, 2909–2916. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214676.

211. Saci, A., and Carpenter, C.L. (2005). RhoA GTPase Regulates B Cell Receptor Signaling. Mol. Cell *17*, 205–214. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.012.

212. Satoh, T. (2014). Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. Small GTPases *5*, e28102. https://doi.org/10.4161/sgtp.28102.

213. Huang, Q.-Y., Lai, X.-N., Qian, X.-L., Lv, L.-C., Li, J., Duan, J., Xiao, X.-H., and Xiong, L.-X. (2019). Cdc42: A Novel Regulator of Insulin Secretion and Diabetes-Associated Diseases. Int. J. Mol. Sci. *20*, 179. https://doi.org/10.3390/ijms20010179.

214. Sylow, L., Jensen, T.E., Kleinert, M., Højlund, K., Kiens, B., Wojtaszewski, J., Prats, C., Schjerling, P., and Richter, E.A. (2013). Rac1 Signaling Is Required for Insulin-Stimulated Glucose Uptake and Is Dysregulated in Insulin-Resistant Murine and Human Skeletal Muscle. Diabetes *62*, 1865–1875. https://doi.org/10.2337/db12-1148.

215. Møller, L.L.V., Klip, A., and Sylow, L. (2019). Rho GTPases-Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. Cells *8*, 434. https://doi.org/10.3390/cells8050434.

216. Ca, E., and Al, O. (2009). Compartmentalization and regulation of insulin signaling to GLUT4 by the cytoskeleton. Vitam. Horm. *80*. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00608-0.

217. Hasegawa, K., Takenaka, N., Tanida, K., Chan, M.P., Sakata, M., Aiba, A., and Satoh, T. (2021). Atrophy of White Adipose Tissue Accompanied with Decreased Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Mice Lacking the Small GTPase Rac1 Specifically in Adipocytes. Int. J. Mol. Sci. *22*, 10753. https://doi.org/10.3390/ijms221910753.

218. Usui, I., Imamura, T., Huang, J., Satoh, H., and Olefsky, J.M. (2003). Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. *278*, 13765–13774. https://doi.org/10.1074/jbc.M208904200.

219. Umbayev, B., Saliev, T., Safarova (Yantsen), Y., Yermekova, A., Olzhayev, F., Bulanin, D., Tsoy, A., and Askarova, S. (2023). The Role of Cdc42 in the Insulin and Leptin Pathways Contributing to the Development of Age-Related Obesity. Nutrients *15*, 4964. https://doi.org/10.3390/nu15234964.

220. Hara, Y., Wakino, S., Tanabe, Y., Saito, M., Tokuyama, H., Washida, N., Tatematsu, S., Yoshioka, K., Homma, K., Hasegawa, K., et al. (2011). Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. Sci. Signal. *4*, ra3. https://doi.org/10.1126/scisignal.2001227.

221. Sordella, R., Jiang, W., Chen, G.-C., Curto, M., and Settleman, J. (2003). Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. Cell *113*, 147–158. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00271-X.

222. Bai, X., Zhu, Q., Combs, M., Wabitsch, M., Mack, C.P., and Taylor, J.M. (2024). GRAF1 deficiency leads to defective brown adipose tissue differentiation and thermogenic response. Sci. Rep. *14*, 28692. https://doi.org/10.1038/s41598-024-79301-6.

223. Nobusue, H., Onishi, N., Shimizu, T., Sugihara, E., Oki, Y., Sumikawa, Y., Chiyoda, T., Akashi, K., Saya, H., and Kano, K. (2014). Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. Nat. Commun. *5*, 3368. https://doi.org/10.1038/ncomms4368.

224. Yang, W., Thein, S., Lim, C.-Y., Ericksen, R.E., Sugii, S., Xu, F., Robinson, R.C., Kim, J.B., and Han, W. (2014). Arp2/3 complex regulates adipogenesis by controlling cortical actin remodelling. Biochem. J. *464*, 179–192. https://doi.org/10.1042/BJ20140805.

225. Ueyama, T., Sakuma, M., Nakatsuji, M., Uebi, T., Hamada, T., Aiba, A., and Saito, N. (2020). Rac-Dependent Signaling from Keratinocytes Promotes Differentiation of

Intradermal White Adipocytes. J. Invest. Dermatol. *140*, 75-84.e6. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.140.

226. Woodham, E.F., Paul, N.R., Tyrrell, B., Spence, H.J., Swaminathan, K., Scribner, M.R., Giampazolias, E., Hedley, A., Clark, W., Kage, F., et al. (2017). Coordination by Cdc42 of Actin, Contractility, and Adhesion for Melanoblast Movement in Mouse Skin. Curr. Biol. CB *27*, 624–637. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.033.

227. Koike, S., Yamasaki, K., Yamauchi, T., Shimada-Omori, R., Tsuchiyama, K., Ando, H., and Aiba, S. (2019). TLR3 stimulation induces melanosome endo/phagocytosis through RHOA and CDC42 in human epidermal keratinocyte. J. Dermatol. Sci. *96*, 168–177. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.11.005.

228. Zhang, J., Liu, S., Guo, W., Huang, Y., and Li, N. (2025). Oxyresveratrol suppressed melanogenesis, dendrite formation, and melanosome transport in melanocytes via regulation of the MC1R/cAMP/MITF pathway. Sci. Rep. *15*, 20400. https://doi.org/10.1038/s41598-025-05248-x.

229. Patwardhan, R., Nanda, S., Wagner, J., Stockter, T., Dehmelt, L., and Nalbant, P. (2023). Cdc42 activity in the trailing edge is required for persistent directional migration of keratinocytes. Mol. Biol. Cell *35*, br1. https://doi.org/10.1091/mbc.E23-08-0318.

230. Zhang, M., Wang, X., Guo, F., Jia, Q., Liu, N., Chen, Y., Yan, Y., Huang, M., Tang, H., Deng, Y., et al. (2019). Cdc42 Deficiency Leads To Epidermal Barrier Dysfunction by Regulating Intercellular Junctions and Keratinization of Epidermal Cells during Mouse Skin Development. Theranostics *9*, 5065–5084. https://doi.org/10.7150/thno.34014.

231. Wu, X., Quondamatteo, F., and Brakebusch, C. (2006). Cdc42 expression in keratinocytes is required for the maintenance of the basement membrane in skin. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *25*, 466–474. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.09.001.

232. McMullan, R., Lax, S., Robertson, V.H., Radford, D.J., Broad, S., Watt, F.M., Rowles, A., Croft, D.R., Olson, M.F., and Hotchin, N.A. (2003). Keratinocyte Differentiation Is Regulated by the Rho and ROCK Signaling Pathway. Curr. Biol. *13*, 2185–2189. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.050.

233. Tiwari, R.L., Mishra, P., Martin, N., George, N.O., Sakk, V., Soller, K., Nalapareddy, K., Nattamai, K., Scharffetter-Kochanek, K., Florian, M.C., et al. (2021). A Wnt5a-Cdc42 axis controls aging and rejuvenation of hair-follicle stem cells. Aging *13*, 4778–4793. https://doi.org/10.18632/aging.202694.

234. Jang, H., Jo, Y., Lee, J.H., and Choi, S. (2023). Aging of hair follicle stem cells and their niches. BMB Rep. *56*, 2–9. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2022-0183.

235. Pradhan, R., Ngo, P.A., Martínez-Sánchez, L. d. C., Neurath, M.F., and López-Posadas, R. (2021). Rho GTPases as Key Molecular Players within Intestinal Mucosa and GI Diseases. Cells *10*, 66. https://doi.org/10.3390/cells10010066.

236. Sakamori, R., Das, S., Yu, S., Feng, S., Stypulkowski, E., Guan, Y., Douard, V., Tang, W., Ferraris, R.P., Harada, A., et al. (2012). Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. J. Clin. Invest. *122*, 1052–1065. https://doi.org/10.1172/JCI60282.

237. Melendez, J., Grogg, M., and Zheng, Y. (2011). Signaling Role of Cdc42 in Regulating Mammalian Physiology. J. Biol. Chem. *286*, 2375–2381. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.200329.

238. Zhang, Z., Zhang, F., Davis, A.K., Xin, M., Walz, G., Tian, W., and Zheng, Y. (2022). CDC42 controlled apical-basal polarity regulates intestinal stem cell to transit amplifying cell fate transition via YAP-EGF-mTOR signaling. Cell Rep. *38*, 110009. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110009.

239. Segain, J.-P., Raingeard de la Blétière, D., Sauzeau, V., Bourreille, A., Hilaret, G., Cario-Toumaniantz, C., Pacaud, P., Galmiche, J.-P., and Loirand, G. (2003). Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. Gastroenterology *124*, 1180–1187. https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00283-x.

240. Kalim, K.W., Yang, J.-Q., Li, Y., Meng, Y., Zheng, Y., and Guo, F. (2018). Reciprocal Regulation of Glycolysis-Driven Th17 Pathogenicity and Regulatory T Cell Stability by Cdc42. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *200*, 2313–2326. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601765.

241. Tiede, I., Fritz, G., Strand, S., Poppe, D., Dvorsky, R., Strand, D., Lehr, H.A., Wirtz, S., Becker, C., Atreya, R., et al. (2003). CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. J. Clin. Invest. *111*, 1133–1145. https://doi.org/10.1172/JCI16432.

242. Ladinsky, M.S., Araujo, L.P., Zhang, X., Veltri, J., Galan-Diez, M., Soualhi, S., Lee, C., Irie, K., Pinker, E.Y., Narushima, S., et al. (2019). Endocytosis of commensal antigens by intestinal epithelial cells regulates mucosal T cell homeostasis. Science *363*, eaat4042. https://doi.org/10.1126/science.aat4042.

243. Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 167–180. https://doi.org/10.1038/nrm1587.

244. Premkumar, L., Bobkov, A.A., Patel, M., Jaroszewski, L., Bankston, L.A., Stec, B., Vuori, K., Côté, J.-F., and Liddington, R.C. (2010). Structural basis of membrane targeting

by the Dock180 family of Rho family guanine exchange factors (Rho-GEFs). J. Biol. Chem. *285*, 13211–13222. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102517.

245. Chang, L., Yang, J., Jo, C.H., Boland, A., Zhang, Z., McLaughlin, S.H., Abu-Thuraia, A., Killoran, R.C., Smith, M.J., Côté, J.-F., et al. (2020). Structure of the DOCK2−ELMO1 complex provides insights into regulation of the auto-inhibited state. Nat. Commun. *11*, 3464. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17271-9.

246. Kunimura, K., Uruno, T., and Fukui, Y. (2020). DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms. Int. Immunol. *32*, 5–15. https://doi.org/10.1093/intimm/dxz067.

247. Single cell type - DOCK1 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000150760-DOCK1/single+cell.

248. Single cell type - DOCK2 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134516-DOCK2/single+cell.

249. Single cell type - DOCK3 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088538-DOCK3/single+cell.

250. Single cell type - DOCK4 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000128512-DOCK4/single+cell.

251. Single cell type - DOCK5 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147459-DOCK5/single+cell.

252. Single cell type - DOCK6 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130158-DOCK6/single+cell.

253. Single cell type - DOCK7 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116641-DOCK7/single+cell.

254. Single cell type - DOCK8 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000107099-DOCK8/single+cell.

255. Single cell type - DOCK9 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088387-DOCK9/single+cell.

256. Single cell type - DOCK10 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135905-DOCK10/single+cell.

257. Single cell type - DOCK11 - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147251-DOCK11/single+cell.

258. Nishikimi, A., Kukimoto-Niino, M., Yokoyama, S., and Fukui, Y. (2013). Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. Exp. Cell Res. *319*, 2343–2349. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.024.

259. Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., Hengartner, M.O., Yajnik, V., and Ravichandran, K.S. (2005). A Steric-Inhibition Model for Regulation of Nucleotide Exchange via the Dock180 Family of GEFs. Curr. Biol. *15*, 371–377. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.050.

260. Komander, D., Patel, M., Laurin, M., Fradet, N., Pelletier, A., Barford, D., and Côté, J.-F. (2008). An α-Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling. Mol. Biol. Cell *19*, 4837–4851. https://doi.org/10.1091/mbc.E08-04-0345.

261. Katoh, H., and Negishi, M. (2003). RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. Nature *424*, 461–464. https://doi.org/10.1038/nature01817.

262. Xu, X., and Jin, T. (2017). ELMO proteins transduce G protein-coupled receptor signal to control reorganization of actin cytoskeleton in chemotaxis of eukaryotic cells. Small GTPases *10*, 271–279. https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1318816.

263. Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.-C., Haney, L.B., Klingele, D., Sondek, J., et al. (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. Nat. Struct. Mol. Biol. *11*, 756–762. https://doi.org/10.1038/nsmb800.

264. Koubek, E.J., and Santy, L.C. (2022). Actin Up: An Overview of the Rac GEF Dock1/Dock180 and Its Role in Cytoskeleton Rearrangement. Cells *11*, 3565. https://doi.org/10.3390/cells11223565.

265. Lin, M.-E., Hsu, Y.-C., Chiu, H.-L., Yao, C.-Y., Liu, C.-H., Kao, C.-J., Li, C.-I., Yuan, C.-T., Yang, Y.-T., Hou, H.-A., et al. (2024). DOCK1 Expression Enhances the Activity of the Notch Signaling Pathway and Promotes the Proliferation and Survival of Acute Myeloid Leukemia Cells. Blood *144*, 6148. https://doi.org/10.1182/blood-2024-209830.

266. Tajiri, H., Uruno, T., Shirai, T., Takaya, D., Matsunaga, S., Setoyama, D., Watanabe, M., Kukimoto-Niino, M., Oisaki, K., Ushijima, M., et al. (2017). Targeting Ras-Driven Cancer Cell Survival and Invasion through Selective Inhibition of DOCK1. Cell Rep. *19*, 969–980. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.016.

267. Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A.J., Fukui, Y., and Sasakawa, C. (2007). Shigella IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO–Dock180 machinery. Nat. Cell Biol. *9*, 121–128. https://doi.org/10.1038/ncb1526.

268. Doan, R.A., and Monk, K.R. (2025). Dock1 functions in Schwann cells to regulate development, maintenance, and repair. J. Cell Biol. *224*, e202311041. https://doi.org/10.1083/jcb.202311041.

269. Laurin, M., Fradet, N., Blangy, A., Hall, A., Vuori, K., and Côté, J.-F. (2008). The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 15446–15451. https://doi.org/10.1073/pnas.0805546105.

270. Grimsley, C.M., Kinchen, J.M., Tosello-Trampont, A.-C., Brugnera, E., Haney, L.B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2004). Dock180 and ELMO1 Proteins Cooperate to Promote Evolutionarily Conserved Rac-dependent Cell Migration*. J. Biol. Chem. *279*, 6087–6097. https://doi.org/10.1074/jbc.M307087200.

271. Shulman, Z., Pasvolsky, R., Woolf, E., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Erez, N., Fukui, Y., and Alon, R. (2006). DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. Blood *108*, 2150–2158. https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-017608.

272. Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Iwata, E., Oike, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y. (2003). DOCK2 is essential for antigen-induced translocation of TCR and lipid rafts, but not PKC-theta and LFA-1, in T cells. Immunity *19*, 119–129. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00169-9.

273. Wissmann, S., Stolp, B., Jímenez, A.M., and Stein, J.V. (2022). DOCK2 and phosphoinositide-3 kinase δ mediate two complementary signaling pathways for CXCR5-dependent B cell migration. Front. Immunol. *13*, 982383. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.982383.

274. Ushijima, M., Uruno, T., Nishikimi, A., Sanematsu, F., Kamikaseda, Y., Kunimura, K., Sakata, D., Okada, T., and Fukui, Y. (2018). The Rac Activator DOCK2 Mediates Plasma Cell Differentiation and IgG Antibody Production. Front. Immunol. *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00243.

275. Sakai, Y., Tanaka, Y., Yanagihara, T., Watanabe, M., Duan, X., Terasawa, M., Nishikimi, A., Sanematsu, F., and Fukui, Y. (2013). The Rac activator DOCK2 regulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice through the lytic synapse formation. Blood *122*, 386–393. https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475897.

276. Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Nakamura, R., Yamada, H., Maeda, N., Ishikawa, T., Hoshino, K., Uruno, T., Cao, Q., et al. (2010). Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. J. Exp. Med. *207*, 721–730. https://doi.org/10.1084/jem.20091776.

277. Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Tanaka, Y., Takii, R., Noda, M., Inayoshi, A., Watanabe, K., Sanematsu, F., Sasazuki, T., Sasaki, T., et al. (2006). DOCK2 is a Rac activator that

regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. J. Cell Biol. *174*, 647–652. https://doi.org/10.1083/jcb.200602142.

278. Watanabe, M., Terasawa, M., Miyano, K., Yanagihara, T., Uruno, T., Sanematsu, F., Nishikimi, A., Côté, J.-F., Sumimoto, H., and Fukui, Y. (2014). DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 5660–5667. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400885.

279. Dobbs, K., Domínguez Conde, C., Zhang, S.-Y., Parolini, S., Audry, M., Chou, J., Haapaniemi, E., Keles, S., Bilic, I., Okada, S., et al. (2015). Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. N. Engl. J. Med. *372*, 2409–2422. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413462.

280. Moens, L., Gouwy, M., Bosch, B., Pastukhov, O., Nieto-Patlàn, A., Siler, U., Bucciol, G., Mekahli, D., Vermeulen, F., Desmet, L., et al. (2019). Human DOCK2 Deficiency: Report of a Novel Mutation and Evidence for Neutrophil Dysfunction. J. Clin. Immunol. *39*, 298–308. https://doi.org/10.1007/s10875-019-00603-w.

281. Ji, L., Xu, S., Luo, H., and Zeng, F. (2022). Insights from DOCK2 in cell function and pathophysiology. Front. Mol. Biosci. *9*, 997659. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.997659.

282. Randall, K.L., Flesch, I.E.A., Mei, Y., Miosge, L.A., Aye, R., Yu, Z., Domaschenz, H., Hollett, N.A., Russell, T.A., Stefanovic, T., et al. (2024). DOCK2 Deficiency Causes Defects in Antiviral T-Cell Responses and Impaired Control of Herpes Simplex Virus Infection. J. Infect. Dis. *230*, e712–e721. https://doi.org/10.1093/infdis/jiae077.

283. Namkoong, H., Edahiro, R., Takano, T., Nishihara, H., Shirai, Y., Sonehara, K., Tanaka, H., Azekawa, S., Mikami, Y., Lee, H., et al. (2022). DOCK2 is involved in the host genetics and biology of severe COVID-19. Nature *609*, 754–760. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05163-5.

284. Alosaimi, M.F., Shendi, H., Beano, A., Stafstrom, K., El Hawary, R., Meshaal, S., Galal, N., Pai, S.-Y., El-Marsafy, A., Geha, R.S., et al. (2019). T-cell mitochondrial dysfunction and lymphopenia in DOCK2-deficient patients. J. Allergy Clin. Immunol. *144*, 306-309.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.02.020.

285. Liu, Z., Man, S.M., Zhu, Q., Vogel, P., Frase, S., Fukui, Y., and Kanneganti, T.-D. (2016). DOCK2 confers immunity and intestinal colonization resistance to Citrobacter rodentium infection. Sci. Rep. *6*, 27814. https://doi.org/10.1038/srep27814.

286. Guo, X., Li, F., Xu, Z., Yin, A., Yin, H., Li, C., and Chen, S.-Y. (2017). DOCK2 deficiency mitigates HFD-induced obesity by reducing adipose tissue inflammation and

increasing energy expenditure. J. Lipid Res. *58*, 1777–1784. https://doi.org/10.1194/jlr.M073049.

287. Ji, J., Xu, X., Zhang, L., Liu, S., Chen, J., Gao, H., Xiang, L., Li, Y., Xu, H., Chen, Y., et al. (2025). Dedicator of cytokinesis 2 regulates cytoskeletal actin dynamics and is essential for platelet biogenesis and functions. Cardiovasc. Res. *121*, 479–491. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaf009.

288. Tanaka, Y., Hamano, S., Gotoh, K., Murata, Y., Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Takii, R., Kawaguchi, M., Inayoshi, A., Masuko, S., et al. (2007). T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor-alpha subunit controlled by the Rac activator Dock2. Nat. Immunol. *8*, 1067–1075. https://doi.org/10.1038/ni1506.

289. Xu, X., Yoshizaki, H., Ishigaki, Y., Kubo, E., Minato, H., and Kiyokawa, E. (2017). Upregulation of multiple signaling pathways by Dock5 deletion in epithelial cells. Mol. Vis. *23*, 1081–1092.

290. Kukimoto-Niino, M., Katsura, K., Kaushik, R., Ehara, H., Yokoyama, T., Uchikubo-Kamo, T., Nakagawa, R., Mishima-Tsumagari, C., Yonemochi, M., Ikeda, M., et al. (2021). Cryo-EM structure of the human ELMO1-DOCK5-Rac1 complex. Sci. Adv. *7*, eabg3147. https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3147.

291. Vives, V., Laurin, M., Cres, G., Larrousse, P., Morichaud, Z., Noel, D., Côté, J.-F., and Blangy, A. (2011). The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *26*, 1099–1110. https://doi.org/10.1002/jbmr.282.

292. Kim, J.A., Im, S., Lim, J., Hong, J.M., Ihn, H.J., Bae, J.-S., Kim, J.-E., Bae, Y.C., and Park, E.K. (2025). The guanine nucleotide exchange factor DOCK5 negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced bone regeneration via the MKK3/6 and p38 signaling pathways. Exp. Mol. Med. *57*, 86–103. https://doi.org/10.1038/s12276-024-01372-2.

293. Ogawa, K., Tanaka, Y., Uruno, T., Duan, X., Harada, Y., Sanematsu, F., Yamamura, K., Terasawa, M., Nishikimi, A., Côté, J.-F., et al. (2014). DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FcεRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. J. Exp. Med. *211*, 1407–1419. https://doi.org/10.1084/jem.20131926.

294. Chen, A., Yang, D., Xuan, X., Miller, H., Luo, X., Yu, J., Yang, G., Wang, H., and Liu, C. (2019). Dock5 controls the peripheral B cell differentiation via regulating BCR signaling and actin reorganization. Cell. Immunol. *337*, 15–21. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.001.

295. Qu, H., Liu, X., Zhu, J., Xiong, X., Li, L., He, Q., Wang, Y., Yang, G., Zhang, L., Yang, Q., et al. (2024). Dock5 Deficiency Promotes Proteinuric Kidney Diseases via Modulating

Podocyte Lipid Metabolism. Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger. *11*, e2306365. https://doi.org/10.1002/advs.202306365.

296. Lai, Y., Zhao, A., Tan, M., Yang, M., Lin, Y., Li, S., Song, J., Zheng, H., Zhu, Z., Liu, D., et al. (2020). DOCK5 regulates energy balance and hepatic insulin sensitivity by targeting mTORC1 signaling. EMBO Rep. *21*, e49473. https://doi.org/10.15252/embr.201949473.

297. Abraham, S., Scarcia, M., Bagshaw, R.D., McMahon, K., Grant, G., Harvey, T., Yeo, M., Esteves, F.O.G., Thygesen, H.H., Jones, P.F., et al. (2015). A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis. Nat. Commun. *6*, 7286. https://doi.org/10.1038/ncomms8286.

298. Kawada, K., Upadhyay, G., Ferandon, S., Janarthanan, S., Hall, M., Vilardaga, J.-P., and Yajnik, V. (2009). Cell migration is regulated by platelet-derived growth factor receptor endocytosis. Mol. Cell. Biol. *29*, 4508–4518. https://doi.org/10.1128/MCB.00015-09.

299. Samani, A., Karuppasamy, M., English, K.G., Siler, C.A., Wang, Y., Widrick, J.J., and Alexander, M.S. (2023). DOCK3 regulates normal skeletal muscle regeneration and glucose metabolism. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *37*, e23198. https://doi.org/10.1096/fj.202300386RR.

300. Namekata, K., Tsuji, N., Guo, X., Nishijima, E., Honda, S., Kitamura, Y., Yamasaki, A., Kishida, M., Takeyama, J., Ishikawa, H., et al. (2023). Neuroprotection and axon regeneration by novel low-molecular-weight compounds through the modification of DOCK3 conformation. Cell Death Discov. *9*, 166. https://doi.org/10.1038/s41420-023-01460-8.

301. Bai, N., Hayashi, H., Aida, T., Namekata, K., Harada, T., Mishina, M., and Tanaka, K. (2013). Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. Mol. Brain *6*, 22. https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-22.

302. Kiyota, N., Shinozaki, Y., Guo, X., Kimura, A., Kawamura, K., Nishijima, E., Honda, S., Harada, C., Nakazawa, T., Namekata, K., et al. (2025). Role of HAUS7 as a DOCK3 binding partner in facilitating axon regeneration. Sci. Adv. *11*, eadq7105. https://doi.org/10.1126/sciadv.adq7105.

303. Helbig, K.L., Mroske, C., Moorthy, D., Sajan, S.A., and Velinov, M. (2017). Biallelic loss-of-function variants in DOCK3 cause muscle hypotonia, ataxia, and intellectual disability. Clin. Genet. *92*, 430–433. https://doi.org/10.1111/cge.12995.

304. Iwata-Otsubo, A., Ritter, A.L., Weckselbatt, B., Ryan, N.R., Burgess, D., Conlin, L.K., and Izumi, K. (2018). DOCK3-related neurodevelopmental syndrome: Biallelic intragenic deletion of DOCK3 in a boy with developmental delay and hypotonia. Am. J. Med. Genet. A. *176*, 241–245. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38517.

305. Liaqat, K., Treat, K., Mantcheva, L., McLaughlin, A., Breman, A., McPheron, M., Conboy, E., and Vetrini, F. (2025). Research-Based Whole Genome Sequencing Identifies Biallelic Loss of Function Variants in DOCK3 Gene Causing DOCK3-Related Disorder: The End of a Diagnostic Journey for This Family. Clin. Genet. *108*, 109–111. https://doi.org/10.1111/cge.14741.

306. Alexander, M.S., and Velinov, M. (2023). DOCK3-Associated Neurodevelopmental Disorder—Clinical Features and Molecular Basis. Genes *14*, 1940. https://doi.org/10.3390/genes14101940.

307. Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. (2006). Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. Exp. Cell Res. *312*, 4205–4216. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.09.006.

308. Huang, L., Chambliss, K.L., Gao, X., Yuhanna, I.S., Behling-Kelly, E., Bergaya, S., Ahmed, M., Michaely, P., Luby-Phelps, K., Darehshouri, A., et al. (2019). SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. Nature *569*, 565–569. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1140-4.

309. Yazbeck, P., Cullere, X., Bennett, P., Yajnik, V., Wang, H., Kawada, K., Davis, V.M., Parikh, A., Kuo, A., Mysore, V., et al. (2022). DOCK4 Regulation of Rho GTPases Mediates Pulmonary Vascular Barrier Function. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *42*, 886–902. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.317565.

310. Sundaravel, S., Duggan, R., Bhagat, T., Ebenezer, D.L., Liu, H., Yu, Y., Bartenstein, M., Unnikrishnan, M., Karmakar, S., Liu, T.-C., et al. (2015). Reduced DOCK4 expression leads to erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E6359-6368. https://doi.org/10.1073/pnas.1516394112.

311. Sundaravel, S., Liang-Kuo, W., Liu, H., Jeong, J., Choudhary, G., Bhagat, T.D., Gordon, S., Verma, A., and Wickrema, A. (2018). Reduced Expression of DOCK4 Leads to Increased Protein Phosphorylation and Migration of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Blood *132*, 2563. https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114320.

312. Ueda, S., Negishi, M., and Katoh, H. (2013). Rac GEF Dock4 interacts with cortactin to regulate dendritic spine formation. Mol. Biol. Cell *24*, 1602–1613. https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0782.

313. Guo, D., Peng, Y., Wang, L., Sun, X., Wang, X., Liang, C., Yang, X., Li, S., Xu, J., Ye, W.-C., et al. (2021). Autism-like social deficit generated by Dock4 deficiency is rescued by restoration of Rac1 activity and NMDA receptor function. Mol. Psychiatry *26*, 1505–1519. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0472-7.

314. Hong, G., Fu, X., Qi, J., Shao, B., Han, X., Fang, Y., Liu, S., Cheng, C., Zhu, C., Gao, J., et al. (2023). *Dock4* is required for the maintenance of cochlear hair cells and hearing function. Fundam. Res. *3*, 557–569. https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.04.016.

315. Herbst, C., Bothe, V., Wegler, M., Axer-Schaefer, S., Audebert-Bellanger, S., Gecz, J., Cogne, B., Feldman, H.B., Horn, A.H.C., Hurst, A.C.E., et al. (2024). Heterozygous loss-of-function variants in DOCK4 cause neurodevelopmental delay and microcephaly. Hum. Genet. *143*, 455–469. https://doi.org/10.1007/s00439-024-02655-4.

316. Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A., and Tanoue, A. (2007). Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. Exp. Cell Res. *313*, 791–804. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.017.

317. Cerikan, B., and Schiebel, E. (2019). Mechanism of cell-intrinsic adaptation to Adams-Oliver Syndrome gene DOCK6 disruption highlights ubiquitin-like modifier ISG15 as a regulator of RHO GTPases. Small GTPases *10*, 210–217. https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1297882.

318. Schnabel, F., Kamphausen, S.B., Funke, R., Kaulfuß, S., Wollnik, B., and Zenker, M. (2021). Aplasia cutis congenita in a CDC42-related developmental phenotype. Am. J. Med. Genet. A. *185*, 850–855. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62009.

319. Southgate, L., Machado, R.D., Snape, K.M., Primeau, M., Dafou, D., Ruddy, D.M., Branney, P.A., Fisher, M., Lee, G.J., Simpson, M.A., et al. (2011). Gain-of-function mutations of ARHGAP31, a Cdc42/Rac1 GTPase regulator, cause syndromic cutis aplasia and limb anomalies. Am. J. Hum. Genet. *88*, 574–585. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.013.

320. Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2006). The Rac Activator DOCK7 Regulates Neuronal Polarity through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18. Neuron *51*, 727–739. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.020.

321. Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Chan, J.R., and Tanoue, A. (2008). ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration. J. Cell Biol. *181*, 351–365. https://doi.org/10.1083/jcb.200709033.

322. Gao, M., Guo, G., Huang, J., Hou, X., Ham, H., Kim, W., Zhao, F., Tu, X., Zhou, Q., Zhang, C., et al. (2021). DOCK7 protects against replication stress by promoting RPA stability on chromatin. Nucleic Acids Res. *49*, 3322–3337. https://doi.org/10.1093/nar/gkab134.

323. Mayer, L., Jasztal, M., Pardo, M., Aguera de Haro, S., Collins, J., Bariana, T.K., Smethurst, P.A., Grassi, L., Petersen, R., Nurden, P., et al. (2018). Nbeal2 interacts with

Dock7, Sec16a, and Vac14. Blood *131*, 1000–1011. https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-800359.

324. Gunay-Aygun, M., Falik-Zaccai, T.C., Vilboux, T., Zivony-Elboum, Y., Gumruk, F., Cetin, M., Khayat, M., Boerkoel, C.F., Kfir, N., Huang, Y., et al. (2011). NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α-granules. Nat. Genet. *43*, 732–734. https://doi.org/10.1038/ng.883.

325. Blasius, A.L., Brandl, K., Crozat, K., Xia, Y., Khovananth, K., Krebs, P., Smart, N.G., Zampolli, A., Ruggeri, Z.M., and Beutler, B.A. (2009). Mice with mutations of Dock7 have generalized hypopigmentation and white-spotting but show normal neurological function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2706–2711. https://doi.org/10.1073/pnas.0813208106.

326. Le, P.T., Bishop, K.A., Maridas, D.E., Motyl, K.J., Brooks, D.J., Nagano, K., Baron, R., Bouxsein, M.L., and Rosen, C.J. (2017). Spontaneous Mutation of Dock7 Results in Lower Trabecular Bone Mass and Impaired Periosteal Expansion in Aged Female Misty Mice. Bone *105*, 103–114. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.006.

327. English, K., Samani, A., Becker, K., Karuppasamy, M., and Alexander, M. (2023). P189 Dock7 is an essential driver of skeletal muscle health and function. Neuromuscul. Disord. *33*, S112–S113. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2023.07.189.

328. Perrault, I., Hamdan, F.F., Rio, M., Capo-Chichi, J.-M., Boddaert, N., Décarie, J.-C., Maranda, B., Nabbout, R., Sylvain, M., Lortie, A., et al. (2014). Mutations in DOCK7 in Individuals with Epileptic Encephalopathy and Cortical Blindness. Am. J. Hum. Genet. *94*, 891–897. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.04.012.

329. Haberlandt, E., Valovka, T., Janjic, T., Müller, T., Blatsios, G., Karall, D., and Janecke, A.R. (2021). Characteristic facial features and cortical blindness distinguish the DOCK7-related epileptic encephalopathy. Mol. Genet. Genomic Med. *9*, e1607. https://doi.org/10.1002/mgg3.1607.

330. Su, H.C., Jing, H., Angelus, P., and Freeman, A.F. (2019). Insights into immunity from clinical and basic science studies of DOCK8 immunodeficiency syndrome. Immunol. Rev. *287*, 9–19. https://doi.org/10.1111/imr.12723.

331. Janssen, E., Tohme, M., Hedayat, M., Leick, M., Kumari, S., Ramesh, N., Massaad, M.J., Ullas, S., Azcutia, V., Goodnow, C.C., et al. A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. J. Clin. Invest. *126*, 3837–3851. https://doi.org/10.1172/JCI85774.

332. Zhang, Q., Dove, C.G., Hor, J.L., Murdock, H.M., Strauss-Albee, D.M., Garcia, J.A., Mandl, J.N., Grodick, R.A., Jing, H., Chandler-Brown, D.B., et al. (2014). DOCK8 regulates lymphocyte shape integrity for skin antiviral immunity. J. Exp. Med. *211*, 2549–2566. https://doi.org/10.1084/jem.20141307.

333. Aydin, S.E., Kilic, S.S., Aytekin, C., Kumar, A., Porras, O., Kainulainen, L., Kostyuchenko, L., Genel, F., Kütükcüler, N., Karaca, N., et al. (2015). DOCK8 deficiency: clinical and immunological phenotype and treatment options - a review of 136 patients. J. Clin. Immunol. *35*, 189–198. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0126-0.

334. Freeman, A.F., Gonzalez, C.E., Yates, B., Cole, K., Little, L., Flannelly, E., Steinberg, S.M., Mo, G., Piette, N., Hughes, T.E., et al. (2025). Hematopoietic cell transplantation for DOCK8 deficiency: Results from a prospective clinical trial. J. Allergy Clin. Immunol. *155*, 176–187. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.08.021.

335. Rimland, C.A., Lam, M.T., and Lee, P.Y. (2025). DOCK8 at the crossroads of immunodeficiency and hyperinflammation. J. Allergy Clin. Immunol. *155*, 1199–1201. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.12.1072.

336. Randall, K.L., Chan, S.S.-Y., Ma, C.S., Fung, I., Mei, Y., Yabas, M., Tan, A., Arkwright, P.D., Al Suwairi, W., Lugo Reyes, S.O., et al. (2011). DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. J. Exp. Med. *208*, 2305–2320. https://doi.org/10.1084/jem.20110345.

337. Janssen, E., Wilkie, H., and Geha, R.S. (2021). Macabre TH2 skewing in DOCK8 deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *148*, 73–75. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.02.025.

338. Kearney, C.J., Vervoort, S.J., Ramsbottom, K.M., Freeman, A.J., Michie, J., Peake, J., Casanova, J.-L., Picard, C., Tangye, S.G., Ma, C.S., et al. (2017). DOCK8 Drives Src-Dependent NK Cell Effector Function. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *199*, 2118–2127. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700751.

339. Zhang, Q., Davis, J.C., Lamborn, I.T., Freeman, A.F., Jing, H., Favreau, A.J., Matthews, H.F., Davis, J., Turner, M.L., Uzel, G., et al. (2009). Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. N. Engl. J. Med. *361*, 2046–2055. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905506.

340. Jabara, H.H., McDonald, D.R., Janssen, E., Massaad, M.J., Ramesh, N., Borzutzky, A., Rauter, I., Benson, H., Schneider, L., Baxi, S., et al. (2012). DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. Nat. Immunol. *13*, 612–620. https://doi.org/10.1038/ni.2305.

341. Deobagkar-Lele, M., Crawford, G., Crockford, T.L., Back, J., Hodgson, R., Bhandari, A., Bull, K.R., and Cornall, R.J. (2024). B cells require DOCK8 to elicit and integrate T cell help when antigen is limiting. Sci. Immunol. *9*, eadd4874. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4874.

342. Harada, Y., Tanaka, Y., Terasawa, M., Pieczyk, M., Habiro, K., Katakai, T., Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Nishizaki, T., Shirouzu, M., et al. (2012). DOCK8 is a

Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. Blood *119*, 4451–4461. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407098.

343. Janssen, E., Das, M., Butts, J., Alasharee, M., Mukherjee, S., Lozano, G.L., Rao, C., Livingston, A.F., Woods, B., Smith, E., et al. (2025). DOCK8 in T cells promotes Th17 and Treg cell functionality to restrain mucosal mast cells and limit susceptibility to oral anaphylaxis. Immunity *58*, 1794-1810.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2025.06.004.

344. Shen, C., Cerf, A., Postat, J., Bhagrath, A., Merino, M., Mingarelli, A., Barnes, G., Patel, D., Rogers, D., Luo, V.M., et al. (2025). A Dock8-dependent mechanosensitive central actin pool maintains T cell shape and protects the nucleus during migration. Sci. Immunol. *10*, eadt9239. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adt9239.

345. Singh, A.K., Eken, A., Hagin, D., Komal, K., Bhise, G., Shaji, A., Arkatkar, T., Jackson, S.W., Bettelli, E., Torgerson, T.R., et al. (2017). DOCK8 regulates fitness and function of regulatory T cells through modulation of IL-2 signaling. JCI Insight *2*, e94275, 94275. https://doi.org/10.1172/jci.insight.94275.

346. Kearney, C.J., Vervoort, S.J., Ramsbottom, K.M., Freeman, A.J., Michie, J., Peake, J., Casanova, J.-L., Picard, C., Tangye, S.G., Ma, C.S., et al. (2017). DOCK8 Drives Src-Dependent NK Cell Effector Function. J. Immunol. *199*, 2118–2127. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700751.

347. Patrizi, O., Baronio, M., Gazzurelli, L., Rossi, S., Rezzola, S., Marcenaro, E., Plebani, A., Badolato, R., Parolini, S., Lougaris, V., et al. (2022). Lack of DOCK8 impairs the primary biologic functions of human NK cells and abrogates CCR7 surface expression in a WASP-independent manner. Clin. Immunol. Orlando Fla *237*, 108974. https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.108974.

348. Shen, C., Cerf, A., Postat, J., Bhagrath, A., Merino, M., Mingarelli, A., Barnes, G., Patel, D., Rogers, D., Luo, V.M., et al. (2025). A Dock8-dependent mechanosensitive central actin pool maintains T cell shape and protects the nucleus during migration. Sci. Immunol. *10*, eadt9239. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adt9239.

349. Zhang, Q., Dove, C.G., Hor, J.L., Murdock, H.M., Strauss-Albee, D.M., Garcia, J.A., Mandl, J.N., Grodick, R.A., Jing, H., Chandler-Brown, D.B., et al. (2014). DOCK8 regulates lymphocyte shape integrity for skin antiviral immunity. J. Exp. Med. *211*, 2549–2566. https://doi.org/10.1084/jem.20141307.

350. Janssen, E., Tohme, M., Hedayat, M., Leick, M., Kumari, S., Ramesh, N., Massaad, M.J., Ullas, S., Azcutia, V., Goodnow, C.C., et al. (2016). A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. J. Clin. Invest. *126*, 3837–3851. https://doi.org/10.1172/JCI85774.

351. Wilkie, H., Das, M., Pelovitz, T., Bainter, W., Woods, B., Alasharee, M., Sobh, A., Baris, S., Eltan, S.B., Al-Herz, W., et al. (2024). Regulatory T-cell dysfunction and cutaneous exposure to Staphylococcus aureus underlie eczema in DOCK8 deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. *154*, 143–156. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.12.020.

352. Misery, L. (2023). Rôle de l'interleukine 31, une cytokine neuro-immune, dans le prurit et au-delà. Ann. Dermatol. Vénéréologie - FMC *3*, 181–190. https://doi.org/10.1016/j.fander.2022.12.005.

353. Yamamura, K., Uruno, T., Shiraishi, A., Tanaka, Y., Ushijima, M., Nakahara, T., Watanabe, M., Kido-Nakahara, M., Tsuge, I., Furue, M., et al. (2017). The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. Nat. Commun. *8*, 13946. https://doi.org/10.1038/ncomms13946.

354. Tangye, S.G., Pillay, B., Randall, K.L., Avery, D.T., Phan, T.G., Gray, P., Ziegler, J.B., Smart, J.M., Peake, J., Arkwright, P.D., et al. (2017). DOCK8-DEFICIENT CD4+ T CELLS ARE BIASED TO A TH2 EFFECTOR FATE AT THE EXPENSE OF TH1 AND TH17 CELLS. J. Allergy Clin. Immunol. *139*, 933–949. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.016.

355. Robinson, M.J., Prout, M., Mearns, H., Kyle, R., Camberis, M., Forbes-Blom, E.E., Paul, W.E., Allen, C.D.C., and Le Gros, G. (2017). IL-4 haploinsufficiency specifically impairs IgE responses against allergens in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *198*, 1815–1822. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601434.

356. Asano, T., Khourieh, J., Zhang, P., Rapaport, F., Spaan, A.N., Li, J., Lei, W.-T., Pelham, S.J., Hum, D., Chrabieh, M., et al. (2021). Human STAT3 variants underlie autosomal dominant hyper-IgE syndrome by negative dominance. J. Exp. Med. *218*, e20202592. https://doi.org/10.1084/jem.20202592.

357. Keles, S., Charbonnier, L.M., Kabaleeswaran, V., Reisli, I., Genel, F., Gulez, N., Al-Herz, W., Ramesh, N., Perez-Atayde, A., Eeder, N.K., et al. (2016). DOCK8 Regulates STAT3 Activation and Promotes Th17 Cell Differentiation. J. Allergy Clin. Immunol. *138*, 1384-1394.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.023.

358. Eken, A., Cansever, M., Okus, F.Z., Erdem, S., Nain, E., Azizoglu, Z.B., Haliloglu, Y., Karakukcu, M., Ozcan, A., Devecioglu, O., et al. (2020). ILC3 deficiency and generalized ILC abnormalities in DOCK8-deficient patients. Allergy *75*, 921–932. https://doi.org/10.1111/all.14081.

359. Janssen, E., Morbach, H., Ullas, S., Bannock, J.M., Massad, C., Menard, L., Barlan, I., Lefranc, G., Su, H., Dasouki, M., et al. (2014). Dedicator of cytokinesis 8-deficient patients have a breakdown in peripheral B-cell tolerance and defective regulatory T cells. J. Allergy Clin. Immunol. *134*, 1365–1374. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.042.

360. Bozkurt, C., Cildir, G., Aba, U., Erdogan, R.K., Warnock, N.I., Kok, C.H., Sefer, A.P., Haskologlu, S., Tekeoglu, S.D., Kılınç, G.M., et al. (2025). Comprehensive αβ T-Cell Receptor Repertoire Analysis Reveals a Unique CD8+ TCR Landscape in DOCK8-Deficient Patients. Allergy. https://doi.org/10.1111/all.16580.

361. Alroqi, F.J., Charbonnier, L.-M., Keles, S., Ghandour, F., Mouawad, P., Sabouneh, R., Mohammed, R., Almutairi, A., Chou, J., Massaad, M.J., et al. (2017). DOCK8 Deficiency Presenting as an IPEX-Like Disorder. J. Clin. Immunol. *37*, 811–819. https://doi.org/10.1007/s10875-017-0451-1.

362. Park, J.H., Lee, K.H., Jeon, B., Ochs, H.D., Lee, J.S., Gee, H.Y., Seo, S., Geum, D., Piccirillo, C.A., Eisenhut, M., et al. (2020). Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome: A systematic review. Autoimmun. Rev. *19*, 102526. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102526.

363. Janssen, E., Kumari, S., Tohme, M., Ullas, S., Barrera, V., Tas, J.M.J., Castillo-Rama, M., Bronson, R.T., Usmani, S.M., Irvine, D.J., et al. DOCK8 enforces immunological tolerance by promoting IL-2 signaling and immune synapse formation in Tregs. JCI Insight *2*, e94298. https://doi.org/10.1172/jci.insight.94298.

364. Pillay, B.A., Fusaro, M., Gray, P.E., Statham, A.L., Burnett, L., Bezrodnik, L., Kane, A., Tong, W., Abdo, C., Winter, S., et al. (2021). Somatic reversion of pathogenic DOCK8 variants alters lymphocyte differentiation and function to effectively cure DOCK8 deficiency. J. Clin. Invest. *131*, e142434, 142434. https://doi.org/10.1172/JCI142434.

365. Aydin, S.E., Freeman, A.F., Al-Herz, W., Al-Mousa, H.A., Arnaout, R.K., Aydin, R.C., Barlogis, V., Belohradsky, B.H., Bonfim, C., Bredius, R.G., et al. (2019). Hematopoietic Stem Cell Transplantation as Treatment for Patients with DOCK8 Deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. Pract. *7*, 848–855. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.10.035.

366. Ollech, A., Mashiah, J., Lev, A., Simon, A.J., Somech, R., Adam, E., Barzilai, A., Hagin, D., and Greenberger, S. (2021). Treatment options for DOCK8 deficiency-related severe dermatitis. J. Dermatol. *48*, 1386–1393. https://doi.org/10.1111/1346-8138.15955.

367. Rossi, M., Bettolini, L., Artelli, G.L., Fraghì, A., Tomasi, C., and Calzavara-Pinton, P. (2023). Dupilumab Treatment Efficacy and Impact on Clinical Scores, Serum Biomarkers, and Itch in Adult Patients with Atopic Dermatitis: A Retrospective Analysis. J. Asthma Allergy *16*, 1233–1240. https://doi.org/10.2147/JAA.S433515.

368. Starrenburg, M.E., Bel Imam, M., Lopez, J.F., Buergi, L., Nguyen, N.T., Nouwen, A.E.M., Arends, N.J.T., Caspers, P.J., Akdis, M., Pasmans, S.G.M.A., et al. (2024). Dupilumab treatment decreases MBC2s, correlating with reduced IgE levels in pediatric atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. *154*, 1333-1338.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2024.06.023.

369. Meller, N., Westbrook, M.W., Shannon, J.D., Guda, C., and Schwartz, M.A. (2008). Function of the N-terminus of zizimin1: autoinhibition and membrane targeting. Biochem. J. *409*, 525–533. https://doi.org/10.1042/BJ20071263.

370. Parrado, A. (2020). Expression of DOCK9 and DOCK11 Analyzed with Commercial Antibodies: Focus on Regulation of Mutually Exclusive First Exon Isoforms. Antibodies Basel Switz. *9*, 27. https://doi.org/10.3390/antib9030027.

371. Kang, N., Liu, J., and Zhao, Y. (2019). Dissociation mechanism of GDP from Cdc42 via DOCK9 revealed by molecular dynamics simulations. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. *87*, 433–442. https://doi.org/10.1002/prot.25665.

372. Gene: DOCK9 (ENSG00000088387) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 115 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000088387;r=13:98793429-99086625.

373. Ruiz-Lafuente, N., Minguela, A., Muro, M., and Parrado, A. (2021). The roles of Cdc42 and Rac1 in the formation of plasma membrane protrusions in cancer epithelial HeLa cells. Mol. Biol. Rep. *48*, 4285–4294. https://doi.org/10.1007/s11033-021-06443-5.

374. Kuramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. (2009). Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons. J. Neurosci. Res. *87*, 1794–1805. https://doi.org/10.1002/jnr.21997.

375. Brown, K.A., Ham, A.-J.L., Clark, C.N., Meller, N., Law, B.K., Chytil, A., Cheng, N., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2008). Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF-beta1. J. Cell. Biochem. *105*, 596–611. https://doi.org/10.1002/jcb.21860.

376. Dock9 | dedicator of cytokinesis 9 mouse gene | IMPC https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:106321.

377. Karolak, J.A., Rydzanicz, M., Ginter-Matuszewska, B., Pitarque, J.A., Molinari, A., Bejjani, B.A., and Gajecka, M. (2015). Variant c.2262A>C in DOCK9 Leads to Exon Skipping in Keratoconus Family. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *56*, 7687–7690. https://doi.org/10.1167/iovs.15-17538.

378. Detera-Wadleigh, S.D., Liu, C., Maheshwari, M., Cardona, I., Corona, W., Akula, N., Steele, C.J.M., Badner, J.A., Kundu, M., Kassem, L., et al. (2007). Sequence variation in DOCK9 and heterogeneity in bipolar disorder. Psychiatr. Genet. *17*, 274–286. https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e328133f352.

379. Pan, Y., Sun, Y., Xiao, Y., Ding, J., Hu, G., Lin, Z., and Chen, C. (2025). DOCK9 as a predictive biomarker linked to angiogenesis and immune response in esophageal squamous cell carcinoma. Clin. Exp. Med. *25*, 1–17. https://doi.org/10.1007/s10238-025-01653-8.

380. Sabik, O.L., Calabrese, G.M., Taleghani, E., Ackert-Bicknell, C.L., and Farber, C.R. (2020). Identification of a Core Module for Bone Mineral Density through the Integration of a Co-expression Network and GWAS Data. Cell Rep. *32*, 108145. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108145.

381. Parrado, A. (2020). Expression of DOCK10.1 protein revealed with a specific antiserum: insights into regulation of first exon isoforms of DOCK10. Mol. Biol. Rep. *47*, 3003–3010. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05342-5.

382. Kukimoto-Niino, M., Ihara, K., Mishima-Tsumagari, C., Inoue, M., Fukui, Y., Yokoyama, S., and Shirouzu, M. (2023). Structural basis for the dual GTPase specificity of the DOCK10 guanine nucleotide exchange factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *653*, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.02.054.

383. Yelo, E., Bernardo, M.V., Gimeno, L., Alcaraz-García, M.J., Majado, M.J., and Parrado, A. (2008). Dock10, a novel CZH protein selectively induced by interleukin-4 in human B lymphocytes. Mol. Immunol. *45*, 3411–3418. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.04.003.

384. Gene: DOCK10 (ENSG00000135905) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 115 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000135905;r=2:224765090-225042468.

385. García-Serna, A.-M., Alcaraz-García, M.-J., Ruiz-Lafuente, N., Sebastián-Ruiz, S., Martínez, C.-M., Moya-Quiles, M.-R., Minguela, A., García-Alonso, A.-M., Martín-Orozco, E., and Parrado, A. (2016). Dock10 regulates CD23 expression and sustains B-cell lymphopoiesis in secondary lymphoid tissue. Immunobiology *221*, 1343–1350. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.07.015.

386. Ruiz-Lafuente, N., Alcaraz-García, M.-J., García-Serna, A.-M., Sebastián-Ruiz, S., Moya-Quiles, M.-R., García-Alonso, A.-M., and Parrado, A. (2015). Dock10, a Cdc42 and Rac1 GEF, induces loss of elongation, filopodia, and ruffles in cervical cancer epithelial HeLa cells. Biol. Open *4*, 627–635. https://doi.org/10.1242/bio.20149050.

387. Agirrezabal, I., Palacios, R., Moreno, B., Sepulcre, J., Abernathy, A., Saiz, A., Llufriu, S., Comabella, M., Montalban, X., Martinez, A., et al. (2016). Increased expression of dedicator-cytokinesis-10, caspase-2 and Synaptotagmin-like 2 is associated with clinical disease activity in multiple sclerosis. Mult. Scler. Demyelinating Disord. *1*, 7. https://doi.org/10.1186/s40893-016-0009-8.

388. Ruiz-Lafuente, N., Minguela, A., Muro, M., and Parrado, A. (2019). The role of DOCK10 in the regulation of the transcriptome and aging. Heliyon *5*, e01391. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01391.

389. Gene: DOCK11 (ENSG00000147251) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 115 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147251;r=X:118495814-118686974.

390. Lin, Q., Yang, W., Baird, D., Feng, Q., and Cerione, R.A. (2006). Identification of a DOCK180-related guanine nucleotide exchange factor that is capable of mediating a positive feedback activation of Cdc42. J. Biol. Chem. *281*, 35253–35262. https://doi.org/10.1074/jbc.M606248200.

391. Matsuda, T., Yanase, S., Takaoka, A., and Maruyama, M. (2015). The immunosenescence-related gene Zizimin2 is associated with early bone marrow B cell development and marginal zone B cell formation. Immun. Ageing A *12*, 1. https://doi.org/10.1186/s12979-015-0028-x.

392. Sugiyama, Y., Fujiwara, M., Sakamoto, A., Tsushima, H., Nishikimi, A., and Maruyama, M. (2022). The immunosenescence-related factor DOCK11 is involved in secondary immune responses of B cells. Immun. Ageing *19*, 2. https://doi.org/10.1186/s12979-021-00259-4.

393. Ide, M., Tabata, N., Yonemura, Y., Shirasaki, T., Murai, K., Wang, Y., Ishida, A., Okada, H., Honda, M., Kaneko, S., et al. (2022). Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication. J. Biol. Chem. *298*, 102097. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102097.

394. Li, Y.-Y., Kuroki, K., Shimakami, T., Murai, K., Kawaguchi, K., Shirasaki, T., Nio, K., Sugimoto, S., Nishikawa, T., Okada, H., et al. (2023). Hepatitis B Virus Utilizes a Retrograde Trafficking Route via the Trans-Golgi Network to Avoid Lysosomal Degradation. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. *15*, 533–558. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.10.008.

395. Doan, P.T.B., Nio, K., Shimakami, T., Kuroki, K., Li, Y.-Y., Sugimoto, S., Takayama, H., Okada, H., Kaneko, S., Honda, M., et al. (2023). Super-Resolution Microscopy Analysis of Hepatitis B Viral cccDNA and Host Factors. Viruses *15*, 1178. https://doi.org/10.3390/v15051178.

396. Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature *463*, 485–492. https://doi.org/10.1038/nature08908.

397. Corvillo, F., Aparicio, V., López-Lera, A., Garrido, S., Araújo-Vilar, D., de Miguel, M.P., and López-Trascasa, M. (2018). Autoantibodies Against Perilipin 1 as a Cause of Acquired Generalized Lipodystrophy. Front. Immunol. *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02142.

398. Dupré, L., Boztug, K., and Pfajfer, L. (2021). Actin Dynamics at the T Cell Synapse as Revealed by Immune-Related Actinopathies. Front. Cell Dev. Biol. *9*, 665519. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665519.

399. Boussard, C., Delage, L., Gajardo, T., Kauskot, A., Batignes, M., Goudin, N., Stolzenberg, M.-C., Brunaud, C., Panikulam, P., Riller, Q., et al. (2023). DOCK11 deficiency in patients with X-linked actinopathy and autoimmunity. Blood *141*, 2713–2726. https://doi.org/10.1182/blood.2022018486.

400. Block, J., Rashkova, C., Castanon, I., Zoghi, S., Platon, J., Ardy, R.C., Fujiwara, M., Chaves, B., Schoppmeyer, R., Van Der Made, C.I., et al. (2023). Systemic Inflammation and Normocytic Anemia in DOCK11 Deficiency. N. Engl. J. Med. *389*, 527–539. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2210054.

401. de Cevins, C., Luka, M., Smith, N., Meynier, S., Magérus, A., Carbone, F., García-Paredes, V., Barnabei, L., Batignes, M., Boullé, A., et al. (2021). A monocyte/dendritic cell molecular signature of SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children with severe myocarditis. Med N. Y. N *2*, 1072-1092.e7. https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.08.002.

402. Nowicka, M., Krieg, C., Crowell, H.L., Weber, L.M., Hartmann, F.J., Guglietta, S., Becher, B., Levesque, M.P., and Robinson, M.D. (2017). CyTOF workflow: differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. F1000Research *6*, 748. https://doi.org/10.12688/f1000research.11622.3.

403. Adam, F., Verbeuren, T.J., Fauchère, J.-L., Guillin, M.-C., and Jandrot-Perrus, M. (2003). Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. J. Thromb. Haemost. JTH *1*, 798–804. https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00138.x.

404. Vargas, P., Terriac, E., Lennon-Duménil, A.-M., and Piel, M. (2014). Study of cell migration in microfabricated channels. J. Vis. Exp. JoVE, e51099. https://doi.org/10.3791/51099.

405. Sangiorgio, V., Pitto, M., Palestini, P., and Masserini, M. (2004). GPI-anchored proteins and lipid rafts. Ital. J. Biochem. *53*, 98–111.

406. Kondo, T., and Hearing, V.J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. Expert Rev. Dermatol. *6*, 97–108. https://doi.org/10.1586/edm.10.70.

407. Elsayed, A., von Hardenberg, S., Atschekzei, F., Siek, P., Witte, T., Sogkas, G., and Ringshausen, F.C. (2025). A novel hemizygous nonsense variant in *DOCK11* causes systemic inflammation and immunodeficiency. Clin. Immunol. *276*, 110504. https://doi.org/10.1016/j.clim.2025.110504.

408. Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. Trends Cell Biol. *20*, 470–481. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.003.

409. Franz, C.M., and Ridley, A.J. (2004). p120 Catenin Associates with Microtubules: INVERSE RELATIONSHIP BETWEEN MICROTUBULE BINDING AND RHO GTPase REGULATION*. J. Biol. Chem. *279*, 6588–6594. https://doi.org/10.1074/jbc.M312812200.

410. Nature, R.C. by S. (2021). RhoGTPases-activating bacterial toxins: The NLRP3 inflammasome fight back. Res. Communities Springer Nat. http://naturemicrobiologycommunity.nature.com/posts/rhogtpases-activating-bacterial-toxins-the-nlrp3-inflammasome-fightback.

411. Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. Nat. Immunol. *18*, 716–724. https://doi.org/10.1038/ni.3731.

412. Kostel Bal, S., Giuliani, S., Block, J., Repiscak, P., Hafemeister, C., Shahin, T., Kasap, N., Ransmayr, B., Miao, Y., van de Wetering, C., et al. (2023). Biallelic NFATC1 mutations cause an inborn error of immunity with impaired CD8+ T-cell function and perturbed glycolysis. Blood *142*, 827–845. https://doi.org/10.1182/blood.2022018303.

413. Lu, L., Barbi, J., and Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. Nat. Rev. Immunol. *17*, 703–717. https://doi.org/10.1038/nri.2017.75.

414. Kim, H.-J., Barnitz, R.A., Kreslavsky, T., Brown, F.D., Moffett, H., Lemieux, M.E., Kaygusuz, Y., Meissner, T., Holderried, T.A.W., Chan, S., et al. (2015). Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. Science *350*, 334–339. https://doi.org/10.1126/science.aad0616.

415. Shahin, T., Mayr, D., Shoeb, M.R., Kuehn, H.S., Hoeger, B., Giuliani, S., Gawriyski, L.M., Petronczki, Ö.Y., Hadjadj, J., Bal, S.K., et al. (2022). Identification of germline monoallelic mutations in IKZF2 in patients with immune dysregulation. Blood Adv. *6*, 2444–2451. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006367.

416. Barbera, S., Dimberg, A., and Essand, M. (2025). News from the T cell trogocytosis front. Trends Immunol. *46*, 677–689. https://doi.org/10.1016/j.it.2025.07.008.

417. Janssen, E., Kumari, S., Tohme, M., Ullas, S., Barrera, V., Tas, J.M., Castillo-Rama, M., Bronson, R.T., Usmani, S.M., Irvine, D.J., et al. (2017). DOCK8 enforces immunological tolerance by promoting IL-2 signaling and immune synapse formation in Tregs. JCI Insight *2*, e94298, 94298. https://doi.org/10.1172/jci.insight.94298.

418. Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., and Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Signal Transduct. Target. Ther. *6*, 402. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1.

419. Collet, A., Guerrier, T., Sanges, S., Chépy, A., Sobanski, V., Launay, D., and Dubucquoi, S. (2025). Autoreactive B cells in autoimmune diseases: Mechanisms, functions and clinical implications. Autoimmun. Rev. *24*, 103851. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2025.103851.

420. Hu, S.-Z., Yuan, Z.-Y., Zhang, X.-X., Yu, X.-J., Ni, H.-Y., Sun, S.-J., Xu, T., and Zhan, H.-Q. (2024). The emerging role of BLyS/APRIL in autoimmune diseases: Biological characteristics, functions, and therapeutic potential. J. Autoimmun. *149*, 103329. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103329.

421. St.Clair, E.W. (2010). Good and Bad Memories Following Rituximab Therapy. Arthritis Rheum. *62*, 1–5. https://doi.org/10.1002/art.25039.

422. Casanova, J.-L., and Abel, L. (2021). Mechanisms of viral inflammation and disease in humans. Science *374*, 1080–1086. https://doi.org/10.1126/science.abj7965.

423. Sakamoto, A., and Maruyama, M. (2020). Contribution of DOCK11 to the Expansion of Antigen-Specific Populations among Germinal Center B Cells. ImmunoHorizons *4*, 520–529. https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2000048.

424. Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. Nat. Rev. Immunol. *13*, 118–132. https://doi.org/10.1038/nri3383.

425. Domínguez Conde, C., Xu, C., Jarvis, L., Rainbow, D., Wells, S., Gomes, T., Howlett, S., Suchanek, O., Polanski, K., King, H., et al. (2022). Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans. Science *376*, eabl5197. https://doi.org/10.1126/science.abl5197.

426. Frieser, D., Pignata, A., Khajavi, L., Shlesinger, D., Gonzalez-Fierro, C., Nguyen, X.-H., Yermanos, A., Merkler, D., Höftberger, R., Desestret, V., et al. (2022). Tissue-resident CD8+ T cells drive compartmentalized and chronic autoimmune damage against CNS neurons. Sci. Transl. Med. *14*, eabl6157. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl6157.

427. Topham, D.J., and Reilly, E.C. (2018). Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells: From Phenotype to Function. Front. Immunol. *9*, 515. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515.

428. Zheng, D., Liwinski, T., and Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. Cell Res. *30*, 492–506. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7.

429. DOCK11 protein expression summary - The Human Protein Atlas https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147251-DOCK11.

430. El Masri, R., and Delon, J. (2021). RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. Nat. Rev. Immunol. *21*, 499–513. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00500-7.

431. Sereni, L., Castiello, M.C., and Villa, A. (2018). Platelets in Wiskott-Aldrich syndrome: Victims or executioners? J. Leukoc. Biol. *103*, 577–590. https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0617-257R.

432. de Kreuk, A.M. (2024). Sickle cell and autoimmune disease: a double whammy. Haematologica *109*, 3471–3473. https://doi.org/10.3324/haematol.2024.285445.

433. Xu, P., Zhang, X., Li, D., Jiao, B., Nie, J., Huang, Y., Xia, Z., Li, J., Dan, Y., Huang, X., et al. (2025). Loss of DCAF8 impairs hematopoietic stem cell function with cellular senescence via the DOCK11-CDC42 axis. Blood *146*, 1462–1475. https://doi.org/10.1182/blood.2024027335.

434. Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2025). Sustained immune youth risks autoimmune disease in the aging host. Nat. Aging *5*, 1404–1414. https://doi.org/10.1038/s43587-025-00919-w.

435. Zheng, Y., Liu, Q., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2023). Immune aging – A mechanism in autoimmune disease. Semin. Immunol. *69*, 101814. https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101814.

436. Rossiello, F., Jurk, D., Passos, J.F., and d'Adda di Fagagna, F. (2022). Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. Nat. Cell Biol. *24*, 135–147. https://doi.org/10.1038/s41556-022-00842-x.

437. Jones-Weinert, C., Mainz, L., and Karlseder, J. (2025). Telomere function and regulation from mouse models to human ageing and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *26*, 297–313. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00800-5.

438. Gene: DOCK9 (ENSG00000088387) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 115 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000088387;r=13:98793429-99086625.

439. Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., and Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Signal Transduct. Target. Ther. *6*, 402. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1.

440. Beltra, J.-C., Abdel-Hakeem, M.S., Manne, S., Zhang, Z., Huang, H., Kurachi, M., Su, L., Picton, L., Ngiow, S.F., Muroyama, Y., et al. (2023). Stat5 opposes the transcription factor Tox and rewires exhausted CD8+ T cells toward durable effector-like states during chronic antigen exposure. Immunity *56*, 2699-2718.e11. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.11.005.

441. Liao, W., Liu, Y., Ma, C., Wang, L., Li, G., Mishra, S., Srinivasan, S., Fan, K.K.-H., Wu, H., Li, Q., et al. (2021). The downregulation of IL-18R defines bona fide kidney-resident CD8+ T cells. iScience *24*, 101975. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101975.

442. Chen, L., and Shen, Z. (2020). Tissue-resident memory T cells and their biological characteristics in the recurrence of inflammatory skin disorders. Cell. Mol. Immunol. *17*, 64–75. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0291-4.

443. Zammouri, J., Vatier, C., Capel, E., Auclair, M., Storey-London, C., Bismuth, E., Mosbah, H., Donadille, B., Janmaat, S., Fève, B., et al. (2022). Molecular and Cellular Bases of Lipodystrophy Syndromes. Front. Endocrinol. *12*, 803189. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.803189.

444. Guaraldi, G., Luzi, K., Bellistrì, G.M., Zona, S., Domingues da Silva, A.R., Bai, F., Garlassi, E., Marchetti, G., Capeau, J., and Monforte, A. d'Arminio (2013). CD8 T-cell activation is associated with lipodystrophy and visceral fat accumulation in antiretroviral therapy-treated virologically suppressed HIV-infected patients. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1999 *64*, 360–366. https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000001.

445. Koda, Y., Teratani, T., Chu, P.-S., Hagihara, Y., Mikami, Y., Harada, Y., Tsujikawa, H., Miyamoto, K., Suzuki, T., Taniki, N., et al. (2021). CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells. Nat. Commun. *12*, 4474. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24734-0.

446. Dai, Z., Chang, Y., Lee, E.Y., Leifer, V.P., Chun Wang, E.H., Perez-Lorenzo, R., de Jong, A., and Christiano, A.M. (2025). Single-cell analysis of temporal immune cell dynamics in alopecia areata reveals a causal role for clonally expanded CD8+ T cells in disease. Cell Rep. *44*, 115798. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115798.

447. Picardo, M., Dell'Anna, M.L., Ezzedine, K., Hamzavi, I., Harris, J.E., Parsad, D., and Taieb, A. (2015). Vitiligo. Nat. Rev. Dis. Primer *1*, 15011. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.11.

448. Morimoto, M., Nicoli, E.-R., Kuptanon, C., Roney, J.C., Serra-Vinardell, J., Sharma, P., Adams, D.R., Gallin, J.I., Holland, S.M., Rosenzweig, S.D., et al. (2024). The spectrum of LYST mutations in Chediak-Higashi syndrome: a report of novel variants and a comprehensive review of the literature. J. Med. Genet. *61*, 212–223. https://doi.org/10.1136/jmg-2023-109420.

449. Yu, J., Yu, D., Checkla, D.M., Freedberg, I.M., and Bertolino, A.P. (1993). Human hair keratins. J. Invest. Dermatol. *101*, S56–S59. https://doi.org/10.1016/0022-202X(93)90501-8.

450. Weng, X., Maxwell-Warburton, S., Hasib, A., Ma, L., and Kang, L. (2022). The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. Trends Endocrinol. Metab. *33*, 318–332. https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.02.002.

451. Patni, N., Hegele, R.A., and Garg, A. (2022). Caveolar dysfunction and lipodystrophies. Eur. J. Endocrinol. *186*, C1–C4. https://doi.org/10.1530/EJE-21-1243.

452. Garg, A., and Agarwal, A.K. (2008). Caveolin-1: A New Locus for Human Lipodystrophy. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 1183–1185. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0426.

453. Akinci, B., Gular, M.C., and Oral, E.A. (2000). Lipodystrophy Syndromes: Presentation and Treatment. In Endotext, K. R. Feingold, S. F. Ahmed, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, et al., eds. (MDText.com, Inc.).

454. Hartleb, M., Gutkowski, K., and Milkiewicz, P. (2011). Nodular regenerative hyperplasia: Evolving concepts on underdiagnosed cause of portal hypertension. World J. Gastroenterol. WJG *17*, 1400–1409. https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i11.1400.

455. Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*, a009191. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191.

456. Agarwal, A.K., Tunison, K., Horton, J.D., and Garg, A. (2024). Regulated regeneration of adipose tissue in lipodystrophic Agpat2-null mice partially ameliorates hepatic steatosis. iScience *27*, 109517. https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109517.

457. Wu, W., Wang, X., He, K., Li, C., and Li, S. (2024). From mice to men: An assessment of preclinical model systems for the study of vitiligo. Clin. Immunol. Orlando Fla *262*, 110171. https://doi.org/10.1016/j.clim.2024.110171.

458. You, S., Cho, Y.-H., Byun, J.-S., and Shin, E.-C. (2013). Melanocyte-specific CD8+ T cells are associated with epidermal depigmentation in a novel mouse model of vitiligo. Clin. Exp. Immunol. *174*, 38–44. https://doi.org/10.1111/cei.12146.

459. Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-Resident Memory T Cells. Immunity *41*, 886–897. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007.

460. DOCK11 (human) https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=8586&showAllSites=true.

461. DOCK9 (human) https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=15037&showAllSites=true.