

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé (ED414)

INSERM U1109

THÈSE présentée par :

Yannick Dieudonné

soutenue le : **1er décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Les cellules B dans le syndrome des
antiphospholipides primaire : approche à partir
d'une cohorte de patients avec triple positivité**

THÈSE dirigée par :

Mme KORGANOW Anne-Sophie Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
INSERM U1109, Université de Strasbourg

co-encadrée par :

M. GIES Vincent Maître de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier
INSERM U1109, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. MEFFRE Eric Professeur, Université de Stanford, Etats-Unis

M. MAHEVAS Matthieu Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
INSERM U1151/CNRS UMS 8253, Université de Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme DUMORTIER Hélène Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

Mme RIZZI Marta Professeur, Université de Freiburg, Allemagne

REMERCIEMENTS

À Monsieur le **Professeur MEFFRE Eric**. Vous me faites l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail. C'est un privilège de pouvoir bénéficier de votre expertise.

À Monsieur le **Professeur MAHEVAS Matthieu**. Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour le temps consacré à ce travail.

À Madame le **Docteur DUMORTIER Hélène**. Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

À Madame le **Professeur MARTA Rizzi**. Je vous suis reconnaissant non seulement de participer au jury de cette thèse, mais aussi pour votre aide tout au long de ce projet et nos échanges qui m'ont beaucoup appris.

Merci à mes encadrants de thèse.

À Madame le **Professeur KORGANOW Anne-Sophie**. Merci pour ton aide au quotidien et nos discussions enthousiastes et constructives. Merci surtout pour la confiance que tu m'as accordée, et ton soutien sans faille depuis maintenant plusieurs années.

À Monsieur le **Docteur GIES Vincent**. Merci pour m'avoir accompagné depuis mes débuts à la paillasse. Merci pour tes remarques toujours judicieuses, ta patience quand je suis obstiné et ta bienveillance quand je suis tourmenté.

À Madame le Professeur SOULAS-SPRAUEL Pauline, pour m'avoir accueilli dans son équipe et son aide tout au long de mon parcours.

À tous ceux qui ont collaboré avec notre équipe pour la réalisation de ce projet, notamment Raquel et Iga.

Au Docteur BOUTBOUL David, au Docteur ANDRE Isabelle, au Docteur HYENNE Vincent, au Professeur FAFI-KREMER Samira, pour avoir participé aux différentes réunions de suivi de thèse. Vos conseils auront été précieux.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale de m'avoir fait confiance et d'avoir financé ce projet.

À Aurélien. Je ne me serais jamais engagé dans l'aventure de l'immunologie sans toi. J'ai hâte qu'on relève ensemble les prochains défis qu'elle nous réserve.

Aux autres chefs de l'équipe pour leurs conseils avisés et leur regard bienveillant. Merci à Fred pour les discussions scientifiques et géopolitiques pétillantes. À Sophie, ma référente Pokaa. Au Professeur Thierry Martin, pour votre soutien dans mon parcours et vos suggestions pertinentes.

À mes amis et collègues qui forment cette équipe incroyable. Merci à Sabine pour son aide empreinte de mélodie, entre sonnerie entêtante et boîte à musique apaisante. Merci à Nadège pour ses sages conseils qui m'ont guidé tant au laboratoire que dans l'Ouest

alsacien. Merci à Quentin R., pour toutes les épreuves traversées, la plus ardue restant tout de même celle de trouver une pièce au fond du tiroir pour un Bueno. Merci à Quentin F. pour le mélange raffiné entre observations aiguisées et moments de franche rigolade. Merci à Damien. Ton calme et ta bonne humeur constants ne forcent pas moins l'admiration que tes exploits sportifs. À Julie, pour ton humour, ton écoute, la stabilité que tu as pu apporter à l'équipe. Ne change rien et surtout pas ta détermination. À Julien, qui a repris le flambeau avec brio et enthousiasme. C'est à toi de jouer, maître. Merci à Stéphane, pour tes remarques mordantes, perçantes, piquantes, coupantes, tranchantes, cinglantes mais toujours pertinentes. Je me réjouis qu'on puisse mener d'autres projets en clinique et en recherche. Merci à Léa et Olivier pour leur aide précieuse dans ce travail. Merci à Tristan pour les (quelques) conseils sur les scripts et les (nombreux) couscous du mardi. Merci à Elodie d'avoir repris un projet qui me tenait à cœur. Merci à tous les autres étudiants qui ont contribué à la dynamique de cette équipe.

À mes amis et collègues du service d'immunologie, sans qui je n'aurais pas pu mener ce travail à terme. Merci Vincent pour ta bonne humeur, ta disponibilité, et les pauses café bien sûr. Merci Mathilde pour ton écoute, ta bienveillance, et simplement d'être mon amie. Merci Léa, pour ta disponibilité et ton humour que j'apprécie particulièrement. Merci à Olivier, avec qui il n'est pas nécessaire d'être face à une vitre pour avoir une fenêtre sur le monde. Merci aux infirmières et aux internes.

Aux amis et collègues de l'IBMC. Je pense à Lucie, Abdou, Delphine, Romain, Alex, Chloé, Adrien, Florent, Anne-Marie, Quentin M, Astrid, Fabien, Delphine et à tous les autres.

À ma famille. À mes parents, pour votre soutien, les valeurs que vous m'avez transmises, votre exigence qui me permet, aujourd'hui, d'avoir la qualité de ne jamais être sûr de rien. Merci Maman pour avoir toujours placé mon intérêt avant tout. Merci Papa pour tes conseils inestimables qui m'aident toujours à prendre du recul. Merci Marine, pour notre complicité, y compris en cuisine. Merci Jean-Pierre, pour tout ce qu'on partage et ce que tu m'as appris.

À Carole, pour être mon premier soutien dans toutes les galères, et pas que sur le vélo. À Laura pour ton enthousiasme et ton sourire, à Anna pour notre complicité malgré la distance. À Capucine dont le parcours et la détermination me rendent admiratif. À Sidonie, la relève est assurée ! À ma marraine qui a toujours été présente.

À Pierre, Gabrielle, Anne-Sophie pour votre appui inestimable. À Angélique, Dominique, Théo pour tous ces beaux moments.

À Arthur, qui m'emplit de fierté. À mes amis, en particulier Luc, Marie, Emma, Vincent, Sarah, Nathan, Joanna, Benoît, Anne-Claire, Yvon, Mégane, Valentin, Franck, Maria, Pierre, Flora, David, Thibaut, Vanessa et tous les autres.

À Florence. Merci d'avoir fait de moi une personne meilleure par la bienveillance, la curiosité, l'ouverture dont tu fais preuve tout au long du chemin qu'on suit ensemble. Merci d'être là tout simplement.

À toi, que j'ai tellement hâte de rencontrer.

ABREVIATIONS

- **ACPA** : Anticorps anti peptides citrullinés
- **ADN** : Acide desoxyribonucléique
- **AID** : *Activated induced deaminase*
- **AIRE** : *Autoimmune regulator*
- **ANA** : Anticorps antinucléaires
- **AP4** : *Activating enhancer binding protein 4*
- **APC** : *Antigen-presenting cell* / cellule présentatrice d'antigène
- **aPL** : Anticorps antiphospholipides
- **BAFF** : *B-cell activating factor*
- **BANK** : *B-lymphocyte scaffold protein with ankyrin repeats*
- **BCMA** : *B cell maturation antigen*
- **BCL** : *B cell lymphoma*
- **BCR** : *B cell receptor* / récepteur des cellules B
- **BLIMP1** : *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*
- **BLK** : *B-cell lymphocyte kinase*
- **BLNK** : *B-cell linker*
- **Breg** : Lymphocyte B régulateur
- **CCR7** : *C-C Motif Chemokine Receptor 7*
- **CDR** : *Complementary determining region*
- **CG** : Centre germinatif
- **CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité
- **CXCR5** : *C chemokine receptor type 5*
- **DICV** : Déficit immunitaire commun variable
- **DNA-PK** : *DNA dependent protein kinase*
- **EBF1** : *Early B cell Factor 1*
- **EBI2** : *Epstein-Barr virus-induced molecule 2*
- **ENA** : *Extractable nuclear antigen*
- **FDC** : Cellule dendritique folliculaire
- **FLT3** : *Fms-Like Tyrosine kinase 3 receptor*
- **FOXO1** : *Forkhead box O1*
- **FR** : *Framework region*
- **Gp** : Glycoprotéine
- **GWAS** : *Genome-wide association study*
- **HEL** : *Hen egg lysozyme*
- **ICOS** : *Inducible T-cell costimulatory*
- **IEI** : *Inborn error of immunity*
- **IFN** : Interféron
- **Ig** : immunoglobuline
- **IL-n°x** : Interleukine-n°x
- **IRAK4** : *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*
- **IRF4** : *Interferon Regulatory factor 4*
- **ITAM** : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
- **LA** : Lupus anticoagulant
- **LAG-3** : *Lymphocyte Activation Gene-3*
- **LB** : Lymphocyte B
- **LES** : Lupus érythémateux systémique
- **LT** : Lymphocyte T
- **MAI** : Maladie auto-immune
- **MTOR** : *Mammalian target of rapamycin*
- **MYD88** : *Myeloid differentiation factor 88*
- **NFAT** : *Nuclear factor of activated T cell*
- **NFκB** : *Nuclear factor-kappa B*
- **NLS** : *Nuclear localization signal*
- **PAMP** : *Pathogen associated molecular patterns*
- **PAX5** : *Paired Box gene 5*
- **PD-1** : *Programmed cell death protein 1*
- **pDC** : *Plasmacytoid dendritic cell* / Cellule dendritique plasmacytoïde
- **PI3K** : *Phosphatidyl inositol 3-kinase*
- **PR** : Polyarthrite rhumatoïde
- **PTI** : Purpura thrombopénique idiopathique
- **PTPN22** : *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*
- **RAG** : *Recombinase-activating gene*
- **RSS** : *Recombination sequence signal*
- **SAPL** : Syndrome des antiphospholipides
- **SFK** : *Src family kinase*
- **SHM** : Mutations hypersomatiques
- **SYK** : *Spleen tyrosine kinase*
- **TACI** : *Transmembrane activator; calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*
- **TCR** : *T cell receptor* / récepteur des cellules T
- **TFH** : Lymphocyte T folliculaire
- **TFR** : lymphocyte T folliculaire régulateur
- **TLR** : *Toll-like receptor*
- **TNF** : *Tumor necrosis factor*
- **Treg** : Lymphocyte T régulateur
- **UPR** : *Unfolded protein response*
- **VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine
- **XBP-1** : *X-Box Binding Protein 1*
- **XRCC4** : *X-ray repair cross-complementing protein 4*
- **ZF** : *Zinc finger*
- **κ** : Kappa
- **λ** : Lambda

TABLE DES MATIERES

PREFACE.....	1
INTRODUCTION.....	5
I. Tolérance lymphocytaire B.....	7
1. Concepts et historique	7
2. Tolérance centrale	8
2.1 Diversité combinatoire et jonctionnelle	9
2.2 Mécanismes de tolérance centrale	13
2.2.1 Délétion	13
2.2.2 Anergie.....	14
2.2.3 Edition du récepteur	15
3. Tolérance périphérique : compartiment naïf.....	17
3.1. Le premier checkpoint.....	18
3.2. Mécanismes de tolérance au stade naïf.....	19
4. Tolérance périphérique : compartiment post antigénique	24
4.1 Différenciation du CG et tolérance	24
4.2 Différenciation extra-folliculaire et tolérance	32
4.3 Tolérance tardive : LB mémoires.....	35
4.4 Tolérance tardive : ASC	38
II. Cellules B autoréactives dans les maladies auto-immunes	43
1. Rupture de tolérance dans les maladies auto-immunes	43
1.1 Compartiment naïf	43
1.2 Compartiment post-antigénique	44
1.2.1 Tolérance du CG	45
1.2.2 Tolérance extra-folliculaire	46
2. Hypothèses mécanistiques.....	47
2.1 Défaut du seuil d'activation	48
2.2 Implication des TLR.....	49
2.3 Anomalie de survie.....	50

3. Conséquences de la rupture de tolérance.....	52
3.1 Un biais de répertoire	52
3.2 Une contribution diverse des LB aux manifestations auto-immunes	53
3.3 Des ASC aux propriétés singulières	56
4. Conclusion : Du BCR autoréactifs aux anticorps pathogènes, un processus multi-étapes	57
III. Auto-immunité et déficit en Ikaros	63
• Papier 1 : <u>Dieudonné Y.</u> , Guffroy A., Vollmer O., Carapito R., Korganow A.S. IKZF1 loss-of-function variant causes autoimmunity and severe familial antiphospholipid syndrome. Journal of Clinical Immunology. 2019. 39: 353–357.	
IV. Syndrome des antiphospholipides primaire (SAPL)	75
1. Introduction.....	75
2. Lymphocytes B et SAPL.	77
• Papier 2 : <u>Dieudonné Y.</u> , Guffroy A., Poindron V., Soulas-Sprauel P., Martin T., Korganow A.S., Gies V. B cells in primary antiphospholipid syndrome: Review and remaining challenges Autoimmunity Reviews. 2021. 20 (5) :102798.	
HYPOTHESES DE TRAVAIL.....	93
MANUSCRIT.....	99
• Papier 3 : <u>Dieudonné Y.</u> , Lorenzetti R., Rottura J., Janowska I., Depauw S., Wadier N., Frenger Q., Jacquel L., Vollmer O., Carbone F., Luka M., Zhu C., Giorgiutti S., Nespola B., Herb A., Martin T., Voll Reinhard E., Poindron V., Guffroy A., Soulas-Sprauel P., Ménager M.M., Rizzi M., Korganow A.S., Gies V. Antiphospholipid B cells emerge from a naive polyreactive pool and, in primary antiphospholipid syndrome, matured through an enhanced mTORC1/MYC activation. Submitted.	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	163
ANNEXES	177
BIBLIOGRAPHIE	191

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Etapes de la recombinaison V(D)J	11
Figure 2. Phénotype des précurseurs B et des LB	12
Figure 3. Recombinaisons sur les locus de chaîne H et L et structure de l'Ig.....	13
Figure 4. Mécanismes de la tolérance centrale B.....	16
Figure 5. Sous-populations B transitionnelles chez l'homme.	19
Figure 6. Signal du récepteur du LB (BCR).....	21
Figure 7. Représentation signal TLR7/9 dépendant de CD19 dans le LB.....	22
Figure 8. BAFF, APRIL et leurs récepteurs.	24
Figure 9. Orientation des LB dans le compartiment post antigénique.....	26
Figure 10. Dynamique du CG et sélection des LB.	29
Figure 11. Propriétés des différentes voies d'activation des LB.....	35
Figure 12. Représentation schématique de la réponse immune secondaire.	37
Figure 13. Activation B extra-folliculaire dans le LES	47
Figure 14. Tolérance B et LES	61
Figure 15. Variants germinaux d' <i>IKZF1</i> associés aux IEL.	65
Figure 16. Critères de classification ACR/EULAR 2023 du SAPL.....	76
Figure 17. Physiopathologie des LB dans le SAPL primaire : des LB naïfs naturels aux aPL pathogènes.....	173

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nombre de gènes V, (D), J, C sur les locus de chaînes H et L chez l'homme ... 10

Tableau 2. Principaux marqueurs membranaires des cellules sécrétrices d'anticorps chez l'homme et la souris 39

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I 173

- Papier : Dieudonné Y., Gies V., Guffroy A., Keime C., Bird A.K., Liesveld J., Barnas J.L., Poindron V., Douiri N., Soulas-Sprauel P., Martin T., Meffre E., Anolik J.H., Korganow A.S. Transitional B cells in quiescent SLE: An early checkpoint imprinted by IFN. Journal of Autoimmunity. 2019;102:150-158.

PREFACE

En condition physiologique, l'organisme est pourvu de mécanismes intrinsèques qui le protège d'une éventuelle réaction antagoniste de son propre système immunitaire, phénomène désigné comme la « tolérance au soi ». Pour les lymphocytes B (LB), ces étapes de tolérance prennent place à la fois dans la moelle osseuse mais aussi en périphérie, dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires, où les LB échappant au filtre central sont éliminés ou régulés. Lorsque ces mécanismes sont dépassés, des LB reconnaissant des antigènes du soi, dits autoréactifs, peuvent survivre, sécréter des autoanticorps pathogènes et conduire à des manifestations auto-immunes : c'est la rupture de tolérance. Ainsi, la contribution des LB a largement été démontrée dans plusieurs maladies auto-immunes (MAI) et illustrée par l'efficacité de la déplétion des LB chez la souris et l'homme. Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une MAI caractérisée par la présence d'autoanticorps aux propriétés pro-coagulantes, les antiphospholipides (aPL), responsables de thromboses et de complications obstétricales. Il peut être primaire, c'est-à-dire isolé, ou secondaire lorsqu'il est associé à une autre MAI. Le rôle pathogénique des aPL a été montré, mais paradoxalement, les anomalies des LB ont été relativement peu étudiées par rapport à d'autres MAI médiées par les autoanticorps.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les LB autoréactifs et d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes de rupture de tolérance dans le SAPL primaire triple positif, une forme sévère de la maladie caractérisée par une positivité multiple des aPL. Avant de détailler les résultats de ce travail, et pour mieux appréhender les résultats de notre approche B multimodale, nous aborderons d'abord les principales étapes de la différenciation B et les filtres de tolérance qui les jalonnent en condition physiologique. Nous discuterons également les principaux points de tolérance déficients dans les MAI et les hypothèses mécanistiques soulevées dans la littérature. Nous nous focaliserons en particulier sur le lupus érythémateux systémique (LES), non seulement parce qu'il s'agit probablement de la MAI systémique la plus étudiée, mais aussi parce c'est la plus fréquemment associée au SAPL secondaire. Nous rapporterons ensuite la découverte d'un cas monogénique de SAPL sévère, impliquant un facteur de transcription clé de la différenciation B centrale et périphérique, IKAROS, qui nous a apporté un fort argument en faveur du rôle majeur de la rupture de tolérance B dans la maladie. Enfin, nous conclurons l'introduction de ce manuscrit en exposant l'état actuel des connaissances quant aux anomalies lymphocytaires B dans le SAPL.

INTRODUCTION

I. Tolérance lymphocytaire B

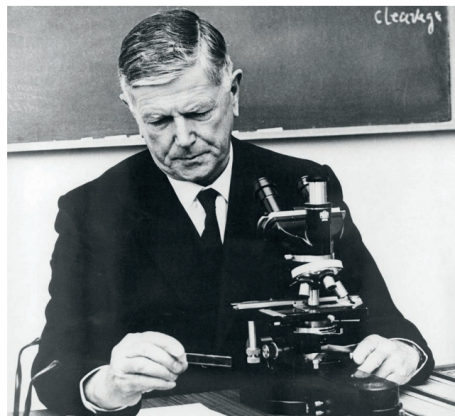
1. Concepts et historique

Les LB ont un rôle déterminant dans la défense anti-infectieuse de l'organisme, notamment via la production d'anticorps, piliers de la réponse immunitaire humorale. Les récepteurs des LB (= BCR) sont caractérisés par une grande diversité permettant théoriquement de reconnaître l'ensemble des micro-organismes exogènes. Après engagement du BCR par un antigène donné, le LB va connaître un processus de maturation d'affinité secondaire, incluant la commutation de classe et les mutations hyper-somatiques (SHM), permettant d'augmenter sa spécificité pour cet antigène et de produire des anticorps de forte affinité.

Le développement d'une telle diversité de récepteurs à l'antigène comporte le risque de générer des BCR autoréactifs, c'est à dire reconnaissant des antigènes non exogènes (autoantigènes). De tels anticorps, nommés autoanticorps, peuvent jouer un rôle directement pathogène et contribuer au développement de manifestations auto-immunes. Leur détection dans le sérum des patients est nécessaire pour retenir le diagnostic de différentes MAI comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou le LES (Kay and Upchurch 2012; Aringer et al. 2019). Les mécanismes de tolérance, dont plusieurs sont analogues pour les LB et T, ont pour but de réduire la fréquence, l'affinité ou la fonctionnalité de ces autoanticorps pathogènes.

Le concept de tolérance est apparu probablement pour la première fois avec les travaux de Paul Ehrlich et Julius Morgenroth à la fin des années 1890. Leurs travaux ont permis de démontrer que des anticorps hémolytiques pouvaient être produits en immunisant des animaux avec des globules rouges provenant d'individus de la même espèce (Ehrlich 1997; Albert 1915; Ehrlich 1997). Ils ont retenu le terme "horror autotoxicus" pour illustrer le potentiel de certains anticorps, ou auto-toxines, à détruire les tissus de l'hôte et suggéré que des mécanismes devaient exister pour empêcher cela chez les individus sains (Ehrlich 1906). Cette théorie, initialement très controversée, a été renforcée par les travaux de Frank Macfarlane Burnet dans les années 1950 et son hypothèse sur la sélection clonale. Selon Burnet, chaque BCR serait spécifique d'un antigène unique. La reconnaissance d'un antigène exogène par des cellules B matures déclencherait

l'expansion clonale d'un LB et la production d'anticorps permettant d'obtenir une réponse humorale spécifique et une mémoire immunologique (Burnet 1959). A l'opposé, la reconnaissance d'un autoantigène par un LB en voie de différenciation aboutirait à la mort cellulaire (= délétion clonale). Pour Burnet, le concept de tolérance était donc binaire, et reposait sur une réponse programmée de mort ou de prolifération cellulaire, selon que la reconnaissance antigénique arrive au stade immature ou mature respectivement (Lederberg 1959). Dans la seconde moitié du XXe siècle, la théorie de la délétion clonale a été mise à mal, notamment lorsque la présence de cellules B autoréactives a été détectée en périphérie chez l'animal (Christopher C. Goodnow 2007). Les processus de tolérance ont été mieux appréhendés par le développement de modèles murins transgéniques permettant de suivre la différenciation B et de moduler la spécificité des BCR *in vivo*. Ces modèles ont conduit à la découverte de réponses alternatives à la reconnaissance d'un autoantigène, tels que l'anergie ou l'édition du récepteur. (Gay et al., 1993; Goodnow et al., 1988; Tiegs et al., 1993, Klinman, 1996). L'ensemble de ces données fait admettre aujourd'hui que la tolérance est un mécanisme dynamique impliquant tous les stades de maturation du LB et permettant la survie contrôlée de cellules autoréactives au potentiel réduit de pathogénicité (Nemazee, 2017; Platt, 2019).



Franck Macfarlane Burnet, 1960, Australie.
(Bernard et al., Nature)

2. Tolérance centrale

La tolérance centrale B se réfère à l'ensemble des mécanismes de régulation concernant l'ontogenèse B dans la moelle osseuse. La synergie de ces processus détermine si une

cellule autoréactive immature est éliminée ou rendue inactive par délétion clonale, édition de récepteur, anergie ou ignorance. Avant d'évoquer ce processus, il est nécessaire de rappeler les étapes de différenciation B précoce et les mécanismes à l'origine de la diversité des anticorps ou immunoglobulines (Ig).

Durant les phases initiales de développement lymphocytaire, les cellules souches hématopoïétiques multipotentes se différencient en progéniteurs communs multipotents caractérisés par la perte de capacité d'auto-renouvellement. L'expression de la tyrosine kinase FLT3 (*Fms-Like Tyrosine kinase 3 receptor*) va médier le signal induit par les cellules stromales médullaires (Ray et al. 1996) et aboutir à la différenciation vers des progéniteurs lymphoïdes communs. L'engagement vers le lignage B dépend du signal IL-7 et de différents facteurs de transcription tels que E2A, EBF1 (*Early B cell Factor 1*), BCL-11a, IKAROS (Nutt and Kee 2007; Kikuchi et al. 2005). A ce stade, PAX5 (*Paired Box gene 5*) est un acteur essentiel puisqu'il va entraîner l'expression de différents gènes spécifiques du lignage B tels que CD79 (Ig α) et CD19 tout en réprimant les gènes inappropriés à la lignée B (Wentink et al. 2019). L'inactivation de PAX5 aboutit à un arrêt précoce de la différenciation lymphocytaire B avec un blocage au stade pro-B (Nutt and Kee 2007). L'expression de CD79 et de CD19 est caractéristique de cellules pro-B où le processus de réarrangement V(D)J des gènes variables d'Ig débute.

2.1 Diversité combinatoire et jonctionnelle

Ce processus, relativement similaire chez l'homme et la souris, est sous la dépendance des enzymes RAG 1 et RAG2 (*Recombinase-activating gene*) (Oettinger et al. 1990). Le locus de la chaîne lourde (*heavy*, H) d'Ig, situé sur le chromosome 14, est composé d'une série de gènes dits variables (V), suivie de ceux de diversité (D), de jonction (J) et des exons des régions constantes (C) qui détermineront ultérieurement l'isotype (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2 et IgE). Chez l'homme, et selon l'haplotype, le nombre de gènes V sur le locus *IGH* est estimé entre 123 et 129 (38 à 46 fonctionnels, 4 à 5 ORF, et 79 à 81 pseudogènes), celui de gènes D à 27 (dont 23 fonctionnels et 4 ORF), celui de J à 9 (6 fonctionnels et 3 ORF) (Lefranc 2014; Matsuda et al. 1998). Les locus de chaînes légères (*light*, L) ne comprennent que les éléments V, J et C et sont respectivement situés sur le chromosome 2 et 22 pour les chaînes lambda (λ) et kappa (κ) (Wentink et al. 2019; Kenter, Priyadarshi, and Drake 2023). Chez l'homme, en raison de variants structuraux, le nombre de gènes

V,D,J,C sur le locus IGH et V,J,C sur les locus IGL et IGK varient selon l'haplotype. Une estimation du nombre de gènes sur les 3 loci, qu'ils soient fonctionnels ou non (pseudogènes ou hors cadre de lecture), est donnée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Nombre de gènes V, (D), J, C sur les locus de chaînes H et L chez l'homme. (D'après Lefranc et al. 2014).

Locus	Localisation Chromosomique	V (Variable)	D (Diversité)	J (Joining)	C (Constant)
IGH	14q32.33	123-129 (38-46)	27 (23)	9 (6)	11 (9)
IGK	2p11.2	76 ^a (34-38)	/	5	1
IGL	22q11.2	73-74 (29-33)	/	7-11 (4-5)	7-11 (4-5)

^aUn haplotype rare comporte uniquement le segment IGKV proximal, d'environ 500 pb, avec 40 gènes V dont 17 à 19 fonctionnels.

Les réarrangements sont réalisés grâce à des séquences cibles dites RSS (*recombination single sequences*), situées immédiatement en 3' des segments V, en 5' et 3' des segments D, et en 5' des segments J, et composées de répétitions stéréotypées (un heptamère palindromique et un nonamère riches en bases A et T) séparées par des séquences intercalantes de longueurs conservées de 12 et 23 paires de bases (Matsuda et al., 1998, **Figure 1**). Une recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre des RSS dissemblables, c'est-à-dire un RSS avec une séquence intercalante de 12 nucléotides et un avec une séquence intercalant de 23 nucléotides (règle 12-23). Les séquences RSS vont être reconnues par un complexe hétéro-tétramérique de 2 sous unités de RAG1 et RAG2 chacun (Kim et al. 2015). La recombinaison est initiée lorsque le complexe induit une cassure d'ADN (Acide désoxyribonucléique) simple brin en 3' de la région codante et en 5' des RSS (Tonegawa 1983). Le complexe RAG-RSS (12) va s'associer à une autre séquence RSS (23) pour former une synapse. Une réaction de transestérification, par laquelle le groupement OH en 3' attaque le groupement phosphodiester du brin opposé, aboutit à la formation de deux épingles à cheveux sur les extrémités codantes et deux extrémités signal franches (van Gent, Mizuuchi, and Gellert 1996). Les cassures double brin activent le complexe DNA-PK (composé des sous unités *DNA dependant protein kinase*, Ku80 et Ku70) qui recrute des protéines de réparation de l'ADN, dont XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein*

4) et Artemis. L'épingle à cheveux est ensuite ouverte, en son centre ou de façon asymétrique par l'endonucléase Artemis (Ma et al. 2002). Lorsque l'ouverture est asymétrique, l'ajout de nucléotides sur le brin complémentaire aboutira à des séquences palindromiques au niveau de la jonction (nucléotides P). Des nucléotides (nucléotides N) peuvent être ajoutés aléatoirement aux extrémités d'ADN par la TdT (terminodeoxynucleotidyl transférase), une ADN polymérase non dépendante de matrice, alors que d'autres peuvent être retirés par des exonucléases, augmentant ainsi la diversité jonctionnelle des régions variables d'Ig. Les extrémités d'ADN sont enfin liées par un mécanisme de recombinaison non homologue, (NHEJ pour *non homologous end-joining*), impliquant notamment la DNA-ligase IV (Deriano and Roth 2013), permettant la jonction entre 2 segments V, D ou J.

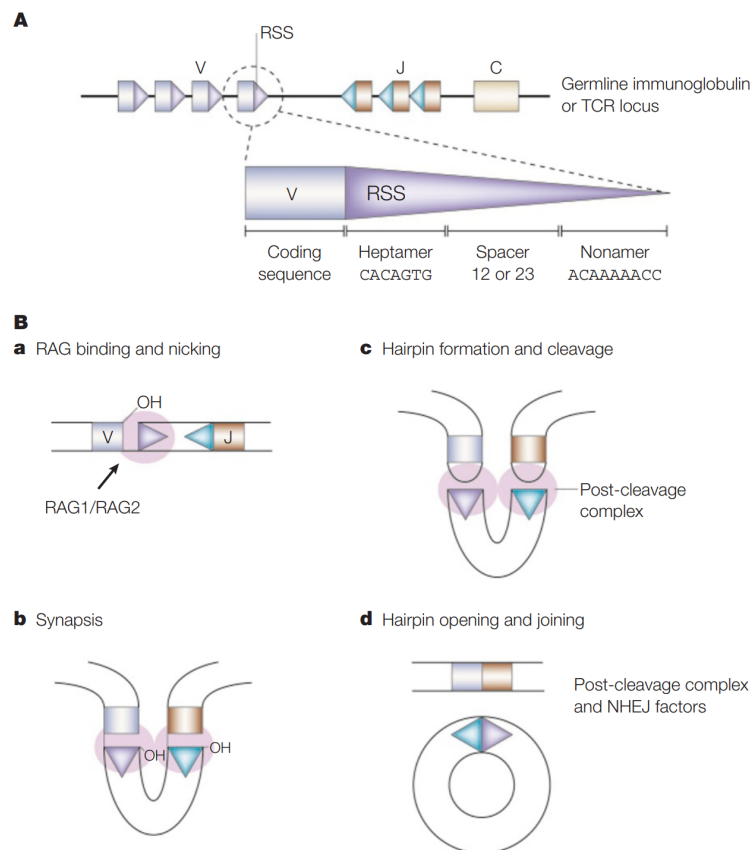


Figure 1 : Etapes de la recombinaison V(D)J. Adapté de Roth, 2003.

A. Représentation d'un locus de chaîne L en configuration germinale et d'une séquence RSS. **B. a,** le complexe RAG1/RAG2 reconnaît une séquence RSS et induit une cassure simple brin entre le segment V et la séquence RSS ; **b,** le complexe RAG/RSS forme une synapse avec une autre région RSS ; **c,** le groupement OH libéré attaque le brin opposé au niveau d'un groupement phosphodiester pour former une cassure double brin, puis deux extrémités codantes scellées en épingle à cheveux et deux extrémités signal franches. Ces extrémités associées à RAG forment le complexe post-clivage, facilitant le recrutement du complexe DNA-PK et des protéines de réparation de l'ADN. **d,** Après ouverture de l'épingle à cheveux par Artemis, des nucléotides sont ajoutés/retirés au niveau des jonctions, ensuite liées par la DNA ligase IV pour former une jonction codante entre les gènes V et J.

Les réarrangements de gènes d'Ig débutent sur le locus de la chaîne H, au stade pro-B (de phénotype CD19+CD34+CD10+IgM-, **Figure 2**). Un segment D est juxtaposé à un segment J, puis un segment V est réarrangé avec ce segment DJ. Après réarrangement, la chaîne H est associée à une pseudo-chaîne L (composée des protéines VpreB et Vλ5) pour former, avec les protéines CD79A et B, le pré-BCR (Kerr et al. 1989). La chaîne L est elle-même réarrangée au stade pré-B (CD19+CD20+CD34-CD10+IgM-) ou un gène J est associé à un gène V sur le locus κ ou λ.

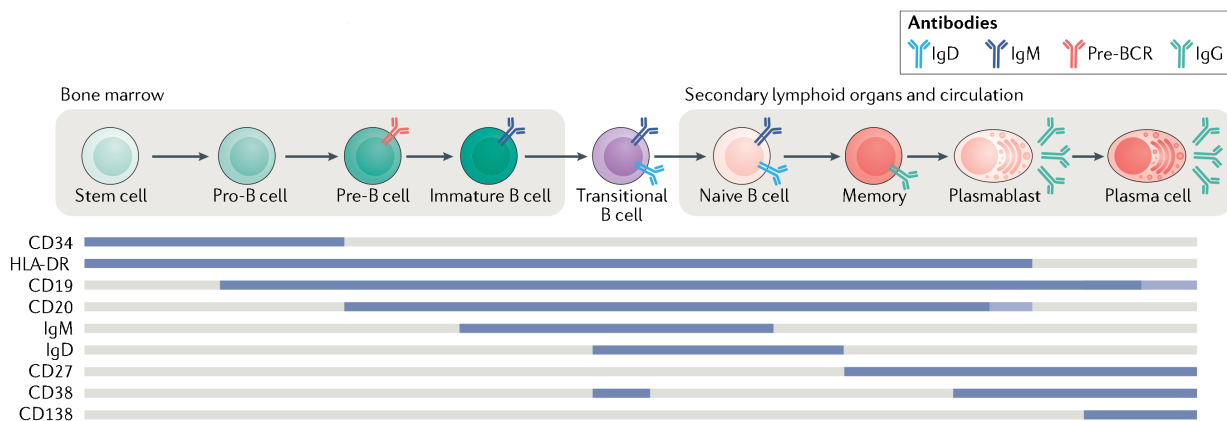


Figure 2 : Phénotype des précurseurs B et des LB immatures dans la moelle osseuse, et des LB de différenciation folliculaire en périphérie (Sabatino, 2019).

Chez l'homme, le locus κ est réarrangé avant le locus λ (Gay et al. 1993). Une fois la chaîne L réarrangée, et après traduction, elle est associée à la chaîne H pour former l'Ig (d'isotype IgM), composée d'un fragment constant Fc et d'une région variable. Celle-ci est constituée de sept séquences peptidiques pour chaque chaîne H et L : quatre FR (*framework region*) et 3 CDR (*complement determining region*) qui constituent le site de liaison à l'antigène ou paratope. Cette Ig est exprimée à la surface au stade B immature pour former, avec CD79A/CD79B et leur domaine cytoplasmique riche en motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) transducteur de signal, un complexe BCR fonctionnel (Nemazee, 2017, **Figure 3**). Plus de 95% des LB immatures expriment une paire unique de chaîne H et L par le phénomène d'exclusion allélique, qui conduit à l'expression d'un seul allèle alors que la cellule B a le potentiel génétique d'exprimer les deux (Pelanda 2014).

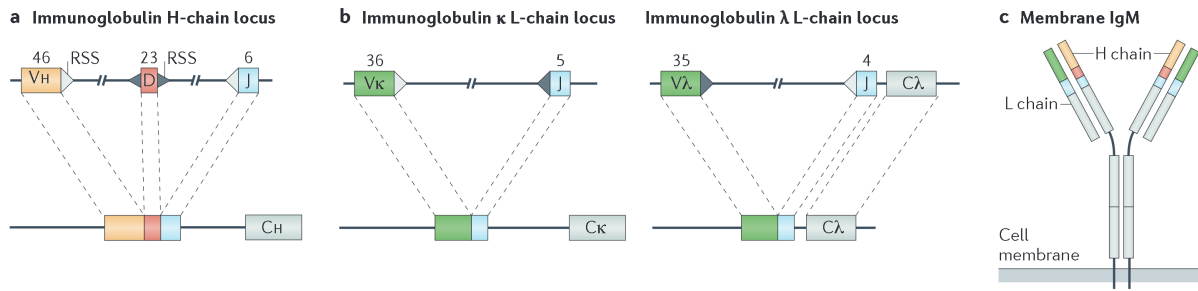


Figure 3 : Recombinaisons sur les locus de chaîne H et L et structure de l'Ig. (Nemazee, 2017).

a. Les processus de recombinaison concernent d'abord les gènes VDJ de la chaîne H au stade proB. **b.** La recombinaison des chaînes L prend place au stade préB. Chez l'homme, la chaîne κ est d'abord réarrangée pour les gènes VJ. Si le BCR est non fonctionnel ou autoréactif, les réarrangements de la chaîne κ reprennent. En cas de nouvel échec, c'est la chaîne λ qui est réarrangée suite à un processus d'exclusion allélique. **c.** A l'issue des réarrangements V(D)J, le BCR exprimé à la surface du LB immature est fonctionnel, et constitué de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes comprenant chacune une région variable et une région constante.

Les diversités combinatoire et jonctionnelle sont des mécanismes utiles pour faire face aux différents pathogènes que l'organisme peut rencontrer. Néanmoins, ces processus stochastiques ont l'inconvénient de générer des anticorps reconnaissant des autoantigènes et ayant le potentiel d'entraîner une auto-immunité. Différents filtres (ou « *checkpoints* ») existent pour réduire le nombre de cellules matures autoréactives ou leur pathogénicité. Le premier de ces checkpoints a lieu au stade B immature dans la moelle osseuse lors d'un processus qui existe dès le développement fœtal chez l'homme : la tolérance centrale (Chen et al. 2020).

2.2 Mécanismes de tolérance centrale

2.2.1 Délétion

Les connaissances sur l'induction de tolérance centrale résultent largement de travaux menés sur des modèles murins transgéniques dans lesquels la majorité ou toutes les cellules B expriment un BCR spécifique d'un antigène donné. Ces modèles offrent la possibilité d'évaluer le développement lymphocytaire B en présence ou en absence d'un antigène donné et en faisant varier sa forme (membranaire ou solubles), et, en conséquence, l'avidité ou l'affinité. Les modèles de souris transgéniques portant le gène de la lysozyme HEL, de sorte que la protéine (HEL) est synthétisée tout au long de la vie en tant qu'autoantigène circulant, est un exemple de ces modèles (Burnett et al. 2019). Ils ont, dans un premier temps, permis de démontrer que l'induction de la tolérance opérait par l'apoptose des cellules autoréactives dans la moelle osseuse (Melamed and Nemazee

1997; S. B. Hartley et al. 1993; C. Chen et al. 1995). Ce mécanisme, nommé délétion clonale, a notamment été mis en évidence dans le modèle double transgénique résultant du croisement entre une souris exprimant un répertoire monoclonal de LB réactifs avec l'antigène HEL (MD4) et une souris exprimant le HEL sous forme membranaire (Suzanne B. Hartley et al. 1991). L'apoptose des LB autoréactifs dépend largement de la protéine pro-apoptotique BIM couplé à l'inhibition de molécules anti-apoptotiques comme BCL-2 (Melamed et al. 1998; Enders et al. 2003). L'expression de *AICDA* codant l'enzyme AID (*activated induced deaminase*), dont nous détaillerons plus loin le rôle dans la maturation d'affinité secondaire des LB, favorise l'apoptose des cellules immatures autoréactives en générant probablement des dommages dans l'ADN (Cantaert et al. 2015). L'ensemble des modèles murins a également permis de préciser que la délétion clonale résulte d'un processus durant plusieurs jours, qu'elle concerne des LB dont l'avidité du BCR est élevée et dont l'antigène est fortement exprimé dans la MO, et que ces LB sont rapidement éliminés par les macrophages et donc difficiles à identifier (Pelanda et al. 2022).

2.2.2 Anergie

Les travaux de C. Goodnow et collaborateurs ont été pionniers dans la mise en évidence de mécanismes alternatifs à la délétion clonale. Dans un des modèles développés par son équipe, la souris MD4 a été croisée avec une souris transgénique (ML5) qui exprime le HEL sous forme soluble. Malgré une affinité du BCR MD4 pour HEL élevée, la nature monovalente du HEL soluble rendait l'avidité anticorps-antigène suffisamment faible pour que la force du signal soit en dessous du seuil induisant la délétion clonale durant le développement des cellules B (C. C. Goodnow et al., 1988). De plus, la construction codant pour le BCR transgénique était insérée en dehors du locus d'Ig, rendant l'édition du récepteur impossible chez ces souris. Ce modèle a permis de confirmer l'existence d'un phénomène d'anergie, résultant d'une interaction faible entre l'antigène et l'anticorps, et aboutissant à la survie de cellules autoréactives au potentiel de prolifération et d'activation réduite. Ce concept d'anergie avait été évoqué en 1980 par Nossal et collaborateurs pour expliquer le fait que des MB spécifiques d'un antigène pouvaient être détectées en périphérie après exposition à de faibles doses d'antigène (Nossal and Pike 1980). Les cellules anergiques sont caractérisées par une demi vie courte, une expression membranaire faible d'IgM et des capacités d'activation réduites après engagement du BCR IgM (Fulcher and Basten 1994).

2.2.3 Edition du récepteur

Un autre mécanisme mis en jeu pour limiter l'autoréactivité des cellules B immatures est l'édition du récepteur, par lequel le processus de réarrangement V-J peut reprendre sur les loci des chaînes Igk ou Igλ des LB autoréactifs. A l'issue de ce réarrangement, catalysé par les gènes *RAG*, la séquence VJ codant la chaîne L autoréactive d'origine est remplacée par un nouveau segment de gène VJ codant une nouvelle chaîne L. Son appariement avec la chaîne H existante forme un nouveau BCR qui est à nouveau testé pour son autoréactivité. Ce phénomène se poursuit jusqu'à ce que le BCR porté par le LB immature devienne non autoréactif ou avec une affinité pour l'autoantigène suffisamment faible.

Les réarrangements mis en œuvre lors de l'édition du récepteur sont directionnels et ne se font pas de façon entièrement aléatoire (Constantinescu and Schlissel 1997; Prak et al. 1994). En effet, ils progressent séquentiellement sur les loci des chaînes κ, des éléments Jκ en amont vers les éléments Jκ en aval. Si le BCR reste toujours autoréactif, une recombinaison s'effectue entre une séquence Kde (kappa deleting element, située en aval du segment constant C kappa) et un gène Vκ ou une séquence RSS en aval du segment Jκ (Bräuninger et al. 2001). Ce processus permet de garantir l'exclusion isotypique, en inactivant le locus κ, et de poursuivre le processus de réarrangement sur le locus λ (Nemazee 2006). Lorsque l'interaction BCR- antigène est forte, l'édition du récepteur est le premier mécanisme mis en jeu et la délétion clonale requise uniquement lors de son inefficacité (Pelanda et al. 2022). L'analyse du répertoire périphérique d'une souris porteuse d'un polymorphisme du gène *IGKC*, permettant d'identifier les LB ayant subi une édition du récepteur *in vivo*, révèle que 30% des LB matures murins ont suivi un tel processus lors de leur développement central (Casellas et al. 2001).

Si l'édition du récepteur a initialement été identifiée chez la souris, elle constitue aussi un mécanisme de tolérance centrale B chez l'homme, comme cela a pu être démontré dans les modèles de souris humanisée. La souris HIS hu-mice (*human immune system humanized mouse model*), au phénotype de déficit immunitaire combiné sévère, exprime un superantigène interagissant avec le fragment constant de l'Igκ humaine (Lang et al. 2016). La greffe de cellules souches humaines hématopoïétiques chez ces souris permet d'analyser la tolérance B humaine puisque toutes les cellules κ⁺ y subissent un processus de sélection négative. Les LB immatures κ⁺ présentent bien des signes d'édition du récepteur, incluant une expression augmentée de *RAG* et une recombinaison secondaire

des gènes de chaîne L, mais aussi un phénotype spécifique dont une baisse de l'expression membranaire de CD19 et de l'IgM (Alves da Costa et al. 2021). L'ensemble de ces éléments supporte l'hypothèse que, lorsqu'un LB immature reconnaît un autoantigène de l'environnement médullaire, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu (**Figure 4**).

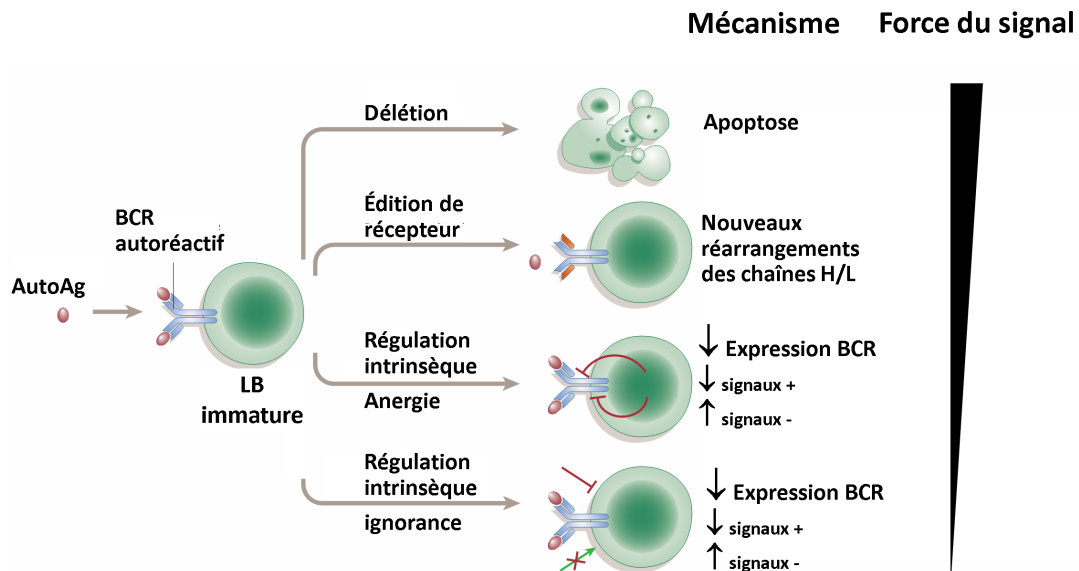


Figure 4. Mécanismes de la tolérance centrale B. Lorsqu'un LB immature reconnaît un autoantigène de l'environnement médullaire, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu selon la force d'interaction et de l'avidité pour l'antigène. Si le signal généré est fort, une quantité importante de BCR va être internalisée et le LB va subir une édition du récepteur voire une délétion clonale si celle-ci est inefficace. En cas de signal faible, la survie du LB sera permise au prix de capacités fonctionnelles réduites lors de l'anergie. Il est également possible que le LB échappe à l'édition de récepteur, à la délétion clonale et à l'anergie, aboutissant à l'ignorance antigénique par une régulation extrinsèque. Ag, antigène.

Le choix d'un de ces mécanismes dépend de la force d'interaction et de l'avidité pour l'antigène, notamment conditionnée par la quantité de BCR exprimés à la surface du B et leur capacité à transduire un signal tonique (Rowland et al. 2010). Si le complexe BCR apparaît donc crucial à ce stade, d'autres signaux, comme ceux générés par récepteurs Toll-like (TLR), peuvent agir en synergie notamment pour augmenter l'expression d'AID (Kuraoka, Meffre, and Kelsoe 2018). Ainsi, le défaut d'un gène impliqué dans le signaling des TLR endosomaux empêche l'élimination des LB immatures autoréactifs, comme le révèle l'inactivation de *MYD88* chez la souris (Kuraoka et al. 2017) ou l'analyse des patients déficients pour *MYD88* ou *IRAK4* (Isnardi et al. 2008). L'analyse des cellules immatures chez des souris humanisées déficientes pour *MYD88*, TLR9 ou TLR7, mise en écho avec celles de patients déficients pour TLR7 et de patients sclérodermiques avec défaut fonctionnel de TLR9, supporte le rôle crucial de TLR9, mais pas de TLR7, dans l'induction de la tolérance centrale (Çakan et al. 2023). Enfin, si le LB immature autoréactif échappe à la délétion clonale, à l'édition du récepteur ou à l'anergie, des mécanismes de régulation extrinsèque, tels qu'une limitation des signaux de co-stimulation ou des médiateurs pro-inflammatoires que nous détaillerons dans les prochains chapitres, peuvent nuancer son potentiel pathogénique (Goodnow et al. 2005).

3. Tolérance périphérique : compartiment naïf

Les LB quittant la moelle osseuse expriment un BCR fonctionnel et théoriquement non autoréactif. Le processus de tolérance centrale est particulièrement efficace : chez l'homme, la fréquence de LB autoréactifs passe de 75% au stade pré/proB à 40% au stade immature (Wardemann et al. 2003). Néanmoins, une fraction non négligeable de cellules B autoréactives passent le filtre central et atteignent la périphérie, c'est-à-dire le sang ou les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Cela implique que des mécanismes de tolérance y soient également mis en place afin d'éliminer les LB potentiellement pathogènes.

3.1. Le premier checkpoint

Les mécanismes de tolérance périphérique sont mis en jeu dès le stade de LB transitionnel (ou *new emigrant*, CD19+CD27-CD10+IgM+CD38^{high}CD24^{high}). Ces cellules, qui font le lien entre la différenciation dans la MO et en périphérie, représentent environ 5% des LB circulants (Anolik 2013) (**Figure 2**). Elles poursuivent leur maturation en périphérie jusqu'aux cellules B matures naïves dont elles sont les précurseurs (Carsetti, Rosado, and Wardmann 2004). Chez l'homme et la souris, trois populations de LB transitionnels sont définies, différenciées en cytométrie en flux par l'expression membranaire de CD21, IgM et IgD (**Figure 5**), mais aussi pas des caractéristiques fonctionnelles différentes (Simon et al. 2016; Palanichamy et al. 2009; Blair et al. 2010). L'hypothèse selon laquelle la population B transitionnelle représente un checkpoint de sélection négative repose largement sur les travaux de Wardemann et al. (Wardemann et al. 2003). Par une technique associant successivement tri des LB en cellule unique (*single cell*), séquençage de leurs régions variables de chaîne H et L, et clonage dans des lignées cellulaires de mammifères, l'anticorps produit par chacune des cellules issues de sous populations B données a pu être testé pour son profil de réactivité. Il en a résulté que la proportion de cellules réactives contre des autoantigènes nucléaires ou cytoplasmiques passait de 40% au stade transitionnel à 20% environ au stade mature naïf.

Ce processus de sélection négative semble particulièrement concerner les LB transitionnels T1 (IgM^{high} IgD^{low} CD21-), pour lesquelles une forte stimulation du BCR entraîne l'apoptose (Sims et al. 2005). Les cellules T2, (IgM^{high} IgD^{high} CD21+) plus matures, ont pour leur part acquis une résistance à l'apoptose induite par l'antigène. Quant aux cellules T3, elles représentent probablement une population anergique avec une faible réponse à la stimulation du BCR, et aux capacités prolifératives réduites. Leur caractère anergique est notamment suggéré par une expression faible d'IgM à leur surface (Duty et al. 2009; Palanichamy et al. 2009). Si ces cellules autoréactives anergiques ou ignorantes ne rencontrent pas leur autoantigène, ou si l'avidité avec leur BCR génère un signal en dessous d'un certain seuil, elles vont survivre et pouvoir, comme les autres LB transitionnels, se différencier en cellules B matures naïves (CD19+CD27-CD10-IgM+CD38+CD24+).

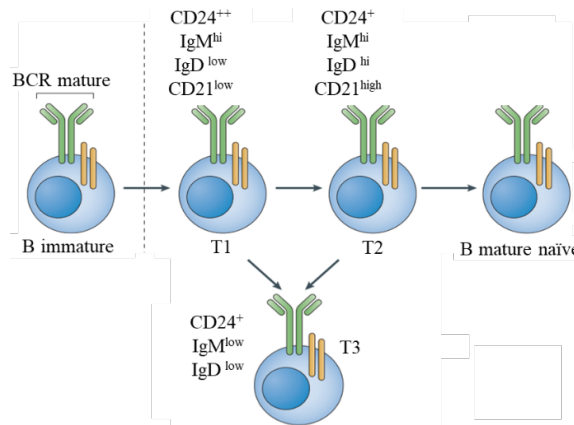


Figure 5 : Sous-populations B transitionnelles chez l'homme (adapté de Cambier et al., 2007).

3.2. Mécanismes de tolérance au stade naïf

La sélection négative ou positive des cellules B transitionnelles et naïves est conditionnée par une régulation fine des signaux B intrinsèques :

Le signal BCR. Les conséquences cellulaires de la liaison à l'antigène dépendent de la capacité du complexe BCR à transduire un signal en deçà ou au-delà du seuil d'activation. Le complexe est composé de l'Ig de surface, associée à CD79A et B dont la phosphorylation des motifs ITAM intracellulaires par les kinases Src (BLK, Lyn, Fyn...), ce qui aboutit au recrutement de la tyrosine kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*), et du CD19 qui agit comme un corécepteur et active la PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*). Ces effecteurs sont à l'origine de signaux, distincts mais convergents, aboutissant à l'activation des voies MAP kinases, AKT/mTOR, et à la translocation nucléaire de facteurs de transcription (NFκB, *nuclear factor-kappa B* ; NFAT, *nuclear factor of activated T cell*...). Ils sont résumés dans la **Figure 6**. D'autres co-récepteurs associés au BCR exercent des fonctions de co-activation (CD21, CD81) ou inhibitrices (CD72, Siglec-10 pour *sialic acid-binding Ig-like lectin*, CD22, FcγRIIB, LILRB) régulant également l'activation du LB (Tsubata 2018; Lobo et al. 2009; Tedder, Inaoki, and Sato 1997).

Dans la population lymphocytaire B transitionnelle et naïve, l'avidité et, de fait, la force du signal transmis par le BCR dépendent du niveau d'expression de l'Ig de surface mais aussi de son isotype. Le LB naïf coexprime deux types de BCR : l'IgM et l'IgD, résultant d'un épissage alternatif par lequel deux segments C sont délétés sur la chaîne H. Dans la population B anergique, nous avons vu que l'expression de surface de l'IgM est réprimée, mais celle de l'IgD est similaire aux autres cellules naïves (Duty et al. 2009). Le modèle

murin Nur77-eGFP développé par Zikherman et collaborateurs, a permis de mieux préciser le rôle de l'Ig de surface dans la capacité de réponse des LB à leur autoantigène (Zikherman et al. 2012). Dans ce modèle, l'expression de la GFP est sous la dépendance du gène Nur77, gène rapidement surexprimé lors de l'engagement du BCR, de sorte que la fluorescence de la GFP soit un indicateur de la force du signal généré par l'interaction antigène-récepteur. Les auteurs ont montré que l'expression de la GFP était inversement corrélée à l'expression de l'IgM de surface, mais pas à l'IgD. Les LB avec une forte expression de GFP étaient présumés autoréactifs, ce qui était confirmé par l'importante proportion de réactivité antinucléaire. Dans ces cellules, la stimulation de l'IgM aboutissait à une diminution du flux calcique intra-cellulaire par rapport aux cellules GFP^{low}, ce qui n'était pas le cas de la stimulation du BCR IgD. Ces données confortent l'hypothèse qu'un pool de cellules autoréactives anergisées survit en périphérie, que l'expression membranaire de l'IgM permet d'en atténuer la réponse à l'antigène, mais que ces cellules restent capables de s'activer dans certaines conditions (notamment via l'IgD) et pourraient constituer un « réservoir » élargissant le répertoire d'anticorps.

L'ensemble des kinases impliquées dans la transduction du signal BCR sont également indispensables au maintien de la tolérance périphérique. La déficience en Lyn augmente le seuil d'activation des LB autoréactifs ainsi préservés de la délétion clonale (Lamagna et al. 2014). Un autre exemple est PI3K. L'activation constitutive de sa sous unité P110 α abolit complètement la délétion clonale et l'édiction du récepteur au niveau central, mais permet aussi aux cellules autoréactives de court circuiter le premier filtre périphérique (Greaves et al. 2019). De plus, contrairement aux autres cellules B naïves, les cellules B anergiques du modèle MD4xML5 n'accumulent pas de PtdInsP3, produit de la PI3K, après stimulation de leur BCR (Browne et al. 2009; Getahun 2022). Au contraire, cette stimulation aboutit à une surexpression de la protéine PTEN (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase), régulatrice négative de PI3K. La délétion de PTEN dans les cellules B MD4xML5 restaure une réponse BCR normale, ce qui souligne l'importance de la régulation négative de PI3K dans le maintien de l'anergie. Enfin, dans un modèle inducible, la délétion de SHP-1 (SH2-containing tyrosine phosphatase-1), phosphatase des motifs ITAMs à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur le signal BCR, réactive les cellules anergiques (Getahun et al. 2016). Ces données supportent le rôle critique du signal BCR comme de ses rétrocontrôles dans le maintien de l'anergie.

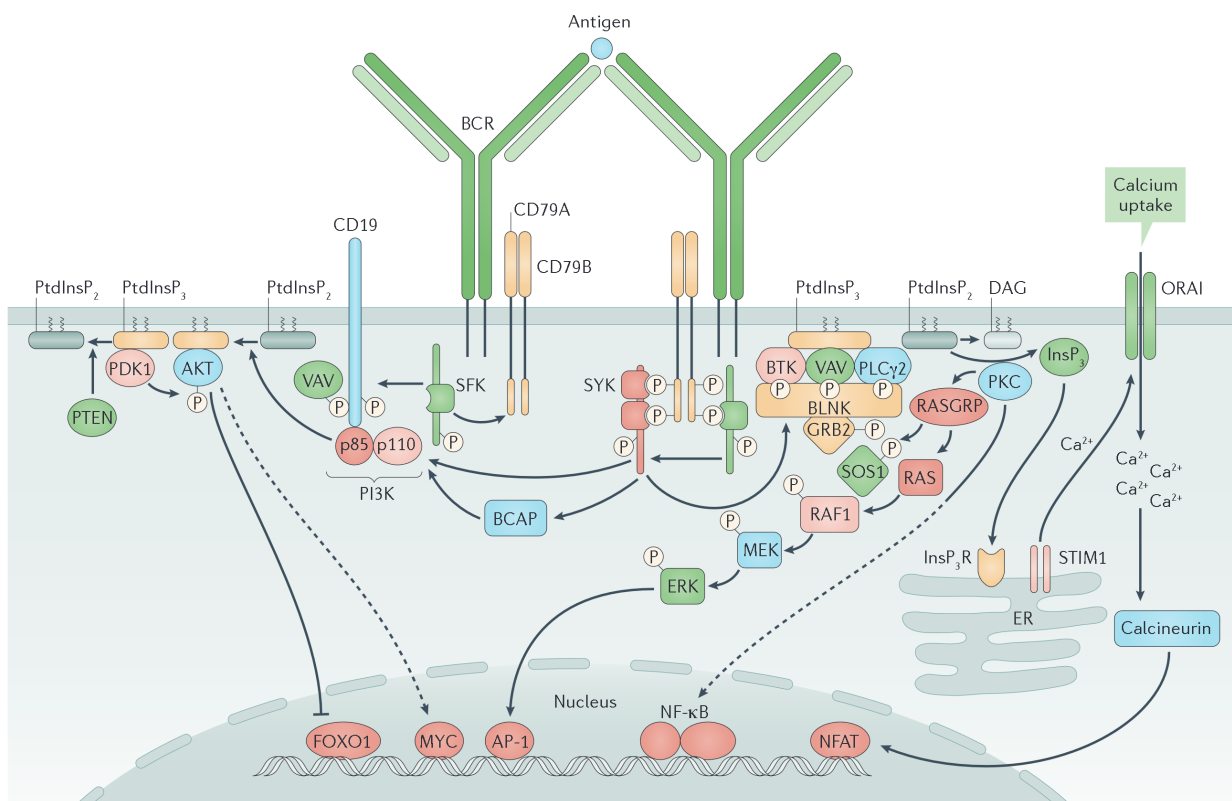


Figure 6 : Signal du récepteur du LB (BCR). (Nemazee et al., 2017).

La liaison du BCR à l'antigène favorise la phosphorylation des la tyrosine de CD79A et CD79B par les kinases de la famille Src (SFK, *Src family kinase*) sur leurs motifs ITAM. Les ITAM phosphorylés recrutent et activent Syk (*spleen tyrosine kinase*), qui initie plusieurs voies de signalisation :

1) CD19 fonctionne comme un co-récepteur du BCR, qui, associé à Lyn, recrute la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (**gauche**). L'activation de PI3K, médiée par cette voie ou par la protéine adaptatrice BCAP (B cell adaptor for PI3K), entraîne la phosphorylation de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdInsP₂), en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdInsP₃), le recrutement de PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), BTK (*Bruton Tyrosine kinase*) puis AKT (ou PKB, protéine kinase B). AKT réprime l'activité de la protéine FOXO1 (*forkhead box O1*) et son export nucléaire, et active la transcription de MYC, ce qui favorise la survie cellulaire.

2) Dans une voie distincte (au centre), la protéine BLNK (*B-cell linker*) agit en tant que substrat pour la phosphorylation médiée par Syk et les kinases Src, favorisant le recrutement de la PLCγ2 (*phospholipase Cγ2*), de BTK, de la protéine GRB2 (*Growth-factor receptor bound protein 2*). La PLCγ2 activée hydrolyse le PtdInsP₂ en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-trisphosphate (InsP₃), ce qui contribue la mobilisation du Ca²⁺ par le récepteur d'InsP₃ (InsP₃R) et l'ouverture du canal Ca²⁺ membranaire ORAI. La mobilisation du calcium favorise l'activation de la calcineurine et la localisation nucléaire de NFAT.

3) DAG (à droite) active également la PKC (*protéine kinase C*), impliquant la voie des *MAPK kinases* notamment par l'activation successive des protéines RASGRP (*RAS guanyl nucleotide-releasing protein*), de la GTPase RAS, de MEK (*MAPK/ERK kinase*) et de ERK (*extracellular signal-regulated kinases*). Après phosphorylation, ERK entre dans le noyau et entraîne l'hétérodimérisation de Fos et Jun en AP-1 permettant son activité transcriptionnelle.

4) PKC phosphoryle la protéine du complexe de signalisation NF-κB CARMA1 (composé de CARMA1, BCL10 et MALT1), entraînant le clivage de A20, une protéine inhibitrice de la signalisation NF-κB, et la phosphorylation par TAK1 (*Transforming growth factor-β (TGF-β)-activated kinase 1*) du trimère IKK (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*, composé de NEMO, NF-κB Essential Modulator, IKKα et IKKβ). IKK phosphoryle ensuite IκB (un inhibiteur de NF-κB lié à celui-ci), induisant sa dégradation protéolytique, libérant NF-κB dans le cytosol et lui permettant sa translocation nucléaire.

Les TLR. Les récepteurs TLR7 et TLR9, dépendants de MYD88 et dont nous avons déjà évoqué le rôle lors de la tolérance centrale, sont exprimés dans le compartiment endosomal des LB. TLR9 est un récepteur spécifique à l'ADN reconnaissant des îlots CpG (Dinucléotide Cytosine-phosphate-Guanine) déméthylés. La transduction du signal TLR9 est dépendante de CD19. En effet, la stimulation via TLR9 entraîne la phosphorylation de CD19, puis le recrutement de PI3K, BTK et AKT, rejoignant une de voies de signalisation du BCR (**Figure 7**). De plus, des cellules B naïves purifiées de patients avec une mutation homo ou hétérozygote de *CD19*, qui entraîne une diminution d'expression CD19 à leur surface, présentent un défaut de réponse spécifique à la stimulation TLR9 (Morbach et al. 2016). De façon physiologique, un engagement simultané du BCR et de TLR9 dans les cellules naïves engendre initialement un signal de prolifération, suivi d'un arrêt de cycle cellulaire et d'une orientation de la cellule vers l'apoptose (Sindhava et al. 2018). A l'opposé du rôle tolérogène de TLR9, la surexpression chez la souris de TLR7, récepteur spécifique à l'ARN (Acide RiboNucléique), favorise l'expansion de cellules transitionnelles et la survie de cellules matures autoréactives (Giltiay et al. 2013).

Figure 7 : Représentation signal TLR7/9 dépendant de CD19 dans le LB. (Morbach et al., 2016).

Le comportement d'un LB après sa rencontre avec l'antigène peut également être modulé par des facteurs extrinsèques, dont les **lymphocytes T (LT)**. Une cellule B donnée pourra ne pas s'activer en l'absence d'activation par un LT auxiliaire (si celle-ci est éliminée lors des processus de tolérance T par exemple) ou sous l'effet de **cellules immunomodulatrices**, comme les LT régulateurs (Treg) (H. Huang et al. 2006; Getahun 2022). Le rôle des Treg dans la tolérance B est illustré chez les patients déficients pour AIRE (*Autoimmune regulator*). Le défaut de sélection des Tregs normalement médié par AIRE aboutit à un répertoire TCR régulateur incomplet et à une accumulation des cellules B naïves autoréactives (Sng et al. 2019). En ce sens, les patients déficients pour *FOXP3* (*forkhead box protein 3*), codant un facteur de transcription critique pour la fonction des Tregs, présentent également une proportion accrue de LB autoréactifs en périphérie alors que la tolérance centrale n'est pas impactée (Kinnunen et al. 2013). Il faut noter qu'une population singulière de LB, au phénotype proche des cellules transitionnelles, est capable d'inhiber l'aide (ou *help*) des LT auxiliaires par la production de cytokines immunosuppressives dont l'interleukine 10 (IL-10) (Blair et al. 2010).

Le système BAFF-APRIL représente un autre de ces facteurs cruciaux dans la régulation du signal lymphocytaire B naïf. La cytokine BAFF (*B cell activating factor*), majoritairement exprimée par les cellules myéloïdes, appartient à la famille des récepteurs du TNF (*Tumor necrosis factor*) et peut être active sous forme membranaire ou sécrétée. Elle a trois récepteurs exprimés par les LB : BAFF-R, TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), BCMA (*B-cell maturation antigen*) (Jackson and Davidson 2019). BAFF peut agir sous forme trimérique ou former de plus gros multimères et ainsi se lier sélectivement à BAFF-R ou TACI (Vigolo et al. 2018). La cytokine APRIL, elle, est produite par les cellules myéloïdes ou épithéliales et se lie à BCMA et TACI (**Figure 8**). Les LB expriment BAFF-R à partir du stade transitionnel, en particulier les cellules T2 pour lesquelles BAFF participe largement à leur résistance à l'apoptose induite par l'antigène en induisant l'expression de molécules anti-apoptotiques (Smulski et al. 2018; Petro et al. 2002; Thorn et al. 2010). Le signal de survie induit par BAFF-R passe par la voie non-canonique de NFκB et l'activation de la PI3K (Stadanlick et al. 2008; Henley, Kovesdi, and Turner 2008). Une surexpression de BAFF, dans le modèle MD4xML5, permet une survie des cellules B autoréactives (Thien et al. 2004; Cancro 2004) (Cancro 2004). Ainsi, BAFF agit comme un rhéostat pour la sélection des LB naïfs notamment au stade transitionnel.

TACI est physiologiquement exprimé à partir du stade mature naïf où il semble exercer un rôle de régulateur négatif de l'activation B. Il joue aussi un rôle plus tardif dans la maturation B en favorisant la commutation de classe et la survie des plasmocytes (PC), tout comme BCMA (Tsuji et al. 2011; Coquery and Erickson 2012).

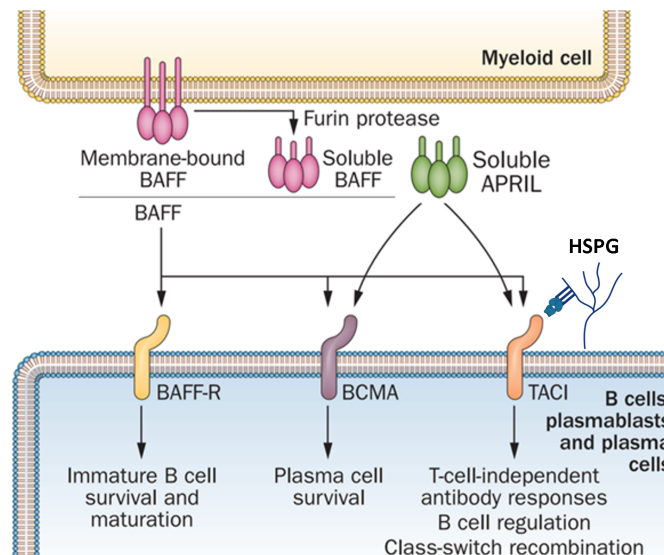


Figure 8 : BAFF, APRIL et leurs récepteurs. (adapté de Hengeveld et al., 2015 et macket et al., 2002)

APRIL et BAFF, sous leur forme soluble, peuvent activer différents récepteurs protéiques transmembranaires. BAFF-R est un récepteur sélectif de BAFF, important pour l'homéostasie lymphocytaire B précoce. BCMA, dont l'expression est restreinte aux cellules sécrétrices d'anticorps et leur confère un signal de survie, lie APRIL et BAFF. TACI, qui reconnaît APRIL mais aussi BAFF sous une forme multimérique, est impliquée dans la différenciation T dépendante et indépendante, et la commutation de classe. L'HSPG (heparan sulfate proteoglycan) facilite l'interaction entre APRIL et TACI.

4. Tolérance périphérique : compartiment post antigénique

4.1 Différenciation du CG et tolérance

Après la rencontre avec l'antigène, les LB naïfs vont subir une maturation d'affinité, et se différencier en cellules mémoires, classiquement identifiées par le marqueur CD27, commutées (CD19+CD27+IgD-IgM-) ou non (CD19+CD27+IgD+ et/ou IgM-), ou en cellules productrices d'anticorps (ASC pour *antibody secreting cells* = plasmablastes puis PC). Deux voies de différenciation des cellules mémoires et des ASC sont décrites : une dépendante du centre germinatif (CG), une indépendante (**Figure 9**).

Stade pré-CG. Le choix de cette orientation dépend de l'interaction du LB avec un LT à l'interface entre le follicule B et la zone T (ou para-cortex) dans les OLS : c'est le stade pré-CG. Les lymphocytes T folliculaires (TFH, ci-après nommés pré-TFH avant l'engagement du LB dans une voie ou une autre), un sous-type particulier de LT CD4+ déterminé par le facteur de transcription BCL-6 (*B-cell lymphoma 6*) et exprimant CXCR5 (*chemokine receptor type 5*), ont un rôle crucial à cette étape. Ils sont nécessaires à la formation et au maintien du CG, notamment par la sécrétion de l'IL-21 (interleukine 21) (Crotty 2019). Le LB récemment activé par l'antigène va notamment exprimer les récepteurs de chemokine CCR7 (*C-C Motif Chemokine Receptor 7*) et CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor type 5*), permettant sa migration et son maintien dans cette zone d'interface T-B. Il va former avec une cellule pré-TFH une synapse immunologique incluant la présentation de l'antigène apprêté et des signaux d'activation secondaires impliquant notamment le couple ICOS-ICOSL (*inducing col-stimulator*) (D. Liu et al. 2015). L'affinité du BCR pour l'antigène paraît déterminant pour déterminer le type de signal *helper* fourni par les pré-TFH, en conditionnant notamment la présentation antigénique aux pré-TFH (Taylor et al. 2015; Inoue and Kurosaki 2023). Une forte affinité favoriserait une différenciation plasmablastique, une plus faible orienterait vers le compartiment mémoire, une intermédiaire vers le CG. Une étude récente, reposant sur le suivi de trajectoire en *single cell* de LB naïfs après transfert adoptif d'un BCR d'affinité fixe, suggère qu'une exposition prolongée à l'antigène résulte en une transformation plasmablastique immédiate, alors qu'une exposition plus courte aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire et une différenciation mémoire, au sein du CG ou non (Glaros et al. 2021). Enfin, l'engagement de TLR9 par des PAMPS (*Pathogen associated molecular patterns*), surajouté à celui du BCR, favoriserait la voie extra-folliculaire en limitant la présentation antigénique aux pré-TFH (Akkaya et al. 2018). Sécrétées selon le type de pathogène rencontré, des cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-6 vont respectivement favoriser ou réprimer la différenciation TFH et ainsi orienter vers la voie CG ou non (Elsner and Shlomchik 2019; 2020). Dans l'ensemble, ces éléments identifient au moins trois déterminants du destin du LB lors de la phase pré-CG : l'affinité pour l'antigène, la durée de l'interaction avec l'antigène, et les signaux du microenvironnement.

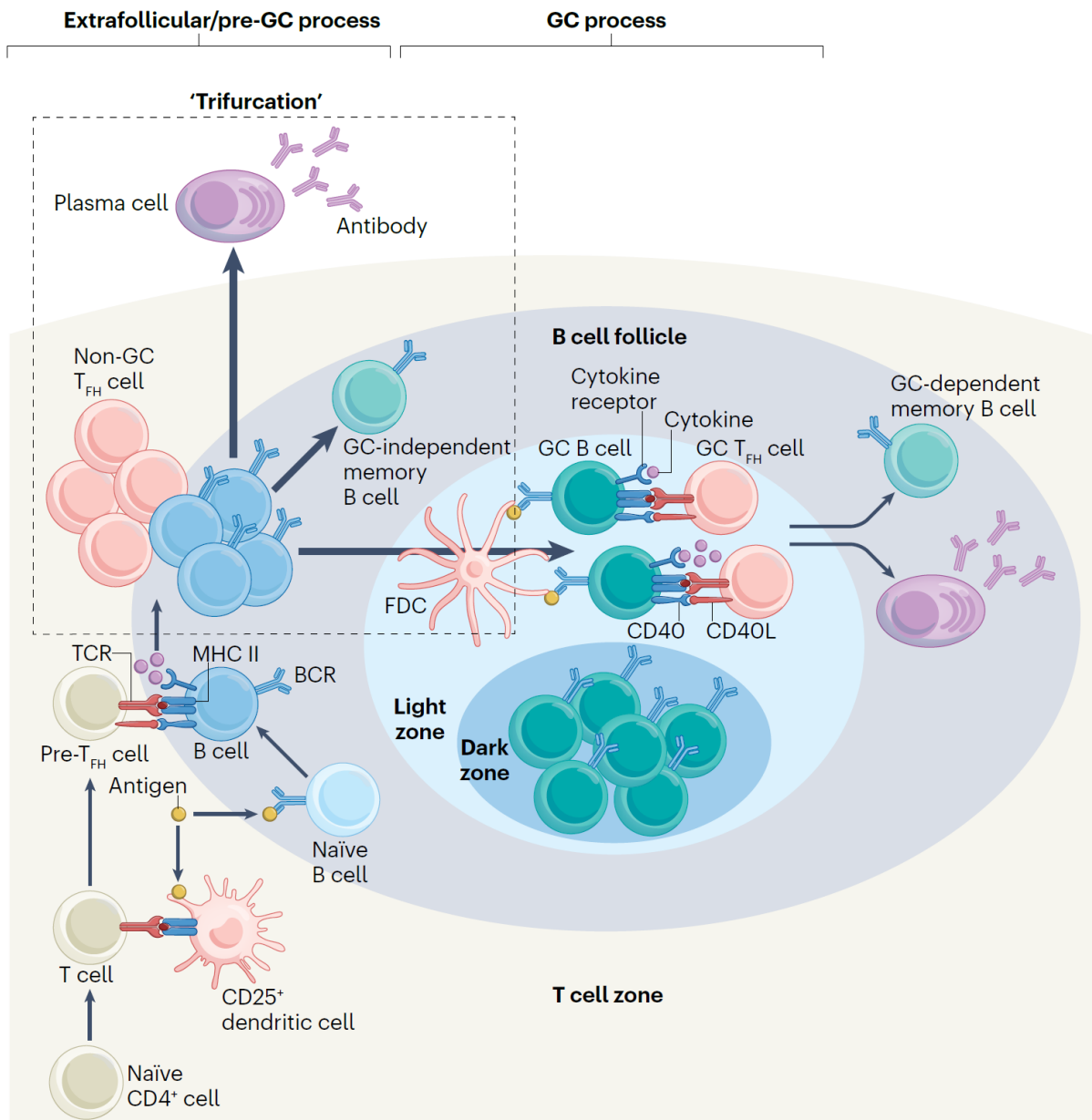


Figure 9 : Orientation des LB dans le compartiment post antigénique (adapté de Inoue et al., 2023).

Le LB engagé par l'antigène modifie son phénotype (expression de CXCR5, EB12 et de CCR7) et migre dans la zone T-B, où il est maintenu par la répression de S1P1R (*Sphingosine-1-phosphate receptor 1*) CD69 dépendante. Il interagit avec un lymphocyte pré-TFH (à gauche), activé par les cellules dendritiques conventionnelles CD25⁺, qui va l'orienter vers un processus de maturation d'affinité secondaire indépendant ou dépendant du CG. Les deux voies permettent de générer des LB mémoires et des ASC (plasmablastes puis PC, à droite).

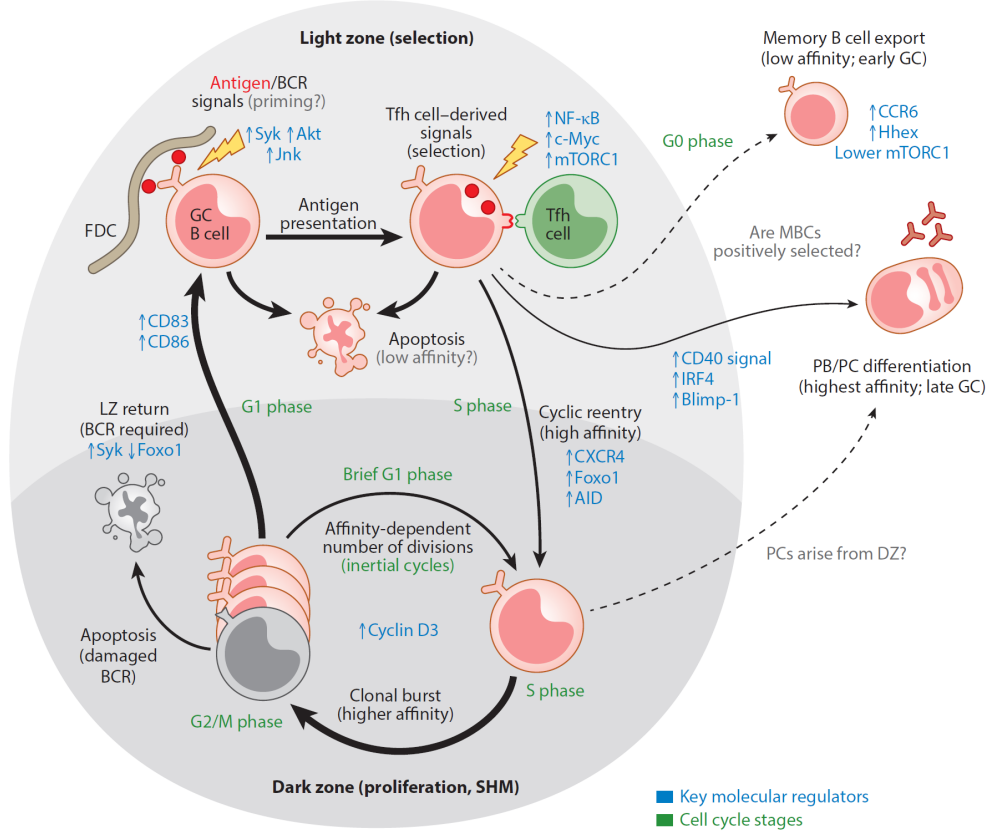
Différenciation folliculaire. Après l'interaction avec les pré-TFH, seule une petite proportion de LB activés est sélectionnée pour entrer dans le CG. La perte d'expression de la molécule EBI2 (*Epstein-Barr virus-induced molecule 2*) est nécessaire à la migration vers le CG. Sa délétion chez la souris aboutit à l'absence de réponse anticorps extra-folliculaire et un excès de cellules B du CG (Pereira et al. 2009). Quatre à sept jours après la rencontre avec l'antigène, les LB pré-CG en prolifération se polarisent en deux zones. La zone sombre (*dark zone*), voisine de la zone T, est composée de LB en prolifération et assujettis aux mutations hypersomatiques (SHM). Ce processus, par lequel des mutations ponctuelles vont être insérées dans les régions variables des Ig, a pour objectif d'en améliorer l'affinité et la spécificité pour l'antigène, notamment lorsque ces mutations ont lieu dans les région hypervariables (CDR). Il implique initialement une déamination des cytosines en uracile médiée par l'enzyme AID puis de mécanismes de réparation imparfaits (*Base excision repair et mismatch repair*). Les cellules B mutées migrent ensuite vers la zone claire (*light zone*), où l'affinité du BCR pour leur antigène lié aux cellules dendritiques folliculaires (FDC) est testé et où les cellules exprimant des Ig les plus affines auront un avantage sélectif. Les LB sélectionnés interagiront ensuite avec les TFH présents dans la zone claire, en leur présentant l'antigène proportionnellement à leur affinité (S. T. Chen et al. 2023). Le signal *help* fourni par les TFH, notamment via l'axe de co-signalisation CD40-CD40L, donne accès à des niveaux plus élevés de BAFF, induit l'expression de c-Myc et, en conséquence, la reprise des cycles prolifératifs. (Finkin et al. 2019; Luo, Weisel, and Shlomchik 2018; D. Liu et al. 2015). Sous l'influence du complexe mTORC1 également activé par les TFH, les LB regagnent la zone sombre où le facteur de transcription AP4 (*activating enhancer binding protein 4*) induit par c-Myc favorise le maintien de la prolifération (Chou et al. 2016). De fait, la progression du LB dans le CG n'est pas linéaire et l'enchaînement prolifération/SHM/sélection positive nécessite un mouvement constant entre zones claire et sombre dans un processus dynamique nommé réentrée cyclique (Victoria and Nussenzweig 2022) (**Figure 10**). De plus, des cellules naïves sont continuellement recrutées tout au long du processus CG, ce qui permet d'améliorer la diversité de réponse à un antigène donné (Hägglöf et al. 2023).

Bien qu'il ait été montré récemment chez l'homme et la souris qu'elle pouvait débiter dès le stade pré-CG (Roco et al., 2019; King et al., 2021), c'est également dans le CG que s'effectue la commutation de classe (ou switch isotypique) vers un isotype IgA, G ou E dans

le but d'optimiser les fonctions effectrices de l'anticorps face à un spectre de pathogène donné. AID en est le principal acteur en induisant des cassures doubles brins d'ADN dans des régions pentamériques répétées dites « S », qui seront suivies d'une recombinaison de la région variable avec une région constante α (isotype IgA), γ (IgG), ou ϵ (IgE). Le choix de l'isotype dépend de l'environnement cytokinique. En effet, les TFH peuvent modifier leur phénotype en TFH1, TFH2 ou TFH17 (identifiés par l'expression différentielle de CXCR3 et CCR6), produisant respectivement les cytokines et favorisant les commutations de LB suivants : interféron gamma (IFN γ)/IL-21 et IgG2 pour TFH1 ; IL-4/21 et IgG1/IgE pour TFH2 ; IL17/21 et IgA pour TFH17 (Olatunde et al. 2021).

Les mécanismes régulant le destin du LB après le passage dans le CG sont multiples. Ils reposent notamment sur le degré d'affinité du LB pour son antigène, conditionnant là encore le signal de soutien apporté par les TFH, de l'équilibre des cytokines IL-4/IL-21 sécrétées par les TFH et du moment de la réponse dans les CG (précoce ou retardée) (Weisel et al. 2016; Cyster and Allen 2019). La différenciation en LB mémoires serait favorisée par un signal TFH faible, entraînant une surexpression de BACH2 réprimant de c-Myc et mTORC1, une répression de BCL-6 et une expression augmentée de la molécule anti-apoptotique BCL-2 (Inoue and Kurosaki 2023; Victora et al. 2010). La différenciation en ASC, concernerait des LB avec maturation prolongée dans le CG, dont la forte affinité pour l'antigène faciliterait l'expression du facteur de transcription plasmablastique Blimp-1 (Weisel et al. 2016; Tunyaplin et al. 2004). En outre, par opposition aux cellules mémoires, un fort co-engagement du BCR et de CD40 via les TFH pourrait réprimer FOXO1 via PI3K, activant ainsi la voie NF κ B puis IRF-4, favorisant l'orientation plasmablastique (Lin et al. 2015; Ise and Kurosaki 2019). Les différents facteurs de transcription et protéines de surface impliqués dans la régulation et le cheminement des LB au sein du CG sont détaillés dans la **Figure 10**.

A.



B.

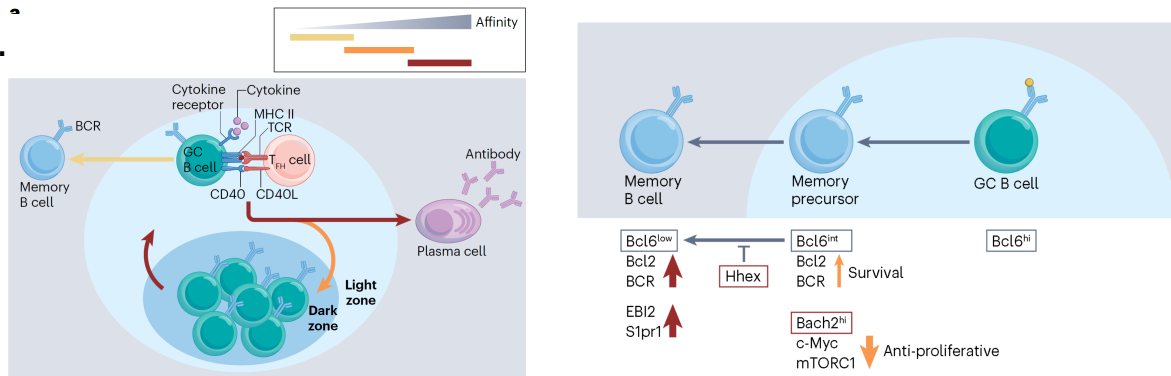


Figure 10 : Dynamique du CG et sélection des LB (d'après Inoue et al. 2023; Victora et al., 2022).

A. Représentation des principales étapes de la sélection des LB du CG. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la fréquence de chaque évènement. Les flèches en pointillés représentent des transitions supposées. Les régulateurs moléculaires clés sont représentés en bleu, et les étapes du cycle cellulaire associées à chaque transition en vert. **B. A gauche :** La sélection de LB mémoires ou de plasmablastes est principalement déterminée par l'affinité pour l'antigène des BCR des LB du CG. Les LB avec BCR de faible affinité sont plus susceptibles de devenir des cellules B mémoires, tandis que ceux avec une affinité élevée réintègrent la zone sombre ou quittent le CG en tant que plasmablaste. **A droite :** Exemple de transition d'un LB du CG vers un LB mémoire. Les précurseurs des cellules B mémoires se caractérisent par une expression élevée de BACH2, qui peut exercer un effet anti-prolifératif en limitant l'activation de c-Myc et de mTORC1. Ces cellules commencent également à réguler à la baisse BCL-6, ce qui permet l'induction de l'expression de BCL-2 et de BCR à la surface cellulaire, fournissant ensemble des signaux de survie, ainsi que l'induction d'EBI2 et de S1PR1, qui régulent la migration des cellules B.

Tolérance périphérique et CG. Deux mécanismes de tolérance tardifs du CG sont classiquement décrits. D'une part, les cellules ayant acquis un caractère autoréactif par les SHM sont éliminées par apoptose (Pulendran et al. 1995; Shokat et al. 1995; Victora and Nussenzweig 2022). Ce mécanisme ne touche que les LB dont l'antigène est exprimé de façon abondante dans les CG (Chan et al. 2012). Il est dépendant de FAS : dans le modèle HEL, l'inactivation de FAS aboutit à l'accumulation de LB non spécifiques de l'antigène et à leur différenciation en ASC (Butt et al. 2015). L'autre mécanisme repose sur le concept de rédemption clonale. Certains LB naïfs autoréactifs, dont les LB anergiques, peuvent entrer dans le CG où ils vont subir des SHM. Les mutations induites peuvent diminuer le caractère autoréactif en augmentant la spécificité pour l'antigène exogène : c'est la rédemption clonale (Burnett et al. 2019; Sabouri et al. 2014). A titre d'exemple, Des LB sécrétant des anticorps neutralisants du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou du virus influenza isolés chez des patients semblent avoir éprouvé une rédemption, puisque ces anticorps sont mutés et que leurs précurseurs en condition germinale sont poly- ou autoréactifs (Andrews et al. 2015; Bajic et al. 2019).

Certains réarrangements exposent tout particulièrement les Ig à la rédemption clonale. 5% à 10% des LB naïfs présents dans le répertoire du sujet sain expriment à leur surface un BCR utilisant le gène *IGHV4-34* de la chaîne H (Pugh-Bernard et al. 2001). Ce segment V confère une activité potentiellement pathogène à l'anticorps qui reconnaît des glycanes comprenant l'antigène sanguin I/i sur la membrane des érythrocytes ou des LB (Bhat et al. 2015). Cette autoréactivité se produit indépendamment de la chaîne L et dépend d'une région hydrophobe dans la FR1 (framework region 1) de la chaîne H, nommée patch hydrophobe et reconnue par l'anticorps anti-idiotype 9G4. Les cellules *IGHV4-34+* reconnues par l'anti-idiotype 9G4 sont nettement sous-représentées dans les CG et ne représentent que 3% des cellules B mémoires switchées du sujet sain (Y.-C. Wu et al. 2010; Reed et al. 2016). La moitié d'entre elles ont des SHM dans l'un des cinq résidus du patch hydrophobe, connues pour diminuer la spécificité I/i. Chez des sujets sains immunisés par le virus de la vaccine ou des alloantigènes RhD (rhésus D), l'autoréactivité des anticorps *IGHV4-34+* mutés dans cette région est abolie mais la spécificité avec RhD ou la vaccine est préservée. Leur réversion en condition germinale restaure le caractère autoréactif avec une forte affinité pour les glycanes I/i de LB (Reed et al. 2016). Ce concept illustre bien la nécessité pour l'organisme de préserver un pool de cellules autoréactives

circulantes, qui pourra perdre ou diminuer son autoréactivité lors de sa maturation tardive, pour améliorer la réponse anti-infectieuse.

Parmi d'autres acteurs impliqués dans la tolérance inhérente aux CG, citons FcγRIIb, un récepteur inhibiteur du BCR. Il prévient l'expansion de cellules autoréactives spécifiquement dans le CG, puisque sa délétion favorise l'accumulation de cellules autoréactives post CG mais décroît leur fréquence au stade naïf (Espéli et al. 2019). Les Tfr (*T follicular regulator*) sont d'autres protagonistes importants. Ces cellules descendent de lymphocytes Treg, ont acquis un programme transcriptionnel de TFH, exprimant notamment CXCR5 et PD-1 (Aloulou et al. 2016). Leur TCR est préférentiellement engagé par des autoantigènes et elles peuvent générer des signaux inhibiteurs via CTLA-4 ou la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β, et réprimer la commutation de classe, l'expression de c-Myc, et les voies métaboliques dont mTORC1 (Fonseca, Ribeiro, and Graca 2019; Sage et al. 2016).

Malgré ces mécanismes, des LB pour lesquels les SHM ont généré des BCR autoréactifs alors qu'ils ne l'étaient pas au stade naïf, survivent. En effet, l'analyse de plus de 100 anticorps issus de LB mémoires switchés de sujets sains montre une fréquence élevée d'autoréactivité (entre 30 et 60%), notamment contre des antigènes nucléaires, et une fréquence plus élevée de polyréactivité que pour les LB naïfs des mêmes sujets (fréquence de réactivité contre au moins deux antigènes parmi insuline, le lipopolysaccharide, et l'ADN double ou simple brin de 22% contre 6%) (Tiller et al. 2007). La réversion des SHM par mutagenèse dirigée conduisait à la perte de cette auto- et polyréactivité pour 36 anticorps testés. Ces LB switchés pourraient être à l'origine d'un pool d'anticorps IgG naturels poly/autoréactifs, qui pourraient renforcer la diversité de la réponse anti-infectieuse mais aussi avoir d'autres rôles, tels que la clairance de débris apoptotiques, avec des fonctions effectrices différentes des IgM (Tiller et al. 2007). Le rôle précis de ces cellules reste toutefois à élucider, tout comme le fait de savoir si elles peuvent être éliminées par des checkpoints de tolérance encore plus tardifs au stade de plasmablastes ou PC.

4.2 Différenciation extra-folliculaire et tolérance

La fréquence d'autoréactivité des LB mémoires non switchés (CD27+ IgM+), considérés comme dérivant d'une voie extra-folliculaire, est faible : 2% d'entre eux reconnaissent des antigènes nucléaires (Tsuiji et al. 2006). Cela suggère que les cellules naïves autoréactives sont éliminées ou détournées de cette voie. Néanmoins, les récentes découvertes dans le champ de la différenciation extra-folliculaire B, et notamment la description des cellules CD11c positives, ouvrent un nouveau champ dans la compréhension de la tolérance du compartiment post antigénique.

Initialement, l'immunité humorale extra-folliculaire était considérée comme spécifique d'antigènes aux motifs répétés, principalement polysaccharidiques, générant une réponse anticorps rapide (environ 3 jours), T-indépendante, peu spécifique, de faible affinité, et ne générant que peu de cellules mémoires (Mond, Lees, and Snapper 1995; García de Vinuesa et al. 1999). La majorité de ces cellules, CD27+, expriment une Ig de type IgM, peu mutée, et sont qualifiées de LB de la zone marginale dans la rate, et de LB mémoires non switchés ou mémoires IgM+ dans le sang périphérique (Weller et al. 2004; Toellner et al. 2002). L'expression persistante d'EBI2 et celle de CXCR4 est importante pour le maintien de ces LB hors du CG (Gatto et al. 2009; Jenks et al. 2019). Leur différenciation prend place dans la zone marginale ou les cordons médullaires ganglionnaires. Elles sont caractérisées par une forte expression de TLR et de TACI, leur permettant une différenciation rapide en plasmablastes (Figgett et al. 2013; Cerutti et al. 2013). En effet, Les TLR7 et 9, les cytokines BAFF et APRIL induisent des signaux permettant l'expression de Blimp-1 puis la répression de PAX5 (He et al. 2010; Nickerson et al. 2010; Litinskiy et al. 2002). Ce profil transcriptionnel favorise la différenciation précoce en plasmablastes au détriment d'un phénotype CG (Mohr et al. 2009; Shaffer et al. 2002; Tellier et al. 2016).

La description d'une réponse mémoire déclenchée par des antigènes réputés « T-indépendants » et le fait que la commutation de classe débute avant le CG a fait nuancer certains points de ce paradigme (Obukhanych and Nussenzweig 2006; Roco et al. 2019). De même, il a longtemps été considéré que les plasmablastes issus de la différenciation extra-folliculaire se différenciaient en PC à courte durée de vie et peu mutés. De fait, l'analyse approfondie de la réponse EF à l'infection par *Salmonella typhimurium* révèle que les plasmablastes ont subi plusieurs SHM à l'origine d'une affinité augmentée (Di Niro

et al. 2015). BAFF et APRIL, mais aussi les LT pré-TFH, notamment via l'IL-21, sont susceptibles de générer la commutation de classe et de les orienter vers une réponse mémoire (He et al. 2010; Litinskiy et al. 2002; S. K. Lee et al. 2011). Récemment, une nouvelle population de lymphocytes T auxiliaires périphériques (*peripheral T helper*) a été décrite. Ces cellules partagent des caractéristiques communes aux TFH, dont l'expression du PD-1, mais sont négatives pour CXCR5. Elle expriment également CXCR3, ce qui contribue à leur recrutement dans les tissus inflammatoires où elles favorisent la différenciation extra-folliculaire et en plasmablastes des LB, notamment médiée par une forte sécrétion d'IFN γ (Yoshitomi et al. 2021; Asashima et al. 2023).

Récemment, une population singulière de cellules a été rattachée à la réponse extra-folliculaire. T-bet est un facteur de transcription connu pour orienter les LT auxiliaires CD4+ vers un profil Th1. Dans les LB, il a été identifié dans une population B murine particulière augmentant avec l'âge (ABCs pour *age associated B cells*), exprimant CD11c en surface (Rubtsova et al. 2013; 2017). Ces cellules sont localisées en bordure de la zone T-B dans les OLS, et leur expansion dépend de TLR7 et de l'IFN γ (Rubtsov et al. 2015; 2013). Elles sont requises pour contrôler certaines infections virales et s'expandent rapidement après une infection par le virus influenza (Cancro 2020). Les niveaux plus faibles de SHM et l'expression réduite des gènes *BCL6*, *S1PR2* et *AICDA*, en comparaison avec les LB du CG, sont compatibles avec une origine extra-folliculaire (Song et al. 2022).

Chez l'homme, une population similaire a été identifiée, même si les définitions ne sont pas uniformes. Ces cellules T-bet positives, sont négatives pour CD27-, exprimant peu ou pas CD21, et sont qualifiées d'atypiques de par l'expression de molécules inhibitrices comme FcRL5 (Fc receptor-like protein 5), CD72, CD22, PD-1, et leur faible réponse à des stimulations *in vitro* (Sutton et al. 2021). Leur expansion a été constatée dans différentes infections, incluant l'hépatite C, le VIH, le paludisme, le Sars coV-2 (Moir et al. 2008; Charles et al. 2011; Portugal et al. 2015; Woodruff et al. 2020). Récemment, une relation clonale a pu être démontrée entre deux populations T-bet+ CD11c+ correspondant globalement à ces LB atypiques : une double négative pour l'IgD et le CD27, nommée DN2 (les DN1 étant des précurseurs de LB mémoires du CG), et une population naïve activée (aNaive) dont elles semblent dériver, ne différant que par l'expression négative de l'IgD (Jenks et al. 2018). Outre le profil transcriptomique, la différenciation préférentiellement extra-folliculaire des DN2 chez l'homme est suggérée par une faible expression

membranaire de CXCR5 et de CD62-L (ligand de la *peripheral Node Adressin*, PNad). Leur expansion apparait comme T dépendante puisque leur génération *in vitro* est optimisée lors d'une double stimulation IFN γ /TLR ou l'IFN γ /CD40L (Keller et al. 2021). Comme l'atteste le profil de réactivité de leurs anticorps après différenciation plasmocytaire *in vitro*, elles sont fréquemment autoréactives, ce qui questionne sur leur rôle et les mécanismes de tolérance les restreignant (S. Wang et al. 2018). Lors d'une infection à *Plasmodium falciparum*, les cellules atypiques présentent des SHM qui réduisent le caractère autoréactif de leur BCR. Cela suggère qu'elle peuvent être contraintes, comme les LB folliculaires, par un mécanisme de rédemption clonale lors d'exposition à des antigènes exogènes (Ambegaonkar et al. 2022).

A la lumière de ces éléments, La réponse B extra-folliculaire est donc aujourd'hui reconsidérée et appréciée comme une réponse humorale complémentaire, induite par certains pathogènes, permettant à la fois une réaction immunitaire rapide peu spécifique, mais aussi une réponse avec maturation d'affinité secondaire impliquant des mécanismes de tolérance encore mal connus (**Figure 11**).

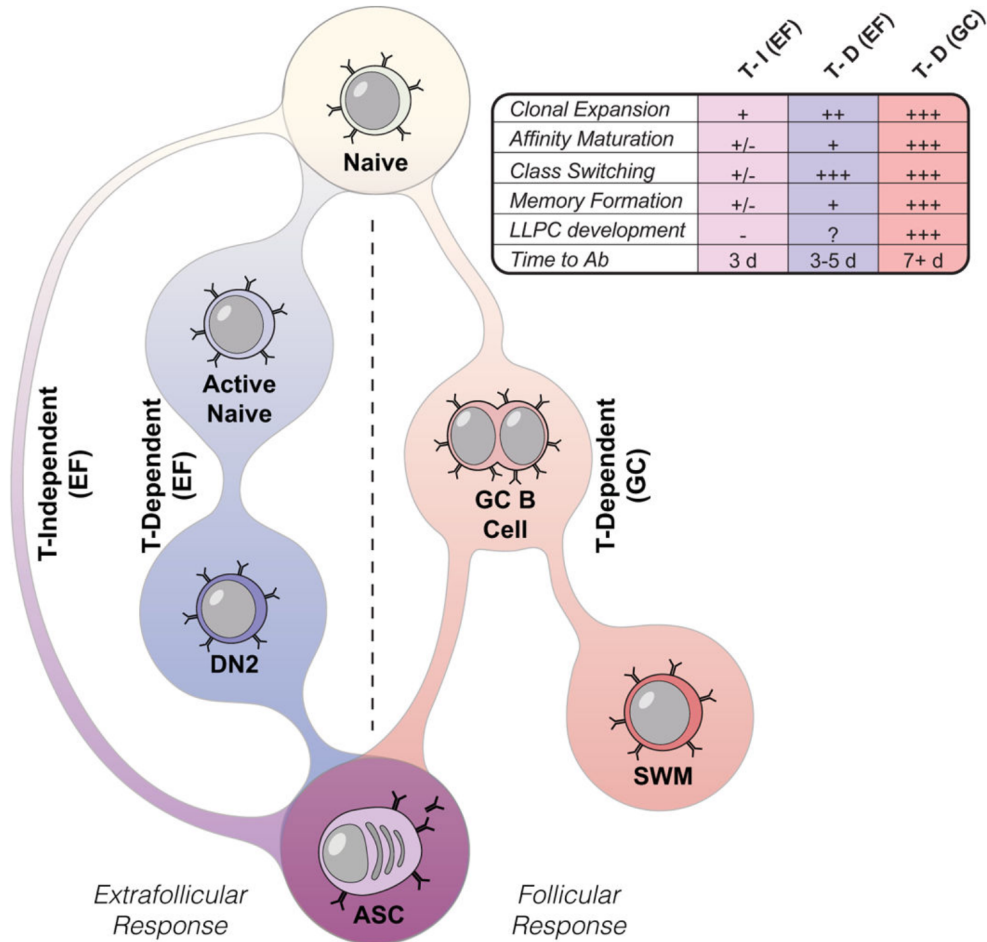


Figure 11 : Propriétés des différentes voies d'activation des LB. (Jenks et al., 2019).

Illustration de deux voies connues d'activation des LB lors d'une réponse extra-folliculaire et comparaison avec la réponse CG. Ces caractéristiques distinctives ont été étudiées dans des modèles murins et sont moins bien connues chez l'homme. Les réponses T-indépendantes (à gauche, en violet) aboutissent à une conversion directe des LB naïfs en PC quelques jours après stimulation. Les réponses T-dépendantes (au milieu, en bleu), passent par plusieurs étapes avant la différenciation terminale, et présentent des niveaux plus élevés d'expansion clonale, de SHM, de commutation de classe et de développement d'une mémoire par rapport aux réponses T-indépendantes. Les LB issus du CG présentent les niveaux les plus élevés de SHM, sont plus prompts au développement d'une mémoire et à la différenciation en PC à longue durée de vie, mais cette réponse est plus longue à mettre en place.

4.3 Tolérance tardive : LB mémoires

La maturation d'affinité des LB, qu'elle soit folliculaire ou non, conduit au développement d'un contingent mémoire. La plupart des cellules mémoires expriment le marqueur CD27 utilisé pour leur identification. Elles peuvent être commutées (IgG/A/E+) ou non (CD27+IgM+IgD+, mémoire non switchées; CD27+ IgM-IgD+ : mémoire IgD only; CD27+IgM+IgD- : mémoire IgM only). Leur localisation est multiple, dans le sang périphérique, les OLS, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), la moelle

osseuse. Une analyse par cytométrie de masse réalisée en cellule unique sur des LB de sujets sains a identifié pas moins de 12 populations mémoires différentes dans ces quatre compartiments (Glass et al. 2020). Elle a révélé que l'expression de CD27 n'y était pas ubiquitaire, et que d'autres marqueurs pouvaient être spécifiques, comme CD45RB et CD39, respectivement exprimés par des cellules mémoires précoces ou résidentes des amygdales.

Les cellules mémoires sont capables de s'activer rapidement en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène. L'étude des LB mémoires spécifiques de la vaccine chez des sujets âgés de plus de 50 ans confirme qu'un contingent mémoire restreint, commuté, sélectionné pour son affinité, peut persister pendant des décennies dans des niches spléniques assurant leur longévité (Chappert et al. 2022). Lors de la réponse immune secondaire, les LB mémoires peuvent se différencier rapidement en ASC ou entrer à nouveau dans le CG pour reprendre le processus de sélection positive et augmenter encore la spécificité et l'affinité pour l'antigène, avant de se différencier finalement en plasmablastes. Ce processus par lequel les cellules mémoires subiraient plusieurs cycles de réentrée dans le CG, où elles deviennent de plus en plus spécifiques, expliquerait pourquoi elles présentent davantage de polyréactivité et moins de SHM que les ASC (Akkaya et al. 2020; Scheid et al. 2011). Dans le modèle murin d'infection par le virus West-Nile avec une souche de virus sauvage et un virus variant, les plasmocytes à longue durée de vie présentent une capacité de neutralisation du virus variant limitée alors que les PC dérivés des LB mémoires génèrent des anticorps capables de reconnaître le virus sauvage et le variant, voire davantage le virus variant (Purtha et al. 2011). De même, les cellules B mémoires des patients vaccinés contre le Sars-Cov2 adaptent progressivement leur affinité après une infection par le variant BA.1, probablement par le même mécanisme (Sokal et al. 2023). Une analyse combinant séquençage BCR et *single cell RNAseq* des LB mémoires issus d'amygdales de sujets sains révèle que l'isotype du LB mémoire influence le destin cellulaire (King et al. 2021). Les LB mémoires switchés démontrent une faculté accrue à activer le signal BCR et à présenter l'antigène, c'est-à-dire à recevoir des signaux favorisant la différenciation plasmablastique, alors que le profil transcriptomique des LB non switchés suggère qu'ils sont prompts à regagner le CG. D'après l'ensemble de ces données et le modèle proposé par Akkaya et al., les LB mémoires paraissent indispensables à la réponse immunitaire secondaire en formant un deuxième rempart pour les pathogènes ayant échappé aux

mailles du filet des PC à longue durée de vie (**Figure 12**). Il est alors aisé d'imaginer que les mêmes processus de tolérance décrit pour les LB naïfs entrant dans le CG s'appliquent aux LB mémoires.

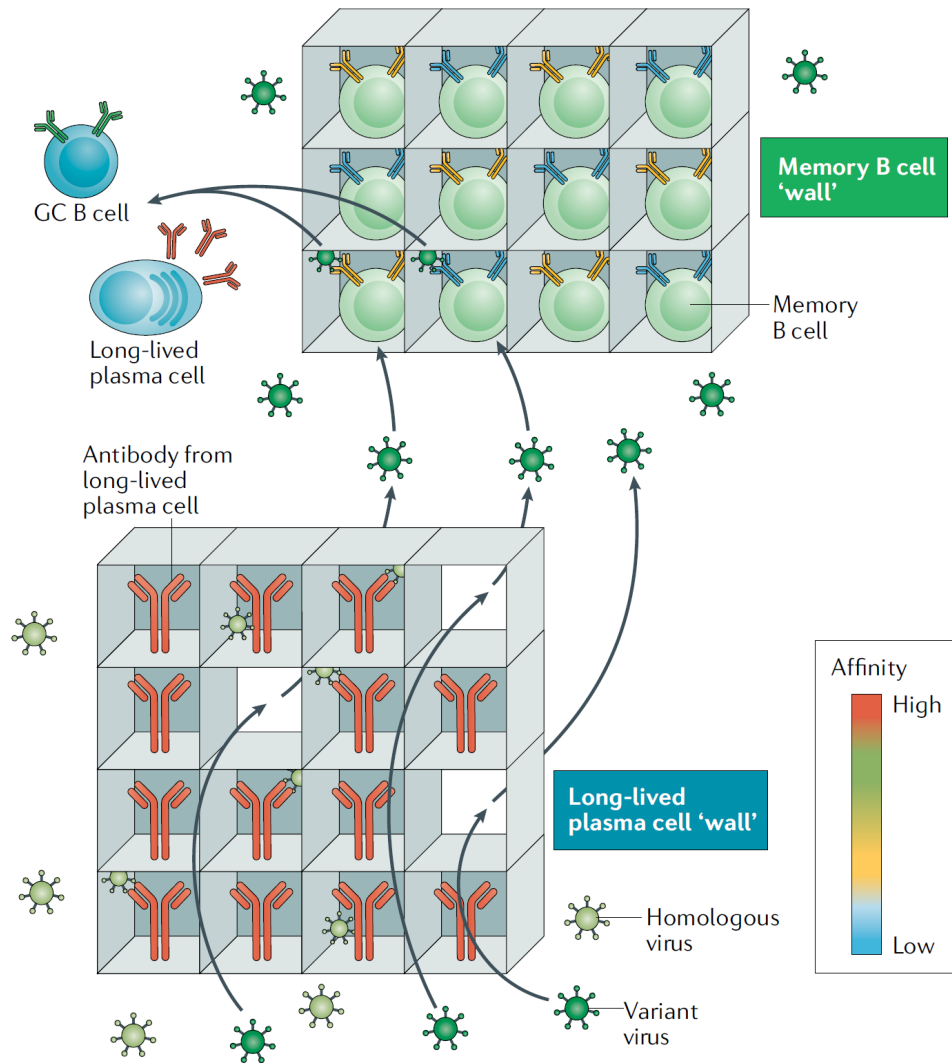


Figure 12 : Représentation schématique de la réponse immunitaire secondaire. (Akkaya et al., 2020).

Les PC à longue durée de vie présents dans la moelle osseuse sécrètent des anticorps fortement sélectionnés et hautement spécifiques (en rouge) qui forment une première barrière (en bas) lors d'une réinfection par un pathogène. Les pathogènes variants peuvent trouver des failles dans cette barrière; ils en rencontreront alors une deuxième (en haut) formée par les LB mémoires, moins spécifiques mais aux BCR plus variés. Une fois activés, les LB mémoires pourront directement se différencier en PC à longue durée de vie ou réintégrer les CG pour maturer leur affinité, puis se différencier secondairement en PC à longue durée de vie ou en nouvelle cellule mémoire plus spécifique du variant.

4.4 Tolérance tardive : ASC

La différenciation en ASC est le dernier évènement dans le développement des LB. Après la maturation d'affinité secondaire, les pré-plasmablastes quittent le follicule B et rejoignent les cordons médullaires du ganglion sous l'effet d'un gradient de CXCL12 instauré par les cellules réticulaires fibroblastiques (H.-Y. Huang et al. 2018). Ces cellules stromales constituent également une source importante des cytokines BAFF, APRIL et IL-6 impliquées dans la survie et la maturation des ASC. Les pré-plasmablastes deviennent alors des plasmablastes, aux fortes capacités prolifératives, puis des PC matures post mitotiques. La durée de vie des PC circulants est considérée comme courte, alors que les PC issus du CG sont destinés à une longue durée de vie et migrent vers la moelle osseuse.

Caractéristiques des différentes ASC

L'analyse du transcriptome révèle un profil d'expression génique très distinct entre LB et les cellules plasmocytaires (Shi et al. 2015). Les principaux facteurs de transcription responsables de la transition vers la sécrétion d'anticorps sont Blimp1 (codé par le gène *PRDM1*), dont nous avons déjà évoqué le rôle dans la répression de PAX5 et de BCL-6, XBP-1 (*X-Box Binding Protein 1*) et IRF4, (*Interferon Regulatory Factor 4*) qui répriment l'identité lymphocytaire B et initient le programme transcriptionnel plasmocytaire (Nutt et al. 2011; Shaffer et al. 2002). Blimp1 active également directement IRF4 et la voie de l'UPR (*Unfolded protein response*) nécessaire à la synthèse des anticorps. Les plasmablastes déficients pour *PRDM1* perdent leur capacité à sécréter des anticorps, en partie par un défaut d'activation de la voie mTORC1 régulant la synthèse protéique (Tellier et al. 2016). Toutes les ASC sont CD27⁺CD38^{hi}IgD⁻CD24⁻ mais les populations plasmocytaires peuvent différer par leur phénotype et notamment l'expression de CD19 et CD138. Schématiquement, les plasmablastes et PC sont différenciés par leur degré de prolifération et la perte du CD20 (B220 chez la souris) (Delaloy et al. 2022). Après une phase de pré-plasmablastes ou l'expression de CD38 est faible, les plasmablastes expriment CD19, CD38, mais pas CD138 (Arce et al. 2004). Les PC circulant en périphérie sont également CD19⁺CD38⁺CD138⁻. L'analyse, chez des adultes sains, des PC spécifiques d'antigènes viraux rencontrés uniquement lors de la vaccination dans l'enfance a permis de montrer que la majorité des PC à longue durée de vie étaient de phénotype CD19⁻CD38⁺CD138⁺ (Halliley et al. 2015). La distinction de ces différentes populations d'ASC

reste toutefois délicate, comme l'illustre le fait que des cellules circulantes CD138⁺ sont détectées en périphérie après immunisation (Ignacio Sanz et al. 2019; Garimalla et al. 2019). Le phénotype des principales populations sécrétrices d'anticorps est résumé dans le **Tableau 2**. La transition plasmocytaire est également caractérisée par une transition entre une Ig membranaire vers une Ig sécrétée, et, de ce fait, il est admis que les PC à longue durée de vie n'expriment pas d'Ig de surface. Au fil des années, des preuves se sont accumulées pour suggérer que ce n'était pas toujours le cas et que les PC IgA⁺ et IgM⁺ continuaient d'exprimer un BCR fonctionnel à leur surface contrairement aux PC IgG⁺ (Blanc et al. 2016; Pinto et al. 2013). Enfin, il est important de noter qu'une population importante de PC, principalement IgA⁺ et exprimant CCR9, est localisée dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale. Certains de ces PC, localisés dans la lamina propria, ont un profil de LPPC. Ils sont impliqués dans la défense anti-infectieuse des muqueuses IgA dépendante, mais jouent aussi un rôle immunomodulateur dans l'homéostasie locale et dans l'interaction avec le microbiote (Isho et al. 2021).

Tableau 2. Principaux marqueurs membranaires des cellules sécrétrices d'anticorps chez l'homme et la souris. (Delaloy et al., 2022).

	Pre-plasmablasts	Plasmablasts	Plasma cells	Long-lived plasma cells
Human	CD38 ^{neg/low} CD27 ^{low} CD138 ⁻ CD20 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺	CD38 ^{high} CD27 ^{high} CD138 ⁻ CD20 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺	CD38 ^{high} CD27 ^{high} CD138 ⁺ CD20 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺	CD38 ^{high} CD27 ^{high} CD138 ⁺ CD20 ⁻ CD19 ⁻ CD45 ⁻
Mouse	TACI ⁺ CD138 ⁺ CD19 ⁺ B220 ⁺	TACI ⁺ CD138 ⁺ CD19 ⁺ B220 ⁺	TACI ⁺ CD138 ⁺ CD19 ⁺ B220 ⁻	TACI ⁺ CD138 ⁺ CD19 ⁻ B220 ⁻

Signaux de survie et tolérance

Les PC à longue durée de vie quittent les OLS en réduisant l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, migrent dans la moelle osseuse sous l'effet chemo-attractant de CXCL12, sécrété par les cellules stromales médullaires, ligand de leur récepteur CXCR4 (Hauser et al. 2002; Li et al. 2014). Ils vont se loger dans des niches médullaires au contact de cellules stromales, avec lesquelles elles interagissent via différentes intégrines, et perdent alors leur capacité

de réponse aux chemokines (Tokoyoda et al. 2004). Les PC à longue durée de vie peuvent survivre sans stimulation antigénique. Effectivement, les niches fournissent aux PC non seulement des signaux pour leur adhésion, mais favorisent également leur survie, notamment via APRIL et BAFF. Un des deux signaux est suffisant pour induire la survie des PC : seule la délétion combinée d'APRIL et BAFF induit la disparition des PC à longue durée de vie chez la souris (Benson et al. 2008). De multiples sources cellulaires différentes d'APRIL ont été rapportées dans la moelle osseuse, incluant les précurseurs myéloïdes, les éosinophiles, les mégacaryocytes (Matthes et al. 2011; Lindquist et al. 2019). APRIL peut lier les protéoglycan heparane sulfate (HSPG) dont fait partie CD138, qui concentre APRIL à la surface des cellules et augmente son efficacité (Duan et al. 2023). APRIL agit sur le récepteur BCMA des PC (qui lie peu BAFF), qui régule notamment l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Benson et al. 2008; Peperzak et al. 2013). Par ailleurs, les PC expriment peu BAFF-R mais fortement TACI. Les deux cytokines APRIL et BAFF peuvent se lier à TACI et générer un signal de survie, de façon cohérente avec le déficit en Ig constaté chez les patients déficients pour TACI (Bossen et al. 2008). L'expression de BCMA diminue progressivement avec la maturation médullaire plasmocytaire, alors que celle de TACI augmente (Duan et al. 2023). Ces éléments laissent penser que BCMA et TACI sont essentiels pour la survie respectivement précoce et au long cours des PC médullaires. La survie prolongée des PC à longue durée de vie dépend également d'un programme métabolique particulier caractérisé par une intense respiration oxydative pyruvate dépendante et une consommation importante de glucose nécessaire à la glycosylation des anticorps (Lam et al. 2016).

De part leurs forts signaux de survie, leur localisation définitive et restreinte aux niches de la moelle osseuse, les PC ne subissent théoriquement pas de processus de délétion ou de rédemption clonale. Néanmoins, l'analyse du profil de réactivité de 177 des Ig exprimés par les PC à longue durée de vie de sujets sains révèle une baisse significative de la fréquence d'anticorps autoréactifs par rapports aux LB mémoires switchés des mêmes sujets (médiane de 13% à 42%) (Scheid et al. 2011). Ces résultats, conjugués à l'expansion spécifique de cellules productrices d'anticorps autoréactives en contexte d'auto-immunité, suggère néanmoins l'existence d'une sélection négative tardive encore mal connue (Suurmond et al. 2019). La question de savoir si cette sélection négative s'opère sur les LB mémoires lors de cycles additionnels dans le CG ou lors de la migration des PC

dans la moelle osseuse reste ouverte. En outre, des mécanismes semblent exister pour moduler l'activité des PC dans leurs tissus résidents. En particulier, une population de PC régulateurs, résidents notamment dans la moelle osseuse, est capable d'exercer des fonctions immunosuppressives par l'intermédiaire de l'IL-10 ou de molécules co-inhibitrices comme Lag-3 (*Lymphocyte Activation Gene-3*) (Lino et al. 2018).

Conclusion

Nous avons vu que de multiples points de passage jalonnent le développement des LB pour restreindre leur propension à l'autoréactivité. La plupart de ces checkpoints peuvent être déficients, et engendrer ou participer au développement de manifestations auto-immunes. Dans le chapitre suivant, nous développerons des exemples de telles situations, exposerons les hypothèses mécanistiques avancées et les conséquences de la rupture de tolérance qui en découlent. Nous insisterons sur l'exemple de LES, non seulement parce que ces mécanismes y ont été particulièrement étudiés, mais aussi parce que c'est la MAI la plus fréquemment associée au SAPL.

II. Cellules B autoréactives dans les maladies auto-immunes

Le rôle pathogénique des LB dans les MAI à autoanticorps est suggéré par les modèles murins, les anomalies phénotypiques récurrentes constatées, et l'efficacité des thérapies ciblant ces cellules chez les patients. La survie de ces LB pathologiques jusqu'à leur différenciation en PC implique des mécanismes de tolérance déficients variables selon les maladies.

1. Rupture de tolérance dans les maladies auto-immunes

1.1 Compartiment naïf

De nombreux travaux ont cherché à identifier et quantifier les cellules B autoréactives en utilisant des techniques telles que la transformation par le virus Epstein-Barr (EBV), le suivi de l'utilisation des gènes V connus pour être fréquemment autoréactifs, ou des approches de cytométrie en flux. Cependant, la plupart des études récentes ont utilisé une approche de clonage et d'expression des séquences d'anticorps obtenus à partir de LB humains en cellule unique à différents stades de leur développement (Wardemann et al. 2003).

Dans le LES, exemple prototypique de MAI B médiée, des autoanticorps peuvent être détectés des années avant les premières manifestations cliniques, ce qui laisse suggérer leur rôle fondateur dans la physiopathologie de la maladie (Arbuckle et al. 2003). Il s'agit notamment d'anticorps antinucléaires (ANA), qui participent à la pathologie par différents mécanismes, et en particulier par la génération de complexes immuns qui induisent inflammation et lésions tissulaires. La détection des ANA, et en particulier des anti-ADN natifs double brin (ADNdb), font partie des critères de diagnostic de la maladie et participent au suivi évolutif (Aringer et al. 2019). Chez des sujets atteints de lupus pédiatriques, *Yurasov et al.* ont pu montrer une augmentation de cellules autoréactives (ANA+ définie en immunofluorescence sur lysats de cellules Hep-2) et polyréactives au stade B transitionnel en faveur d'un défaut de tolérance centrale (Yurasov et al. 2005). La différence est encore plus marquée au stade mature naïf, suggérant que le premier point de contrôle périphérique puisse également être déficient (Yurasov et al. 2005) : 40 à 50%

des BCR de LB naïfs sont ainsi autoréactifs dans le LES, contre 20% chez les sujets sains. Ces résultats ont été confirmés par une autre technique : l'analyse des surnageants de culture selon Nojima de LB triés en cellule unique révèle que la proportion de LB autoréactifs ne diminue pas entre le stade transitionnel et mature naïf dans le LES (Su et al. 2016; Watanabe et al. 2019). De plus, une fréquence augmentée de LB transitionnels est constatée dans le LES, que la maladie soit active ou quiescente (Simon et al. 2016; Palanichamy et al. 2014; Dieudonné, Gies, et al. 2019, voir **Annexe 1**). Cette expansion, concernant principalement les cellules T1 et T2, laisse penser que la sortie de la moelle des LB transitionnels puisse être favorisée. Une autre hypothèse est que ces cellules présentent une résistance accrue à l'apoptose et qu'elles puissent court-circuiter le premier filtre de tolérance périphérique. Cette fréquence élevée de cellules autoréactives/polyréactives aux stades transitionnel et mature naïf est commune à d'autres MAI dont la PR, le Sjögren, le diabète de type 1, la myasthénie (Samuels et al. 2005; Glauzy et al. 2017; Eric Meffre and O'Connor 2019; J.-Y. Lee et al. 2016). Si elles sont fréquemment polyréactives et d'affinité faible, ces cellules naïves autoréactives non éliminées sont susceptibles de poursuivre leur maturation d'affinité et de s'activer après la rencontre avec l'antigène.

1.2 Compartiment post-antigénique

Une rupture de tolérance plus tardive a pu être démontrée dans le LES. Plusieurs travaux ont retrouvé une expansion des ASC et une signature plasmablastique corrélant avec l'activité de la maladie (Grammer et al. 2003; Gies et al. 2018; Tipton et al. 2015; Banchereau et al. 2016). Une étude reposant sur l'utilisation d'extraits de fragment nucléaires biotinylés a cherché à quantifier, dans le LES, la fraction de cellules B ANA+ en cytométrie en flux (Suurmond et al. 2019). La fréquence des LB ANA+ n'était pas augmentée dans les cellules naïves des patients. En revanche, une augmentation globale des ASC IgG+, à l'origine d'un nombre accru de PC autoréactifs, était retrouvée à la fois dans les modèles murins et chez les patients. Ces résultats semblent contradictoires avec les données exposées dans le paragraphe précédent, mais il faut souligner que le LES est une maladie hétérogène, et il n'est pas exclu que plusieurs checkpoints de tolérance soient plus ou moins impactés selon les patients.

Comme nous l'avons déjà évoqué, le caractère autoréactif des LB mémoires ou ASC peut être hérité d'un LB naïf qui l'était déjà ou être généré *de novo*. Appuyant la première théorie, l'isolement de deux autoanticorps IgG anti-Ro52 (appartenant à un groupe d'antigènes cibles du LES, les anti antigènes solubles du noyau ou anti-ENA) chez une mère d'un enfant présentant des manifestations cardiaques de lupus néonatal a montré des niveaux faibles de SHM et une réactivité élevée envers Ro52 de son ancêtre germinal (Reed et al. 2017). En faveur de la seconde hypothèse, d'autres anticorps anti-ENA isolés chez des patients lupiques, d'isotype IgG et mutés, perdent leur caractère autoréactif lorsqu'ils sont inversés en condition germinale (Mietzner et al. 2008). De même, dans le pemphigus vulgaire, les autoanticorps pathogènes reconnaissant la desmoglérine-3 ont subi des SHM, mais la plupart des ancêtres non mutés ne montrent plus d'affinité pour cet autoantigène (Di Zenzo et al. 2012).

1.2.1 Tolérance du CG

La rupture de tolérance tardive et l'expansion des ASC dans le LES peuvent théoriquement résulter d'un défaut de sélection dans le CG ou d'une différenciation extra-folliculaire dérégulée. De fait, la littérature donne des arguments pour les deux hypothèses. D'une part, la fréquence largement augmentée de LB *IGHV4-34+* de type 9G4+ (c'est-à-dire portant le patch hydrophobe) au sein des compartiments du CG et post-CG chez les patients atteints de LES, par rapport à des sujets sains, suggère un déficit de l'exclusion du CG, mais aussi de la rédemption clonale (Cappione et al. 2005). Il est connu que les anticorps portant le gène *IGHV4-34* contribuent majoritairement au pool d'autoanticorps dans le LES (Isenberg et al. 1993; van Vollenhoven et al. 1999). La présence de LB *IGHV4-34* ayant muté la région hydrophobe, mais reconnaissant toujours des autoantigènes comme l'ADNdb ou des débris apoptotiques, suggère que le défaut de rédemption clonale n'est pas dû à une incapacité à subir des SHM mais à un échec dans la sélection négative des LB autoréactifs (Richardson et al. 2013). Le purpura thrombopénique idiopathique (PTI) est une autre MAI B prototypique pour laquelle un défaut de tolérance du CG a pu être mis en évidence. Les autoanticorps ciblent des antigènes plaquettaires, dont la glycoprotéine (GP) IIb-IIIa. La rate est un organe clé dans sa physiopathologie. Une réponse de type CG intense y est constatée chez les patients, générant des PC sécréteurs d'anticorps anti GpIIb-IIIa de haute affinité (Mahévas et al. 2013). En particulier, des PC à longue durée de vie apparaissent dans la rate après déplétion B par anti-CD20

(Rituximab). Chez les patients en rechute après traitement par Rituximab, les PC autoréactifs proviennent à la fois de LB naïfs récemment activés, mais aussi d'un pool de LB mémoires spléniques résistants au Rituximab, réprimant certaines molécules B dont le CD20 et aux capacités d'activation du BCR réduites (Crickx et al. 2021). La filiation clonale suggère qu'ils dérivent du CG, incapable de les éliminer et permettant leur survie au long cours.

1.2.2 Tolérance extra-folliculaire

D'autre part, plusieurs éléments laissent penser qu'une activation de la voie extra-folliculaire pourrait participer à la physiopathologie du LES. Une accumulation de cellules ABC, exprimant largement des autoanticorps, est retrouvée dans les modèles murins lupiques (Rubtsova et al. 2017; Rubtsov et al. 2013). Cette expansion est reversée par la délétion de T-bet+, qui améliore également la survie et prévient les lésions rénales de glomérulonéphrite lupique. Une expansion de ces cellules CD11c+, est également constatée chez les patients (Jenks et al. 2018; Tipton et al. 2015; Rincon-Arevalo et al. 2021). La fréquence des cellules aNaive et des DN2 est deux à trois fois plus élevée que chez les sujets sains et corrèle à l'activité de la maladie et aux titres d'autoanticorps. Elle concerne particulièrement les patients en poussée et les sujets afro-américains dont le phénotype est plus sévère (Korbet et al. 2007). La fréquence de BCR contenant le gène *IGH4-34* est augmentée dans les LB CD11c+ par rapport aux LB mémoires switchés et aux LB naïfs conventionnels (rNaive pour *resting Naive* par opposition à *activated Naive*). Les cellules CD11c+ des patients ont une signature transcriptomique plasmablastique (expression de TACI, BCMA, IRF4) suggérant qu'elles puissent se différencier préférentiellement et rapidement en ASC. Effectivement, une stimulation IL-21 couplée à un agoniste du récepteur TLR7, auxquels elles semblent particulièrement sensibles, entraîne une différenciation rapide en PC sécréteurs de divers autoanticorps spécifiques de la maladie lupique (anti Sm, anti DNA natifs...) (S. Wang et al. 2018). Cette fréquence élevée de cellules CD11c (ou de cellules proches sur le plan phénotypique, définies comme CD21low) est retrouvée dans diverses MAI comme la PR, mais aussi dans des conditions pathologiques associées à de l'auto-immunité comme les déficits immunitaires commun variables (DICV) ou la trisomie 21 (Jenks et al. 2018; Karnell et al. 2017; Warnatz et al. 2002; Malle et al. 2023). Il est tentant de considérer que ces LB, dérivés de certaines cellules naïves ayant échappé à la tolérance précoce et potentiellement précurseurs de PC

sécréteurs d'autoanticorps, suivent une voie extra-folliculaire préférentielle pour court-circuiter les mécanismes de tolérance du CG (**Figure 13**).

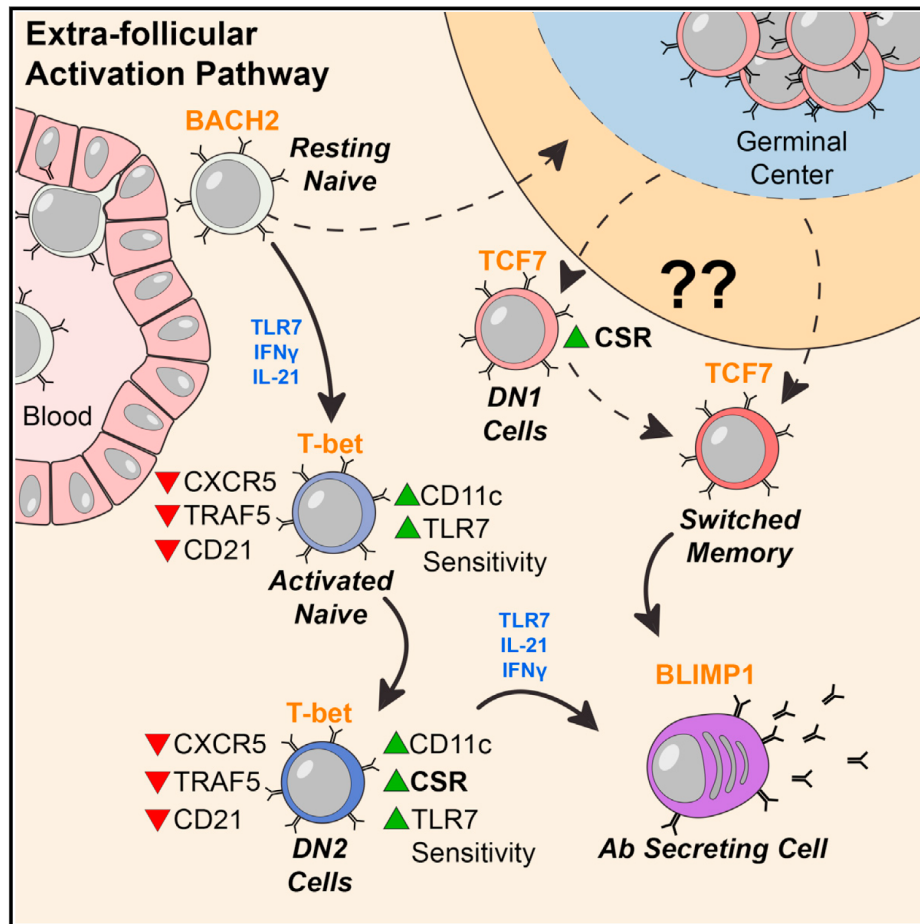


Figure 13 : Activation B extra-folliculaire dans le LES. (Jenks et al., 2019).
CSR, *class switch recombination*.

2. Hypothèses mécanistiques

Plusieurs types de déficits du système immunitaire inné ou adaptatif pouvant conduire à des MAI B médiées ont pu être identifiés. Certains se révèlent très instructifs pour intégrer les anomalies des LB dans le processus de rupture de tolérance. Ces défauts peuvent impliquer (1) le seuil d'activation des LB, (2) les co-récepteurs du BCR ou 3) la survie des LB.

2.1 Défaut du seuil d'activation

Selon le stade de différenciation où elle se produit, une dérégulation du seuil d'activation (que ce seuil soit augmenté ou abaissé) du LB peut entraîner des conséquences différentes. L'analyse des patients avec déficit immunitaire et les études GWAS (*Genome-wide association study*) ont permis l'identification de centaines de polymorphismes génétiques associés à un risque accru d'auto-immunité (Deng and Tsao 2014; Niewold 2015; Parkes et al. 2013; Yarwood et al. 2016). Nombre de ces variants sont susceptibles de modifier la signalisation du LB, incluant des gènes codant pour des récepteurs ou des protéines intervenant dans la cascade du BCR. Plusieurs sont associés à des défauts de tolérance centrale tels ceux impactant *BTK*, *MYD88*, *IRAK-4* (Ng et al. 2004; Isnardi et al. 2008). Le polymorphisme 1858T de *PTPN22* (*Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*) est l'un des plus souvent associés aux MAI dont la PR, le LES, le diabète de type 1 (Eric Meffre and O'Connor 2019). Ce variant, à l'origine d'une substitution R620W, affecte la protéine tyrosine phosphatase LYP et réduit les signaux BCR et TCR. Un seul variant *PTPN22* est suffisant pour causer un défaut de tolérance B central et périphérique similaire à celui retrouvé dans les MAI (Menard et al. 2011). De plus, l'expression induite par lentivirus du variant *PTPN22* R620W dans des LB humains développés chez une souris humanisée est suffisante pour altérer leur tolérance centrale, un processus inversé en inhibant la fonction de *PTPN22* (Schickel et al., 2016).

Parmi de nombreux polymorphismes identifiés sur les études GWAS (*BANK*, *BLK*...) certains favorisent une activation pathologique ou un défaut de maintien d'anergie de LB autoréactifs (Jiang et al. 2019; Vinuesa, Shen, and Ware 2023). Citons LYN pour lequel la délétion B spécifique dans les modèles murins est suffisante pour générer des autoanticorps pathogènes, de spécificité Sm, RNP ou ADNdb (Lamagna et al. 2014). Une expression réduite de LYN est retrouvée chez certains patients lupiques, une baisse de sa phosphorylation en lien avec un polymorphisme de CSK (codant pour la c-Src tyrosine kinase) chez d'autres (Manjarrez-Orduño et al. 2012; Te et al. 2010). Un autre exemple implique le signal PI3K dont nous avons vu que la régulation était cruciale pour le maintien de l'anergie B. Le niveau d'expression du régulateur négatif PTEN est réduit dans toutes les sous population B de patients lupiques, une conséquence d'un défaut de régulation épigénétique par des miARN (micro acide ribonucléique) (X. Wu et al. 2014).

Ces données suggèrent que même des modifications mineures du LB sont susceptibles de promouvoir l'émergence d'une auto-immunité (Rawlings et al. 2017).

2.2 Implication des TLR

Les acides nucléiques, parfois inclus dans des complexes immuns les rendant plus immunogènes, sont les principaux autoantigènes ciblés dans le LES. Ils sont capables de stimuler les LB autoréactifs, la combinaison d'un signal *via* le BCR et les TLR7/9 induisant leur activation et la production d'ANA (Leadbetter et al. 2002; Christensen et al. 2006). Le modèle de souris lupique Yaa dépend d'une duplication du gène *TLR7* sur le locus *Yaa* (*Y linked-Autoimmunity accelerator*) (Pisitkun et al. 2006). Bien qu'elles réduisent toutes les deux le titre d'autoanticorps, les délétions du TLR7 ou TLR9 entraînent toutefois des effets opposés, et d'apparence paradoxale : la suppression de TLR7 est protectrice dans le modèle MRL/lpr, alors que la délétion de TLR9 exacerbe de manière surprenante la maladie (Christensen et al. 2006). Des observations similaires ont été effectuées lors de délétions ciblées du TLR7 ou 9 dans les LB d'un modèle murin auto-immun, suggérant que les conséquences de l'absence des TLR 7 ou 9 sur la maladie sont dépendantes des LB et non d'autres cellules exprimant ces TLR comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Jackson et al. 2014; Tilstra et al. 2020; Hwang et al. 2012).

Les données chez l'homme confirment les rôles opposés de TLR7 et 9 sur la tolérance. Des polymorphismes du TLR7 ont été associés à la maladie lupique (Kawasaki et al. 2011; Shen et al. 2010). Nous avons déjà discuté l'influence d'une stimulation de TLR7 sur l'expansion des cellules CD11c+. Récemment, des variants ont été identifiés sur TLR7 comme cause de LES monogénique (Brown et al. 2022). Parmi eux, le variant hétérozygote gain de fonction Y264H, de transmission liée à l'X, est à l'origine d'une affinité accrue de TLR7 pour la guanosine. La reproduction de cette mutation chez la souris (*Tlr7^{kik/+}* = souris kika) induit l'apparition d'anticorps anti RNP et ADNdb et de glomérulonéphrite, dépendants d'une activation B extra-folliculaire. Le transfert adoptif de moelles chimériques (WT/TLR7^{kik}) suggère que les anomalies sont intrinsèques aux LB.

Des travaux de notre équipe ont montré qu'il existait une altération de la réponse TLR9 dans les LB transitionnels et naïfs de patients lupiques non traités, avec une diminution d'expression des marqueurs d'activation et de production cytokinique (Gies et al. 2018;

Dieudonné, Gies, et al. 2019). Ce défaut de réponse était spécifique des LB puisqu'il n'existait pas pour les pDC. Il pourrait être expliqué par une diminution d'expression de la molécule CD19, constatée chez des patients actifs mais aussi quiescents à partir du stade transitionnel (Korganow et al. 2010; Dieudonné et al. 2019; Morbach et al. 2016). Des données récentes ont encore souligné la complexité du rôle joué par TLR9 dans le maintien de la tolérance B (Leibler et al. 2022). Différentes mutations de TLR9 ont été générées sur fond MRL/lpr, affectant le site de liaison au ligand ou à MYD88. Les effets opposés constatés sur le phénotype lupique suggèrent que le rôle tolérogène de TLR9 soit médié par une voie MYD88-indépendante.

Globalement, un excès ou défaut de réponse TLR7 ou 9, respectivement, pourraient donc être en partie responsables du développement de complications auto-immunes au cours du LES, mais l'intrication des deux signaux reste difficile à dénouer.

2.3 Anomalie de survie

L'altération de la longévité des LB peut également mener à un phénotype lupique. Un variant faux-sens de *PRKCD*, avec perte de fonction de la protéine PKC δ entraînant une résistance à l'apoptose induite par le BCR, a été découvert dans une famille avec trois cas de LES pédiatriques (Belot et al. 2013). Les médiateurs solubles peuvent aussi influencer la survie des LB autoréactifs, comme le prouve l'étude des souris transgéniques surexprimant BAFF qui présentent un nombre excessif de LB matures, des centres germinatifs plus nombreux, un nombre élevé de PC, et produisent des autoanticorps avec des dépôts d'immuns complexes au niveau rénal (Mackay et al. 1999). L'administration de récepteur BAFF soluble (permettant de capter et donc bloquer la cytokine BAFF) diminue la progression de la maladie et améliore la survie des souris (Gross et al. 2000). BAFF prévient également les signaux de mort cellulaires pouvant être induits par les TLR. L'adjonction de BAFF prévient l'apoptose engendrée par le co-engagement BCR-TLR9 dans des LB primaires humain naïfs (Sindhava et al. 2018). Des niveaux élevés de BAFF sont retrouvés chez les patients avec SLE ou sclérodermie, tout comme des variants de *TNFSF13C* (codant BAFF). La souris BAFF-Tg caractérisée par une surexpression de BAFF développe des autoanticorps, dont des anti-ADNdb, et un phénotype lupus-like (Groom et al. 2007). La fonction de TACI semble plus complexe et associe un rôle d'activateur du BCR mais aussi de régulateur négatif. Les patients avec mutation hétérozygote *TNFRSF13B* à

l'origine d'une perte de fonction de TACI ont un défaut de tolérance centrale, dû à une réponse BCR et TLR7/9 altérée, et révélé par une accumulation de LB transitionnels autoréactifs (Romberg et al. 2013). Les patients avec deux allèles mutés, quant à eux, ne présentent pas d'autoanticorps. Chez la souris BAFF-Tg, une expansion de cellules transitionnelles exprimant TACI et enrichies en BCR autoréactifs est notée (Jacobs et al. 2016). La délétion de TACI dans ce modèle prévient l'apparition d'autoanticorps et des manifestations auto-immunes, probablement en inhibant la surexpression de TLR7 induite par BAFF (Figgett et al. 2015; Jackson et al. 2019). Enfin, les modèles de knock-out de TACI ou APRIL sur fond Yaa améliorent la maladie dans les deux cas (Tran, Schneider et al. 2017). Au total, les cytokines BAFF et APRIL sont donc des facteurs supplémentaires permettant la survie des LB autoréactifs en périphérie, d'où l'émergence d'anticorps monoclonaux ciblant BAFF (belimumab ou plus récemment Ianalumab) ou BAFF/APRIL (atacicept) comme thérapie dans le LES ou le Sjögren (Navarra et al. 2011; Bowman et al. 2022; Steri et al. 2017).

L'interferon α (IFN α) peut également favoriser l'expansion des LB naïfs et abaisser le seuil d'activation de leur BCR ou TLR dans le LES (Uccellini et al. 2008; Bekereditian-Ding et al. 2005). Une signature IFN est identifiée chez la plupart des patients, corrélant avec l'activité de la maladie (R. Banchereau et al. 2016; Chiche et al. 2014) et l'expansion des LB transitionnels (Dieudonné, Gies, et al. 2019). Les patients avec une forte sécrétion d'IFN de type I dans la moelle présentent une diminution des précurseurs B médullaires (pro, pré B et B immatures) et une expansion des cellules T1 et T2 médullaires (Palanichamy 2014). Des traitements ciblant les récepteurs à l'IFN de type I (IFNAR) ont fait leur preuve (Morand et al. 2022). Dans le modèle murin 3H9, une chaîne H issue d'un hybridome spécifique de l'ADNdb est insérée dans le locus de chaîne lourde, résultant en un répertoire B enrichi en BCR ADNdb réactifs (Ferri et al. 2023). Un taux élevé d'IFN α chez la souris 3H9, obtenu par transduction d'un adénovirus, aboutit à une fréquence augmentée d'IgM anti-ADNdb, une expansion des cellules du CG, une augmentation du ratio κ/λ et une diminution des V κ RS (équivalent murin des Kde). De plus, les cellules IgMa-Ig λ 1, hautement affines pour l'ADNdb dans le modèle, ont une expression augmentée de CD86 et de l'IgM, et sont enrichies dans le compartiment T2, folliculaire et dans le CG. Toutes ces caractéristiques sont reversées par la délétion conditionnelle d'IFNAR dans les LB, suggérant que l'IFN puisse altérer la tolérance centrale et

périphérique en perturbant l'édition du récepteur, la délétion clonale, et le maintien de l'anergie en périphérie. De façon intéressante, le titre d'autoanticorps d'isotype IgG et la fréquence d'ASC autoréactives ne sont pas augmentés, ce qui laisse penser que l'IFN n'impacte pas les checkpoints tardifs.

Le rôle des cytokines et des TLR est encore plus déterminant si la réponse B post antigénique se déroule proche des sites inflammatoires. Dans le LES, le Sjogren, la PR, des CG ectopiques au sein de structures lymphoïdes dites tertiaires ont été constatés dans le rein, les glandes salivaires ou la synoviale (Manzo et al. 2005; Chang et al. 2011; Bombardieri et al. 2017). L'environnement pro-inflammatoire, les débris nécrotiques ou corps apoptotiques activant les PRR, ou l'absence de cellules assurant leur clairance (comme les macrophages médullaires) propres à ces structures peuvent alors favoriser l'expansion de cellules autoréactives par *epitope spreading* (extension d'épitope) ou *bystander activation* (activation de cellules non spécifiques de l'antigène) (Cashman et al. 2019).

3. Conséquences de la rupture de tolérance

3.1 Un biais de répertoire

Dans les MAI, les preuves que les cellules B naïves autoréactives échappent aux filtres de tolérance sont nombreuses. La conséquence logique de checkpoints précoces défaillants serait un répertoire B naïf intégrant des BCR qui, dans des conditions physiologiques, auraient été éliminés. L'émergence du séquençage haut débit des régions variables d'Ig a permis de montrer des modifications significatives de répertoire B dans les MAI par rapport aux répertoires publiques. Une utilisation biaisée des segments VH4 a été constatée dans le LES, en particulier les gènes *IGHV4-39* et *IGHV4-34* (Tipton et al. 2015; Bashford-Rogers et al. 2019). La PR, la maladie coeliaque, la sclérose en plaque sont associées à une utilisation accrue des gènes *IGHV4-34*, *IGHV5-51*, *IGHV4-39* respectivement (Doorenspleet et al. 2014; Roy et al. 2017; Palanichamy 2014). D'autres familles sont sous-représentées, comme *IGHV2-5* dans la sclérodermie (de Bourcy et al. 2017). Une longueur accrue des CDR3 et une fréquence d'acides aminés chargés positivement dans la CDR3, caractéristiques des BCR poly/autoréactifs (Crouzier et al.

1995; E. Meffre et al. 2001; Schroeder and Kirkham 2000; Bashford-Rogers et al. 2019), sont retrouvées dans les B synoviaux de la PR (Doorenspleet et al. 2014). Des CDR3 de chaîne H plus longs sont aussi constatés dans les B naïfs de la sclérodermie (Glauzy et al. 2022). Les données concernant la fréquence des SHM sont contradictoires (Sfikakis et al. 2009; Tipton et al. 2015). Le séquençage des chaînes lourdes chez plus de 200 patients a récemment implémenté les connaissances du répertoire de six MAI ou inflammatoires, dont le LES et les vascularites à ANCA (anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophile) (Bashford-Rogers et al. 2019). Chez les patients lupiques, en comparaison à celles des sujets sains, les chaînes lourdes analysées présentaient : 1) une fréquence accrue des segments VH4 (dont *IGHV4-34, 39, 59*) à la fois dans le compartiment naïf et post antigénique ; 2) des CDR3 plus longs dans les LB switchés ; 3) une expansion clonale dans tous les isotypes, partiellement inversée sous immunosuppresseur (mycophénolate mofétil ou rituximab). Les caractéristiques des chaînes H étaient très variables d'une maladie à l'autre, comme illustré par les vascularites à ANCA où ni biais de familles VH ni expansion clonale n'étaient retrouvés.

L'analyse des réarrangements de chaîne κ donne des indications précieuses sur l'intégrité des mécanismes d'édition du récepteur. En effet, l'utilisation préférentielle des gènes $V\kappa$ distaux et des gènes J proximaux ($J\kappa 1$ plutôt que 4 ou 5) suggère un défaut de recombinaison secondaire. Un tel profil de réarrangement κ est retrouvé chez les patients lupiques et chez certains patients atteints de PR (Bensimon et al. 1994; Samuels et al. 2005; Yurasov et al. 2005; Eric Meffre and O'Connor 2019). Des LB exprimant deux chaînes légères d'isotypes différents dans le LES ont aussi été décrits, ce qui pourrait constituer un élément en faveur d'une recombinaison du Kde et d'une exclusion allélique déficientes (Fraser et al. 2015). Des biais d'usage $V\lambda$ sont également retrouvés (notamment $V\lambda 4$ dans le LES), mais les données divergent (Foreman et al. 2007).

3.2 Une contribution diverse des LB aux manifestations auto-immunes

La constatation d'un répertoire biaisé et l'accumulation de LB autoréactifs en périphérie ne signifient pas que ces cellules ont un effet pathogénique dans les MAI. La contribution directe des LB est fortement suggérée par les anomalies phénotypiques B rencontrées dans les MAI et l'efficacité des thérapies ciblant les LB. Les anticorps monoclonaux anti-CD20, comme le rituximab, ont largement démontré leur efficacité dans la PR ou les

vascularites à ANCA (Edwards et al. 2004; Stone et al. 2010). Dans le LES, bien que la déplétion des cellules B améliore la maladie dans le modèle MRL/lpr, les résultats des anti-CD20 en clinique sont plus mitigés (Ahuja et al. 2007). Toutefois, l'efficacité des CAR-T cells anti-CD19 replace aujourd'hui les LB au centre de la physiopathologie (Mackensen et al. 2022).

L'action pathogénique des LB peut résulter des **fonctions lymphocytaires B indépendantes des autoanticorps**. En 1999, l'équipe de Schlomchik a généré des souris lupique MRL/lpr dont les LB présentaient des Ig de surface ne pouvant pas être secrétées. Ces souris ont des LB mais pas d'anticorps circulants, et pourtant elles développent un phénotype lupus-like sans dépôts d'autoanticorps (Chan et al. 1999). De plus, chez la souris lupique (NZBxNZW)F1, la déplétion des LB par anti-CD20 permet une amélioration de la maladie sans changement notable du taux d'autoanticorps, et, chez certains patients lupiques, une amélioration clinique est constatée plusieurs mois avant la baisse d'autoanticorps dans le sérum (Bekar et al. 2010; Looney et al. 2004). Ce rôle anticorps-indépendant passe aussi bien par leur potentielle capacité de cellules présentatrices d'autoantigène, que par la perturbation des fonctions des Brég chez les patients lupiques (Blair et al. 2010; Menon et al. 2016). L'une des clés de cette action réside également dans la capacité des LB à produire des cytokines modulant aussi bien la réponse humorale que cellulaire (Lund 2008). Ces cytokines peuvent réguler la formation et la maintenance des structures lymphoïdes ectopiques (en particulier la lymphotoxine- α), et le recrutement des TFH, permettant ainsi la maturation des LB autoréactifs (Aloisi and Pujol-Borrell 2006; Ebert et al. 2004). Ces LB producteurs de cytokines sont donc nécessaires à l'induction et la maintenance d'une réponse immune anormale et permettent une exacerbation de la maladie (Cashman et al. 2019).

La principale contribution des LB autoréactifs reste cependant **anticorps dépendante**. Les anticorps répondant aux critères suivants sont généralement considérés comme pathogéniques : (a) détection exclusive chez les patients présentant une pathologie de la maladie, (b) transfert passif chez les animaux et/ou transfert placentaire aux nouveau-nés induisant une pathologie équivalente, et (c) initiation de dommages cellulaires et/ou d'inflammation dans des tests fonctionnels pertinents (Bona 1991). Les autoanticorps qui satisfont à l'ensemble de ces critères sont le plus souvent observés dans les MAI spécifiques d'organe, comme, les anticorps dirigés contre des Ag érythrocytaires dans

l'anémie hémolytique auto-immune, les anticorps anti-desmoglérine dans le pemphigus vulgaire, les anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine dans la myasthénie. Ils peuvent induire des dommages par lyse cellulaire directe, action sur des récepteurs, recrutement d'autres médiateurs inflammatoires (Ludwig et al. 2017). Le rôle pathogénique des autoanticorps, responsables de lésions cutanées, rénales, myocardiques après transfert passif, a aussi été largement démontré dans le LES (Yung and Chan 2012; Buyon et al. 1990; Iñaki Sanz 2014). Parmi eux, les anti-ADNdb semblent corrélés à l'activité de la maladie et ils peuvent contribuer directement à l'atteinte rénale et cérébrale (Maddison and Reichlin 1979; ter Borg et al. 1990). En plus de leur rôle conventionnel par hypersensibilité de type II (cytotoxicité anticorps dépendante) et de type III (dépôts de complexe immuns), les autoanticorps peuvent former des complexes immuns contenant des acides nucléiques, et activer les LB autoréactifs (via l'engagement BCR/TLR) ou les pDCs spécialisées dans la production d'IFN de type I (Rönnblom et al. 2001). Ces mécanismes de pathogénicité dans le LES sont illustrés par les défauts en DNASE1L3, une endonucléase de l'ADN qui participe à l'élimination des débris d'ADN et le rend moins immunogène dans les particules apoptotiques. Une réduction de cette enzyme, constatée chez les patients avec mutation null ou hypomorphe, ainsi que chez les souris MRL/lpr et (NZB/NZW)F1, aboutit à des manifestations lupiques (Al-Mayouf et al. 2011; Carbonella et al. 2017; Wilber et al. 2003). L'ADN extra cellulaire y stimule la production d'IFN α TLR dépendante, précipitant une différenciation extra-folliculaire des LB sécrétant des anti-ADNdb à l'origine de lésions tissulaires (Soni et al. 2020). Environ 30% des LES et plus de 50 % des patients avec atteinte rénale présentent des anticorps avec activité neutralisante de la DNASE1L3, pouvant agir comme une phénocopie des déficits en DNASE1L3 (Hartl et al. 2021; Vinuesa, Grenov, and Kassiotis 2023). L'analyse d'anticorps mutés IGHV4-34+ avec réactivité double contre la DNASE1L3 et l'ADNdb montre qu'ils dérivent d'un précurseur germinale déjà réactif contre DNASE1L3, acquérant une réactivité supplémentaire anti-ADNdb par les SHM (Gomez-Bañuelos et al. 2023). Si ces éléments n'apportent pas la preuve de leur rôle fondateur, ils suggèrent à minimum que les autoanticorps entretiennent la boucle d'amplification pathologique en favorisant le caractère immunogène des acides nucléiques dans le LES. Le rôle directement délétère des autoanticorps a aussi été démontré dans d'autres connectivites comme le Sjögren et la PR (Sáez Moya et al. 2021; Broeren et al. 2022). Pour cette dernière, les anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) participent à la formation de complexes immuns activant le

complément et les cellules innées, ou agissent par effet agoniste sur certains récepteurs (Kuhn et al. 2006; Toes and Pisetsky 2019).

3.3 Des ASC aux propriétés singulières

Les ASC autoréactives sont à l'interface entre la rupture de tolérance B et les anticorps pathogènes, et, en ce sens, les principaux acteurs cellulaires B des MAI. Les PC à longue durée de vie autoréactifs du lupus sont localisés dans la moelle osseuse mais aussi dans les tissus inflammés, comme le rein en cas de glomérulonéphrite (Chu et al. 2009). De plus, la proportion d'ASC circulantes est largement augmentée en comparaison à des sujets sains en situation post vaccinale. La majorité des anticorps recombinants issus de ces ASC circulants sont réactifs contre l'ADNdb, la chromatine, les protéines SSA/Ro et ribosomales P, mais pas le *tétanos* ou le *virus* influenza (Tipton et al. 2015). Ils portent fréquemment le gène *IGHV4-34*, ce qui suggère que ce sont bien les LB échappant aux différents filtres de tolérance qui se différencient en ASC autoréactifs spécifiques. L'expansion des ASC se fait principalement aux dépens de cellules particulières, atypiques en périphérie, qui ressemblent à des PC à longue durée de vie médullaires, malgré un phénotype prolifératif Ki67+/HLA-DR+ : elles sont CD19-CD138+, un aspect cytologique vacuolisé (Ignacio Sanz et al. 2023). L'analyse transcriptomique révèle un profil de résistance à l'apoptose et leur survie *in vitro* est accrue, mais reversée lorsque la production autocrine d'APRIL ou d'IL-10 est bloquée. Elles expriment fortement CXCR3 en cas de LES actif, ce qui pourrait favoriser leur migration dans les sites inflammatoires et fortement CXCR4, suggérant qu'elles sont destinées à rejoindre la moelle osseuse et à devenir des PC à longue durée de vie.

Les PC à longue durée de vie producteurs d'autoanticorps sont peu accessibles aux traitements, probablement de par leur caractère peu proliférant et leur localisation restreinte aux niches médullaires. Ayant perdu l'expression de molécules B comme le CD20, ils ne sont pas ciblés par les anticorps monoclonaux comme le Rituximab. L'intérêt des thérapies spécifiques du compartiment plasmocytaire par des molécules comme les inhibiteurs du protéasome (bortezomib) ou des anticorps monoclonaux anti-CD38 (daratumumab) est croissant (Alexander et al. 2015; Ostendorf et al. 2020; McGlothlin et al. 2023). L'efficacité de ces thérapies, et notamment des anti-CD38, se heurte à certaines propriétés des PC à longue durée de vie. Les PC restent difficiles à cibler. L'analyse de la

trajectoire en cellule unique des PC médullaires révèle qu'ils évoluent progressivement vers un phénotype tardif avec baisse d'expression du CD38 et un profil de résistance à l'apoptose (Duan et al. 2023). Ces PC tardifs persistent sous traitement par daratumumab.

Une illustration de cette difficulté à cibler les PC à longue durée de vie a notamment été apportée dans le PTI. L'identification des ASC autoréactifs a pu être réalisée en utilisant une technique d'encapsulation des cellules mononuclées avec la GPIIb-IIIa, où la sécrétion d'anticorps spécifiques dans la gouttelette génère un signal fluorescent (DropMap) (Canales-Herrerias et al. 2022). Des ASC de haute affinité pour la GPIIb-IIIa ont été détectés dans le sang, la rate et la moelle. Chez les patients traités par anti-CD38, après échec de splénectomie ou Rituximab, la fréquence d'ASC autoréactifs circulants était drastiquement réduite. Néanmoins, chez un patient en échec de daratumumab, la proportion de PC autoréactifs dans la moelle ne changeait pas sous traitement. Ces résultats suggèrent que ces PC soient résistants ou que de nouveaux puissent être générés à partir d'autres sites comme les ganglions. La deuxième hypothèse était soutenue par le fait qu'un autre patient ait rechuté à l'arrêt du daratumumab.

4. Conclusion : Du BCR autoréactifs aux anticorps pathogènes, un processus multi-étapes

Les preuves de la rupture de tolérance dans les MAI, les hypothèses mécanistiques sous-jacentes, et le rôle pathogénique des autoanticorps en résultant ont été évoqués. Toutefois, la détection d'autoanticorps chez des sujets sains, ou plusieurs années avant les premières manifestations cliniques, suggère que leur présence est nécessaire mais non suffisante (Theander et al. 2015; Rantapää-Dahlqvist et al. 2003; Arbuckle et al. 2003). Quels sont les facteurs ou étapes favorisant le passage d'une phase avec autoanticorps "bénins" à une authentique MAI ? Un environnement inflammatoire, un trigger infectieux, une prédisposition génétique sont autant d'hypothèses plausibles. Cette transition pourrait aussi résulter d'une accumulation d'autoanticorps différents, ou de modifications des propriétés ou du titre d'un autoanticorps donné. Le phénomène d'*epitope spreading* a bien été démontré pour les anti-Sm dans le LES, où des autoanticorps reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène apparaissent progressivement (James et al. 1995). D'autre part, des modifications post traductionnelles peuvent moduler la pathogénicité

des autoanticorps : 90% des ACPA sont glycosylés dans leurs domaines variables chez les patients avec PR, un processus qui module leur durée de vie et la liaison aux épitopes citrullinés (Kissel et al. 2022). Ce mécanisme nécessite un site de N-glycosylation (séquence /X/arginine) qui confère également un avantage sélectif lorsqu'il est induit par les SHM (Vergroesen et al. 2018).

D'après leurs résultats obtenus sur les LB autoréactifs à activité facteur rhumatoïde (FR), l'équipe de J.H. Reed a proposé un modèle où l'accumulation d'évènements mutationnels successifs intrinsèques à un clone B aboutirait à la production d'anticorps pathogènes de haute affinité (Singh et al. 2020). Le FR est un anticorps d'isotype IgM reconnaissant le fragment Fc des IgG. Il s'agit d'un exemple d'anticorps pouvant être bénin ou pathogénique. Les anticorps FR peuvent être détectés chez des sujets sains, notamment en contexte post vaccinal. Ils sont possiblement retrouvés dans la PR, le LES, le GS, et peuvent être directement responsables de manifestations de vascularite cryoglobulinémique dans laquelle le complexe FR-IgG précipite au froid (Desbois et al. 2019). Pour explorer les déterminants précipitant un FR « bénin » vers la pathogénicité, les auteurs ont analysé et suivi l'évolution des FR chez des patients atteints de GS et de vascularite cryoglobulinémique liée à une cryoglobuline de type 2, c'est-à-dire d'un complexe IgG polyclonales-IgM kappa monoclonale. Les FR ont été détectés par leurs idiotypes, dont le plus fréquent, Wa, est conféré par l'association des gènes des *IGHV1-69*, *IGJH4* et *IGVK3-20*. Ces anticorps étaient mutés et la réversion germinale leur faisait perdre leur activité FR et cryoprécipitante. Le séquençage VDJ et l'analyse génomique en *single cell* des LB Wa+ ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques impliquant des gènes clés de la lymphomagenèse comme *CARD11*, *CCND3*, *KLHL6*, *TNFAIP3*, pouvant favoriser dans les clones autoréactifs : i) l'activation et les fonctions effectrices ; ii) la survie et la prolifération ; iii) la survenue de SHM. La perte de fonction de *KLHL6* était notamment responsable d'une augmentation de la fréquence des SHM dans les clones mutés. De façon intéressante, le suivi des LB Wa+ avant et après le développement des manifestations cliniques a montré que les mutations somatiques de la lymphomagenèse apparaissaient dans un premier temps, suivie de l'accumulation aléatoire de SHM dans les régions variables de l'Ig. Seuls les clones Wa+ porteurs de mutations VDJ modifiant la solubilité du complexe anticorps-antigène, et non l'affinité pour l'antigène, avaient une activité cryoprécipitante. Au total et selon ce concept, le

développement d'une auto-immunité B médiée résulterait d'une cascade de mutations somatiques permettant successivement à certains LB autoréactifs d'échapper aux filtres de tolérance, de s'expandre, et d'exprimer un anticorps devenu pathogène selon un processus stochastique (Reed 2022) qui rappelle celui de l'évasion clonale dans les cancers (Goodnow 2007). Il reste à déterminer si ce modèle, également décrit chez les patients avec syndromes ALPS (auto-immun lymphoprolifératif) où des mutations somatiques de *FAS* dans certains clones B confère un phénotype plus sévère (Janda et al. 2016), peut s'appliquer à d'autres MAI impliquant plusieurs autoanticorps comme le LES, la PR ou le SAPL.

Ainsi, de nombreuses données montrent un rôle pathogène des LB dans le LES et d'autres MAI, résultant d'un défaut de tolérance à différents stades du développement lymphocytaire B et de la maturation des autoanticorps. La **Figure 14** résume schématiquement ces étapes de tolérance B impactées dans le LES.

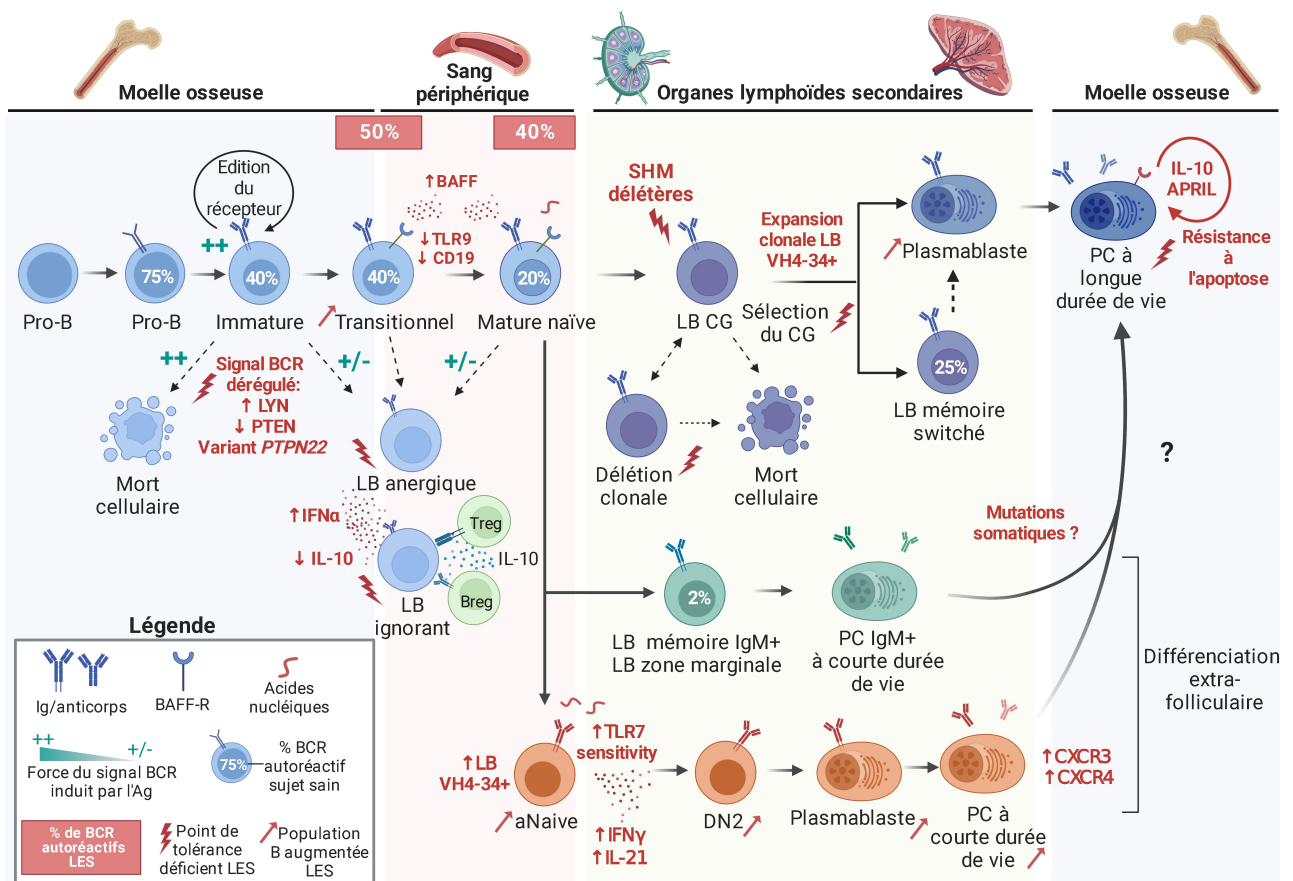


Figure 14 : Tolérance B et LES. Le pourcentage en blanc dans les cellules B représente le pourcentage de BCR autoréactifs pour chaque sous-population B respective chez le sujet sain, lorsqu'il est connu. Les éléments en rouge sur la figure sont propres au LES. Le pourcentage dans les rectangles rouge correspond au pourcentage de BCR autoréactifs pour chaque sous-population B respective dans le LES, lorsqu'il est connu. Les flèches rouges illustrent une augmentation de fréquence de la sous-population B correspondante dans le LES. L'éclair rouge représente un point de tolérance impacté. Les acteurs supposés être impliqués dans le dysfonctionnement de ces checkpoints sont également représentés, de façon non exhaustive. *Fait avec Biorender.*

Dans la partie suivante, nous exposerons un cas d'auto-immunité familiale liée à une perte de fonction d'un facteur de transcription clé dans la lymphopoïèse B précoce et la maturation d'affinité, IKAROS. Cet exemple illustre le lien entre ontogenèse B, rupture de tolérance et MAI, et fera le lien avec le SAPL, une maladie à autoanticorps ou le rôle des LB est encore mal compris.

III. Auto-immunité et déficit en Ikaros

IKAROS est un facteur de transcription avec motifs en doigt de zinc (ZF pour *zinc finger*) codé par le gène *IKZF1*. Avec AOILOS, HELIOS, PEGASUS, il appartient à la famille des facteurs de transcription IKAROS, régulateurs du lignage hématopoïétique. IKAROS, agit en homo- ou hétérodimère et modifie l'accessibilité à l'ADN de différents gènes par remodelage de la chromatine en recrutant notamment des complexes histone déacétylase (Sellars et al. 2011). *IKZF1* contient 7 exons chez l'homme, un domaine N-terminal de liaison à l'ADN avec quatre répétitions ZF et un domaine C-terminal de dimérisation avec deux ZF. L'épissage alternatif génère plus de huit isoformes d'IKAROS, se liant ou non à l'ADN en fonction de la présence du domaine N terminal (Francis et al. 2011). Le rôle crucial de IKAROS dans la lymphopoïèse a été démontré chez la souris. La mutation *IKZF1 H191R* homozygote (IKAROS plastic), inactivant la liaison à l'ADN, est létale et induit l'absence complète de différenciation T/B/NK. Elle inhibe la différenciation B à l'état hétérozygote (Papathanasiou et al. 2003). La délétion du domaine C terminale (IKAROS *null*) entraîne également un arrêt du développement lymphocytaire (J.-H. Wang et al. 1996). Dans le lignage B, IKAROS était initialement connu pour agir comme un suppresseur de tumeur. Des variants somatiques de *IKZF1*, agissant par perte de fonction, sont décrits dans la leucémie aigüe lymphoblastique B où ils confèrent un pronostic péjoratif (Mullighan et al. 2009; Kastner et al. 2013). Là encore, les modèles murins ont précisé le rôle d'IKAROS dans l'ontogenèse B physiologique. Dans le modèle *IKZF1^{1/1}*, l'insertion d'un gène rapporteur dans l'exon 2 résulte en une protéine tronquée partiellement fonctionnelle et dont l'expression est réduite de 90% (Kirstetter et al. 2002). L'analyse des LB de ce modèle hypomorphe révèle un bloc entre le stade proB-préB, un défaut de répression de la pseudo chaîne légère, d'exclusion allélique, une diminution des protéines RAG et TdT (Sellars et al. 2011). Ces résultats sont B intrinsèques puisque retrouvés lorsque IKAROS est inactif sélectivement dans les pro- et pré-B (Heizmann et al. 2013). En périphérie, les souris présentent une réduction significative des CG et une diminution de la commutation vers IgG1 et 3 consécutive à une accessibilité réduite de AID à certaines régions S. Les LB folliculaires ont un seuil d'activation abaissé et une expression réduite de molécules co-inhibitrices. Le modèle *Cd23-Cre Ikzf1^{fl/fl}* inactivant IKAROS dans les cellules B folliculaires et de la zone marginale induit un défaut d'anergie, une réponse exacerbée à la stimulation TLR9 (Schwickert et al. 2019) et l'apparition

d'autoanticorps. L'ensemble de ces données suggère qu'IKAROS joue non seulement un rôle dans le développement B précoce, dans la maturation d'affinité secondaire des LB, mais aussi dans le maintien de leur tolérance.

Chez l'Homme, l'implication d'IKAROS dans la tolérance a été suggérée par la découverte de variants associés au LES dans les études GWAS (Han et al. 2009). Récemment, plusieurs variants germinaux hétérozygotes d'*IKZF1* ont été décrits. Les variants gain de fonction sont associés à des complications prolifératives plasmocytaires, inflammatoires et atopiques (Hoshino et al. 2022). D'autres entraînant une perte de fonction d'IKAROS, ont été identifiés chez des patients atteints de déficit immunitaires primitifs (ou IEI pour *inborn error of immunity*) et parfois d'auto-immunité. Les mutations affectant l'acide aminée N159, localisé dans le domaine de liaison, agissent par effet dominant négatif et entraînent un déficit immunitaire combiné avec infections opportunistes (Boutboul et al. 2018; Kellner et al. 2019). Des variants affectant le domaine de dimérisation sont retrouvés en contexte de cytopénies auto-immunes et lymphoprolifération (Kuehn et al. 2020). Cependant, la plupart des mutations germinales, identifiées chez une soixantaine de patients en 2023, impliquent une délétion ou un faux-sens dans les domaines ZF2,3,4, altérant la liaison à l'ADN et agissant par haploinsuffisance, avec une pénétrance incomplète (Goldman et al. 2012; H. S. Kuehn et al. 2016; Bogaert et al. 2018; Hoshino et al. 2017; Van Nieuwenhove et al. 2018; Sriaroon et al. 2019; Eskandarian et al. 2019; Q. Chen et al. 2018; Groth et al. 2020; Kuehn, Boast, and Rosenzweig 2023). Les différents variants publiés sont résumés dans la **Figure 15**. Le phénotype associe un déficit humoral avec infections sino-pulmonaires répétées, une hypogammaglobulinémie, une lymphopénie B d'aggravation progressive et une lymphopénie CD4+. Certains patients présentent également des anomalies B centrales avec blocage de différenciation médullaire au stade B précoce et évolution vers une LAL-B. Des manifestations auto-immunes sont retrouvées chez près de 30% des patients, incluant des LES, thyroïdites, cytopénies ou hépatites auto-immunes (Kuehn, et al. 2021).

Nous décrivons le cas d'une famille au sein de laquelle un variant hétérozygote d'*IKZF1* responsable d'une perte de fonction d'IKAROS par haploinsuffisance, a été identifié chez trois sujets. Outre une hypogammaglobulinémie, le cas index a développé un SAPL primaire sévère, sa sœur un LES et SAPL secondaire, et son père des ANA. Ce cas représente la deuxième association décrite entre SAPL haplo-insuffisance d'IKAROS.

Compte tenu du rôle joué par IKAROS dans le développement B, il interroge sur les mécanismes de rupture de tolérance impliqués dans le développement du SAPL.

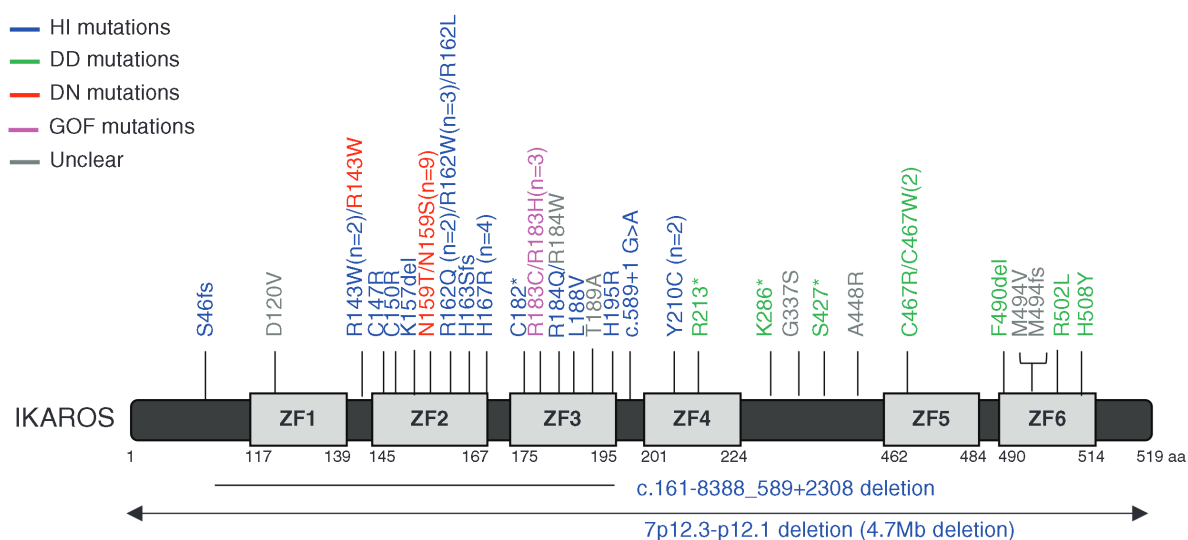


Figure 15 : Variants germinaux d'*IKZF1* associés aux IEL. (Kuehn et al., 2023).

Les variants à l'origine d'une haploinsuffisance sont représentés en bleu, ceux agissant par un effet dominant négatif en rouge, ceux affectant le domaine de dimérisation en vert. Les mutations agissant par gain de fonction sont représentées en violet. Le nombre à côté des mutations représente le nombre de familles différentes portant la même mutation.

PAPIER 1

Dieudonné Y. Guffroy A., Vollmer O., Carapito R., Korganow A.S.

IKZF1 loss-of-function variant causes autoimmunity and severe familial antiphospholipid syndrome

Journal of Clinical Immunology. 2019. 39: 353–357.



IKZF1 Loss-of-Function Variant Causes Autoimmunity and Severe Familial Antiphospholipid Syndrome

Yannick Dieudonné^{1,2,3} · Aurélien Guffroy^{1,2,3}  · Olivier Vollmer² · Raphael Carapito^{3,4,5} · Anne-Sophie Korganow^{1,2,3}

Received: 8 March 2019 / Accepted: 6 May 2019 / Published online: 14 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

To the Editor,

Ikaros is a transcription factor with key roles in lymphocyte development and homeostasis. It is encoded by the IKAROS family zinc finger protein 1 (*IKZF1*) gene, which contains highly conserved N-terminal and C-terminal zinc finger domains and is highly expressed in hematopoietic cells. The functions of Ikaros were first illustrated in different sets of *IKZF1*-deficient mice. In humans, *IKZF1* loss-of-function (LOF) somatic variants are associated with leukemogenesis in B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) [1]. More recently, different germline heterozygous variants, acting either by haploinsufficiency or by a dominant negative effect in *IKZF1*, were identified in autosomal dominant forms of common variable immunodeficiencies (CVID) or combined immunodeficiencies (CID) [2–4]. A series of families showed a progressive loss of B cells and hypogammaglobulinemia, but the absence of symptoms in several mutated patients suggests an incomplete penetrance. Additional germline mutations were described in patients with hypogammaglobulinemia associated with autoimmune manifestations, including vasculitis, juvenile-onset arthritis, or systemic lupus erythematosus (SLE) [5–7].

Here, we describe a two-generation non-consanguineous Caucasian family with three patients—the father (I.1), his son (II.1), and his daughter (II.2)—carrying a heterozygous *IKZF1* variant (c.500A>G; p.H167R) (Fig. 1a). The two children (II.1 and II.2) had antiphospholipid syndrome (APLS) in the context of a previous CVID and SLE diagnosis respectively, with autoimmune thrombosis and aberrant production of antiphospholipid antibodies (APLs) such as anticardiolipid, anti- β 2gPI, or antiprothrombinase antibodies. Familial cases of APLS are very rare. One case of secondary APLS (in a juvenile-onset SLE patient) associated to another *IKZF1* deleterious variant has been already described [4]. We present the cases in the context of literature and discuss the potential implications of our findings.

Case 1

The index patient (II.1) was diagnosed with juvenile-onset CVID at the age of 14 after a bacterial pneumonia and a septic shock. Polyvalent immunoglobulin replacement therapy was then initiated (IVIg). According to the pediatrician reports, his

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10875-019-00643-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Anne-Sophie Korganow
korganow@unistra.fr

¹ CNRS UPR 3572, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

² Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

³ UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴ Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, plateforme GENOMAX, INSERM UMR_S 1109, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), LabEx TRANSPLANTEX, Université de Strasbourg, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France

⁵ Service d'Immunologie Biologique, Plateau Technique de Biologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

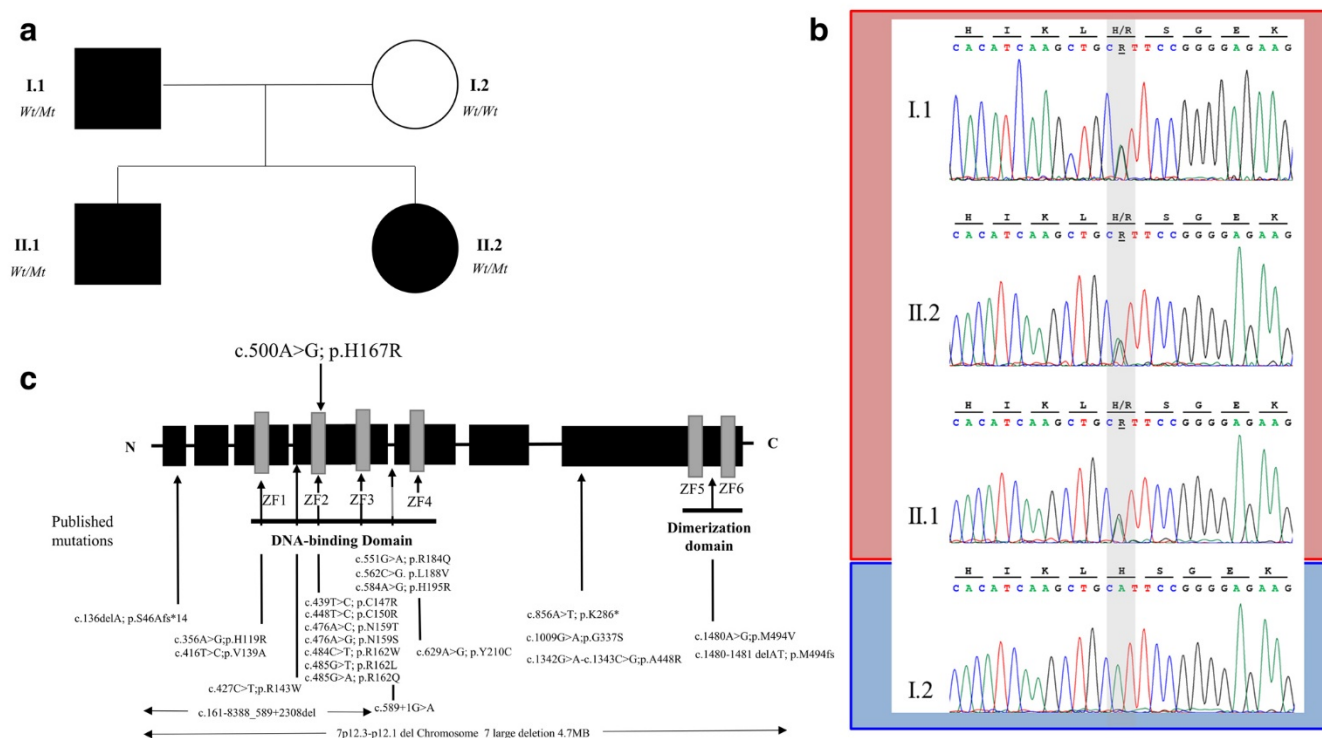


Fig. 1 Genetic variants of the family with *IKZF1* mutation c.500A>G. Pedigree of the family (a), Sanger sequencing of *IKZF1* mutation (b), and localization of described mutations on *IKZF1* gene (c)

early medical history included a severe pneumonia that was rapidly followed by an adrenocortical hemorrhage, a reversible ischemic neurological deficit, a thrombosis of the left arm, and a transient renal failure with proteinuria. MRI revealed several vascular cortical defects of venous origin. The search for anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant (LA) was positive, allowing a diagnosis of APLS that was treated with anticoagulant and high doses of steroids. The diagnosis of catastrophic antiphospholipid syndrome was very likely considering that more than 3 organs were involved with renal failure and signs of disseminated intravascular coagulation. However, no biopsy was performed, in view of thrombocytopenia and the absolute need for anticoagulation [6]. He was first referred to the adult Clinical Immunology department (Strasbourg University Hospital) at the age of 19. At that time, he was free of infection and of any clinical manifestations, and his treatment consisted of prednisone, fluidione, and IVIg. ANA (antinuclear antibodies) were positive at 1/1280 without specific staining pattern. Antiphospholipid antibodies included high levels of IgM anticardiolipin and anti- β 2gp1 antibodies, as well as LA (Table 1). Hypocomplementemia (low C3 and C4) was constant. The patient was then followed during several years under IVIg therapy and anticoagulant. Steroids were slightly decreased. He had at least 3 unexplained episodes of pneumonia that spontaneously regressed. He also presented several episodes of herpes infections and warts on both feet. He was then lost to follow-up. At the age of 24, the last laboratory

examination showed normal Ig levels (under substitution) and still very high levels of IgM antiphospholipid antibodies with hypocomplementemia. He was again referred to our department at the age of 32 after the removal of a thrombosed implantable port, considering the occurrence of fever and a local hematoma. At that time, he was free of therapy except low-dose heparin in tandem with fluidione. He complained about abdominal and thoracic pain. Laboratory examination showed high levels of IgM APL antibodies, IgG APL antibodies, LA, hypocomplementemia, inflammatory syndrome, and high troponin level. Echocardiography and cardiac MRI confirmed cardiac microvascular disease with a favorable evolution under fluidione and aspirin. Further immunological analysis revealed subnormal levels of IgG, low lymphocyte counts with low CD4, and low B cell numbers. A more detailed immune profiling (Supplementary Fig. 1) revealed that memory CD27⁺ B cells were particularly affected. CD24⁺CD38⁺ transitional B cells and CD21^{low}CD38^{low} B cells (both considered to be possible reservoirs of autoreactive B cells) remained unchanged in percentages compared with healthy donors (HDs). CD4 lymphopenia was obvious with a subsequent decrease in all CD4 T cell subsets (Table 1 and Supplementary Fig. 1). However, memory T cells appeared more affected in percentages than in naïve and regulatory CD4 T cells (Tregs). Finally, as described for other CVID patients with auto-immune features, an important increase in the percentage of circulating T follicular helper type 1 (cTFh1) cells was observed [7].

Table 1 Clinical and immunological features of affected individuals

	I.1	II.1	II.2	I.2	Normal range
Age (years), sex (F/M)	57, M	32, M	24, F	57, F	
Age of onset (years)	Childhood	14	11	-	
Bacterial infections	+	+	+	-	
Other infections	-	+ (HSV, HPV)	+ (HSV, HPV)	-	
Autoimmune cytopenia	ITP	-	-	-	
SLE manifestations	-	-	Nephritis (class V), arthritis	-	
Other autoimmune diseases	-	-	-	-	
Thromboembolic events (A/V, arterial/venous)	-	+ (A, V)	+ (A)	-	
Auto-antibodies	+	+	+	-	
ANA (titer and pattern)	1/1280 (nucleolar)	1/1280 (nucleolar)	1/1280 (speckled, nucleolar)	-	< 1/320
Anti-dsDNA (titer, U/mL)	-	-	313	-	< 50
Anticardiolipin (titer, U/L)	-	IgM (4880), IgG (62)	IgM (34), IgG (14)	-	0–0.1
Anti β 2 GP-I (titer, U/L)	-	IgM (7191)	IgM (57)	-	0–18
Lupus anticoagulant	-	+	+	-	
Hypocomplementemia	+ (C4)	+ (C3, C4)	+ (C3, C4)	-	
IgG (g/L)	7.9	6.33	6.1	NA	7.2–14.7
IgM (g/L)	ND	2.75	1.14	NA	0.48–3.1
IgA (g/L)	ND	< 0.22	0.49	NA	1.1–3.6
Normal vaccinal response ^a	+	-	+	NA	
Lymphocytes (count/ μ L)	1315	1038	1085	NA	1600–2400
CD3 ⁺	1218	849	936	NA	1100–1700
CD3 ⁺ CD4 ⁺	334	232	560	NA	700–1100
CD3 ⁺ CD8 ⁺	887	554	231	NA	500–900
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	0.4	0.4	2.4	NA	1.0–3.6
NK CD56 ⁺ cells	56	NA	56	NA	200–400
CD19 ⁺ cells	30	46	66	NA	200–400

^aNormal vaccinal response was defined by adequate levels of antitetanus or antipneumococcal antibodies after vaccination considering laboratory reference values. ANA, antinuclear antibodies; *anti-dsDNA*, anti-double-stranded DNA; F, female; HSV, herpes simplex virus; HPV, human papilloma-virus; IgG/IgA/IgM, immunoglobulin G/A/M; ITP, immune thrombocytopenic purpura; M, male

Case 2

II.2 is the sister of II.1. She was diagnosed with juvenile-onset SLE and presented with arthritis and class V nephritis at the age of 11. Concomitantly, she was diagnosed with APLS with 2 episodes of chorea and triple positivity for APLs (LA, anticardiolipin, and anti- β 2gI.1 antibodies, of both IgG and IgM subtypes). At that time, cerebral MRI showed several small bilateral ischemic lesions. Laboratory testing revealed slight hypogammaglobulinemia and elevated levels of IgM. ANAs were positive with anti-ds DNA antibodies and C3, C4, and hypocomplementemia. The treatment consisted of 1 mg per kg prednisone and efficient anticoagulation. Her condition improved with the exception of recurrent buccal herpes infections and warts on both hands as her brother. Four years later, she was referred many times with distal polyarthritis sensitive to steroid therapy. Hydroxychloroquine was not used due to two episodes of exudative retinal detachment. Prednisone was

maintained at 5 to 10 mg per day to control the symptoms. At the age of 19, she was lost to follow-up. Her last treatment consisted of low-dose steroids, fluindione, and valaciclovir. She consulted in our department with her brother again at the age of 23. Laboratory values were stable with global lymphopenia (Table 1). She had no symptoms except for fatigue, subjective cognitive impairment, and trouble with attention. Physical examination was normal.

Case 3

I.1 is the father of II.1 and II.2. Medical anamnesis revealed that he presented several infections in childhood including bronchopneumonia and sinusitis. He reported a thrombocytopenia episode, chronic fatigue symptoms, and fibromyalgia. Blood analysis showed low IgA and high titers of ANAs without anti-dsDNA antibodies. Anticardiolipin antibodies

were negative but LA was found. Lymphocyte subset analysis revealed a predominantly CD4 T cell lymphopenia (Table 1).

Genetic Analysis and Discussion

Genetic variants were detected through whole exome sequencing (WES) of both patients II.1 and II.2, and their parents were filtered for rare coding variants predicted to be damaging (see [supplemental material](#)). The kindred's pedigree is shown in Fig. 1a. The father (I.1) and his children (II.1 and II.2) carried a c.500A>G substitution in *IKZF1* (NM_006060), resulting in a substitution of arginine for histidine at codon 167 (p.His167Arg). The segregation of the variant was confirmed by Sanger sequencing (Fig. 1b). No other deleterious mutations in genes known to be associated with monogenic forms of immunodeficiency or SLE were detected (Supplementary Table S1). Haploinsufficient variant c.500A>G (p.His167Arg) was previously reported as a LOF mutation in a family with three members affected by recurrent infections, but no autoimmunity. These mutated patients had a decrease in immunoglobulin levels, B cell lymphopenia, and an inverted CD4/CD8 T cell ratio, as in our patients. In this family, bone marrow examination indicated an incomplete blockade in B cell differentiation between the pre-B and the immature B cell stages [2].

To date, 77 patients with *IKZF1* LOF variants have been described in the literature (Supplementary Table S2). Most of them were affected by severe or recurrent bacterial infections [2, 3]. Reported heterozygous mutations in *IKZF1* (Fig. 1c) are associated with a decrease in *IKZF1* DNA binding leading to haploinsufficiency and a partial defect (CVID) [3–6, 8]. In some cases, heterozygous mutations of *IKZF1* lead to a dominant negative effect with a more severe phenotype (CID) [2]. In both cases, flow cytometry showed that the amounts of mutant proteins in T and B cells in cases of amino acid substitutions are comparable to those in cells from controls and that these mutant proteins are stable and able to enter into the nucleus. More recently, mutations have been reported in the C-terminal domain of IKAROS (dimerization domain) [7]. Twenty patients out of all patients described with *IKZF1* LOF variants (26%) suffered from autoimmune diseases. Autoimmune cytopenia (ITP and/or AIHA) was highly represented as in other PIDs [9]. All genotypes could be associated with autoimmune manifestations (Supplementary Table S3). In most cases, patients also developed infections and hypogammaglobulinemia, with progressive B cell lymphopenia and increased CD8⁺ T cells with inverted CD4:CD8 ratio (mainly in case of protein-positive haploinsufficiency mutations) [2]. Among these *IKZF1* mutated patients with autoimmunity, Van Nieuwenhoe et al. reported a girl with the heterozygous *IKZF1* variant c.562C>G. This patient presented with juvenile-onset SLE and venous thrombosis due to APLS (LA, IgM, and IgG anticardiolipid antibodies but no

anti-β2gpl antibodies). Systematic immunological analysis in the father also carrying the c.562C>G variant revealed the presence of LA and ANA [5].

To our knowledge, there is no unique explanation for autoimmunity in *IKZF1* immunodeficiency. Both *Ikzf1*^{−/−}-null mice or *Ikzf1*^{+/-}-dominant-negative mouse models argue for a role of Ikaros in early B cell development stages in the bone marrow (resulting in B cell lymphopenia and hypogammaglobulinemia) but also in the control of central tolerance via mechanisms that remain to be elucidated [10–12]. Other evidences argue for a peripheral process of tolerance breakdown. Despite normal counts, B cells harbor phenotypical abnormalities including a decreased of switched memory B cells (Supplementary Fig. 1A), a hyperresponsive state (increase proliferation, increase of the expression of CD69 activation marker, Erk hyperphosphorylation, increase of CD19 and CD22) [5], and an increase of survival of autoreactive memory and long-lived B cells [5]. The role of TFH cells could be discussed, considering the relative increase of cTFH1 T cells (supplementary Fig. 1B) also found in other PIDs with autoimmunity [8, 13]. Furthermore, a direct relation between *IKZF1* variants and autoimmune SLE-like diseases is suggested both by clinical phenotype of *IKZF1* immunodeficient patients and the association of common *IKZF1* polymorphisms in adult-onset SLE [14, 15].

Here, we describe 2 siblings with *IKZF1* mutation, presenting both a primary humoral and cellular immunodeficiency and APLS. One patient is affected with SLE and APLS (II.2), and the other one is considered to be primary severe APLS, likely CAPS (II.1) [16]. Hypothesis to explain the whole phenotype includes specific B and/or T cell tolerance impairment as well as a potential role of *IKZF1* in other cells (such as myeloid cells or platelets) where the protein is also expressed. Based on these findings, we suggest that families with APLS and/or SLE with primary hypogammaglobulinemia could be explored for *IKZF1* mutations, particularly when they display viral or recurrent bacterial infections and an inverted CD4/CD8 ratio. Such a diagnosis would impact both the treatment and the follow-up considering the autosomal dominant inheritance and the risk for B-ALL.

Acknowledgments We thank C. Bole and S. Hanein (Institut Imagine) for exome sequencing. We thank JL Pasquali and P Kieffer for clinical data. We thank S. Bahram for critical reading. We thank S Jung for her helpful comments.

Funding Information A.S.K., A. G, and Y. D are supported by grants from the French Ministry of Health (PHRC IR 2011), from the Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI), from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), and from the EU-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET.” R.C. is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX), MSD Avenir, and the INTERREG V European regional development fund (European Union) program (project 3.2 TRIDIAG).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453:110–4.
- Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, et al. Loss of B cells in patients with heterozygous mutations in IKAROS. *N Engl J Med*. 2016;374:1032–43.
- Boutboul D, Kuehn HS, Van de Vyngaert Z, Niemela JE, Callebaut I, Stoddard J, et al. Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2018;128:3071–87.
- Bogaert DJ, Kuehn HS, Bonroy C, Calvo KR, Dehoorne J, Vanlander AV, et al. A novel IKAROS haploinsufficiency kindred with unexpectedly late and variable B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:432–5 e7.
- Van Nieuwenhove E, Garcia-Perez JE, Helsen C, Rodriguez PD, van Schouwenburg PA, Dooley J, et al. A kindred with mutant IKAROS and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142:699–702 e12.
- Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, et al. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:223–31.
- Eskandarian Z, Fliegauf M, Bulashevskaya A, Proietti M, Hague R, Smulski CR, et al. Assessing the functional relevance of variants in the IKAROS family zinc finger protein 1 (IKZF1) in a cohort of patients with primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2019;10:568.
- Turpin D, Furudoi A, Parrens M, Blanco P, Viallard J-F, Duluc D. Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in COVID patients with non-infectious clinical complications. *Clin Immunol*. 2018;197:130–8.
- Fischer A, Provot J, Jais J-P, Alcais A, Mahlaoui N, Adoue D, et al. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:1388–93 e8.
- Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol*. 2002;32:720–30.
- Macias-Garcia A, Heizmann B, Sellars M, Marchal P, Dali H, Pasquali J-L, et al. Ikaros is a negative regulator of B1 cell development and function. *J Biol Chem*. 2016;291:9073–86.
- Wojcik H, Griffiths E, Staggs S, Hagman J, Winandy S. Expression of a non-DNA-binding Ikaros isoform exclusively in B cells leads to autoimmunity but not leukemogenesis. *Eur J Immunol*. 2007;37:1022–32.
- Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N, et al. The T_H1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:730–40.
- He C-F, Liu Y-S, Cheng Y-L, Gao J-P, Pan T-M, Han J-W, et al. TNIP1, SLC15A4, ETS1, RasGRP3 and IKZF1 are associated with clinical features of systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Lupus*. 2010;19:1181–6.
- Wang C, Ahlford A, Järvinen TM, Nordmark G, Eloranta M-L, Gunnarsson I, et al. Genes identified in Asian SLE GWASs are also associated with SLE in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet*. 2013;21:994–9.
- Legault K, Schunemann H, Hillis C, Yeung C, Akl EA, Carrier M, et al. McMaster RARE-Bestpractices clinical practice guideline on diagnosis and management of the catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. 2018;16:1656–64.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

IV. Syndrome des antiphospholipides primaire (SAPL)

1. Introduction

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une MAI caractérisée par la présence d'autoanticorps dirigés contre les phospholipides (aPL). Sa faible prévalence en fait une maladie rare (<1/2000) (Duarte-García et al. 2019). Il est dit primaire lorsqu'il n'est pas associé à une autre condition pathologique ou MAI, en particulier au LES. Les patients affectés par un SAPL développent des thromboses avec des complications veineuses, artérielles ou obstétricales parfois sévères (Garcia and Erkan 2018). Une forme extrême de la maladie, le syndrome catastrophique des antiphospholipides, est caractérisée par une atteinte microcirculatoire sévère entraînant des défaillances d'organes et grevée d'un pronostic sombre (Rodríguez-Pintó et al. 2016).

Le SAPL est directement lié à la pathogénicité d'un groupe hétérogène d'aPL interférant avec la coagulation et dirigés contre les cardiolipides, leurs cofacteurs, comme la β 2-glycoprotéine I (β 2-GP1), ou un complexe phospholipide-cofacteur. Le lupus anticoagulant (LA, aussi appelé anticoagulant circulant) correspond à une propriété fonctionnelle de certains aPL qui consiste à allonger les temps de coagulation *in vitro* (Pengo et al. 2009). Sa présence est fortement associée aux complications thrombotiques (Wahl et al. 1997; Groot et al. 2005; Galli et al. 2003). La persistance des aPL à 12 semaines d'intervalle est requise pour poser le diagnostic de SAPL selon les critères de Sydney (Wilson et al. 1999; Miyakis et al. 2006). Les patients avec « triple positivité », c'est-à-dire présentant un LA, des taux élevés d'anticorps anticardiolipides et anti- β 2-GP1 sont à haut risque de thrombose, avec un risque estimé à 5,3% par an (Pengo et al. 2005; 2011). D'autres aPL (anti-phosphatidylsérine, anti-phosphatidyléthanolamine, anti-annexinV, anti- β 2-GP1 d'isotype IgA...) sont dits « non classants » car exclus des critères de classification actuels. Leurs conséquences cliniques sont variables et débattues (Petri 2020). Les nouveaux critères ACR/EULAR 2023 ne les incluent pas, au contraire des manifestations non thrombotiques rencontrées dans le SAPL comme la thrombopénie, les atteintes valvulaires cardiaques ou encore microcirculatoires rénales (Barbhaiya et al. 2023) (Figure 16).

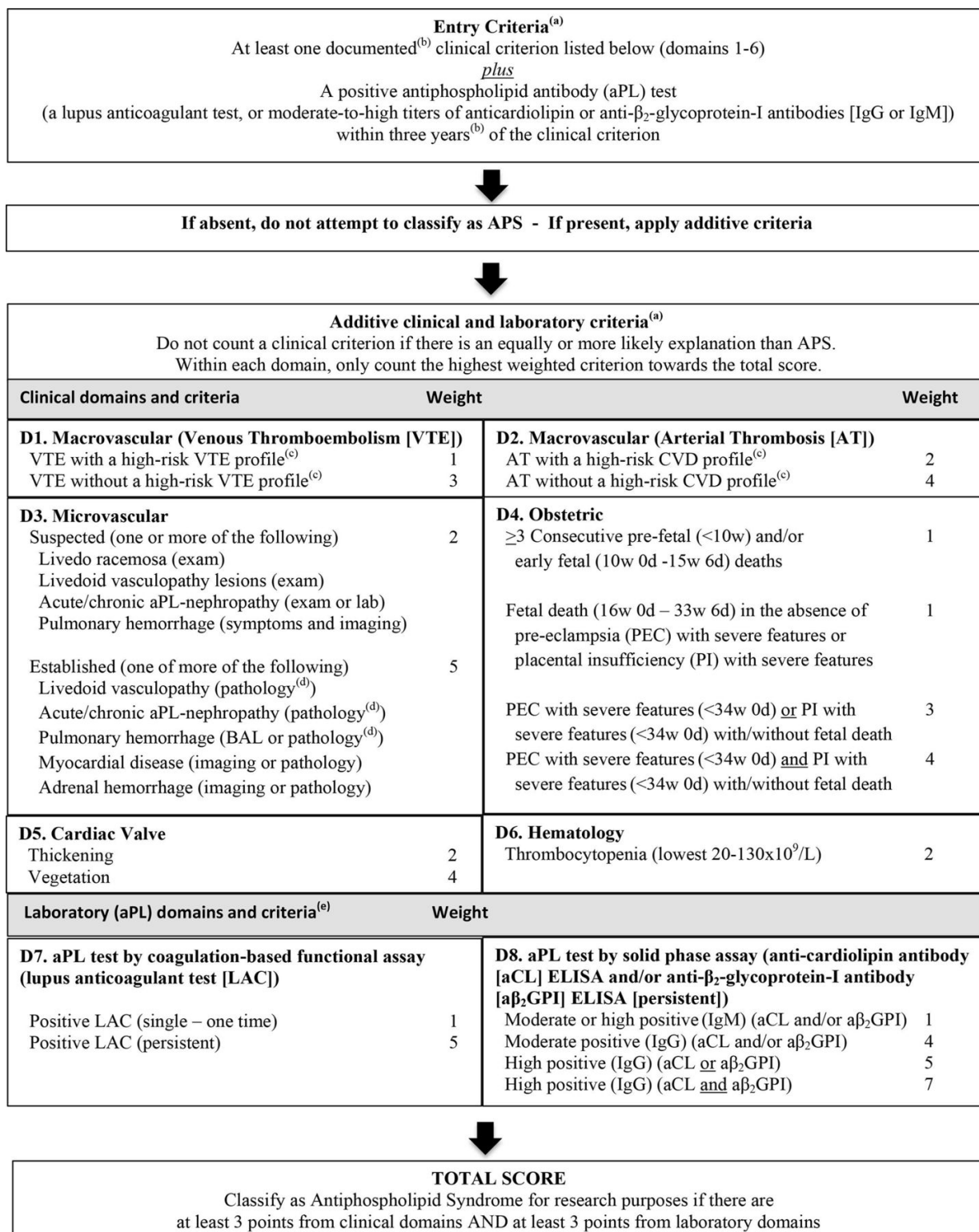


Figure 16 : Critères de classification ACR/EULAR 2023 du SAPL (Barbhaiya et al., 2023).

Le terme *persistent* se réfère à deux détections consécutives des autoanticorps à au moins 12 semaines d'intervalle.

Le rôle directement pathogène des aPL a été démontré, en particulier pour la β 2-GP1. Il s'agit d'une apolipoprotéine plasmatique considérée comme un inhibiteur naturel de la coagulation. Après liaison, le complexe β 2-GP1/anticorps peut engendrer une activation des plaquettes, des cellules endothéliales, des monocytes et des neutrophiles via différents récepteurs cellulaires (TLR 2,4, Annexine 2...), et conduire à l'état pro-coagulant (Arachchillage and Laffan 2017). Dans les modèles murins, le transfert passif d'IgG anti β 2-GP1 humain entraîne la formation de thrombus (Arad et al. 2011). Cependant, une lésion vasculaire préalable ou un contexte inflammatoire surajouté (activation des cellules innées via les TLR, activation du complément...) est nécessaire pour conduire à cet événement (Pierangeli et al. 2005; 2007). Comme le suggère la détection d'aPL chez des sujets sains et selon la théorie du « *second hit* », la présence des autoanticorps ne serait donc pas suffisante pour aboutir au phénotype clinique (Meroni et al. 2018).

Le SAPL pose un problème thérapeutique, notamment pour les patients avec triple positivité qui sont souvent exclus des études. A l'heure actuelle, les patients sont traités par anticoagulants au long cours (Tektonidou et al. 2019). Les thérapies immunomodulatrices ont été globalement décevantes. Celles ciblant les LB peuvent être efficaces sur les manifestations non classantes mais peinent à réduire le titre des autoanticorps (Erkan et al. 2013; Emmi et al. 2019; Dobrowolski et al. 2019; Yun et al. 2023; Bettiol et al. 2022; Chatzidionysiou et al. 2020). Néanmoins, les données récentes de la littérature ont replacé le LB au centre de la physiopathologie de la maladie. La description de cas de SAPL sévère monogénique, en contexte d'haploinsuffisance d'un facteur clé de l'hématopoïèse B, IKAROS, va dans ce sens (Dieudonné et al. 2019; Van Nieuwenhove et al. 2018). Soulignant le rôle du développement B périphérique et de la maturation des autoanticorps, il a été montré que des anticorps anti- β 2-GP1 humains d'isotype IgG reconnaissent un épitope d'une bactérie commensale du tube digestif, et qu'une immunisation avec ce « mimitope » de la β 2-GP1 conduit au développement d'aPL et à la thrombose chez la souris (Ruff et al. 2019).

2. Lymphocytes B et SAPL

Malgré le rôle central de LB dans la physiopathologie du SAPL, et contrairement à d'autres MAI médiées par les LB, les connaissances sur les anomalies des LB et la rupture de tolérance propre au SAPL primaire sont limitées. La revue ci-après fait un état des lieux de nos connaissances actuelles sur les LB dans cette pathologie.

PAPIER 2

Dieudonné Y. Guffroy A., Poindron V., Soulas-Sprauel P., Martin T.,
Korganow A.S., Gies V.

***B cells in primary antiphospholipid syndrome: Review and
remaining challenges***

Autoimmunity Reviews. 2021. 20 (5) :102798.



Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Review

B cells in primary antiphospholipid syndrome: Review and remaining challenges

Yannick Dieudonné^{a,b,c,*}, Aurélien Guffroy^{a,b,c}, Vincent Poindron^{a,b,c},
 Pauline Soulas Sprauel^{a,b,d}, Thierry Martin^{a,b,c}, Anne-Sophie Korganow^{a,b,c}, Vincent Gies^{a,b,d}

^a Université de Strasbourg, INSERM UMR - S1109, F-67000 Strasbourg, France^b Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Systemic Autoimmune Diseases (CNR RESO), Tertiary Center for Primary Immunodeficiencies, F-67000 Strasbourg, France^c Université de Strasbourg, Faculty of Medicine, F-67000 Strasbourg, France^d Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, F-67400 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Autoantibody
 Antiphospholipid syndrome
 B cell
 Tolerance
 Autoimmunity
 Thrombosis

ABSTRACT

It is now widely accepted that antiphospholipid antibodies (aPL) have direct pathogenic effects and that B cells, notably through aPL production, play a key role in the development of antiphospholipid syndrome (APS). Recent findings strengthened the implication of B cells with the description of specific B cell phenotype abnormalities and inborn errors of immunity involving B cell signaling in APS patients. In addition, it has been shown in preclinical models that cross-reactivity between APS autoantigens and mimotopes expressed by human gut commensals can lead to B cell tolerance breakdown and are sufficient for APS development. However, B cell targeting therapies are surprisingly not as effective as expected in APS compared to other autoimmune diseases. Elucidation of the B cell tolerance breakdown mechanisms in APS patients may help to develop and guide the use of novel therapeutic agents that target B cells or specific immune pathway.

1. Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder characterized by the presence of pathogenic autoantibodies directed against membrane phospholipids and/or their associated plasma proteins. Antiphospholipid antibodies (aPL) were first described by Hughes et al. in 1983 [1]. Annual incidence and prevalence are estimated at approximately 2 and 50 per 100,000 individuals [2]. Clinical features are related to a hypercoagulable state leading to obstetrical complications and/or venous or arterial thromboembolic events (TEs) affecting almost every organ system [3]. The criteria derived from the Sapporo classification revised in 2006 (Sidney) are quite consensual and require the association of one of these clinical manifestations and the persistence of “classical” aPL, namely lupus anticoagulant (LA), anti-cardiolipin antibodies (anti-CL) and anti-β2 glycoprotein I antibodies (anti-β2GPI) [4]. Patients may encompass non TEs manifestations or “non-classical” aPL (including phosphatidylserine/prothrombin complex, PS/PT, PE, or anti-annexin5A, Anx5A, antibodies) that are excluded from Sydney criteria due to a role that remain elusive [5].

Recently coronavirus disease 2019 (COVID-19) and the associated

abnormalities in coagulation measures have put the spotlight back on aPL occurrence and their clinical relevance. There are strong evidences that B cells, notably through aPL production, have a central role in APS pathogenesis. Paradoxically, B cell targeting therapies are somehow not as effective as expected considering experiences in other autoimmune diseases. Herein we propose a review that highlights the major role of B cells and autoantibodies in APS, and how they provide a window into the pathogenesis, the clinical features and the risk assessment in APS.

2. B cells: the leading role?

2.1. Pathogenesis of aPL

B cells contribute to APS pathogenesis notably through antibody production. The pathogenic mechanisms mediated by aPL have been largely supplied by animal models, especially for β2GPI-dependent aPL. In 1990 Mc Neil et al. found that the binding of aPL to cardiolipin requires the presence of β2GPI as a cofactor [6]. Passive transfer of purified human anti-β2GPI IgG, but not anti-β2GPI depleted IgG or normal human IgG, potentiates thrombosis formation in animal models after

* Corresponding author at: Université de Strasbourg, INSERM UMR - S1109, F-67000 Strasbourg, France.

E-mail address: yannick.dieudonne@chru-strasbourg.fr (Y. Dieudonné).

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102798>

Received 25 December 2020; Accepted 3 January 2021

Available online 13 March 2021

1568-9972/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

vessel injury or pre-treatment with lipopolysaccharide (LPS) [7,8]. Anti- β 2GPI also induce fetal losses or growth retardation in pregnant mice without the need of additional factors [9], and the prominent role of the β 2GPI/anti- β 2GPI complex is highlighted by the absence of thrombosis in β 2GPI deficiencies [10]. The binding of anti- β 2GPI antibodies to their antigen is dependent on β 2GPI conformation. β 2GPI comprised 5 domains, the fifth domain shielding the domain 1 epitope in the circular conformation form in plasma [11]. Autoantibodies do not bind this conformation form but β 2GPI binding to negatively charged structures (such as anionic phospholipids) induce conformational changes [12,13]. As a result, cryptic epitopes in domain I are exposed and the autoantibodies are able to recognize β 2GPI [14]. The type of interaction is also critical since human IgG anti- β 2GPI domain I (anti- β 2GPI-DmI) with high avidity induced significantly larger thrombi *in vivo* compared to anti- β 2GPI-DmI with poor avidity [15].

A part of APS pathophysiology is mediated by the disruption of AnxA5 shield over phospholipid bilayers, making them available for coagulation reactions [16]. Interestingly, anti- β 2GPI-DmI has been associated with significantly reduced AnxA5 anticoagulant activity in adults with aPL [17]. Nevertheless, considering β 2GPI-dependent aPL as the only ones with pathological relevance would be too straightforward, since aPL targeting other phospholipid-binding proteins (such as prothrombin) [18,19] or cofactor-independent aPL [20] may also exert thrombogenic effects in mice, but it has become increasingly evident that the phospholipid binding protein β 2GPI is the major antigenic target for thrombogenic aPL antibodies.

The pathogenic effects of aPL do not depend solely on the immunogenicity of the phospholipid, but also on the downstream effect of the autoantibodies. aPL or the phospholipid/antibody complex can activate multiple cells and factors that finally drive clot formation, which is the key event underpinning vascular manifestations. A non exhaustive list of such mechanisms is listed in Table 1.

2.2. B cell phenotype in APS

Despite the central role of aPL, little is known about B cell disturbance and characteristics of the aPL producing clones. Indeed, only few data on small cohorts are available concerning B cell phenotype in APS. A work assessing B cell phenotypic abnormalities in obstetric APS women described reduced memory B cells and increased percentage and absolute count of CD27⁺ IgM⁺ naive B cells in patients with history of TEs. This higher number of naive B cells was associated with lower serum levels of C4, higher levels of anti-CL and anti- β 2GPI IgG and with the development of thrombotic complications during follow-up [22]. The authors assumed that altered peripheral B cell differentiation and activation could bypass normal B cell differentiation leading to a bias toward plasma cell maturation. These results were confirmed on another cohort of 11 patients with thrombotic primary antiphospholipid syndrome (PAPS), which showed expansion of naive B cells as compared to controls, non-APS thrombotic patients, systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) patients [23]. An increased proportion of transitional B cells, a putative source of autoreactive B cells, was also noticed [23]. However, a recent work heightens the debate, showing a decrease of naive/immature B cell compartment only in obstetric PAPS patients [24]. Increase of CD19⁺CD5⁺ B cells percentage was found in PAPS patients with TEs, which can represent up to 20% of total B cells in this population [25]. CD5, firstly described in T cells, is not a distinctive marker but is highly expressed by B1 cells in humans, a subset producing natural polyreactive IgM with a repertoire biased toward bacterial and self-antigens [26]. An increase of CD5⁺ B cells have been described in several conditions, including SLE, RA, or chronic viral infections [27]. In APS, their number correlates with aPL IgM titers and most of them have reactivity against phospholipids [27]. Recently, Hisada et al. reported a decreased frequency of IL-10 producing regulator B cells (B-regs) and an increase of plasmablasts in 26 PAPS and 19 SLE/APS patients. This increase was associated with TLR7 SNP

Table 1

aPL and/or phospholipid/aPL complex-mediated prothrombotic and proinflammatory changes [9,12,19,21].

Actors	Binding	Consequences
Anticoagulant mediators		Inhibition of protein C activation inhibition of the tissue factor pathway inhibitor Inhibition of β 2GPI anticoagulant activity Inhibition of antithrombin activity Disruption of Anx5A
Endothelial cells	β 2GPI AnxA2 TLR2 TLR4	Expression of adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) Increase of tissue factor expression PP2A activation, decreased NO production inhibition of the TF pathway inhibitor and of the C reactive protein activity Proliferation through mTOR pathway activation IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- α release
Platelets	ApoER2 GpIbA	Platelet activation Increase of GPIIb-IIIa expression Thromboxan A2 synthesis
Monocytes	AnxA2 TLR2 TLR4	IL-1, IL-6, TNF α secretion Increase of tissue factor expression Increased intracellular ROS
Neutrophils	TLR4 C5a receptor	Increased NET release IL-8 secretion
Complement		Classical complement pathway activation Increased C5b-9 deposition on the cell surface
Trophoblast	β 2GPI	Increased trophoblast apoptosis Decreased trophoblast proliferation and migration Decreased production of hCG defective secretion of growth factors
Decidua		Inflammatory response in decidual cells Defective angiogenesis and spiral artery development

Anx, Annexin; β 2GPI, β 2 glycoprotein I; GP, Glycoprotein; hCG, Human chorionic gonadotropin; ICAM, Intercellular adhesion molecule; IL, Interleukine; NET, Neutrophil extracellular traps; NO, Nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; TF, Tissue factor; TLR, Toll-like receptor; VCAM, Vascular cell adhesion molecule.

rs38553839 and type I IFN upregulation [28]. Another soluble mediator that could dysregulate B cell survival and development is B-cell activating factor (BAFF), known as a key cytokine in SLE [29]. In APS, soluble BAFF level is increased both in patients with secondary APS and PAPS and correlates with prognostic scores of thrombosis [24,30].

2.3. BCR repertoire in APS

Features of the BCR repertoire have been investigated in several immune-mediated diseases and profound changes have been described in SLE, RA or vasculitides [31]. However, in depth BCR repertoire analysis is lacking in APS. In a systematic analysis of 36 identified aPL sequences, there was no evidence of preferential gene or family usage in any group of aPL studied, but only two aPL were proven to be pathogenic and many of them were derived from asymptomatic patients [32]. Our group performed molecular and functional analysis of anti-CL autoantibodies in a patient with PAPS, by cloning the BCR of autoreactive B cells isolated as single cells [33]. The five different antibodies were highly heterogeneous in terms of V, D or J gene usage and mutations in variable regions. However, the only antibody with LA activity had the highest mutation rate [33]. In accordance, among five selected monoclonal aPL originating from another patient, the only one inducing fetal losses, when passively injected in mice, had the highest rate of mutation in the Vk region [34]. This pathogenic effect was reversible when this autoantibody was *in vitro* reverted to inferred naive germline configuration [34]. In this process of somatic hypermutation, the presence of

newly inserted positively charged in CDR3 seems to play a particularly important role, and Pericleous et al. showed that new arginine residues enhance the binding to β 2GPI-DmI [35]. In conjunction with studies proposing that aPL belong to the natural antibodies [27], pathogenic aPL clones identified by our group were polyreactive, suggesting that they may be part of the natural repertoire [34]. However, in lupus-prone mice, B cells specific for phospholipid are largely found in germinal centers, whereas few are localized in the extrafollicular compartment, suggesting that follicular class-switch recombination of autoreactive clones is important to drive aPL pathogenicity [36].

3. APS: a “hit(s)-parade” toward B cell maturation

Although aPL are directly implicated in pathophysiology and correlate with the thrombotic risk, TEs occur occasionally, suggesting that other factors are needed to push the thrombotic/haemostatic balance in favor of thrombosis [37]. The “second hit” hypothesis is widely accepted and regarded as an additional procoagulant condition that is needed to precipitate clotting formation in aPL carriers [9]. This theory is strongly supported by several experiments in APS prone mice models. In this view, Pierangeli et al. described mouse model of injury-induced thrombosis with surgically induced thrombus formation, and showed in this model the importance of complement activation in aPL's pathogenicity [38]. Similarly, the same group showed that aPL mediated thrombogenic effects were reduced in mice non-responsive to LPS [39]. Hence, a priming factor (e.g. vessel injury or pre-treatment with LPS) is needed for passively transferred human aPL to induce thrombosis [7,8].

Among various mechanisms, infection agents or oxidative stress may increase aPL exposure [40], β 2GPI conformation modifications that expose cryptic epitopes [41] or complement activation. Whereas β 2GPI binding to endothelial cells requires priming with pro-inflammatory factors, uterine vessels and trophoblast physiologically express high level of β 2GPI [42]. Thereby, pregnancy increases specific epitope exposure and could act as a second hit *per se* [9]. Other clinical situations, such as traumatism, inflammatory state or surgery can trigger clot formation, leading to clinical events defining APS. However, and as discussed further, such additional hits may, in an alternative or complementary manner, step in earlier in the pathogenic process driving B cells from benign and transient aPL production toward persistent and pathological autoantibodies generation.

3.1. aPL occurrence

It is widely accepted that autoimmune diseases, including APS, may arise via an inappropriate immune response toward infections. Apart from chronic infectious, such as the one induced by human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis C virus, in which link between aPL and APS-related features is controversial [43], most “infectious” aPL are transient, cofactor independent, bind neutral or negative PL with low affinity, and clinical APS-related complications remain an epiphenomenon [32,44]. While not frequently reported, cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr Virus (EBV), Herpes simplex virus (HSV) and adenovirus infections could lead to anti-CL production and transient LA positivity [45]. Development of pathogenic aPL has been reported during Parvovirus B19 infection, with aPL of IgG isotype and cofactor-dependent binding, similar to autoimmune disease [45–47]. Recently, high prevalence of LA have been described in patients with SARS-CoV2 [48]. Among 216 patients, 44 (20%) were found to have a prolonged activated partial-thromboplastin time (aPTT), due to LA in 90% of them. Additionally, in a recent series, 15% of 122 infected patients were positive for anti- β 2GPI IgG and about 5% for anti-CL IgG [49]. Similarly to patients with triple positive APS or catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS), IgG isolated from COVID-19 patients increase thrombus extension in a mouse model of inferior vena cava thrombosis [50]. TEs are frequent during acute SARS-CoV2 infection [48,51], and the severe form of COVID-19 share several clinical and laboratory features with

hyperferritinemic syndromes [52,53]. However, no association between thrombosis and aPL is clearly established and, during COVID-19, anti- β 2GPI displayed an epitope specificity different than in PAPS [49]. The role of aPL in this hypercoagulable state should be elucidated, as well as the question of their long-term persistence.

Regarding bacterial infections, aPL are most commonly associated with *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma pneumoniae*, streptococci, and *Mycobacterium tuberculosis* infections. The latter three infections may be associated with persistent autoantibodies and authentic APS [54]. The relatively high prevalence of anti-CL antibodies found in syphilis is largely due to a cross-reactivity of syphilis antibodies against treponemal cardiolipins [43]. Multiple aPL positivity and β 2GPI-dependent binding are found in sera from patients with leprosy [55]. Mice immunized with proteins from *Haemophilus influenzae* or *Neisseria gonorrhoeae*, which share sequence homology with β 2GPI-DmIII, led to the production of anti-CL and anti- β 2GPI IgG autoantibodies [56]. Parasite or yeast induced-aPL are very rare and mostly occur after *Plasmodium falciparum* or visceral leishmaniasis infection [57].

Finally, several other clinical conditions have been associated with the occurrence of aPL. Drug induced aPL, following antiarrhythmic or antipsychotic agents, are common, but they are usually benign and disappear after the drug withdrawal [44]. Reports documented the appearance of aPL after vaccine administration responses. Indeed, the frequency of aPL production after influenza immunization is higher than after infection [44]. In a prospective study, 8% (7/101) of healthy subjects developed anti-CL but not anti- β 2GPI after seasonal influenza vaccination. Anti-CL positivity was no longer observed at week 12 post-vaccination [58]. Tetanus toxoid vaccination triggers antibodies which are cross-reactive with β 2GPI as shown in animal models [57]. The role of adjuvants as stimulators of innate actors in vaccine associated aPL is not elucidated.

3.2. From aPL to thrombosis

Several potential mechanisms have been evoked to explain the production of aPL during infections, including epitope spreading, bystander activation, and molecular mimicry. However, little is known about mechanisms sustaining chronic autoimmunity in APS. The transient character of aPL after infection might suggest that continuous antigen exposure is needed for the maintenance of chronic autoreactive B lymphocyte activation. The microbiome is a potential source of persistent self-antigens that either trigger or perpetuate an autoreactive B cell response [59]. Depletion of the gut microbiota with antibiotic regimen leads to lower anti- β 2GPI titers and protection from thrombotic events in mice [60]. In a recent work, *Roseburia intestinalis* (*R. int*) was identified as a chronic driver of β 2GPI autoreactivity [61]. Indeed, Ruff et al. provided evidence for cross-reactivity between mimotopes of this common human gut commensal and the major T cell (p276-290 in DmV) and B cell (R39-R43 in DmI) autoepitopes of β 2GPI. APS-derived monoclonal antibody with LA activity binds to a mimotope of a *R. int* DNA methyltransferase (DNMT). *R. int* immunization of BALB/c mice induces autoepitope-specific cross-reactivity to human β 2GPI, and oral gavage of the spontaneous APS mouse model (NZW x BXSB) F1 mice lead to a significantly elevated anti-human β 2GPI IgG autoantibody and TEs. In conjunction, elevated levels of anti-*R. int* DNMT IgG were found in 15 patients with APS, and positively correlated with anti- β 2GPI IgG. The authors suggested that cross-reactivity with commensals is likely to impact mechanisms of tolerance of B cells but also T cells providing help to PL-specific B cells [62]. Could this hypothesis be sufficient to explain how aPL producing B cells bypass tolerance mechanisms? Indeed, autoreactive B cells are detectable in healthy individuals [63], but several checkpoints ensure their counterselection or their immunologic ignorance to thwart autoimmunity in physiological conditions [64]. Hence, pathogenic aPL producing clones may only arise in predisposed individuals.

In this way, primary abnormalities of tolerance mechanisms linked

to genetical defects could favor the maintenance of aPL reactive B cell clones. *BLK* polymorphism (rs2736340) displayed a strong genetic association with PAPS [65]. Polymorphisms in *IRF5* or *BANK1*, classically reported in SLE, displayed low or no association in PAPS respectively [65]. In line with other autoimmune diseases, several candidate genes especially in HLA locus (eg. *HLA DR4*, *DRw53*) were identified in monozygotic twins and familial clusters of PAPS, and suggested to be involved in the pathogenesis of PAPS through genome wide association studies (GWAS) or next-generation sequencing (NGS) approach [66–69]. Monogenic inborn errors of immunity that affect B cells can be associated with aPL seropositivity or PAPS, and offer a prototypical condition to explore the tolerance breakdown against aPL. We reported recently a family of patients with APS and an heterozygous variant of *IKZF1* causing loss of function for IKAROS, a key transcription factor involved in primary and secondary affinity maturation processes of B cells [70]. Long-term persistence of aPL may also depend on intrinsic characteristics of autoreactive B cells. Indeed, one could speculate that somatic mutations affecting aPL producing clones could provide selective advantage to escape negative selection, in line with findings in autoimmune lymphoproliferative (ALPS) syndrome, where somatic mutations appear relevant for the accumulation of Fas-deficient memory

B cells and the development of autoimmunity [71].

These data strengthen a model whereby, on a predisposing genetic background, transient or benign phospholipid reactive clones could pass through B cell tolerance checkpoints, expand and mature, leading to aPL-secreting plasma cells accumulation. The development of such persistent and pathogenic clones may be in part sustained by an adaptive immune responses against cross-reactive microbiota, as opposed to acute infections due to pathogens that are cleared by the host [61]. Specific epitope exposure in pregnancy and/or other clinical situations, including vessel injury and/or inflammatory processes, could thereafter provide additional triggers leading to clinical events defining APS (Fig. 1).

4. Autoantibodies and clinical implication

4.1. aPL and diagnosis

The main role of autoreactive B cells is emphasized by the central place of aPL in the APS diagnostic [72]. However, the various association between large panels of serological and clinical phenotypes remains elusive. According to Sydney classification, diagnosis laboratory criteria

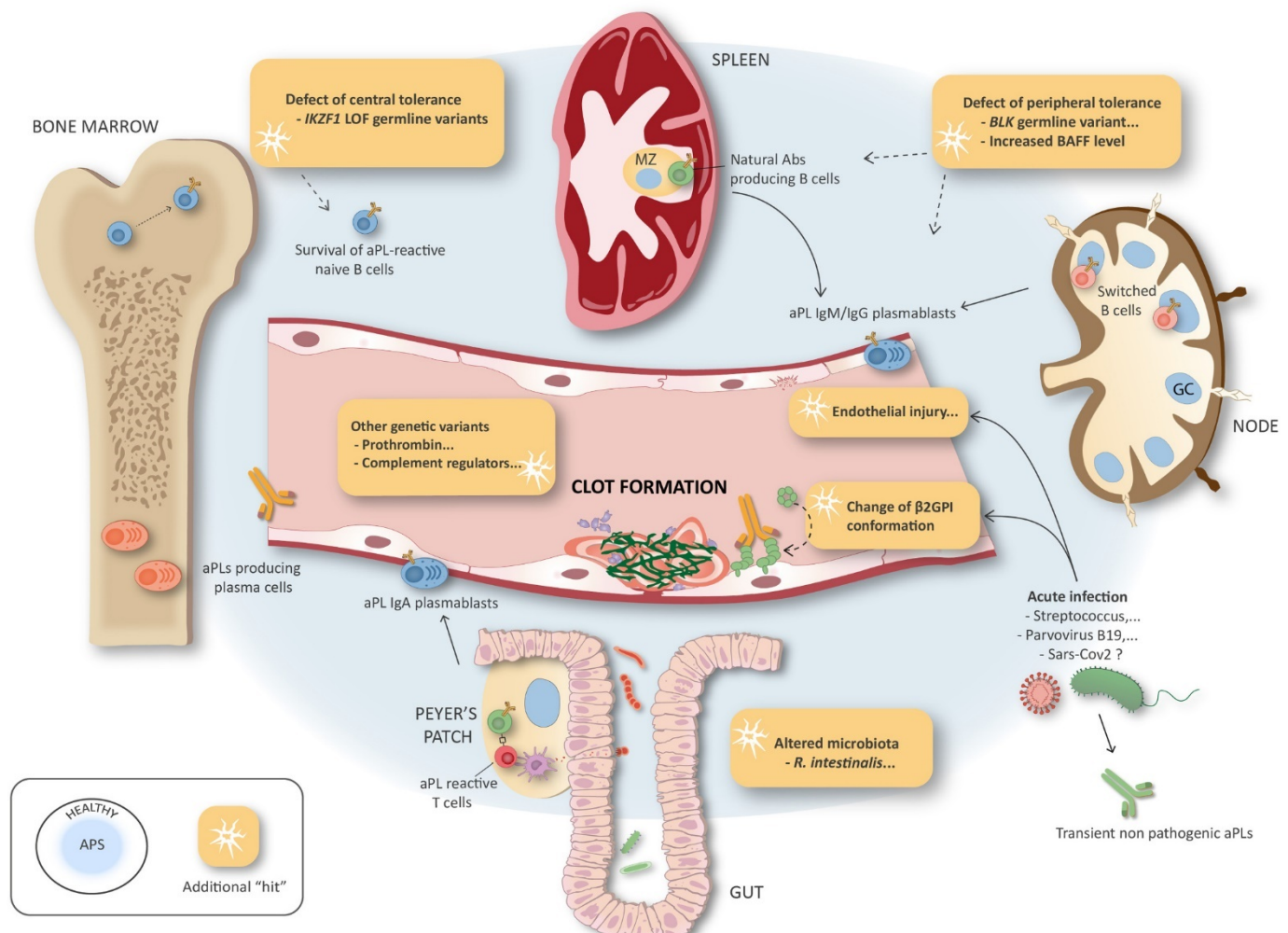


Fig. 1. From B-cell tolerance breakdown to thrombosis in APS: a multistep process toward B cell maturation. Predispositional genetic background, chronic inflammation or continuous antigen exposure through host-commensal interactions represent crucial “hits” that could favor the escape of transient or anergic aPL reactive clones to tolerance checkpoints, their expansion and maturation, and lead to aPL-secreting plasma cells accumulation. Specific epitope exposure due to additional factors (infection, inflammation...) thereafter provide the trigger leading to clinical events, such as thrombosis, defining APS.

Abs, antibodies; aPL, Antiphospholipid antibody; APS, Antiphospholipid syndrome; BAFF, B-cell activating factor; CMV, cytomegalovirus; GC, Germinal center; IgA/G/M, Immunoglobulin A/G/M; LOF, Loss of function; MZ, Marginal zone.

include LA, anti-CL and anti- β 2GPI, of IgM or IgG isotype at medium-to-high titres (generally tested by ELISA), that should be tested repeatedly positive at least 12 weeks apart. Usually, anti-CL and anti- β 2GPI from the same isotype are detected together [73]. The positivity for LA reflects the ability of aPL to prolong phospholipid-dependent coagulation assays. The LA activity is often displayed by anti- β 2GPI, especially those directed against domain I of β 2GPI. Seropositivity of all three-classification criteria-aPL is linked with a more aggressive APS phenotype, named “triple-positive”.

Alternative aPL, named “non-classical”, have been excluded from Sidney criteria due to an initial lack of clinical implication. However, patients with clinical manifestations compatible with APS, positive for such extra criteria aPL, and negative for classical aPL exist and were named “seronegative APS patients” (SN-APS). This entity introduced in 2003 by Hughes and Khamashta [74] remains controversial and three possible explanations have originally been considered to explain the existence of such SN-APS patients: (i) a wrong diagnosis, (ii) previously positive aPL tests that became negative, or more likely (iii) aPL not detected by the current consensual tests. A retrospective study found no significant differences in clinical manifestations between patients with APS and those with SN-APS [75]. Zohoury et al. showed that about 35% of SN-APS patients have detectable non classical aPL [76]. Hence, some consider that SN-APS is a proof that classic aPL tests are not sufficient to diagnose APS, arguing for an update to the current criteria incorporating non-conventional aPL and consensual technical procedures in diagnosis criteria [77]. Recently, four profiles of non-criteria APS were proposed: 1) clinical non-criteria APS, 2) laboratory non-criteria APS, 3) incomplete laboratory APS: patients fulfilling clinical criteria, plus positive aPL, but not fulfilling the classification criteria, and 4) seronegative APS: patients with persistently negative antiphospholipid antibodies despite fulfilling clinical criteria [78].

Our actual knowledges on non-classical aPL highlight their importance in the APS physiopathology. Among them, antibodies targeting the PS/PT complex can display LA activity [79–81] and seems to be of strong clinical relevance. Their presence, together with anti- β 2GPI-DmI, correlate with vascular and obstetrical complications, and their combination have 100% predictive value for the diagnosis of APS [82–84]. In 14 triple positive patients also positive for anti-PS/PT (so called “tetra positive APS patients”), from whom different type of aPL were affinity purified, anticoagulant activity was largely attributable to anti-PS/PT antibodies [85]. Anti-PS/PT detection is not influenced by anticoagulant treatment and could be considered to confirm the presence of LA. Concerning other non-classical aPL, among a cohort of patients with thrombosis, anti-PE antibodies were found in 15%, being the sole aPL detected in 67% of the cases [86]. Antibodies targeting phosphatidic acid (PA), or phosphatidylinositol (PI) may be the only one detectable in women with recurrent pregnancy losses [87,88], although their binding to antigen and their pathogenicity may be β 2GPI-dependent. Lastly, IgA against β 2GPI are significantly associated with TEs, especially in SLE patients [89]. Despite the clinical interest of non-conventional aPL, a lack of standardization in the assays used for their detection still remains [90].

4.2. Specific aPL for distinct phenotypes?

Vascular occlusions belong to the classical clinical pictures of APS, and include deep venousthrombosis, pulmonary embolism or arterial TEs such as strokes [91]. In addition to this thrombotic APS, some patients present with an “obstetric APS” phenotype and suffer from pregnancy morbidity, including recurrent early miscarriage but also late (after 10 weeks) pregnancy loss and premature birth (<34 weeks) related to preeclampsia or placental insufficiency [92]. Patients with APS may also experience a myriad of additional features, usually branded as “extra criteria”, including neurological (epilepsy, chorea...) and hematological manifestations (thrombocytopenia and hemolytic anemia), livedo reticularis, nephropathy and valvular heart disease

[93]. CAPS is the most severe form of the disease and characterized by widespread small vessel thrombosis with multiorgan failure presenting over a short period of time and is associated with a mortality higher than 30% [91,94]. Despite published association with drugs, malignancies and a wide spectrum of autoimmune diseases [95], secondary APS is mainly associated with SLE, in about 20–30% of cases [2,5]. aPL positive patients with SLE have higher rates of arthritis, cytopenia, hypocomplementemia and severe renal disease than those without SLE [96].

Relying these homogenous clinical phenotypes to serological characteristics remains challenging. Patients with single obstetrical APS tend to have lower rate of multiple aPL positivity [9,97]. In series on the Serbian national cohort, patients with secondary APS had more frequent multiple aPL positivity than those with PAPS, whereas LA alone was more frequently reported in the latter [98]. However, these results were not found in the large Euro-Phospholipid cohort. Additionally, in this cohort of 1000 European patients with APS, no differences were found in the clinical presentation of PAPS, at its onset and during a 10-year follow-up period, according to the presence or absence of anti-CL or LA [5,91]. In 2016 data from the CAPS Registry, LA was present in 83% of episodes, anti-CL IgG in 81%, IgG anti- β 2GPI in 78% whereas anti-CL and anti- β 2GPI of IgM isotype were less frequent (50% and 58% respectively) [99]. Recently, three studies on large cohort aimed to aggregate patients into subgroups sharing common clinical and specific classical aPL profiles [97,100,101]. The main results are depicted in Table 2. Nonetheless, these studies do not consider extra criteria aPL. Using multiplex line immunoassay, Volkov et al. evaluated the presence of non-criteria aPL in a cohort of 130 APS patients. Whereas arterial thrombosis was associated with multiple aPL positivity (>7), venous TE was not linked to any specific aPL and inversely correlated with anti-phosphatidic acid IgM detection. The presence of anti-CL IgG and anti-PS IgG was linked with pregnancy morbidity [102]. These results suggest that evaluating a broad spectrum of aPL may enable to better define APS phenotype.

4.3. Prognostic markers and risk assessment

Identifying the risk of clinical events in patients with APS is challenging due to the clinical heterogeneity, the different sets of aPL and their fluctuation in the disease course. Multiple positivity for anti-CL, anti- β 2GPI or LA is associated with higher rate of TEs than single test positivity [103,104]. Subjects with triple positivity for these criteria aPL have an annual incidence of TEs of 5.3%, with a cumulative risk of 37% after ten years [105]. LA positivity is associated with the highest risk for both arterial and venous TEs [106] whereas results are controversial for anti-CL [106–108]. β 2GPI antibodies seems to confer a moderate increase of the risk, with an odd ratio from 1.6 to 2.4 for venous TEs and of 2.3 for ischemic strokes [109–111]. β 2GPI-dependent LA activity assay correlated two times better with TEs than the classic LA assay [112]. The relevance of anti-CL/ β 2GPI IgM antibodies has been debated. Most studies were unable to demonstrate a correlation between IgM positivity and TEs, but Chayoua et al. recently provided evidence for an independent association with pregnancy morbidity [113]. Among non-criteria aPL, anti- β 2GPI-DmI positively correlates with the Global Antiphospholipid Score (GAPSS) [114,115], a validated thrombotic risk score [116]. Hence, anti- β 2GPI-DmI seems to represent a robust biological criterion, in association with classical aPL, to better apprehend the thrombotic risk. Other works showed diverse clinical association with reactivity to different epitopes on β 2GPI and suggested that classification of anti- β 2GPI into subgroups regarding epitope specificity would be of clinical relevance [117–120]. As an example, in a cohort of 135 women with persistently positive anti- β 2GPI IgG, anti- β 2GPI-DmI positivity was associated with triple positivity, thrombosis and predictive of late pregnancy morbidity, whereas anti-domain IV/V (anti- β 2GPI-DmIV/V) antibodies were not associated with clinical APS manifestations [118]. Conversely, DmIV/V are preferentially recognized by anti- β 2GPI antibodies from one-year-old healthy children born to

Table 2

Summary of aPL profiles according to identified clusters.

Study	Subjects	Ethnicity	Thrombosis	Pregnancy morbidity	APS with SLE	Healthy aPL carriers	Comments
Sciascia (97) 2019	n = 486 - 257 PAPS - 96 SLE/APS - 133 aPL carriers	Caucasian	- High prevalence of anti-CL IgG/M (69%) 85% with multiple aPL positivity - high rate of triple positivity (35%)	- Low rate of anti-β2GPI (23%) - low rate of multiple aPL positivity (30%) - low rate of triple positivity (4%)	- High rate of multiple aPL positivity (84%) - 22% with triple positivity	- High prevalence of anti-CL IgG/M (61%) - multiple aPL positivity in 57% of patients - no patient with triple positivity	<u>One additional cluster:</u> - defined APS (42%) and high rate of cytopenia (42%) - low rate of triple positivity (5%) No data on extra criteria aPL
Zuily (100) 2020	n = 497 - 324 PAPS - 173 aPL/APS associated with other autoimmune disease	Various	<u>In females with frequent VTE:</u> - high rate of anti-CL (93%) - high rate of β2GPI (77%) - high rate of triple positivity (55%) <u>In men with frequent ATE, heart valve disease, CV risk factors:</u> - anti-β2GPI:53% - triple positivity: 40%	<u>In females with isolated PM:</u> - high frequency of LA (80%) - high frequency of anti-CL (68%) - lower frequency of anti-β2GPI (40%)	- high prevalence of LA (85%) - low rate of anti-anti-β2GPI (14%) - low rate of triple positivity (7%)	<u>Asymptomatic aPL-positive females:</u> - high prevalence of anti-CL (85%) or anti-β2GPI (64%)	No data on extra criteria aPL
Alijotas-Reig (101) 2019	n = 1000 - 1000 OAPS - 76 OAPS with SLE	Caucasian	/	- High frequency of single LA positivity (35%) - low rate of double (18%) and triple positivity (11%)	/	/	<u>Recurrent miscarriage:</u> - high rate of single anti-CL IgG/M positivity (27%) - 26% with multiple aPL positivity <u>Fetal loss:</u> - high rate of single LA positivity (31%) No data on extra criteria aPL

anti-CL, Anticardiolipin antibody; aPL, Antiphospholipid antibody; ATE, Arterial thromboembolic event; CV, Cardiovascular; LA, Lupus anticoagulant; OAPS, Obstetric antiphospholipid syndrome; PAPS, Primary antiphospholipid syndrome; PM, Pregnancy morbidity; SLE, Systemic lupus erythematosus; VTE, venous thromboembolic events.

mothers with systemic autoimmune diseases and from subjects with non-APS conditions [119], and the ratio anti-β2GPI-DmI to anti-β2GPI-DmIV/V IgG has been proposed as a helpful tool to discriminate patients with systemic autoimmunity from those carrying less pathogenic anti-β2GPI antibodies [120].

Regarding other non-classical aPL, it is widely accepted that prothrombin is a common antigenic target for aPL, but assays may detect distinct populations of autoantibodies which have different clinical implications. Positivity for anti-PT, detected by directly coating prothrombin on ELISA plates, does not seem to be such a strong risk factor for APS [121]. However, the cumulative incidence rate of thrombotic events is significantly higher when anti-PS/PT, which recognize a conformational epitope, are detected among aPL carrier patients [122]. Additionally, the risk of pregnancy morbidity seems to be associated with the presence of anti-PE, PA, PS and PI [90].

Based on the global aPL profile, different models, such as the Antiphospholipid Score, have been tested to evaluate the risk of having APS and for predicting thrombosis [123]. The use of antibody profiles as prognostic markers is however delicate for several reasons. High inter-laboratory variability and the widespread of retrospective designs may explain the large discrepancies between the finding of clinical studies. Moreover, conventional cardiovascular risk factors should be considered to assess the thrombotic risk. The GAPSS proposed by Sciascia et al., based on the profile of four aPL and the presence of dyslipidemia or arterial hypertension, has been proven to represent the probability of having TEs or pregnancy loss in patients with SLE and is an example of risk model that takes in account such factors [116]. EUREKA is another algorithm that predicts the risk of pregnancy morbidity considering aPL

titres and profiles [124].

5. Management of APS and B cells: paradox and remaining challenges

Despite the widespread of targeted therapies in autoimmune diseases, anticoagulation remains the corner stone of management in patients with APS. Briefly, low dose aspirin (LDA) is recommended for asymptomatic patients with high risk aPL profiles whereas patients with thrombotic APS should have long term treatment with vitamin K antagonists. The use of direct oral anticoagulants (DOACs) is highly debated [92,125]. Patients with obstetric APS only should receive prophylactic dose low-molecular-weight heparin (LMWH) and LDA throughout pregnancy. The European League Against Rheumatism (EULAR) recently developed evidence-based recommendations for the prevention and treatment of adults with APS [126]. Considering the crucial role of autoantibodies in the definition and the pathophysiology of the disease, data on the use of therapies directed toward B cells are lacking and somehow disappointing in APS.

5.1. B cell targeting therapies

The use of anti-CD20 therapies has been supported by strong evidences in other autoimmune diseases [127], but also by clinical and/or serological beneficial effects in case reports concerning PAPS, secondary APS, or CAPS [128]. In the retrospective literature review by Erre et al., eight out of 12 patients with classical aPL treated with rituximab, a chimeric monoclonal antibody targeting CD20, showed normalization

or reduction of aPL titers. Some of them were however concurrently treated with immunosuppressors [129]. Results on TEs recurrence are debated and limited to small series or case reports [130]. In a phase II trial, safety and efficacy of rituximab was evaluated in 19 patients with APS criteria [131]. Rituximab was efficient for some non-criteria manifestations, especially thrombocytopenia (response rate of 50%) cognitive dysfunction (80%) and skin ulcers (100%), but failed to change significantly aPL profiles [131]. Such effect on extra thrombotic manifestations, including thrombocytopenia, was confirmed in other studies [133,134]. There are concerns about thrombosis exacerbation since severe acute thrombotic events were described in two APS/SLE patients receiving rituximab [132]. In the study from Erkan et al., 12 serious adverse events were recorded including neurological complications ($n = 5$), infections ($n = 3$) and recurrence of TEs ($n = 1$) [131]. According to recommendations, rituximab may be considered in CAPS, where aPL production is associated with systemic inflammatory response syndrome [94]. In a retrospective review, 13 of 20 patients with severe/relapsed CAPS treated with rituximab recovered. aPL became negative in 50% of those with follow-up (4/8). Comparing 30 patients treated with rituximab *versus* contemporaneous patients in the CAPS registry, an *ad hoc* analysis provided an odd's ratio for survival of 0.41 (95% CI 0.15, 1.11) [133]. However, evidences are not strong enough to use rituximab as a first line therapy in CAPS and it is considered as an alternative treatment in severe or refractory cases [92]. Novel anti-CD20 therapies such as obinutuzumab, a human monoclonal anti-CD20 antibody, induce different cellular response and stronger antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) [134]. Their uses in autoimmune diseases are under evaluation and they could provide a second life to anti-CD20 therapy in APS.

Because anti-CD20 treatment does not affect plasma cells, the insufficient therapeutic outcome may be caused by the survival of aPL producing plasma cells. *Ex vivo* experiments showed that aPL producing CD20 negative B cells circulate in peripheral blood of APS patients [28]. This rational is sustained by the successful use of bortezomib on TEs recurrence and aPL titers in case reports [135,136]. As an alternative, anti-CD38 monoclonal antibodies, such as daratumumab, enter the field of autoimmune diseases therapy with impressive response in post-transplant patient with autoimmune cytopenia [137,138] and at least in 2 patients with SLE, in association with belimumab [139].

5.2. Cytokines

BAFF blockade has shown therapeutic potential in preclinical models. BAFF antagonists reduced renal and cardiac infarcts and prolonged survival in NZW $\times$ BXSB F1 mice although it did not prevent anti-CL development [140]. Interestingly, in human, BAFF level is increased in PAPS and secondary APS [24,30]. Belimumab, a monoclonal antibody against BAFF, was found to reduce anti-CL and anti- β 2GPI IgM and IgG titers treatment in 12 SLE/APS patients independently of hydroxychloroquine treatment [141]. However, in a recent post-hoc analysis on two large randomized SLE-controlled trials focusing on anti-CL titers, intravenous belimumab showed a significant reduction of anti-CL IgA and IgG only in patients with concomitant antimalarial treatment [142]. Similarly, Bettiol et al., in another recent *post hoc* analysis of 249 patients with SLE from the BLISS-SC trial, observed a significant reduction of anti- β 2GPI IgA and anti-CL IgM titres in the belimumab+antimalarials group as compared with the placebo+antimalarials group, suggesting that the two treatments may exert beneficial synergistic effect [143]. The independent role of belimumab on aPL titre reduction needs to be further evaluated, and, so far, such data are lacking in PAPS.

Alternative therapeutic approaches might consider inflammatory mediators inhibitors such as type I IFN antagonists. Anifrolumab, that blocks the type I interferon receptor subunit 1, has proven efficiency on disease activity in SLE patients [144]. The high type I IFN signature observed in about 40% of patients with PAPS [145], together with the positive correlation between plasma cells expansion and type I IFN

upregulation in APS [28], support the evaluation of such antagonists.

5.3. aPL targeting

Plasmapheresis and intravenous immunoglobulins (IVIg) could thwart aPL pathogenic effects by increasing their clearance, inhibiting their action or through the control of anti-idiotypic antibodies. In CAPS, they are recommended as first line treatment in combination with steroids and heparin [126]. Agostinis et al. identified a single-chain fragment variable directed against β 2GPI-DmI that induced, in mice, thrombosis and fetal losses in a complement dependent matter. Interestingly, a variant of this antibody lacking the CH2 domain, required for C1q binding and complement activation, compete with human anti- β 2GPI IgG and prevent blood clot formation and fetal loss [146].

The use of peptide therapies recently provided another approach to inhibit aPL pathogenicity. The rational is to block binding to target cells or receptors using small synthetic peptides. No clinical trial has been developed to date but such molecules, including synthetic analogs of β 2GPI-DmI or A1 (ApoER2 ligand-binding domain) reduced thrombus formation in animal models [147,148]. Peptides therapy, as well as CH2-deleted antibody, could represent an innovative approach potentially useful to treat refractory APS patients.

5.4. Beyond B cells

Other conventional or targeted therapies could overcome the apparent limited effectiveness of B therapies and work synergistically to counterbalance pro-coagulation state. Some of them may exert indirect action on aPL or autoreactive B cells development. *In vitro*, hydroxychloroquine reverses the disruption of AnxA5 shielding induced by aPL, and thereby restore the binding of AnxA5 to phospholipids [16]. Besides decreasing aPL titers in patients with secondary APS, hydroxychloroquine reduces LA activity [142,149]. Sirolimus may also contribute to lower aPL titers in SLE patients [130]. Statins exert multiple anti-inflammatory effects, including reduction on tissue factor expression by monocytes and cytokine secretion, but little is known about B cell implication. In accordance with the hypocomplementemia and increased levels of complement activation in APS patients [150], anti-C5 antibody prevents the prothrombotic activity of aPL *in vitro*, and precludes aPL-mediated thrombosis in some murine models [38]. This therapy showed promising results as adjunction therapy in CAPS, but results are limited to cases reports and do not enable conclusion on aPL titers [130,151]. Further studies should elucidate the place of these therapies in the APS therapeutic plan and their specific effect on B cells and autoantibodies.

6. Conclusion

The central role of B cells in APS is highlighted by strong evidence of antibody mediated pathogenesis, specific B cell phenotype abnormalities, and by the development of the disease in patients with inborn errors of immunity involving B cell ontogeny. Recent findings questioned the links between B cell tolerance breakdown, genetic defects, and commensal microorganisms. However, the origin and characteristics of pathogenic aPL producing clones remain largely unknown. Despite the discrepancies in clinical trial results, therapies targeting B cells should remain an important therapeutic approach in APS. A broad range of immunomodulatory drugs has recently emerged with serious rational to modulate the inflammatory response and vascular damages in APS. Further studies should determine if this new therapeutic area could provide a second wind to the field of B cell targeting in APS and which homogeneous groups of patients should benefit from it.

Funding

No funding sources.

Authorship

Y-D, A.G., A-S.K. and V.G. wrote the manuscript.

Y-D, A.G., V.P., P.S.L, T.M., A-S.K. and V.G. reviewed or edited the manuscript before submission.

Y-D, A.G., V.P., P.S.L, T.M., A-S.K. and V.G. contributed to researching data for the article and discussions of the article content.

Declaration of Competing Interest

Declarations of interests: none.

Acknowledgements

We thank the Fondation pour la Recherche Médicale, the European reference Networks (ERNS) RITA and ReCONNET, and the INTERREG V program (PERSONALIS project, co-financed by the European regional development fund (ERDF).

References

- [1] Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:1088–9. <https://doi.org/10.1136/bmj.287.6399.1088>.
- [2] Duarte-García A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, et al. The epidemiology of Antiphospholipid syndrome: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2019;71:1545–52. <https://doi.org/10.1002/art.40901>.
- [3] García D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med* 2018;378:2010–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705454>.
- [4] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
- [5] Cervera R, Piette J-C, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 100 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019–27. <https://doi.org/10.1002/art.10187>.
- [6] McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4120–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4120>.
- [7] Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. β 2-glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood* 2011;117:3453–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-300715>.
- [8] Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005;106:2340–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1319>.
- [9] Meroni PL, Borghi MO, Grossi C, Chighizola CB, Durigutto P, Tedesco F. Obstetric and vascular antiphospholipid syndrome: same antibodies but different diseases? *Nat Rev Rheumatol* 2018;14:433–40. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0032-6>.
- [10] Bancsi LF, van der Linden IK, Bertina RM. Beta 2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost* 1992;67:649–53.
- [11] Chaturvedi S, McCrae KR. The antiphospholipid syndrome: still an enigma. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:53–60. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.53>.
- [12] Arachchilage DRJ, Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2017;178:181–95. <https://doi.org/10.1111/bjh.14632>.
- [13] de Laat B, Derksen RHW, van Lummel M, Pennings MTT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* 2006;107:1916–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1943>.
- [14] Ağar Ç, van Os GMA, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. β 2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;116:1336–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260976>.
- [15] Pericleous C, Ruiz-Limón P, Ronay-Penabad Z, Marín AC, Garza-García A, Murfitt L, et al. Proof-of-concept study demonstrating the pathogenicity of affinity-purified IgG antibodies directed to domain I of β 2-glycoprotein I in a mouse model of anti-phospholipid antibody-induced thrombosis. *Rheumatology* 2015;54:722–7. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu360>.
- [16] Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood* 2010;115:2292–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-213520>.
- [17] Wahezi DM, Ilowite NT, Wu XX, Pelkmans L, Laat B, Schanberg LE, et al. Annexin A5 anticoagulant activity in children with systemic lupus erythematosus and the association with antibodies to domain I of β 2-glycoprotein I. *lupus* 2013;22:702–11. <https://doi.org/10.1177/0961203313490241>.
- [18] Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol* 2006;135:214–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06283.x>.
- [19] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:330–9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.52>.
- [20] Manukyan D, Müller-Calleja N, Jäckel S, Luchmann K, Mönnikes R, Kiouptsi K, et al. Cofactor-independent human antiphospholipid antibodies induce venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2016;14:1011–20. <https://doi.org/10.1111/jth.13263>.
- [21] Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:1033–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1112830>.
- [22] Carbone J, Gallego A, Lanio N, Navarro J, Orera M, Aguarón A, et al. Quantitative abnormalities of peripheral blood distinct T, B, and natural killer cell subsets and clinical findings in obstetric antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2009;36:1217–25. <https://doi.org/10.3899/jrheum.081079>.
- [23] Simonin L, Pasquier E, Leroyer C, Cornec D, Lemerle J, Bendaoud B, et al. Lymphocyte disturbances in primary antiphospholipid syndrome and application to venous thromboembolism follow-up. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:14–27. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8568-1>.
- [24] Alvarez-Rodríguez L, Riancho-Zarrabeitia L, Calvo-Alén J, López-Hoyos M, Martínez-Taboada V. Peripheral B-cell subset distribution in primary antiphospholipid syndrome. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020589>.
- [25] Simonin L, Pasquier E, Leroyer C, Cornec D, Bendaoud B, Hillion S, et al. A1.9 among patients with venous thrombo-embolism, B cell subset disturbances characterise those with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2015;74:A4. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207259>.
- [26] Wong JB, Hewitt SL, Heltemes-Harris LM, Mandal M, Johnson K, Rajewsky K, et al. B-1a cells acquire their unique characteristics by bypassing the pre-BCR selection stage. *Nat Commun* 2019;10:4768. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12824-z>.
- [27] Youinou P, Renaudineau Y. The antiphospholipid syndrome as a model for B cell-induced autoimmune diseases. *Thromb Res* 2004;114:363–9. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.019>.
- [28] Hisada R, Kato M, Sugawara E, Kanda M, Fujieda Y, Oku K, et al. Circulating plasmablasts contribute to antiphospholipid antibody production, associated with type I interferon upregulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1134–43. <https://doi.org/10.1111/jth.14427>.
- [29] Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:365–73. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.33>.
- [30] van den Hoogen LL, Palla G, Bekker CPJ, Fritsch-Stork RDE, Radstake TRDJ, van Roon JAG. Increased B-cell activating factor (BAFF)/B-lymphocyte stimulator (BLyS) in primary antiphospholipid syndrome is associated with higher adjusted global antiphospholipid syndrome scores. *RMD Open* 2018;4:e000693. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2018-000693>.
- [31] Bashford-Rogers RJM, Bergamaschi L, McKinney EF, Pombal DC, Mescia F, Lee JC, et al. Analysis of the B cell receptor repertoire in six immune-mediated diseases. *Nature* 2019;574:122–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1595-3>.
- [32] Giles IP, Haley JD, Nagl S, Isenberg DA, Latchman DS, Rahman A. A systematic analysis of sequences of human antiphospholipid and anti- β 2-glycoprotein I antibodies: the importance of somatic mutations and certain sequence motifs. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:246–65. <https://doi.org/10.1053/sarh.2003.49994>.
- [33] Lieby P, Soley A, Levallois H, Hugel B, Freysson JM, Cerutti M, et al. The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood* 2001;97:3820–8. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3820>.
- [34] Lieby P, Poindron V, Roussi S, Klein C, Knapp A-M, Garaud J-C, et al. Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood* 2004;104:1711–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0462>.
- [35] Pericleous C, Miles J, Esposito D, Garza-García A, Driscoll PC, Lambrianides A, et al. Evaluating the conformation of recombinant domain I of β (2)-glycoprotein I and its interaction with human monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2011;49:56–63. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.07.024>.
- [36] Wong Baeza C, Reséndiz-Mora A, Donis-Maturano L, Wong Baeza I, Zárate-Neira L, Yam-Puc JC, et al. Anti-lipid IgG antibodies are produced via germinal centers in a murine model resembling human lupus. *Front Immunol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00396>.
- [37] Oku K, Nakamura H, Kono M, Ohmura K, Kato M, Bohgaki T, et al. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2016;15:1001–4. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.020>.
- [38] Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005;52:2120–4. <https://doi.org/10.1002/art.21157>.
- [39] Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V, et al. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1327–33. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.065037>.

- [40] Ruff WE, Vieira SM, Krieger MA. The role of the gut microbiota in the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2014;17:472. <https://doi.org/10.1007/s11926-014-0472-1>.
- [41] van Os GMA, Meijers JCM, Agar C, Seron MV, Marquart JA, Åkesson P, et al. Induction of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies in mice by protein H of *Streptococcus pyogenes*. *J Thromb Haemost JTH* 2011;9:2447–56. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04532.x>.
- [42] Agostinis C, Biffi S, Garrovo C, Durigutto P, Lorenzon A, Bek A, et al. In vivo distribution of β 2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions. *Blood* 2011;118:4231–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333617>.
- [43] Sène D, Piette J-C, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 2008;7:272–7. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.10.001>.
- [44] Martirosyan A, Aminov R, Manukyan G. Environmental triggers of autoreactive responses: induction of antiphospholipid antibody formation. *Front Immunol* 2019;10:1609. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01609>.
- [45] Abdel-Wahab N, Talathi S, Lopez-Olivo MA, Suarez-Almazor ME. Risk of developing antiphospholipid antibodies following viral infection: a systematic review and meta-analysis. *Lupus* 2018;27:572–83. <https://doi.org/10.1177/0961203317731532>.
- [46] Asano Y, Sarukawa M, Idezuki T, Harada S, Kaji K, Nakasu I, et al. Multiple small pulmonary emboli associated with transient antiphospholipid syndrome in human Parvovirus B19 infection. *Clin Rheumatol* 2006;25:585–7. <https://doi.org/10.1007/s10067-005-0032-1>.
- [47] Loizou S, Cazabon JK, Walport MJ, Tait D, So AK. Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:103–8. <https://doi.org/10.1002/art.1780400115>.
- [48] Bowles L, Platten S, Yartey N, Dave M, Lee K, Hart DP, et al. Lupus anticoagulant and abnormal coagulation tests in patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2020;383:288–90. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2013656>.
- [49] Borghi MO, Beltagy A, Garrafa E, Curreli D, Cecchini G, Bodio C, et al. Antiphospholipid antibodies in COVID-19 are different from those detectable in the anti-phospholipid syndrome. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584241>.
- [50] Zuo Y, Estes SK, Ali RA, Gandhi AA, Yalavarthi S, Shi H, et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med* 2020;12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>.
- [51] Harzallah I, Deblieux A, Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost* 2020;18:2064–5. <https://doi.org/10.1111/jth.14867>.
- [52] Shoenfeld Y. Corona (COVID-19) time musings: our involvement in COVID-19 pathogenesis, diagnosis, treatment and vaccine planning. *Autoimmun Rev* 2020;19:102538. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102538>.
- [53] Colafrancesco S, Alessandri C, Conti F, Priori R. COVID-19 gone bad: a new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome? *Autoimmun Rev* 2020;19:102573. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102573>.
- [54] Abdel-Wahab N, Lopez-Olivo MA, Pinto-Patarroyo GP, Suarez-Almazor ME. Systematic review of case reports of antiphospholipid syndrome following infection. *Lupus* 2016;25:1520–31. <https://doi.org/10.1177/0961203316640912>.
- [55] Avčin T, Toplak N. Antiphospholipid antibodies in response to infection. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:212–8. <https://doi.org/10.1007/s11926-007-0034-x>.
- [56] Blank M, Krause I, Fridkin M, Keller N, Kopolovic J, Goldberg I, et al. Bacterial induction of autoantibodies to β 2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:797–804. <https://doi.org/10.1172/JCI12337>.
- [57] Mendoza-Pinto C, García-Carrasco M, Cervera R. Role of infectious diseases in the antiphospholipid syndrome (including its catastrophic variant). *Curr Rheumatol Rep* 2018;20:62. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0773-x>.
- [58] Toplak N, Kveder T, Trampus-Bakija A, Šubelj V, Čučnik S, Avčin T. Autoimmune response following annual influenza vaccination in 92 apparently healthy adults. *Autoimmun Rev* 2008;8:134–8. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.07.008>.
- [59] Chen JW, Rice TA, Bannock JM, Bielecka AA, Strauss JD, Catanzaro JR, et al. Autoreactivity in naïve human fetal B cells is associated with commensal bacteria recognition. *Science* 2020;369:320–5. <https://doi.org/10.1126/science.aay9733>.
- [60] Depletion of the gut microbiota prevents β 2-glycoprotein I antibody production and mortality in a model of antiphospholipid syndrome. *ACR Meet Abstr* 2021; S1–1331. <https://acrabstracts.org/abstract/depletion-of-the-gut-microbiota-prevents-beta-2-glycoprotein-i-antibody-production-and-mortality-in-a-model-of-anti-phospholipid-syndrome/> (accessed May 14, 2020).
- [61] Ruff WE, Dehner C, Kim WJ, Pagovich O, Aguiar CL, Yu AT, et al. Pathogenic autoreactive T and B cells cross-react with Minotops expressed by a common human gut commensal to trigger autoimmunity. *Cell Host Microbe* 2019;26:100–13. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.003>.
- [62] Rauch J, Salem D, Subang R, Kuwana M, Levine JS. β 2-glycoprotein I-reactive T cells in autoimmune disease. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02836>.
- [63] Lieby P, Soley A, Knapp A-M, Cerutti M, Freysinet J-M, Pasquali J-L, et al. Memory B cells producing somatically mutated antiphospholipid antibodies are present in healthy individuals. *Blood* 2003;102:2459–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0180>.
- [64] Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;201:703–11. <https://doi.org/10.1084/jem.20042251>.
- [65] Yin H, Borghi MO, Delgado-Vega AM, Tincani A, Meroni P-L, Alarcón-Riquelme ME. Association of STAT4 and BLK, but not BANK1 or IRF5, with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2009;60:2468–71. <https://doi.org/10.1002/art.24701>.
- [66] Caliz R, Atsumi T, Kondeatis E, Amengual O, Khamashta MA, Vaughan RW, et al. HLA class II gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome: haplotype analysis in 83 Caucasoid patients. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:31–6. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.1.31>.
- [67] Ravindran V, Rajendran S, Elias G. Primary antiphospholipid syndrome in monozygotic twins. *Lupus* 2013;22:92–4. <https://doi.org/10.1177/0961203312467393>.
- [68] Sebastiani GD, Iuliano A, Cantarini L, Galeazzi M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: an update. *Autoimmun Rev* 2016;15:433–9. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.005>.
- [69] Iuliano A, Galeazzi M, Sebastiani GD. Antiphospholipid syndrome's genetic and epigenetic aspects. *Autoimmun Rev* 2019;18:102352. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102352>.
- [70] Dieudonné Y, Guffroy A, Vollmer O, Carapito R, Korganow A-S. IKZF1 loss-of-function variant causes autoimmunity and severe familial Antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* 2019;39:353–7. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00643-2>.
- [71] Janda A, Schwarz K, van der Burg M, Vach W, Ijspeert H, Lorenz MR, et al. Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2016;127:2193–202. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-642488>.
- [72] Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145–51. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0409>.
- [73] Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: a primary variant with antibodies to beta 2-glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med* 1996;101:472–81. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(96\)00254-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(96)00254-9).
- [74] Hughes GRV, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1127. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.006163>.
- [75] Rodríguez-García JL, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Sanna G, Ateka-Barrutia O, Khamashta MA. Clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) with and without antiphospholipid antibodies (the so-called "seronegative APS"). *Ann Rheum Dis* 2012;71:242–4. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200614>.
- [76] Zohoury N, Bertolaccini ML, Rodríguez-García JL, Shums Z, Ateka-Barrutia O, Sorice M, et al. Closing the serological gap in the antiphospholipid syndrome: The value of "Non-criteria" antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 2017;44:1597–602. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170044>.
- [77] Conti F, Andreoli L, Crisafulli F, Mancuso S, Truglia S, Tektonidou MG. Does seronegative obstetric APS exist? "pro" and "cons.". *Autoimmun Rev* 2019;18:102407. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102407>.
- [78] Pires da Rosa G, Bettencourt P, Rodríguez-Pintó I, Cervera R, Espinosa G. "Non-criteria" antiphospholipid syndrome: A nomenclature proposal. *Autoimmun Rev* 2020;19:102689. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102689>.
- [79] Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood* 2007;110:1178–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066043>.
- [80] Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, et al. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol* 2001;113:621–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02755.x>.
- [81] de Laat B, Derksen RHWM, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005;105:1540–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3387>.
- [82] Nakamura H, Oku K, Amengual O, Ohmura K, Fujieda Y, Kato M, et al. First-line, non-Criteria Antiphospholipid antibody testing for the diagnosis of Antiphospholipid syndrome in clinical practice: a combination of anti- β 2-glycoprotein I domain I and anti-Phosphatidylserine/Prothrombin complex antibodies tests. *Arthritis Care Res* 2018;70:627–34. <https://doi.org/10.1002/acr.23310>.
- [83] de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IEM, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009;9:1767–73. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03588.x>.
- [84] Radin M, Foddai SG, Cecchi I, Rubini E, Schreiber K, Roccatello D, et al. Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies: an update on their association with clinical manifestations of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2020;120:592–8. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1705115>.
- [85] Cattini MG, Bison E, Pontara E, Cheng C, Denas G, Pengo V. Tetra positive thrombotic antiphospholipid syndrome: major contribution of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies to lupus anticoagulant activity. *J Thromb Haemost* 2020;18:1124–32. <https://doi.org/10.1111/jth.14765>.
- [86] Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2007;97:949–54.
- [87] Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Saad Aldin E, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1358–67. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket126>.
- [88] Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other

- antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril* 1996;66:540–6. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58565-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58565-3).
- [89] Mehrani T, Petri M. Association of IgA Anti-beta2 glycoprotein I with clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2011;38:64–8. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100568>.
- [90] Pignatelli P, Ettore E, Menichelli D, Pani A, Violi F, Pastori D. Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of “non-criteria” antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica* 2020;105:562–72. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.221945>.
- [91] Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Cervera R, Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1011–8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204838>.
- [92] Uthman I, Noureldine MHA, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Management of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2019;78:155–61. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213846>.
- [93] Sciascia S, Amigo M-C, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: “extra-criteria” manifestations and technical advances. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:548–60. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.124>.
- [94] Cervera R, Rodríguez-Piñó I, Colafrancesco S, Conti F, Valesini G, Rosário C, et al. 14th international congress on antiphospholipid antibodies task force report on catastrophic antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2014;13:699–707. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.03.002>.
- [95] Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2014;48–49:20–5. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.006>.
- [96] Unlu O, Erkan D, Barbhuiya M, Andrade D, Nascimento I, Rosa R, et al. The impact of systemic lupus erythematosus on the clinical phenotype of Antiphospholipid antibody-positive patients: results from the antiphospholipid syndrome alliance for clinical trials and international clinical database and repository. *Arthritis Care Res* 2019;71:134–41. <https://doi.org/10.1002/acr.23584>.
- [97] Sciascia S, Radin M, Cecchi I, Bertolaccini ML, Bertero MT, Rubini E, et al. Identifying phenotypes of patients with antiphospholipid antibodies: results from a cluster analysis in a large cohort of patients. *Rheumatology* 2020;kez596. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez596>.
- [98] Belizna C, Stojanovich L, Cohen-Tervaert JW, Fassot C, Henrion D, Loufrani L, et al. Primary antiphospholipid syndrome and antiphospholipid syndrome associated to systemic lupus: are they different entities? *Autoimmun Rev* 2018;17:739–45. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.027>.
- [99] Rodríguez-Piñó I, Moitinho M, Santacreu I, Shoenfeld Y, Erkan D, Espinosa G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of 500 patients from the International CAPS Registry. *Autoimmun Rev* 2016;15:1120–4. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.010>.
- [100] Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Sáez-Comet L, Lefkou E, Mekinian A, et al. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): a survey of 1000 consecutive cases. *Autoimmun Rev* 2019;18:406–14. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.006>.
- [101] Zuily S, Clerc-Urmès I, Bauman C, Andrade D, Sciascia S, Pengo V, et al. Cluster analysis for the identification of clinical phenotypes among antiphospholipid antibody-positive patients from the APS ACTION Registry. *Lupus* 2020;29:1353–63. <https://doi.org/10.1177/0961203320940776>.
- [102] Volkov I, Seguro L, Leon EP, Kovács L, Roggenbuck D, Schierack P, et al. Profiles of criteria and non-criteria anti-phospholipid autoantibodies are associated with clinical phenotypes of the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Highlights* 2020;11:8. <https://doi.org/10.1186/s13317-020-00131-3>.
- [103] Sailer T, Zoghiani C, Kurz C, Rumpold H, Quehenberger P, Panzer S, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are associated with pregnancy loss in women with the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 2006;95:796–801.
- [104] Lee EY, Lee C-K, Lee TH, Chung SM, Kim SH, Cho YS, et al. Does the anti-beta2-glycoprotein I antibody provide additional information in patients with thrombosis? *Thromb Res* 2003;111:29–32. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.08.023>.
- [105] Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 2011;118:4714–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340232>.
- [106] Reynaud O, Lega J-C, Mismetti P, Chapelle C, Wahl D, Cathébras P, et al. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2014;13:595–608. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.11.004>.
- [107] Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003;101:1827–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0441>.
- [108] Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis: a multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2007;97:949–54. <https://doi.org/10.1160/TH06-10-0604>.
- [109] Groot PGD, Lutters B, Derksen RHW, Lisman T, Meijers JCM, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:1993–7. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01485.x>.
- [110] Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009;9:998–1005. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70239-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70239-X).
- [111] Petri M. Update on anti-phospholipid antibodies in SLE: the Hopkins lupus cohort. *Lupus* 2010;19:419–23. <https://doi.org/10.1177/0961203309360541>.
- [112] De Laat B, Derksen RHW, Reber G, Musial J, Swadzba J, Bozic B, et al. An international multicentre-laboratory evaluation of a new assay to detect specifically lupus anticoagulants dependent on the presence of anti-beta2-glycoprotein autoantibodies. *J Thromb Haemost JTH* 2011;9:149–53. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04068.x>.
- [113] Chayoua W, Kelchtermans H, Gris J-C, Moore GW, Musial J, Wahl D, et al. The (non-)sense of detecting anti-cardiolipin and anti-β2glycoprotein I IgM antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost JTH* 2020;18:169–79. <https://doi.org/10.1111/jth.14633>.
- [114] Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Cuffaro S, Banzato A, Bison E, et al. Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost JTH* 2015;13:782–7. <https://doi.org/10.1111/jth.12865>.
- [115] Nascimento IS, Radin M, Gándara APR, Sciascia S, de Andrade DCO. Global antiphospholipid syndrome score and anti-β2 glycoprotein I domain I for thrombotic risk stratification in antiphospholipid syndrome: a four-year prospective study. *Lupus* 2020;29:676–85. <https://doi.org/10.1177/0961203320916527>.
- [116] Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatology* (Oxford) 2013;52:1397–403. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes388>.
- [117] Artenjak A, Locatelli I, Brelvi H, Simonić DM, Ulcova-Gallova Z, Swadzba J, et al. Immunoreactivity and avidity of IgG anti-β2 glycoprotein I antibodies from patients with autoimmune diseases to different peptide clusters of β2-glycoprotein I. *Immunol Res* 2015;61:35–44. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8578-0>.
- [118] Chighizola CB, Pregnolato F, Andreoli L, Bodio C, Cesana L, Comerio C, et al. Beyond thrombosis: anti-β2GPI domain 1 antibodies identify late pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2018;90:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.002>.
- [119] Andreoli L, Nalli C, Motta M, Norman GL, Shums Z, Encabo S, et al. Anti-β2-glycoprotein I IgG antibodies from 1-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target domain 4/5: might it be the reason for their “innocent” profile? *Ann Rheum Dis* 2011;70:380–3. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.137281>.
- [120] Andreoli L, Chighizola CB, Nalli C, Gerosa M, Borghi MO, Pregnolato F, et al. Clinical characterization of antiphospholipid syndrome by detection of IgG antibodies against β2-glycoprotein I domain 1 and domain 4/5: ratio of anti-domain 1 to anti-domain 4/5 as a useful new biomarker for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2015;67:2196–204. <https://doi.org/10.1002/art.39187>.
- [121] Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome: a systematic review. *Thromb Haemost* 2014;111:354–64. <https://doi.org/10.1160/TH13-06-0509>.
- [122] Tonello M, Mattia E, Favaro M, Del Ross T, Calligaro A, Salvan E, et al. IgG phosphatidylserine/prothrombin antibodies as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid antibody carriers. *Thromb Res* 2019;177:157–60. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.03.006>.
- [123] Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2012;64:504–12. <https://doi.org/10.1002/art.33340>.
- [124] Pregnolato F, Gerosa M, Raimondo MG, Comerio C, Bartoli F, Lonati PA, et al. EUREKA algorithm predicts obstetric risk and response to treatment in women with different subsets of anti-phospholipid antibodies. *Rheumatology* (Oxford) 2020. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa203>.
- [125] Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, Jose SP, Hoxha A, Ruffatti A, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood* 2018;132:1365–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-848333>.
- [126] Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1296–304. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215213>.
- [127] Kaegi C, Wuest B, Schreiner J, Steiner UC, Vultaggio A, Matucci A, et al. Systematic review of safety and efficacy of rituximab in treating immune-mediated disorders. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01990>.
- [128] Khattri S, Zandman-Goddard G, Peeva E. B-cell directed therapies in antiphospholipid antibody syndrome — new directions based on murine and human data. *Autoimmun Rev* 2012;11:717–22. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.12.011>.
- [129] Erre GL, Pardini S, Faedda R, Passiu G. Effect of rituximab on clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a case report and a review of literature. *Lupus* 2008;17:50–5. <https://doi.org/10.1177/0961203307085251>.
- [130] Dobrowolski C, Erkan D. Treatment of antiphospholipid syndrome beyond anticoagulation. *Clin Immunol Orlando Fla* 2019;206:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.03.001>.

- [131] Erkan D, Vega J, Ramón G, Kozora E, Lockshin MD. A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2013;65:464–71. <https://doi.org/10.1002/art.37759>.
- [132] Suzuki K, Nagasawa H, Kameda H, Amano K, Kondo T, Itoyama S, et al. Severe acute thrombotic exacerbation in two cases with anti-phospholipid syndrome after retreatment with rituximab in phase I/II clinical trial for refractory systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2009;48:198–9. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken421>.
- [133] Legault K, Schunemann H, Hillis C, Yeung C, Akl EA, Carrier M, et al. McMaster RARE-Bestpractices clinical practice guideline on diagnosis and management of the catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2018;16:1656–64. <https://doi.org/10.1111/jth.14192>.
- [134] Cartron G, Watier H. Obinutuzumab: what is there to learn from clinical trials? *Blood* 2017;130:581–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-771832>.
- [135] Quartuccio L, Rupolo M, Michieli M, De Vita S. Efficacy and tolerability of repeated cycles of a once-weekly regimen of bortezomib in lupus. *Rheumatology* 2014;53:381–2. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket284>.
- [136] Tkachenko O, Lapin S, Maslyansky A, Myachikova V, Mikhailova L, Gilburd B. Relapsing Evans syndrome and systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome treated with Bortezomib in combination with plasma exchange. *Clin Immunol Orlando Fla* 2019;199:44–6. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.12.010>.
- [137] Schuetz C, Hoenig M, Moshous D, Weinstock C, Castelle M, Bendavid M, et al. Daratumumab in life-threatening autoimmune hemolytic anemia following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Adv* 2018;2:2550–3. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018020883>.
- [138] Migdady Y, Ediriwickrema A, Jackson RP, Kadi W, Gupta R, Socola F, et al. Successful treatment of thrombocytopenia with daratumumab after allogeneic transplant: a case report and literature review. *Blood Adv* 2020;4:815–8. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001215>.
- [139] Ostendorf L, Burns M, Durek P, Heinz GA, Heinrich F, Garantzotis P, et al. Targeting CD38 with Daratumumab in Refractory Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2020;383:1149–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023325>.
- [140] Kahn P, Ramanujam M, Bethunaickan R, Huang W, Tao H, Madaio MP, et al. Prevention of murine antiphospholipid syndrome by BAFF blockade. *Arthritis Rheum* 2008;58:2824–34. <https://doi.org/10.1002/art.23764>.
- [141] Emmi G, Bettiol A, Palterer B, Silvestri E, Vitiello G, Parronchi P, et al. Belimumab reduces antiphospholipid antibodies in SLE patients independently of hydroxychloroquine treatment. *Autoimmun Rev* 2019;18:312–4. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.11.002>.
- [142] Chatzidionysiou K, Samoli E, Sfrikakis PP, Tektonidou MG. Effect of belimumab treatment on antiphospholipid antibodies levels: post-hoc analysis based on two randomised placebo-controlled trials in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216367>.
- [143] Bettiol A, Pregnolato F, Sciascia S, Emmi G, Prisco D, Meroni PL. Association of subcutaneous belimumab and long-term antimalarial treatment reduces antiphospholipid antibodies levels in systemic lupus erythematosus: post-hoc analysis of a randomised placebo-controlled trial—comment on: ‘Effect of belimumab treatment on antiphospholipid antibody levels: post-hoc analysis based on two randomised placebo-controlled trials in systemic lupus erythematosus’ by Chatzidionysiou et al. *Ann Rheum Dis* 2020. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218377>.
- [144] Morand EF, Furie R, Tanaka Y, Bruce IN, Askanase AD, Richez C, et al. Trial of anifrolumab in active systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2020;382:211–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1912196>.
- [145] Palli E, Kravvariti E, Tektonidou MG. Type I interferon signature in primary Antiphospholipid syndrome: clinical and laboratory associations. *Front Immunol* 2019;10:487. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00487>.
- [146] Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D, Borghi MO, Grossi C, Guida F, et al. A non-complement-fixing antibody to $\beta 2$ glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome. *Blood* 2014;123:3478–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-537704>.
- [147] Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, Papalardo E, Vargas G, et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost JTH* 2009;7:833–42. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03316.x>.
- [148] Kolyada A, Porter A, Beglova N. Inhibition of thrombotic properties of persistent autoimmune anti- $\beta 2$ GPI antibodies in the mouse model of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2014;123:1090–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520882>.
- [149] Broder A, Putterman C. Hydroxychloroquine use is associated with lower odds of persistently positive antiphospholipid antibodies and/or lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2013;40:30–3. <https://doi.org/10.3899/jrheum.120157>.
- [150] Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1030–5. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.090670>.
- [151] Shapira I, Andrade D, Allen SL, Salmon JE. Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab. *Arthritis Rheum* 2012;64:2719–23. <https://doi.org/10.1002/art.34440>.

HYPOTHESES DE TRAVAIL

Le SAPL est une MAI dont les autoanticorps ont la propriété particulière d'entraîner un état pro-coagulant. Il n'est pas discutable que les aPL jouent un rôle pathogénique dans la maladie, notamment les anti- β 2GPI (Knight et al. 2023). Les preuves croissantes de l'implication du système immunitaire inné ont récemment renforcé la théorie du « *second hit* » selon laquelle un évènement additionnel à la présence d'autoanticorps est nécessaire pour conduire au phénotype clinique (Zuo et al. 2020; Chaturvedi et al. 2020). Néanmoins, les polymorphismes identifiés chez les patients, les formes monogéniques associés au SAPL, et la réaction croisée entre des anti- β 2GPI ayant subi une maturation d'affinité secondaire et des épitopes bactériens, dont l'immunisation génère des événements thrombotiques, sont autant d'arguments pour penser que de tels événements additionnels puissent être intrinsèques aux LB (Dieudonné, Guffroy, et al. 2019; Ruff et al. 2019; Yin et al. 2009; Sebastiani et al. 2016). L'efficacité variable des thérapies ciblant les LB, et le fait que des aPL puissent être détectés en l'absence de manifestations cliniques, justifie de mieux préciser les propriétés des LB autoréactifs et des autoanticorps réellement pathogènes dans la maladie.

De fait, les caractéristiques des LB ont été relativement peu étudiées dans le SAPL primaire. Les quelques travaux relatifs aux anomalies phénotypiques des LB périphériques montrent des résultats contradictoires (Carbone et al. 2009; Simonin et al. 2017; Alvarez-Rodriguez et al. 2018). De plus, et au contraire d'autres MAI comme le LES, la PR ou les vascularites, l'analyse approfondie du repertoire B n'a jamais été réalisée dans le SAPL (Bashford-Rogers et al. 2019). Les connaissances concernant les propriétés spécifiques des LB autoréactifs sont également restreintes. L'étude de ces LB est complexifiée de par la multiplicité des autoantigènes impliqués. Les travaux traitants du sujet, incluant de précédents travaux de notre équipe, sont limités à l'analyse d'anticorps monoclonaux isolés chez un patient unique ou au sein de cohortes hétérogènes. Ils soulignent l'importance de la maturation d'affinité secondaire et des SHM dans le caractère pathogène des aPL (P. Lieby et al. 2001; I. Giles et al. 2006). Une méta-analyse identifiant 36 aPL monoclonaux a mis en évidence une importante hétérogénéité des aPL avec peu de similarité en terme de région variable d'Ig (I. P. Giles et al. 2003). Toutefois, cette étude incluant à la fois des SAPL primaires, secondaires, et des sujets asymptomatiques avec positivité des aPL.

Dans ce travail, nous avons cherché à préciser les caractéristiques des LB et les propriétés des cellules B autoréactives dans le SAPL primaire, notamment en termes de profil de réactivité, de répertoire et de voie de différenciation. Nous nous sommes focalisés sur la forme primaire de la maladie afin de déterminer si les mécanismes impliqués étaient différents de ceux du LES auxquels le SAPL est fréquemment associé. Nous avons également choisi de recruter des patients avec triple positivité, pour constituer un groupe homogène de patients, mais aussi dans l'hypothèse que la rupture de tolérance B soit la plus marquée dans cette forme extrême de la maladie.

Dans un premier temps, nous sommes intéressés aux sous-populations B périphériques pour déterminer si des anomalies phénotypiques proches de cellules du LES étaient constatées. Un biais de répertoire global a été recherché par séquençage haut débit du BCR de ces LB. L'analyse plus spécifique des LB autoréactifs a été permise par une immortalisation de LB des patients en cellule unique et l'analyse systématique du profil de réactivité de chacune de ces cellules. Les caractéristiques de leur région variable ont ensuite été utilisées pour détecter les LB potentiellement réactifs contre les PL dans une analyse multimodale (*CITE-Seq, Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing*) sur les LB primaires des mêmes patients, permettant de les caractériser en terme de transcriptome (*single cell RNAsequencing*) et de profil d'expression protéique de surface (ADT pour *antibody derived tag*). L'ensemble de ces analyses avait pour objectif d'émettre des hypothèses quant aux potentiels mécanismes expliquant l'émergence de LB autoréactifs pathogéniques au cours du SAPL primaire triple positif.

MANUSCRIT

PAPIER 3

Dieudonné Y. Lorenzetti R., Rottura J., Janowska I., Depauw S., Wadier N., Frenger Q., Vollmer O., Jacquiel L., Zhu C., Giorgiutti S., Nespola B., Herb A., Martin T., Voll Reinhard E., Poindron V., Guffroy A., Soulas-Sprauel P., Ménager M.M., Rizzi M., Korganow A.S., Gies V.

Antiphospholipid B cells emerge from a naïve polyreactive pool and, in primary antiphospholipid syndrome, matured through an enhanced mTORC1/MYC activation. Submitted.

Antiphospholipid B cells emerge from a naive polyreactive pool and, in primary antiphospholipid syndrome, matured through an enhanced mTORC1/MYC activation.

ARTICLE TYPE: Research article

ONE SENTENCE SUMMARY

Autoreactive B cells in primary antiphospholipid syndrome derived from a naive polyreactive pool and escape selection process throughout follicular maturation.

AUTHORS

Dieudonné Yannick,^{1,2,3#} Lorenzetti Raquel,^{4#} Rottura Julien,² Janowska Iga,⁴ Depauw Sabine,² Wadier Nadège,² Frenger Quentin,² Jacquel Léa,^{1,2,3} Vollmer Olivier,^{1,2,3} Carbone Francesco,¹⁰ Luka Marine,¹⁰ Zhu Chengsong,⁵ Giorgiutti Stéphane,^{1,2,3} Nespola Benoît,⁶ Herb Agathe,⁷ Martin Thierry,^{1,2,3} Voll Reinhard Edmund,⁸ Poindron Vincent,¹ Guffroy Aurélien,^{1,2,3} Soulas-Sprauel Pauline,^{1,2,9} Ménager Mickaël Mathieu,¹⁰ Rizzi Marta,^{4,8*} Korganow Anne-Sophie,^{1,2,3*} Gies Vincent,^{1,2,9*}

#These authors contribute equally

*These authors share senior authorship

CORRESPONDANCE

To Yannick Dieudonné, Nouvel Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, Yannick.Dieudonne@chru-strasbourg.fr, phone +33369550521

To Vincent Gies, Nouvel Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, Vincent.Gies@chru-strasbourg.fr, phone +33369550521

AFFILIATIONS

¹ Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Systemic Autoimmune Diseases (CNR RESO), Tertiary Center for Primary Immunodeficiency, Strasbourg University Hospital, F-67000 Strasbourg, France.

² Université de Strasbourg, INSERM UMR - S1109, Institut thématique interdisciplinaire (ITI) de Médecine de Précision de Strasbourg, Transplantex NG, Fédération Hospitalo-

33 Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS),
34 F-67000 Strasbourg, France.

35 ³ Université de Strasbourg, Faculty of Medicine, F-67000 Strasbourg, France.

36 ⁴ Center for Chronic Immunodeficiency, Medical Center University of Freiburg, Faculty of
37 Medicine, University of Freiburg, Germany

38 ⁵ Microarray Core Facility, Department of Immunology, BioCenter, University of Texas

39 ⁶ Laboratoire d'Immunologie, Plateau technique de Biologie, Strasbourg University
40 Hospital, F-67000 Strasbourg, France

41 ⁷ Hematology laboratory, Strasbourg University Hospital, F-67000 Strasbourg, France

42 ⁸ Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Medical Center, Faculty of
43 Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany

44 ⁹ Faculty of Pharmacy, F-67400 Illkirch, France.

45 ¹⁰ Université Paris Cité, Institut Imagine, Laboratory of Inflammatory Responses and
46 Transcriptomic Networks in Diseases, Atip-Avenir Team, INSERM UMR 1163; F-75015
47 Paris, France.

ABSTRACT

Peripheral B cell selection of autoreactive B cells is crucial for preventing autoimmunity. In this study, we identify that a significant proportion of antiphospholipid (aPL) B cells present in the naive compartment, exhibit polyreactivity and belong to the natural repertoire. Interestingly, in primary antiphospholipid syndrome (PAPS), a life-threatening autoantibody-mediated clotting disorder, these aPL B cells are not effectively eliminated from the post-antigenic compartment. Analysis of B cell phenotype and repertoire suggest that autoantibodies are of germinal center origin in PAPS. In contrast, in systemic lupus erythematosus to which APS is often associated autoreactive B cells are of extrafollicular origin. We followed B cells with aPL features throughout their development from naïve B cells to bone marrow plasma cells in patients with PAPS. We found a distinct IFN and APRIL signature, as well as dysregulation of mTORC1/MYC, which may elucidate the survival of these autoreactive B cells and suggest a potential therapeutic opportunity for the treatment of PAPS.

INTRODUCTION

The ability to bind self-antigens is widespread in the antibody repertoire within the immature and the naive B cell developmental stages. In healthy individuals, self-reactive specificities are counter-selected or regulated within the memory compartment (1–3). Failure in B cell tolerance checkpoints may result in the formation of autoantibodies and autoimmune diseases (AD) (4). These autoantibodies can be pathogenic with devastating consequences in AD such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), or antiphospholipid syndrome (APS).

Understanding origin of self-reactivity has therapeutic relevance. Indeed, B cell depletion is often beneficial, but paradoxically, B cell targeting therapies are not always effective. This suggests that either non-B cells or distinct B cell subpopulations resistant to treatment contribute to disease maintenance. Upon antigen encounter and in presence of second signal via T cells help or Toll-like receptor, naive B cells can rapidly develop into plasmablast via the extrafollicular (EF) differentiation pathway (5, 6). Alternatively, they can move in to the germinal center (GC) and mature to class switched memory cells and long-lived plasma cells that migrate to bone marrow (BM) where they produce antibodies for a life-time (6). Affinity and activation of B cell receptor contribute to developmental decision in these processes (7, 8). In SLE an expansion of the EF B cell response has been linked to disease activity and the production of anti-dsDNA antibodies (9). The EF response has also been implicated in the break of B cell tolerance of RA and multiple sclerosis. Besides, the role of GC in these diseases has been sustained by defect in clonal redemption, in which somatic hypermutation (SHM) allows to ‘mutate’ away from self-reactivity (10–12).

APS is a life-threatening autoantibody-mediated clotting disorder. It manifests with a wide range of clinical symptoms, including venous, arterial thrombosis, or severe pregnancy complications (13). Thrombotic events are directly linked to pathogenic autoantibodies, known as antiphospholipid antibodies (aPL), directed against membrane phospholipids (PL) and/or their associated cofactor plasma proteins, (14, 15). Diagnosis is notably based on the presence of at least one “criteria” aPL autoantibody, i.e. lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin (aCL), and/or anti- β 2 glycoprotein I (a β 2GP1) antibodies) (13, 16). The primary form of APS (PAPS) occurs in the absence of an underlying systemic autoimmune disease, but APS is often associated with SLE (17). Even though APS is driven by

pathogenic autoantibodies, no clear characteristics of B cells have emerged. In 11 patients with PAPS, an increased frequency of naïve and transitional B cells was observed, along with a decrease in switched memory B cells compared to control subjects or patients who experienced a thrombotic event without aPL (18). However, the observed variations were modest and not replicated in a larger cohort of 37 PAPS patients (19). B cell receptor (BCR) repertoire has been investigated in several immune-mediated diseases, and profound changes have been described in SLE, RA, or vasculitides (20), but in-depth BCR repertoire analysis is lacking in APS. Additionally, little is known about aPL-producing B cells in APS. In fact, the diversity of self-antigens targeted by the autoantibodies represent a major challenge in identifying them. Systematic analysis of aPL variable region sequences showed VH gene or family usage comparable to control; though this study was performed on 36 sequences only and mostly derived from asymptomatic patients (21). We previously demonstrated that unmutated aPL are less pathogenic than mutated aPL (22–24), suggesting that pathogens or commensals could drive the affinity maturation of such antibodies or their production (25). Another hypothesis is that some individuals present in addition intrinsic features of B cell favoring the expansion of pathogenic clones. To uncover the B cell features underlying the disease we studied a homogenous PAPS cohort with triple-aPL-positivity, representing an extreme form of the disease (i.e. the "highest thrombosis-risk" aPL profile) (26) and a model of strong B cell tolerance breakdown without biases related to other autoimmune diseases (e.g. SLE). Based on B cell phenotype and lupus-like model data (27), we hypothesized that break of tolerance for aPL B cells follows a different path compared to autoreactive B cells in SLE. Using single B cell repertoire, transcriptome and reactivity characterization, we find that aPL B cells have specific BCR variable chain features sustaining polyreactivity and, in PAPS patients, are not effectively eliminated from the post-antigenic compartment. Moreover, IFN and APRIL signature, as well as dysregulation of mTORC1/MYC may explain the survival of these autoreactive B cells and suggest a potential therapeutic opportunity for the treatment of PAPS.

RESULTS

B cell subpopulations distribution in triple positive PAPS is not altered

We studied 16 non-consanguineous male and female PAPS patients with triple positivity of European ancestry, aged between 29 and 65 years. These patients fulfilled both Sydney and 2023 ACR/EULAR criteria (13, 16), and did not exhibit any other autoimmune diseases (**Table S1**). B cell flow cytometry analysis revealed that numbers and percentages of total B cells were comparable between patients and aged/sex-matched healthy donors (HD, $8.7\% \pm 1.0$ of lymphocytes vs $7.8\% \pm 1.1$, $P = 0.4$) (**Fig. 1A and B**). In line with previous report (19), the distribution of B cell subsets was similar between patients and controls. Indeed, despite a slight but non-significant increase of transitional B cells (CD19+CD27-CD24^{high}CD38^{high}; $4.9\% \pm 0.7$ vs $3.5\% \pm 0.4$, $P = 0.18$), distribution of memory B cells (CD19+CD27+) (24.3% versus 22.9% , $P = 0.81$), antibody secreting cells (ASC) (**Fig. 1A-C**), as well as the distribution of B cells expressing distinct Ig subclasses (**Fig. 1D**) were similar to controls.

Extrafollicular B cell compartment is not expanded in PAPS

The extra-follicular response is characterized by B cells that express CD11c, the transcription factor T-bet and low level of CD21, and derive from naive B cells via IL-21/IFN γ cytokines, TLR7 and T cell stimulation (28). Increase of CD11c⁺ cells, which include CD27⁻IgD⁺ activated naive (aN) B cells and a subpopulation of switched CD27⁻IgD⁻ cells (double-negative, DN2), has been described in different conditions including SARS-Cov2 or auto-immune-prone Down syndrome patients (9, 28, 29). Of note, they are largely expanded in SLE and represent a pool of “pre-plasmablasts” enriched for autoreactive specificities (5, 30). Given the link between SLE and APS, we wanted to determine if extra-follicular activation was also a hallmark of PAPS. Neither DN2 nor aN B cells were increased in PAPS patients (**Fig. 1E and F**), with respectively $0.46\% \pm 0.1$ of CD19⁺ cells vs $0.69\% \pm 0.1$ ($P = 0.22$) and $0.59\% \pm 0.1$ vs $0.72\% \pm 0.1$ in HD ($P = 0.85$). We rather found a trend toward an increased DN1/DN2 ratio (**Fig. 1F**). DN1 cells are thought to be switched memory B cells precursors (5). CXCR5, a follicle homing receptor, and CXCR3, an inflamed tissue homing receptor, surface expressions were similar in respective CD11c⁺ and CD11c⁻ populations between patients and HD (**Fig. 1G**). Frequencies of regulatory T cells and of the different T cells subsets, including the circulating T follicular helper cells,

frequently correlating with CD11c⁺ B cell expansion (28), were also comparable (**Fig. S1A**).

Altogether, PAPS patients appeared to have mild abnormalities in B cell phenotype with no evidence of extrafollicular activation.

BCR diversity is reduced in PAPS

Within the BCR variable regions, distinct VH segments have been associated with autoimmunity (20). We studied the BCR repertoire by extracting BCR sequences from a single B cell multimodal analysis (combining single-cell V(D)J sequencing, RNA sequencing (scRNA-Seq) and antibody-derived tags (ADT analysis) of sorted B cells from PBMCs of 5 PAPS patients and 2 HD (**Fig. 2A**).

We did not observe consistent differences in the whole V(D)J gene usage patterns (**Fig. 2B-F**), CDR3 amino acid length distribution (**Fig. 2G**) or SHM frequencies (**Fig. 2H**). However, PAPS patients showed reduced clonotype diversity for the *IGHV* repertoire compared to HD across the IGHM IGHG and IGHA subsets (**Fig 2I, J**), as indicated by the Chao1 (abundance of unique clones in a repertoire) and D50 (number clonotype contributing 50% of the cumulative CDR3 sequences) indexes. The constrained clonotype diversity within the IGHM compartment suggests an impaired generation or selection of the primary repertoire in the BM.

aPL-specific B cells escape tolerance and persist after the naive B cell stage in PAPS

Several autoantigens have been identified in APS (31). Beside the criteria aPL, patients may also develop other aPL, such as anti-phosphatidylserine/prothrombin complex, anti-phosphatidylethanolamine, anti-annexinA5. These are not part of the diagnostic criteria, despite growing evidence of their involvement in thromboembolic events (31). To identify aPL B cells in PAPS patients and examine their BCR profile, we performed single-cell EBV transformation on isolated CD27⁻ and CD27⁺ B cells from five PAPS patients with triple aPL positivity (32–34). Clonality was assessed by Ig isotype and kappa/lambda staining. Based on Ig staining, we identified the transformed cells as naïve (CD27-IgD⁺), unswitched memory (CD27-IgD⁺), memory (CD27-IgD⁻), and double negative (CD27-IgD⁻) B cells. We tested the monoclonal antibodies secreted by the immortalized B cells for reactivity against criteria PL (i.e., CL and β 2GPI), as well as non-criteria PL (pool PL, **Fig. 3A, B**).

The frequency of aPL B cell clones decreased along maturation stages, with respectively 31.3%, 22.1% and 18.1% of aPL-producing B cells in naive, unswitched memory and switched memory B cells (**Fig. 3C**). The frequency of PL specific B cell clones within the naïve compartment was similar between HD and PAPS patients (39.3% vs 31.3%, $P = 0.07$), suggesting that aPL B cells are part of the natural repertoire. In HD, the frequency of aPL B cell clones markedly dropped within the CD27⁺ memory B cells (12% vs 20.6% in PAPS patients, $P = 0.008$) especially in the switched memory population (7.4% vs 18.1%, $P = 0.01$; **Fig. 3C** and **Fig. S2**). IgG⁺ aPL clones were of IgG1 and IgG3 isotype, consistently with previous report linking anticardiolipin specificity and IgG3 subtype, with a significantly higher frequency of IgG3 compared to non-aPL clones (27.8% vs 4.7%, $P = 0.0003$) (35) (**Fig. 3D**). Autoantibody silencing can occur via the substitution of the light chain, especially via the use of lambda light chains (1). We observed a predominant use of kappa light chain in aPL clones (**Fig. 3E**), suggesting that impaired receptor editing/silencing may support the maintenance of aPL in the B cell pool. These data suggest a peripheral tolerance defect in triple positive PAPS with the survival of memory aPL B cells in PAPS patients.

The naive pool of aPL B cells is largely polyreactive in PAPS

aPL are found in up to 20% of HD (23, 24), supporting the hypothesis that aPL belong to the natural repertoire. Natural autoantibodies are known to be polyreactive (1, 36), hence we screened the polyreactive features of aPL and non-aPL antibodies secreted by the B cell clones. We tested their reactivity against Hep-2 cells by Immunofluorescent assay (IFA) and against a panel of defined antigens using ELISA. Naive and memory IgM⁺ aPL clones displayed a high frequency of HEp-2 reactivity as compared to non-aPL ones (respectively 79.5% vs 17.6% and 45.8% vs 9.4%, $P < 0.0001$, **Fig. 4A**). IgG aPL progressively lost their HEp-2 reactivity, although it was still higher than their non-aPL counterparts (16.7% vs 10%; $P = 0.6$). Of note, one specific cytoplasmic staining pattern was recurrent and suggestive of reactivity against vimentin, proposed to be a cofactor of CL and a potential target of aPL (**Fig. S3**) (37). A high proportion of naive aPL-specific clones had reactivities to nucleosome, thyroglobulin, myosin, insulin and/or tetanus antigens (**Fig. 4B**) and antibodies with multiple reactivity (cluster 2,3,4) mostly belong to the aPL positive pool as suggested by unsupervised clustering approach based on ELISA reactivity (**Fig. 4C**). Indeed, 45%, 18.8% and 0% of aPL derived from IgM⁺CD27⁻,

IgM⁺CD27⁺ and IgG⁺CD27⁺ clones respectively recognized more than 3 antigens by ELISA (vs 0% in non-aPL clones) supporting (i) polyreactivity in a substantial proportion of IgM⁺CD27⁻ aPL clones and (ii) that switched clones were no longer polyreactive (**Fig. 4D**). Antigen array testing reactivity for 97 different foreign and self-antigens confirmed the high frequency of polyreactivity in IgM aPL clones (**Fig. S4**). It has recently been shown that human IgG anti- β 2GP1 cross-react with infectious mimotopes, suggesting that cross-reactivity may drive affinity maturation of natural PL reactive B cell that will then exhibit pathogenic features (38). However, no reproducible pattern of reactivity was identified among aPL clones, considering bacterial or viral epitopes (eg. SARS-CoV2 peptides (39)) (**Fig. S4**).

As expected, HD clones exhibited similar characteristics of reactivity, with 79.8% of naive IgM⁺ aPL testing positive on HEp-2 (vs 79.5% in PAPS patients, $P = 0.9$) and 48.5% against more than 3 antigens in ELISA (vs 45% in PAPS patients, $P = 0.9$). A gradual decrease in polyreactivity was also observed as B cells matured (**Fig. S2B-D**). These findings were confirmed by the auto-antigen array (**Fig. S5**).

We concluded that aPL B cells in PAPS patients emerge from a natural polyreactive B cell pool existing in HD and lose polyreactivity during their evasion of tolerance mechanisms.

aPL antibodies have a constrained repertoire usage and distinct CDR3 features

As the variable region of the BCR of PAPS patients show lower diversity compared to controls, we explored the hypothesis that a restricted repertoire encoding the variable regions of heavy and light chain and/or intrinsic BCR features may explain a predetermined reactivity of aPL B cells. Distinct self-reactive BCR hallmarks have been described in different autoimmune conditions, including skewed use of VDJ families, longer CDR3, and impairment of Ig light chain recombination (1, 20). Thus, Ig variables region (heavy and light chain) from 384 clones were sequenced. We found that aPL clones compared to non aPL had a restricted usage of V genes, with an enrichment of specific *IGHV3-11*, *3-21*, *3-74*, *4-34* and *4-39* genes (cumulative frequency 24% in aPL clones vs 9% in the non-aPL, $P = 0.0001$, **Fig. 5A**). Increase frequency of *IGHV4-34* (and its 9G4 idiotype) has been described in autoimmune diseases and both *IGHV3-74* and *4-39* have been isolated in patients with primary and secondary APS respectively (40, 4, 10, 41). Considering individual samples, in four of the five patients the BCR gene segments had a bias toward *IGHV4-39* and three toward *IGHV3-74* and/or *IGHV4-34* (**Fig. 5A**, see boxed

figure). Of note, 71% of *IGHV4-34* and 60% of *IGHV4-39* aPL clones from the IgM⁺CD27⁻ compartment, belong to cluster 3 and 4 in (thereby recognizing at least 3 different antigens) (**Fig. 4C**).

Increased *IGHD-6* family usage was another feature of aPL clones (27% vs 17%, $P = 0.01$, **Fig. 5B**), whereas similar repartition of *IGHJ* gene usage was observed between the two groups (**Fig. 5C**). CDR3 of aPL clones exhibited a significant higher number of positively charged amino acids (2.0 ± 0.1 vs 1.6 ± 0.1 , $P = 0.003$), a feature associated with self-reactivity (1) that is consistent with facilitated binding to negatively charged PL (**Fig. 5D**). Arginine residues in CDR are important in conferring the ability to bind $\alpha 2$ GP1-dependent PL (42) and their frequency was notably increased in CDR3 from aPL clones (**Fig. 5D**). No significant differences were detected in CDR3 length, number of non-templated (N) nucleotide or SHM, (**Fig. 5E-G**). Light chain sequencing confirmed increased usage of kappa isotype in aPL clones (60% vs 50% in non-aPL clones) and revealed a preferential usage of *IGKV3-20* (23% of kappa aPL clones vs 15%). *IGLV2-14* and *IGLV2-23* were the most frequent genes used among lambda aPL clones (mean frequency 22% and 14% respectively vs 14% and 7% in non aPL clones) (**Fig. S6A-H**). No significant differences were observed in the CDR3 with regard to positively charged amino acids, SHM, or length. *IGHV3-11*, *3-21*, *3-74*, *4-34* and *4-39* encoded antibody were more frequently associated with kappa light chain when they exert PL reactivity (**Fig. S6I**). Our data therefore suggest that VDJ usage is restricted in aPL B cells since the naive stage. The similar level of SHM to non-aPL clones in the switched memory compartment supports the GC-dependent post-antigen maturation.

ASC secreting pathogenic aPL persist in the BM of patients

In healthy human, several antibodies arising from the BM are self-reactive, but many of these are removed from the repertoire during B cell development due to peripheral checkpoints (1–3, 43). In this view, B cells with *IGHV4-34* BCR, which are intrinsically autoreactive, are censored in the GC and prevented from differentiating into ASC, a mechanism that is defective in SLE (44). In our cohort *IGHV3-21*, *IGHV3-74* and *IGHV4-39* gene were still enriched in the memory compartment of aPL clones with a significant higher frequency than in memory non-aPL clones (cumulative frequency 16.3% vs 4.8%, $P = 0.01$, **Fig. 5H**), arguing that BCRs with specific aPL features persist in the post-antigenic compartments of PAPS patients. In opposition, *IGHV4-34* and *IGHV3-11* clones

were no longer found in the memory compartment of aPL clones (**Fig. 5H**). In HD, *IGHV3-11*, *3-21*, *4-34* and *4-39* usage was also found in naive aPL clones but none of these VH families were detected in aPL memory B cells (**Fig. S7A, B**). Considering that ASC survive as long-lived plasma cells (PC) in the BM, we characterize the antibody repertoire of BM PC in PAPS patients. We obtained the IgH and IgL chain genes of 69 single CD138⁺CD27⁺CD38⁺ PC isolated from the BM of two patients of our series. *IGHV4-39* usage frequency was four time higher when compared with public data obtained from BM PC of HD (45) (**Fig. 5I**).

Thus, in PAPS patients PL reactive B cells are not eliminated from the post antigenic compartment and become long-lived PC.

B cells from PAPS patients display MYC and mTORC1 activation and an increased level of TACI

To gain insight into the immunological mechanisms leading to the persistence and the activation of aPL reactive B cells in PAPS patients, scRNA-Seq libraries were dimensionally reduced and visualized in a single two-dimensional uniform manifold approximation and projection (UMAP). For each sample, unsupervised hierarchical clustering grouped the cells into 12 clusters without clear differences between patients and HD (**Fig. 6A and B**). Differentially expressed genes (DEGs) were used to link the clusters to previously identified B cell subpopulations (**Fig. 6C and Fig. S9A**). Examination of isotype using V(D)J sequences confirmed that naive, transitional and unswitched B cells segregate with *IGHM* on the one hand; and switched and DN with *IGHG/A* on the other hand (**Fig. S8B**). Consistent with flow cytometry analysis, B cell subsets distribution, as well as kappa/lambda repartition in all B cell subpopulation were comparable between PAPS patients and HD (**Fig. S8C-D**).

Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed an increased expression in PAPS B cells compared to HD B cells of MYC target genes (NES = 7.86), genes related to oxidative phosphorylation (NES = 7.71), genes involved in IFN α/γ response (NES = 4.61) and genes related to mTORC1 axis (NES = 5.41, **Fig. 6D**) in PAPS B cells as opposed to HD B cells. The serine-threonine kinase mTOR is a component of two protein complexes, mTORC1 and mTORC2, which regulate protein synthesis, survival and cell growth (46). mTORC1 is involved in B cell proliferation, and is needed for B cell to prepare plasma cell functions and subsequent antibody synthesis (47). Together with MYC, it is essential in GC initiation,

323 maintenance and positive selection by allowing selected light-zone B cells to proliferate
324 and to re-enter the dark zone (48, 49). In PAPS patients, genes involved in MYC and
325 mTORC1 signaling pathway were significantly enriched in both naive and memory B cells
326 from patients (**Fig. 6E**). Unsupervised hierarchical clustering relating on 50 genes from
327 the mTORC1 pathway grouped four patients' samples together, in which most of these
328 genes were upregulated, including mTORC1 positive regulators such as *RPTOR*, *MIOS* or
329 *RHEB*. (**Fig. 6F**). CD148 is a receptor phosphatase that is expressed in response to AKT
330 phosphorylation in B cells (50). We assessed CD148 expression, as proxy for Akt-PI3K-
331 mTOR pathway, and found increased CD148 expression in PAPS naive B cells (**Fig. S8E**),
332 in line with their mRNA changes.

333 Projecting scaled enrichment score revealed that, among naive B cells, cluster 17 and 18
334 display the strongest enrichment in MYC, mTORC1 and IFN α activation (**Fig. 6G**). These
335 clusters also exhibit the highest levels of IFN receptor genes expression, and, together with
336 cluster 8, higher expression of *TNFRSF13B*, encoding the transmembrane activator and
337 CAML interactor (TACI) than other naive clusters (**Fig. 6H**). Of note, the frequency of B
338 cells belonging to cluster 8, 16 and 17 was increased in patients (**Fig. 6B**). TACI serves as
339 a receptor for BAFF and APRIL cytokines and is expressed as of mature naive B cells.
340 Engagement of TACI plays a crucial role in mitigating apoptosis, driving class-switching
341 recombination and germinal center maintenance, as well as promoting antibody
342 production (51). Consistently with *RNAseq*, a higher surface expression of TACI (but not
343 BAFF-R) was found on naive B cells using flow cytometry (**Fig. 6I and Fig. S8F**) as well as
344 increased level of APRIL in patients' sera (**Fig. S8G**).

345 Our data therefore suggest that B cells from PAPS patients, since the naive stage, are
346 submitted to proliferation and activation pressures, involving IFN and APRIL cytokines on
347 the one hand, mTORC1 and MYC axis on the other.

348
349 *MYC/mTORC1 activation is associated with hallmarks of GC differentiation and defective*
350 *positive selection in aPL specific B cells*

351 To study the specific transcriptomic and protein expression of aPL B cells in PAPS patients,
352 we then identified *IGHV3-11*, *3-74*, *3-21*, *4-34* and *4-39* BCR on CITE-Seq. First, we
353 confirmed a reduced diversity in these clonotypes which were associated to restrained
354 *IGLV* in patients as compared to HD (**Fig. 7A**). The proportion of *IGHV3-21*, *3-74*, and *4-39*

B cells was comparable between patients and HD in naiveIGHM and IGHG populations (Fig. 7B).

We then focus on *IGHV4-39* encoding aPL since they are found up to plasma cells in patients. The expression levels of various cell surface proteins, BCR complex transmembrane proteins and activation markers, were assessed according to *IGHV4-39* or non *IGHV4-39* usage. No differences were observed between cells expressing a *IGHV4-39* BCR and those who did not in patients or in HD (Fig. 7C). However, compared to HD, naïve B cells from patients displayed increased level HLA-DR molecules and a decreased surface expression of IgM that could increase the threshold of BCR engagement and alter early peripheral negative selection. Memory B cell subset was similar between patients and controls (Fig. 7C).

We did not find differences in genes expression between *IGHV4-39* and other B cells in patients but observed that MYC and mTORC1 pathway signature was globally enriched as opposed to B cells from HD, in both naive and memory B cells (Fig. 7D). Hence, MYC and mTORC1 activation appears as a hallmark of all B cells in PAPS rather than a specific signature of PL reactive B cells. Likewise, both *IGHV4-39* and other clonotypes of patients display an increase pre-GC signature (52) and increased transcription of follicle homing receptors *SELL* and *CXCR5*. PAPS naive B cells did not exhibit a plasmablast signature that could have indicated that they were poised to generate short lived plasmablasts (Fig. 7E and F). Accordingly, a trend for increased CXCR4 expression found on circulating ASC (Fig. S1B and C) suggest that they are prone to join the BM as long-lived plasma cell, a process usually associated with GC maturation. The *in vitro* formation of plasmablasts (CD27^{high}CD38^{high}), upon T help mimicking condition (stimulation with CD40L and IL-21), was enhanced in PAPS patients (Fig. 7G).

We next tested if dysregulation of mTORC1/MYC axis and hyperresponsiveness to T cell help could alter positive selection process in periphery. As BCR with *IGHV3-21*, 74 or 4-39 was only slightly increased in the post antigenic compartment, we hypothesized that patient fail to attenuate their self-reactivity in late processes such as clonal redemption. Analysis of intra-clonal VH mutations indeed revealed that SHM more frequently introduced arginine, lysine or histidine residues in VH, and arginine in CDR3, in patients than in HD (Fig. 7I-J). Altogether, these results reinforce the perspective that, in patients, B cells are preferentially oriented towards follicular maturation with a failure to eliminate or attenuate self-reactivity of PL reactive BCR.

DISCUSSION

APS is a model for auto-antibody mediated disease (53), in which the genesis of pathogenic aPL remains incompletely understood due to the complex pattern of aPL reactivities and the challenge of identifying aPL specific B cells. To overcome these challenges, we focused on PAPS patients to avoid the confounding influence of SLE, which is frequently linked to APS. Additionally, we studied triple-positive PAPS, a subset with highly severe autoimmune disease. By employing B cell scRNAseq in conjunction with single-cell EBV immortalization, we were able to link phenotype and function of self-reactive B cell specificities. We demonstrated that in triple positive PAPS, self-reactive naïve B cells preferentially mature via the follicular pathway and become long-lived plasma cells. Altered positive selection in the post antigenic compartment suggests that dysregulation of mTORC1/MYC axis and hyperresponsiveness to T cell help could enable natural naïve PL reactive B cells to increase their specificity and become pathogenic.

It is widely accepted that most self-reactive B cells, including antinuclear antigen specific clones, are primarily regulated in the BM through mechanisms such as clonal deletion, receptor editing, or silencing during the transition from early immature to immature stages (2). A second tolerance checkpoint further eliminates autoreactive B cells between new emigrant or transitional B cells and mature naïve B cells. Despite these processes, the naïve B cell repertoire of HD still retains around 20% of self-reactive B cells (1). Given that most naïve or IgM⁺ aPL B cell clones in patients with PAPS exhibit polyreactivity towards self or non-self-antigens, we conclude that aPL B cells originate from a heterogeneous natural polyreactive pool of B cells. This observation holds true for both PAPS patients and healthy individuals, as supported by our data.

After antigen encounter, activated B cells either differentiate into short-lived plasma cells or after cognate interaction with antigen-specific T cells, can form GCs (54–56). B cells that pass the GC increase their affinity, through iterative cycles of clonal expansion and SHM in the variable regions of the heavy and light chains, and can commit to the plasma cell lineage or alternatively become memory B cells and long-lived quiescent cells capable of reactivation (57). However, it is now admitted that both CSR and SHM can occur both inside and outside of GC (58). Indeed, SLE is characterized by B-cells lacking IgD and CD27 (DN), which include CXCR5-CD11c⁺ cells (DN2), actors of B extrafollicular response, that represent pre-plasma cells (5). Although, we confirm an IFN transcriptional signature at the B cell level, neither our phenotypic or transcriptomic analysis show similar B cells

subpopulation repartition and neither of them argue for a disequilibrium of DN2 or extra-follicular B cell activation in PAPS. Furthermore, considering the similar occurrence of SHM in both antigen-experienced aPL and non-aPL B cell clones, we conclude that activated aPL B cells in PAPS likely undergo a GC maturation. Since antiphospholipid syndrome is often associated with SLE, the specific fate of aPL B cells in SLE remains an open question.

During B cell development in the fetal liver and BM, recombination of immunoglobulin genes gives rise to the naive BCR repertoire. This repertoire is then refined by eliminating or suppressing self-reactive B cells (1, 4, 59), to mitigate the likelihood of autoimmune disease. Ultimately, this repertoire is shaped through interactions with antigens, such as pathogens. As a result, the features of the BCR repertoire correlate with pathogen interactions and, should tolerance mechanisms fail, immune-mediated diseases (20). For instance, a comparison of B cell repertoires in SLE and anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis (ANCA-AAV) reveals a skewed IGH repertoire in both diseases with increased expression of genes of the *IgHV4* family. Notably IgHV4-34 can bind both autoantigens and commensal bacterial, and it has been associated with SLE in both the naive and in the post-antigenic compartments. Extensive BCR repertoire has never been done in PAPS. BCR diversity appear significantly reduced in PAPS, as observed in other autoimmune diseases, with a clonal expansion and a restricted light and heavy chain usage. Specific *VH* encoded BCR, such as IgVH4-39, previously described in a few SLE and APS patients (4), were associated to autoreactive positively charged BCRs and could be followed from the naive stage to the long-lived plasma cell compartment. Although the self-reactive antibodies expressed by polyreactive naive B cells in PAPS may not be directly pathogenic, they could readily be restricted to some *IgH* or *IgL* families and undergo class switching upon B cell activation. Furthermore, aPL specificities might be selected or expanded during this maturation process, leading to the loss of polyreactivity, as suggested by the critical role of SHM in driving the thrombotic process *in vivo* (22–24). In this context, cross reactivity with exogenous pathogens may drive the future pathogenic B cells (38). However, our experiments, which involved testing the reactivity of 300 clones on a diverse antigen array including various infectious triggers like SARS-CoV2 peptides, were not able to provide conclusive evidence on this matter.

We then hypothesized that autoreactive B cells harbor specific characteristics of signaling, as in an appropriate environmental setting even modest alterations in B cell signaling may

be sufficient to promote or sustain auto-immunity (60). To investigate this further, we conducted a two-step analysis. Firstly, we performed single-cell transcriptomics on sorted B cells. Secondly, we focused on the previously detected specific IgHV and IgLV rearrangements. Our studies demonstrates that in patients with PAPS, B cells displayed a global activation state, along with higher prevalence of specific BCR. This activation state appears to be associated with mTORC1 signaling, independently of the specific IgVH or IgVL. CD148 expression increased expression, a proxy for Akt-PI3K-mTOR pathway (50), aligns with the activation of the mTORC1 pathway. Interestingly, one of the exceedingly rare monogenic defects observed in PAPS involves a gain-of-function mutation in *mTOR* (61). The involvement of the mTOR molecular pathway in antiphospholipid syndrome has been demonstrated in patients with APS-related nephropathy at the endothelial level (62). However, the role of mTOR signaling in PAPS B cells has not been previously explored. Among the upstream signals of mTORC1, the cytokine B-cell-activating factor (BAFF), also known as TNFSF13B, plays a prominent role in B cell survival and homeostasis (63, 64). Based on our findings, we propose that increased TACI engagement on naive B cells in PAPS contributes to mTOR signaling, which, in turn, likely drives the GC maturation of polyreactive autoreactive B cells towards a pathogenic state. Increase of IFN levels, which is known to modify B cell response to MYD88 signaling (65), could potentiate this B cell tolerance checkpoints disruption, as suggested by the IFN transcriptional signature we observe in B cells and previously found in whole blood transcriptome of patients with triple positive PAPS (66, 67).

In summary, our findings indicate that phospholipid-reactive B cells in patients with PAPS originate from a pool of naturally polyreactive B cells. These B cells exhibit a restricted BCR repertoire and manage to evade peripheral tolerance mechanisms at the naive stage, sustained by TACI and IFN-R engagement, and increased MYC/mTOR signaling. At this stage, PAPS B cells are likely exposed to antigenic stimuli, although the specific triggers remain unidentified. Previous evidence suggests potential cross-reactivity with commensal or pathogenic antigens, but the involvement of local environmental triggers mediated by monocyte or neutrophil activation, along with mTOR signaling, is also under debate. Our data suggest that extra-follicular differentiation is not a predominant pathway for PAPS B cells. Instead, GC maturation appears to play a significant role in generating B cells memory B cells and ASC with enhanced affinity for aPL.

MATERIALS AND METHODS

Study and design

The objective of this study was to analyze the features (i.e. BCR characteristics, phenotypic and transcriptomic profiles) of B cells and aPL-producing B cells in a cohort of PAPS patients with triple positivity. We used high dimensional flow-cytometry, integrated CITE-Seq and BCR-Seq approach to compare the B cells of cohort of healthy donors (HD) with a cohort of PAPS patients. Single B cells repertoire and aPL reactivity characterization was further characterized in smaller sub-cohorts with an EBV single cells immortalization method applied on sorted B-cells (32).

Recruitment of participants and sample collection

The diagnosis of PAPS was confirmed by two senior physicians specialized in Internal Medicine and in Clinical Immunology, according to revised Sydney criteria (13). All patients also fulfilled 2023 ACR/EULAR classification criteria (16). Triple positivity was considered when persistent positivity (*on two or more occasions at least 12 weeks apart*) for LA, aCL and anti- β 2GPI antibodies (IgG or IgM at medium or high levels) was present. Patients were enrolled in the Clinical Immunology Department (National Reference Center for Rare Autoimmune Systemic Diseases, CRMR RESO) of Strasbourg University Hospital. Although some of them presented antinuclear positivity, they were not affected by another autoimmune disease including SLE, and none of them had significant levels of anti-dsDNA. All patient data and samples were obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and with the Ethical Board at Strasbourg University Hospital (CPP-Est IV N° 13/48). All the participants provided written consent.

Clinical and immunological features of the patients are available in **Table S1**.

Cell staining and phenotyping

Human B-cell phenotype was assessed on fresh EDTA peripheral blood samples immediately after collection. BM cells were subjected to density gradient centrifugation to get mononuclear cells suspensions and remove dead cells. Samples were incubated with antibodies for 15 minutes at room temperature. Dead cells were excluded Zombie NIR™ (Biolegend, San Diego, CA, USA). The cells were analyzed on a spectral flow cytometer (Aurora, Cyttek Biosciences, Fremont, California, USA). Data analysis was

performed using FlowJo software (TreeStar, USA). The following antibodies were used (clones are indicated in parentheses): CD3 (OKT3, Life Technologies), CD10 (HI10a, BD Bioscience), CD11c (S-HCL-3, Biolegend), CD16 (3G8, Invitrogen), CD19 (HIB19, BioLegend), CD20 (2H7, BioLegend), CD21 (Bu32, BioLegend), CD27 (L128, BD Bioscience), CD33 (WM-53, Invivogen), CD38 (HB-7, BioLegend), CD69 (FN50, BD Bioscience), CD95 (DX2, BD Bioscience), CD138 (L-101, Biolegend), BAFF-R (11C1, BD Bioscience), TACI (1A1, BioLegend), CCR5 (RF8B2, BD Bioscience), CCR6 (11A9, BD Bioscience), CXCR3 (REA232, Miltenyi), CXCR4 (12G5, BD Bioscience), CXCR5 (RF8B2, BD Bioscience), IgM (MHM-88, BioLegend; polyclonal, Jackson), IgD (IA6-2, BD Bioscience), IgG1 (SAG1, Cytognos), IgG2 (SAG2, Cytognos), IgG3 (SAG3, Cytognos), IgG4 (SAG4, Cytognos), IgA1 (SAA1, Cytognos), IgA2 (SAA2, Cytognos), IgE (MHE-18, BioLegend).

B-cell sorting and immortalization

B-cell were sorted and immortalized as previously described (32). B-cells were FACS sorted in naive (CD3⁺CD19⁺CD27⁻) and memory (CD3⁺CD19⁺CD27⁺) subsets. Sorted cells were then incubated in complete medium containing 50% EBV supernatant (of B95-8 cells) and 2.5 mg/mL CpG ODN 2006 (Apara Biosciences, Denzlingen, Germany) for 4 hours at 37°C. Cells were then seeded on 10 000 irradiated allogeneic mononuclear cells at 3 cells per well in 96 U-bottom plates.

Assessment of clonality of single EBV B-cell clones in the final population was performed staining for the kappa or lambda light chain by flow cytometry and complemented with BCR sequencing data and ELISA. Clonality was defined by: a) presence of cells with only one type of light chain (kappa or lambda) using flow cytometry, and b) presence in supernatant of only one isotype of immunoglobulin heavy chain. Cells were then categorized, based on their isotype and the initial sort, in naive (CD3⁺CD19⁺CD27⁻IgG/A⁻), unswitched memory (CD3⁺CD19⁺CD27⁺IgG/A⁻), switched memory (CD3⁺CD19⁺CD27⁺IgG/A⁺) or DN (CD3⁺CD19⁺27⁻IgG/A⁺) subsets.

ELISA

Immunoglobulin concentration: Immunoglobulin concentration in the supernatant of the EBV clones was analyzed by ELISA. Briefly, 96 wells (Nunc Maxisorp) were coated with anti-human Immunoglobulin mix (Jackson ImmunoResearch) in bicarbonate buffer and serial dilution of EBV supernatants were added.

Polyreactivity assays: 96 wells (Nunc Maxisorp) were coated with insulin (*Sigma-Aldrich*, Saint-Quentin Fallavier, France; 2µg/mL), thyroglobulin (*Sigma-Aldrich*, Germany; 2µg/mL), myosin (*Sigma-Aldrich*; 2µg/mL) or nucleosome solution (DNA final concentration: 1µg/mL) in bicarbonate buffer. Nucleosome were obtained as previously described (68). Briefly, nucleosomes were isolated from L1210 cells and DNA concentration was measured (dilution 1:100 in 0.1% (v/v) SDS solution). Plates were incubated with 100 µl of per well, at 37°C overnight. Plates were saturated with PBS/0.05% (v/v) Tween/1% (w/v) bovine serum albumine (BSA) for 1 hour at 37°C. 100µL of EBV clones' supernatants ([IgM, IgG or IgA] = 2µg/mL) were incubated overnight at +4°C. Antibodies were considered polyreactive when they recognized at least three analyzed antigens.

Revelation step: Bound Ig were detected with peroxidase conjugated anti-human IgM, IgG or IgA (Jackson ImmunoResearch), and developed with TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). The reaction was stopped with HCl (1M), before reading at 450nm using MultiScan FC (*Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France*).

Antiphospholipid ELISA

Reactivity against PL was determined using a modified protocol from Lieby et al. (22, 23). For "pool PL" ELISA, polystyrene microtiter plates (PolySorp, Nunc ImmunoPlate) were coated with 50 µL/well of cardiolipin (*Sigma-Aldrich*), phosphatidylserine (*Sigma-Aldrich*), phosphatidic acid (*Sigma-Aldrich*), phosphatidylcholine (*Sigma-Aldrich*), phosphatidylethanolamine (*Sigma-Aldrich*), phosphatidylinositol (*Sigma-Aldrich*) and phosphatidylglycerol (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) at 25 µg/mL in absolute alcohol and evaporated at room temperature for 4 hours. Plates were saturated with PBS 10% FCS with 5µg/mL of prothrombin (*Sigma-Aldrich*) for 2 hours at room temperature. For cardiolipin/β2GPI ELISA, polystyrene microtiter plates (PolySorp, Nunc ImmunoPlate) were coated with 50 µL/well of cardiolipin (*Sigma-Aldrich*) at 50 µg/mL in absolute alcohol and evaporated at room temperature for 4 hours. Plates were saturated with 1µg/mL of purified human cofactor β2GP1 (*Sigma-Aldrich*) for 2 hours at room temperature.

40µL of supernatant were then incubated overnight at +4°C. 50µL/well peroxidase-conjugated goat antihuman IgM, IgG or IgA coupled to peroxidase (polyclonal; *Jackson ImmunoResearch*) were added and incubated 1 hour at 37°C. After addition of TMB for 20

minutes. The reaction was stopped with HCl (1M), before reading at 450nm using MultiScan FC (*Thermo Fisher Scientific*). *Patients with known titer of aPL antibodies were systematically used as positive controls.* Additionally, serums from the same 5 HD were systematically added to establish a positivity threshold based on a z-score; $z\text{-score} = (X - M) / SD$ in which X is the optical density (OD) of the considered sample (EBV supernatant), M and SD are the mean and standard deviation of the OD for the HD group. *Sample was labelled as containing (i) aPL if the z-score was >10, (ii) and non-aPL antibodies if the z-score was <10 in pool PL ELISA and <10 in cardiolipin/ β 2GPI ELISA. Samples reactive in cardiolipin/ β 2GPI ELISA but not in pool PL ELISA were labelled as doubtful and definitively discarded.* For the all-subsequent analysis only samples with z-score <2 or >10 were considered.

HEp-2 reactivity

HEp-2 reactivity was assessed on slides coated with HEp-2 cells (ZEUS scientific, NJ, USA). cell-coated slides (ZEUS scientific, NJ, USA) were incubated in a moist chamber at room temperature with 30 μ L of EBV clones' supernatants and detected with AlexaFluor488 goat anti-Human IgG (Invitrogen, CA, USA; dilution 1/200) or AlexaFluor488 goat anti-Human IgM AF488 (Invitrogen; dilution 1/200). ZEISS Axioskop microscope was used to read patterns. Pictures were acquired with Zeiss LSM800 (20x/0.8).

Autoantigens array

IgG and IgM reactivities were measured using a microarray developed by University of Texas Southwestern Medical Center.

(<https://microarray.swmed.edu/products/category/protein-array/>).

EBV clones' supernatants (dilution 1/2) were incubated and the autoantibodies binding to the antigens on the array were detected with laser wavelengths 532nm (cy3 labeled anti-IgG) and 635nm (cy5 labeled anti-IgM). Genepix Pro 6.0 software was used to analyze the image. The background-subtracted median signal intensity of each antigen was normalized using standard practices, then an antibody score (Ab-score) was calculated: $Ab\text{-Score} = \log_2(NFI * SNR + 1)$. Values are plotted as fold change versus mean of Ab-Score of the non-aPL group in the considered subset.

B-cell clone repertoire analysis

RNA of B-EBV cell clones was isolated using NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel, Düren, Germany), and then reverse transcribed on a T100™ Thermal cycler (BioRad) using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. IgH/IgL transcripts were amplified as previously described (1, 4, 59). Briefly, 3.5µl of cDNA products was amplified by a PCR in 20µl reactions containing 20pM primers and 10µL of HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, 1U of HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase per reaction). PCR was performed for 45 cycles at 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, 72°C for 55 sec. All PCR products were purified from agarose gel using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) and then sequenced by Sanger sequencing (Eurofins Genomic). Sequences were analyzed using IMGT/HighV-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input); and the NCBI's IgBLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Rare non-germline sequences that contained high numbers of mutations that could not be attributed to sequence polymorphisms were excluded from further analysis.

Bone marrow plasma cell repertoire analysis

Single cell sorting of plasma cells (CD3⁻CD19⁺CD27^{high}CD38^{high}IgD⁻CD24⁻CD138⁺) populations was performed on a FACS Aria II flow Cytometer (BD Biosciences) into 96-well PCR plates. RNA from these single cells was reverse-transcribed in the original 96-well plate in 40 µl reactions using SuperScript IV CellsDirect cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. 4µl of cDNA product were used to amplify IgH transcripts by two rounds of PCR in 20µl reactions containing 20pM primers and 10µL of HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen). PCR was performed for 45 cycles at 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, 72°C for 55 sec (1st-PCR) or 45 sec (2nd PCR) (1). PCR efficiencies ranged from 30-40%. All PCR products were purified from agarose gel using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel), sequenced by Sanger sequencing (Eurofins Genomic) and analyzed for IgH V, D and J gene usage on IMGT/HighV-QUEST and NCBI's IgBLAST server.

Plasma APRIL level

The APRIL level in the plasma of PAPS (primary antiphospholipid syndrome) patients was assessed using the LEGENDplex™ Human B cell Panel, following the manufacturer's instructions.

In vitro plasmablast differentiation assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated blood from PAPS patients and HD. Total B cells were isolated with the EasySep™ Human B-cell Isolation Kit (Stemcell Technologies) following manufacturers' instructions. A total of 50,000 B-cells/well were plated into U96 wells and stimulated with CD40L, IL-21 and IL-4 in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI; Life Technologies) enriched with gentamicine (50 µg/mL), supplemented with 10% FCS. After 6 days in culture, the phenotype of human B-cells was determined using Attune NxT Flow Cytometer (Invitrogen).

CITE-SEQ and VDJ sequencing

PBMCs were isolated blood from five PAPS patients and two HD. Total B cells were isolated with the EasySep™ Human B-cell Isolation Kit (Stemcell Technologies). B cells were resuspended at 10×10^6 /mL and incubated with Human TruStain FcX Fc Blocking reagent for 10min at 4°C. Cells were then incubated with the 10 following antibodies conjugated to an antibody-derived tag for 30 min at 4°C : CD19 (HIB19, TotalSeq, BioLegend) CD27 (0323), CD24 (ML5), CD38 (HIT2), CD5 (UCHT2), HLA-DR (L243), CD86 (IT2.2), IgM (MHM-88), IgD (IA6-2), CD21 (Bu32). The scRNA-seq libraries were generated using Chromium Next GEM Single Cell 5' V(D)J Reagent Kit v.1.1 with Feature Barcoding (10X Genomics) according to the manufacturer's protocol. Gene expression (mRNA), ADT and VDJ BCR libraries were constructed. Briefly, cells were counted and up to 10 000 cells were loaded in the 10X Genomics Chromium Controller to generate single-cell gel-beads in emulsion. After reverse transcription, gel-beads in emulsion were disrupted. Barcoded complementary DNA was isolated and amplified by PCR. Following fragmentation, end repair and A-tailing, sample indexes were added during index PCR. The purified libraries were sequenced on a Novaseq S2 flowcell (Illumina).

ScRNA-Seq data processing

The sequencing reads were demultiplexed and aligned to the human reference transcriptome (GRCh38-2020-A), using the CellRanger Pipeline (v5.0.1). The unfiltered raw UMI counts from cellranger were loaded into Seurat v4.0.4 for quality control, data integration and downstream analyses (69). Empty sequencing beads, apoptotic cells and potential doublets were removed by filtering out cells with fewer than 500 features or a mitochondrial content higher than 20%. BCR reads were aligned to the GRCh38 reference genome (vdj_GRCh38_alts_ensembl-5.0.0) and consensus BCR annotation was performed using the cellranger vdj program (v5.0.1). The clonotypes information (all_contig_annotations.csv files) were loaded into the seurat object and only productive contigs of BCR were kept for the analysis. Data from each sample were normalized and scaled using the SCTransform method, and batch effect between samples was corrected using Seurat's FindIntegratingAnchors. On this integrated dataset, we computed the principal component analysis on the 3000 most variable genes. UMAP was carried out using the 30 most significant PCs, and community detection was performed using the graph-based modularity-optimization Louvain algorithm from Seurat's FindClusters function. Cell type labels were assigned to resulting clusters based on a manually curated list of marker genes. All clusters were annotated, and 27886 cells were kept for further analysis. Two small clusters with T cell and monocyte signatures were removed from further analysis as well as rare clear doublets. To evaluate the expression of the 10 surface proteins, the antibody-derived tags (ADT) count for the cells retained after filtering were loaded in the integrated seurat object and normalized using the CLR normalization method. Differentially expressed genes between different clusters were identified using the FindAllMarkers function from Seurat using default settings (Wilcoxon test and Bonferroni P value correction). For GSEA analysis, differentially expressed genes were calculated using the Wilcoxon rank sum test via the wilcoxauC function of the presto package using default parameters (including Benjamini-Hochberg false discovery rate correction) and filtered on $\log_{2}FC > 0.5$ and $padj < 0.01$. GSEA was run on pre-ranked genes using the fgsea package implemented in R (70).

scBCR-seq data processing

Immune profiling V(D)J data was added to the dataset by matching cell barcodes in the scRNAseq libraries. Cell barcodes that had a BCR heavy or light chain that mapped to "NA"

was excluded from downstream analysis, as well as cases of 10X Genomics barcodes with two or more consensus heavy chain sequences. On the BCR data, repertoire abundance and overlap, gene usage, and diversity estimation were performed using the R package immunarch (v0.9.0) (71). Mutation quantification and lineage reconstruction was performed on the immcantation framework (72) as described by Mathew et al (73). In brief, clones clustering were made with the Change-O toolkit and lineages were reconstructed using the dnapars function of the Phylip package via buildPhylipLineage function (74). Sequences that had the same V-gene, same J-gene, the same CDR3 length and nucleotide hamming distance of 0.2 were considered as potentially belonging to the same clonal group. Mutation frequencies in V genes were then calculated using the calcObservedMutations() function from Immcantation/SHazaM v1.0.2 R package. Circlize package was used for heavy and light chain pairing (75).

Statistics

Statistical analysis were performed using Prism v9 (GraphPad). Unpaired t test was used to compare variables with normal distribution. For nonparametric variables, the Mann-Whitney test was used. The χ^2 test was used for categorical values. Multiple comparisons were performed using Wilcoxon rank sum test and Bonferroni correction. Numerical values are given by mean $\pm$ SEM. A *P* value of ≤ 0.05 , or < 0.01 for multiple comparisons, was considered significant.

REFERENCES AND NOTES

Acknowledgments

We are thankful to all patients and volunteers who participated in this study. We thank the Team at the Microarray Core at UT Southwestern Medical center in Dallas (TX, USA) for their expert help with custom arrays, autoantigen processing and data analysis.

Fundings

This study was supported by the PERSONALIS project co-financed by the European *regional development* fund (ERDF), the University of Strasbourg, the Strasbourg University Hospital and the University of Freiburg. It was also supported by the “Fonds de Dotation CSL Behring Pour La Recherche” and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant number FDM201906008804.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests for this work.

REFERENCES

1. H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. **301**, 1374–1377 (2003).
2. D. Nemazee, Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 281–294 (2017).
3. E. Meffre, K. C. O'Connor, Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunol. Rev.* **292**, 90–101 (2019).
4. S. Yurasov, H. Wardemann, J. Hammersen, M. Tsuiji, E. Meffre, V. Pascual, M. C. Nussenzweig, Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **201**, 703–711 (2005).
5. S. A. Jenks, K. S. Cashman, E. Zumaquero, U. M. Marigorta, A. V. Patel, X. Wang, D. Tomar, M. C. Woodruff, Z. Simon, R. Bugrovsky, E. L. Blalock, C. D. Scharer, C. M. Tipton, C. Wei, S. S. Lim, M. Petri, T. B. Niewold, J. H. Anolik, G. Gibson, F. E.-H. Lee, J. M. Boss, F. E. Lund, I. Sanz, Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. **49**, 725–739.e6 (2018).
6. R. A. Elsner, M. J. Shlomchik, Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. **53**, 1136–1150 (2020).
7. J. S. Turner, F. Ke, I. L. Grigorova, B Cell Receptor Crosslinking Augments Germinal Center B Cell Selection when T Cell Help Is Limiting. *Cell Rep.* **25**, 1395–1403.e4 (2018).
8. S. T. Chen, T. Y. Oliveira, A. Gazumyan, M. Cipolla, M. C. Nussenzweig, B cell receptor signaling in germinal centers prolongs survival and primes B cells for selection. *Immunity*. **56**, 547–561.e7 (2023).
9. M. C. Woodruff, R. P. Ramonell, D. C. Nguyen, K. S. Cashman, A. S. Saini, N. S. Haddad, A. M. Ley, S. Kyu, J. C. Howell, T. Ozturk, S. Lee, N. Suryadevara, J. B. Case, R. Bugrovsky, W. Chen, J. Estrada, A. Morrison-Porter, A. Derrico, F. A. Anam, M. Sharma, H. M. Wu, S. N. Le, S. A. Jenks, C. M. Tipton, B. Staitieh, J. L. Daiss, E. Ghosn, M. S. Diamond, R. H. Carnahan, J. E. Crowe, W. T. Hu, F. E.-H. Lee, I. Sanz, Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* **21**, 1506–1516 (2020).
10. J. H. Reed, J. Jackson, D. Christ, C. C. Goodnow, Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *J. Exp. Med.* **213**, 1255–1265 (2016).
11. D. L. Burnett, J. H. Reed, D. Christ, C. C. Goodnow, Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. *Immunol. Rev.* **292**, 61–75 (2019).
12. Z. Sabouri, P. Schofield, K. Horikawa, E. Spierings, D. Kipling, K. L. Randall, D. Langley, B. Roome, R. Vazquez-Lombardi, R. Rouet, J. Hermes, T. D. Chan, R. Brink, D. K. Dunn-Walters, D. Christ, C. C. Goodnow, Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2567–2575 (2014).
13. S. Miyakis, M. D. Lockshin, T. Atsumi, D. W. Branch, R. L. Brey, R. Cervera, R. H. W. M. Derksen, P. G. DE Groot, T. Koike, P. L. Meroni, G. Reber, Y. Shoenfeld, A. Tincani, P. G. Vlachoyiannopoulos, S. A. Krilis, International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost. JTH.* **4**, 295–306 (2006).

14. A. Arad, V. Proulle, R. A. Furie, B. C. Furie, B. Furie, β 2-glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood*. **117**, 3453–3459 (2011).
15. F. Fischetti, P. Durigutto, V. Pellis, A. Debeus, P. Macor, R. Bulla, F. Bossi, F. Ziller, D. Sblattero, P. Meroni, F. Tedesco, Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. **106**, 2340–2346 (2005).
16. M. Barbhaiya, S. Zuily, R. Naden, A. Hendry, F. Manneville, M.-C. Amigo, Z. Amoura, D. Andrade, L. Andreoli, B. Artim-Esen, T. Atsumi, T. Avcin, H. M. Belmont, M. L. Bertolaccini, D. W. Branch, G. Carvalheiras, A. Casini, R. Cervera, H. Cohen, N. Costedoat-Chalumeau, M. Crowther, G. de Jesús, A. Delluc, S. Desai, M. D. Sancho, K. M. Devreese, R. Diz-Kucukkaya, A. Duarte-García, C. Frances, D. Garcia, J.-C. Gris, N. Jordan, R. K. Leaf, N. Kello, J. S. Knight, C. Laskin, A. I. Lee, K. Legault, S. R. Levine, R. A. Levy, M. Limper, M. D. Lockshin, K. Mayer-Pickel, J. Musial, P. L. Meroni, G. Orsolini, T. L. Ortel, V. Pengo, M. Petri, G. Pons-Estel, J. A. Gomez-Puerta, Q. Raimboug, R. Roubey, G. Sanna, S. V. Seshan, S. Sciascia, M. G. Tektonidou, A. Tincani, D. Wahl, R. Willis, C. Yelnik, C. Zuily, F. Guillemin, K. Costenbader, D. Erkan, ACR/EULAR APS Classification Criteria Collaborators, 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Ann. Rheum. Dis*. **82**, 1258–1270 (2023).
17. J. Y. Dabit, M. O. Valenzuela-Almada, S. Vallejo-Ramos, A. Duarte-García, Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome in the General Population. *Curr. Rheumatol. Rep*. **23**, 85 (2021).
18. L. Simonin, E. Pasquier, C. Leroyer, D. Cornec, J. Lemerle, B. Bendaoud, S. Hillion, J.-O. Pers, F. Couturaud, Y. Renaudineau, Lymphocyte Disturbances in Primary Antiphospholipid Syndrome and Application to Venous Thromboembolism Follow-Up. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. **53**, 14–27 (2017).
19. L. Alvarez-Rodriguez, L. Riancho-Zarrabeitia, J. Calvo-Alén, M. López-Hoyos, V. Martínez-Taboada, Peripheral B-Cell Subset Distribution in Primary Antiphospholipid Syndrome. *Int. J. Mol. Sci*. **19**, 589 (2018).
20. R. J. M. Bashford-Rogers, L. Bergamaschi, E. F. McKinney, D. C. Pombal, F. Mescia, J. C. Lee, D. C. Thomas, S. M. Flint, P. Kellam, D. R. W. Jayne, P. A. Lyons, K. G. C. Smith, Analysis of the B cell receptor repertoire in six immune-mediated diseases. *Nature*. **574**, 122–126 (2019).
21. I. P. Giles, J. D. Haley, S. Nagl, D. A. Isenberg, D. S. Latchman, A. Rahman, A systematic analysis of sequences of human antiphospholipid and anti- β 2-glycoprotein I antibodies: The importance of somatic mutations and certain sequence motifs. *Semin. Arthritis Rheum*. **32**, 246–265 (2003).
22. P. Lieby, A. Soley, H. Levallois, B. Hugel, J. M. Freyssinet, M. Cerutti, J. L. Pasquali, T. Martin, The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood*. **97**, 3820–3828 (2001).
23. P. Lieby, A. Soley, A.-M. Knapp, M. Cerutti, J.-M. Freyssinet, J.-L. Pasquali, T. Martin, Memory B cells producing somatically mutated antiphospholipid antibodies are present in healthy individuals. *Blood*. **102**, 2459–2465 (2003).
24. P. Lieby, V. Poindron, S. Roussi, C. Klein, A.-M. Knapp, J.-C. Garaud, M. Cerutti, T. Martin, J.-L. Pasquali, Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood*. **104**, 1711–1715 (2004).
25. S. Manfredo Vieira, M. Hiltensperger, V. Kumar, D. Zegarra-Ruiz, C. Dehner, N. Khan, F. R. C. Costa, E. Tiniakou, T. Greiling, W. Ruff, A. Barbieri, C. Kriegel, S. S. Mehta, J. R. Knight, D. Jain,

- A. L. Goodman, M. A. Kriegel, Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science*. **359**, 1156–1161 (2018).
26. V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani, S. Testa, T. Fierro, F. Marongiu, V. De Micheli, P. Gresele, M. Tonello, A. Ghirarduzzi, E. Bison, G. Denas, A. Banzato, S. Padayattil Jose, S. Iliceto, Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. **118**, 4714–4718 (2011).
 27. C. Wong-Baeza, A. Reséndiz-Mora, L. Donis-Maturano, I. Wong-Baeza, L. Zárate-Neira, J. C. Yam-Puc, J. Calderón-Amador, Y. Medina, C. Wong, I. Baeza, L. Flores-Romo, Anti-Lipid IgG Antibodies Are Produced via Germinal Centers in a Murine Model Resembling Human Lupus. *Front. Immunol.* **7**, 396 (2016).
 28. B. Keller, V. Strohmeier, I. Harder, S. Unger, K. J. Payne, G. Andrieux, M. Boerries, P. T. Felixberger, J. J. M. Landry, A. Nieters, A. Rensing-Ehl, U. Salzer, N. Frede, S. Usadel, R. Elling, C. Speckmann, I. Hainmann, E. Ralph, K. Gilmour, M. W. J. Wentink, M. van der Burg, H. S. Kuehn, S. D. Rosenzweig, U. Kölsch, H. von Bernuth, P. Kaiser-Labus, F. Gothe, S. Hambleton, A. D. Vlagea, A. Garcia Garcia, L. Alsina, G. Markelj, T. Avcin, J. Vasconcelos, M. Guedes, J.-Y. Ding, C.-L. Ku, B. Shadur, D. T. Avery, N. Venhoff, J. Thiel, H. Becker, L. Erazo-Borrás, C. M. Trujillo-Vargas, J. L. Franco, C. Fieschi, S. Okada, P. E. Gray, G. Uzel, J.-L. Casanova, M. Fliegau, B. Grimbacher, H. Eibel, S. Ehl, R. E. Voll, M. Rizzi, P. Stepensky, V. Benes, C. S. Ma, C. Bossen, S. G. Tangye, K. Warnatz, The expansion of human T-bethighCD21low B cells is T cell dependent. *Sci. Immunol.* **6**, eabh0891 (2021).
 29. L. Malle, R. S. Patel, M. Martin-Fernandez, O. J. Stewart, Q. Philippot, S. Buta, A. Richardson, V. Barcessat, J. Taft, P. Bastard, J. Samuels, C. Mircher, A.-S. Rebillat, L. Maillebouis, M. Vilaire-Meunier, K. Tuballes, B. R. Rosenberg, R. Trachtman, J.-L. Casanova, L. D. Notarangelo, S. Gnjatic, D. Bush, D. Bogunovic, Autoimmunity in Down's syndrome via cytokines, CD4 T cells and CD11c+ B cells. *Nature*. **615**, 305–314 (2023).
 30. S. Wang, J. Wang, V. Kumar, J. L. Karnell, B. Naiman, P. S. Gross, S. Rahman, K. Zerrouki, R. Hanna, C. Morehouse, N. Holoweckij, H. Liu, Z. Manna, R. Goldbach-Mansky, S. Hasni, R. Siegel, M. Sanjuan, K. Streicher, M. P. Cancro, R. Kolbeck, R. Ettinger, IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c^{hi} T-bet⁺ B cells in SLE. *Nat. Commun.* **9**, 1758 (2018).
 31. Y. Dieudonné, A. Guffroy, V. Poindron, P. S. Sprauel, T. Martin, A.-S. Korganow, V. Gies, B cells in primary antiphospholipid syndrome: Review and remaining challenges. *Autoimmun. Rev.*, 102798 (2021).
 32. A. Janda, K. Schwarz, M. van der Burg, W. Vach, H. Ijspeert, M. R. Lorenz, M. Elgizouli, K. Pieper, P. Fisch, J. Hagel, R. Lorenzetti, M. Seidl, J. Roesler, F. Hauck, E. Traggiai, C. Speckmann, A. Rensing-Ehl, S. Ehl, H. Eibel, M. Rizzi, Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. **127**, 2193–2202 (2016).
 33. P. Casali, G. Inghirami, M. Nakamura, T. F. Davies, A. L. Notkins, Human monoclonals from antigen-specific selection of B lymphocytes and transformation by EBV. *Science*. **234**, 476–479 (1986).
 34. E. Traggiai, S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M. R. Gismondo, B. R. Murphy, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 871–875 (2004).

35. A. Tsutsumi, T. Koike, K. Ichikawa, K. Shimada, K. Takabayashi, H. Tomioka, S. Yoshida, IgG subclass distribution of anticardiolipin antibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **15**, 1764–1767 (1988).
36. A. Berneman, B. Guilbert, S. Eschrich, S. Avrameas, IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Mol. Immunol.* **30**, 1499–1510 (1993).
37. E. Ortona, A. Capozzi, T. Colasanti, F. Conti, C. Alessandri, A. Longo, T. Garofalo, P. Margutti, R. Misasi, M. A. Khamashta, G. R. V. Hughes, G. Valesini, M. Sorice, Vimentin/cardiolipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* **116**, 2960–2967 (2010).
38. W. E. Ruff, C. Dehner, W. J. Kim, O. Pagovich, C. L. Aguiar, A. T. Yu, A. S. Roth, S. M. Vieira, C. Kriegel, O. Adeniyi, M. J. Mulla, V. M. Abrahams, W. W. Kwok, R. Nussinov, D. Erkan, A. L. Goodman, M. A. Kriegel, Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity. *Cell Host Microbe.* **26**, 100–113 (2019).
39. Y. Zuo, S. K. Estes, R. A. Ali, A. A. Gandhi, S. Yalavarthi, H. Shi, G. Sule, K. Gockman, J. A. Madison, M. Zuo, V. Yadav, J. Wang, W. Woodard, S. P. Lezak, N. L. Lugogo, S. A. Smith, J. H. Morrissey, Y. Kanthi, J. S. Knight, Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabd3876 (2020).
40. N. Müller-Calleja, A. Hollerbach, J. Royce, S. Ritter, D. Pedrosa, T. Madhusudhan, S. Teifel, M. Meineck, F. Häuser, A. Canisius, T. S. Nguyen, J. Braun, K. Bruns, A. Etzold, U. Zechner, S. Strand, M. Radsak, D. Strand, J.-M. Gu, J. Weinmann-Menke, C. T. Esmon, L. Teyton, K. J. Lackner, W. Ruf, Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science.* **371**, eabc0956 (2021).
41. C. M. Tipton, C. F. Fucile, J. Darce, A. Chida, T. Ichikawa, I. Gregoret, S. Schieferl, J. Hom, S. Jenks, R. J. Feldman, R. Mehr, C. Wei, F. E.-H. Lee, W. C. Cheung, A. F. Rosenberg, I. Sanz, Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* **16**, 755–765 (2015).
42. I. Giles, N. Lambrianides, N. Pattni, D. Faulkes, D. Latchman, P. Chen, S. Pierangeli, D. Isenberg, A. Rahman, Arginine Residues Are Important in Determining the Binding of Human Monoclonal Antiphospholipid Antibodies to Clinically Relevant Antigens. *J. Immunol.* **177**, 1729–1736 (2006).
43. M. Tsuiji, S. Yurasov, K. Velinzon, S. Thomas, M. C. Nussenzweig, H. Wardemann, A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J. Exp. Med.* **203**, 393–400 (2006).
44. C. Richardson, A. S. Chida, D. Adlowitz, L. Silver, E. Fox, S. A. Jenks, E. Palmer, Y. Wang, J. Heimbürg-Molinari, Q.-Z. Li, C. Mohan, R. Cummings, C. Tipton, I. Sanz, Molecular basis of 9G4 B cell autoreactivity in human systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **191**, 4926–4939 (2013).
45. J. F. Scheid, H. Mouquet, J. Kofler, S. Yurasov, M. C. Nussenzweig, H. Wardemann, Differential regulation of self-reactivity discriminates between IgG+ human circulating memory B cells and bone marrow plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 18044–18048 (2011).
46. B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* **129**, 1261–1274 (2007).
47. B. T. Gaudette, D. D. Jones, A. Bortnick, Y. Argon, D. Allman, mTORC1 coordinates an immediate unfolded protein response-related transcriptome in activated B cells preceding antibody secretion. *Nat. Commun.* **11**, 723 (2020).

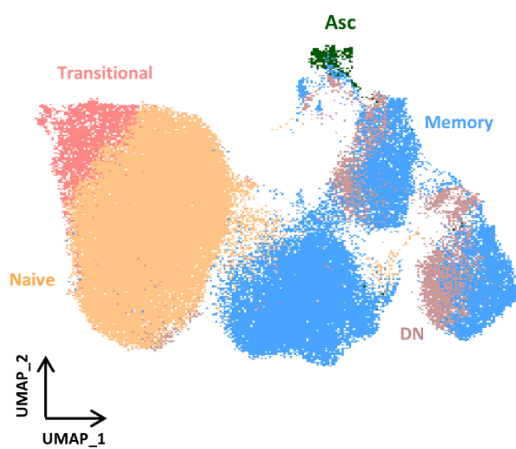
48. W. Luo, F. Weisel, M. J. Shlomchik, B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. *Immunity*. **48**, 313-326.e5 (2018).
49. J. Ersching, A. Efeyan, L. Mesin, J. T. Jacobsen, G. Pasqual, B. C. Grabiner, D. Dominguez-Sola, D. M. Sabatini, G. D. Vitoria, Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. *Immunity*. **46**, 1045-1058.e6 (2017).
50. E.-M. Cox, M. El-Behi, S. Ries, J. F. Vogt, V. Kohlhaas, T. Michna, B. Manfroi, M. Al-Maarri, F. Wanke, B. Tirosh, C. Pondarre, H. Lezeau, N. Yogev, R. Mittenzwei, M. Descatoire, S. Weller, J.-C. Weill, C.-A. Reynaud, P. Boudinot, L. Jouneau, S. Tenzer, U. Distler, A. Rensing-Ehl, C. König, J. Staniek, M. Rizzi, A. Magérus, F. Rieux-Laucat, F. T. Wunderlich, N. Hövelmeyer, S. Fillatreau, AKT activity orchestrates marginal zone B cell development in mice and humans. *Cell Rep*. **42**, 112378 (2023).
51. P. Schneider, The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol*. **17**, 282–289 (2005).
52. H. W. King, N. Orban, J. C. Riches, A. J. Clear, G. Warnes, S. A. Teichmann, L. K. James, Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Sci. Immunol*. **6**, eabe6291 (2021).
53. P. L. Meroni, M. O. Borghi, E. Raschi, F. Tedesco, Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat. Rev. Rheumatol*. **7**, 330–339 (2011).
54. J. J. Taylor, K. A. Pape, M. K. Jenkins, A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med*. **209**, 597–606 (2012).
55. F. J. Weisel, G. V. Zuccarino-Catania, M. Chikina, M. J. Shlomchik, A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity*. **44**, 116–130 (2016).
56. E. K. Deenick, D. T. Avery, A. Chan, L. J. Berglund, M. L. Ives, L. Moens, J. L. Stoddard, J. Bustamante, S. Boisson-Dupuis, M. Tsumura, M. Kobayashi, P. D. Arkwright, D. Averbuch, D. Engelhard, J. Roesler, J. Peake, M. Wong, S. Adelstein, S. Choo, J. M. Smart, M. A. French, D. A. Fulcher, M. C. Cook, C. Picard, A. Durandy, C. Klein, S. M. Holland, G. Uzel, J.-L. Casanova, C. S. Ma, S. G. Tangye, Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J. Exp. Med*. **210**, 2739–2753 (2013).
57. H. W. King, N. Orban, J. C. Riches, A. J. Clear, G. Warnes, S. A. Teichmann, L. K. James, Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Sci. Immunol*. **6**, eabe6291 (2021).
58. J. A. Roco, L. Mesin, S. C. Binder, C. Nefzger, P. Gonzalez-Figueroa, P. F. Canete, J. Ellyard, Q. Shen, P. A. Robert, J. Cappello, H. Vohra, Y. Zhang, C. R. Nowosad, A. Schiepers, L. M. Corcoran, K.-M. Toellner, J. M. Polo, M. Meyer-Hermann, G. D. Vitoria, C. G. Vinuesa, Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*. **51**, 337-350.e7 (2019).
59. Chen, T. A. Rice, J. M. Bannock, A. A. Bielecka, J. D. Strauss, J. R. Catanzaro, H. Wang, L. C. Menard, J. H. Anolik, N. W. Palm, E. Meffre, Autoreactivity in naïve human fetal B cells is associated with commensal bacteria recognition. *Science*. **369**, 320–325 (2020).
60. D. J. Rawlings, G. Metzler, M. Wray-Dutra, S. W. Jackson, Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol*. **17**, 421–436 (2017).

61. M. E. Rodríguez-García, F. J. Cotrina-Vinagre, M. Bellusci, A. Martínez de Aragón, L. Hernández-Sánchez, P. Carnicero-Rodríguez, E. Martín-Hernández, F. Martínez-Azorín, A novel de novo MTOR gain-of-function variant in a patient with Smith-Kingsmore syndrome and Antiphospholipid syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **27**, 1369–1378 (2019).
62. G. Canaud, F. Bienaimé, F. Tabarin, G. Bataillon, D. Seilhean, L.-H. Noël, M.-A. Dragon-Durey, R. Snanoudj, G. Friedlander, L. Halbwachs-Mecarelli, C. Legendre, F. Terzi, Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N. Engl. J. Med.* **371**, 303–312 (2014).
63. S. W. Jackson, A. Davidson, BAFF inhibition in SLE—Is tolerance restored? *Immunol. Rev.* **292**, 102–119 (2019).
64. J. Sintes, M. Gentile, S. Zhang, Y. Garcia-Carmona, G. Magri, L. Cassis, D. Segura-Garzón, A. Ciociola, E. K. Grasset, S. Bascones, L. Comerma, M. Pybus, D. Lligé, I. Puga, C. Gutzeit, B. He, W. DuBois, M. Crespo, J. Pascual, A. Mensa, J. I. Aróstegui, M. Juan, J. Yagüe, S. Serrano, J. Lloreta, E. Meffre, M. Hahne, C. Cunningham-Rundles, B. A. Mock, A. Cerutti, mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nat. Commun.* **8**, 1462 (2017).
65. D. M. Ferri, C. Nassar, K. P. Manion, M. Kim, Y. Baglaenko, C. Muñoz-Grajales, J. E. Wither, Elevated levels of interferon- α act directly on B cells to breach multiple tolerance mechanisms promoting autoantibody production. *Arthritis Rheumatol.* **n/a**, doi:10.1002/art.42482.
66. K.-M. Verrou, P. P. Sfikakis, M. G. Tektonidou, Whole blood transcriptome identifies interferon-regulated genes as key drivers in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J. Autoimmun.* **134**, 102978 (2023).
67. M. R. Ugolini-Lopes, G. T. Torrezan, A. P. R. Gândara, E. H. R. Olivieri, I. S. Nascimento, E. Okazaki, E. Bonfá, D. M. Carraro, D. C. O. de Andrade, Enhanced type I interferon gene signature in primary antiphospholipid syndrome: Association with earlier disease onset and preeclampsia. *Autoimmun. Rev.* **18**, 393–398 (2019).
68. V. Gies, A. Wagner, C. Seifert, A. Guffroy, J.-D. Fauny, A.-M. Knapp, J.-L. Pasquali, T. Martin, H. Dumortier, A.-S. Korganow, P. Soulas-Sprauel, Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes. *Sci. Rep.* **7**, 602 (2017).
69. Y. Hao, S. Hao, E. Andersen-Nissen, W. M. Mauck, S. Zheng, A. Butler, M. J. Lee, A. J. Wilk, C. Darby, M. Zager, P. Hoffman, M. Stoeckius, E. Papalexi, E. P. Mimitou, J. Jain, A. Srivastava, T. Stuart, L. M. Fleming, B. Yeung, A. J. Rogers, J. M. McElrath, C. A. Blish, R. Gottardo, P. Smibert, R. Satija, Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* **184**, 3573–3587.e29 (2021).
70. G. Korotkevich, V. Sukhov, N. Budin, B. Shpak, M. N. Artyomov, A. Sergushichev, Fast gene set enrichment analysis (2021), p. 060012.
71. M. Samokhina, A. Popov, ivan-immunomind, V. I. Nazarov, immunarch.bot, E. Rumynskiy, gracecodeadventures, tsvvas, M. Zarodniuk, immunomind/immunarch: Immunarch 0.9.0 (2022), , doi:10.5281/zenodo.7446955.
72. J. A. Vander Heiden, G. Yaari, M. Uduman, J. N. H. Stern, K. C. O'Connor, D. A. Hafler, F. Vigneault, S. H. Kleinstein, pRESTO: a toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 1930–1932 (2014).
73. N. R. Mathew, J. K. Jayanthan, I. V. Smirnov, J. L. Robinson, H. Axelsson, S. S. Nakka, A. Emmanouilidi, P. Czarnewski, W. T. Yewdell, K. Schön, C. Lebrero-Fernández, V. Bernasconi, W. Rodin, A. M. Harandi, N. Lycke, N. Borchering, J. W. Yewdell, V. Greiff, M. Bemark, D. Angeletti, Single-cell BCR and transcriptome analysis after influenza infection reveals

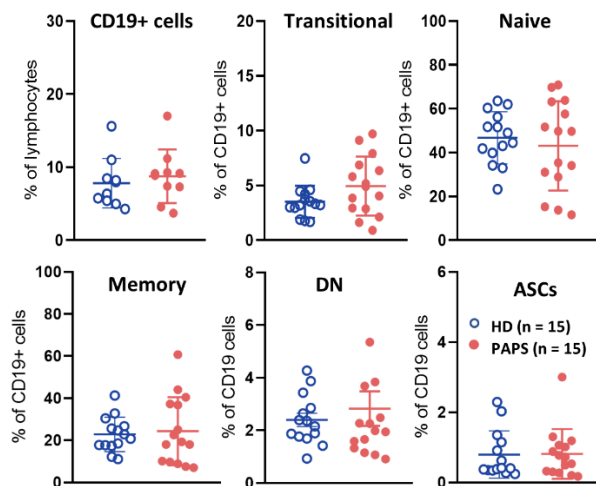
- spatiotemporal dynamics of antigen-specific B cells. *Cell Rep.* **35** (2021), doi:10.1016/j.celrep.2021.109286.
74. N. T. Gupta, J. A. Vander Heiden, M. Uduman, D. Gadala-Maria, G. Yaari, S. H. Kleinstein, Change-O: a toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **31**, 3356–3358 (2015).
75. Z. Gu, L. Gu, R. Eils, M. Schlesner, B. Brors, circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics.* **30**, 2811–2812 (2014).

FIGURES

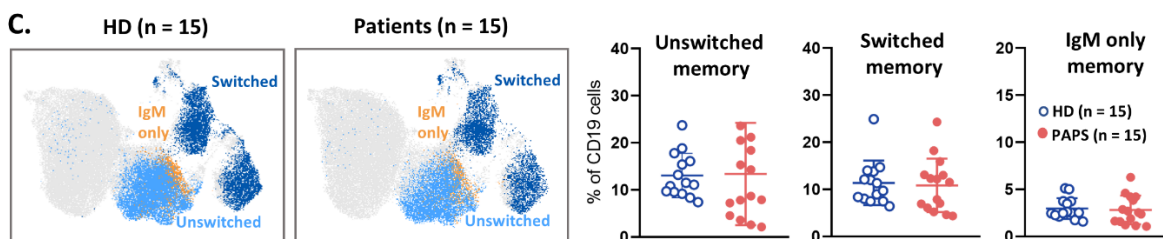
A.



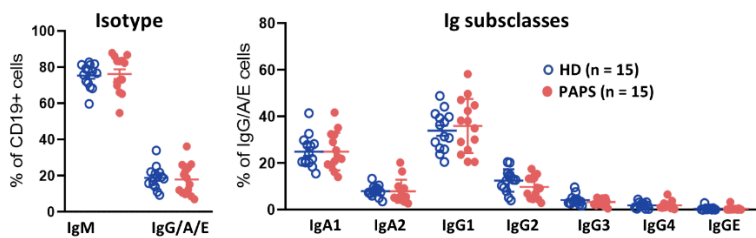
B.



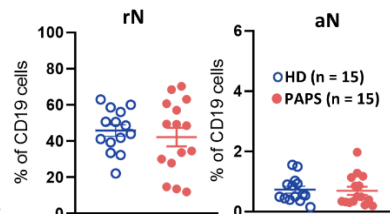
C.



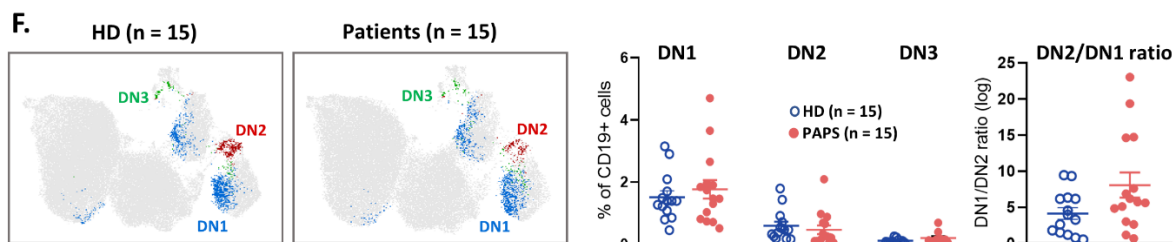
D.



E.



F.



G.

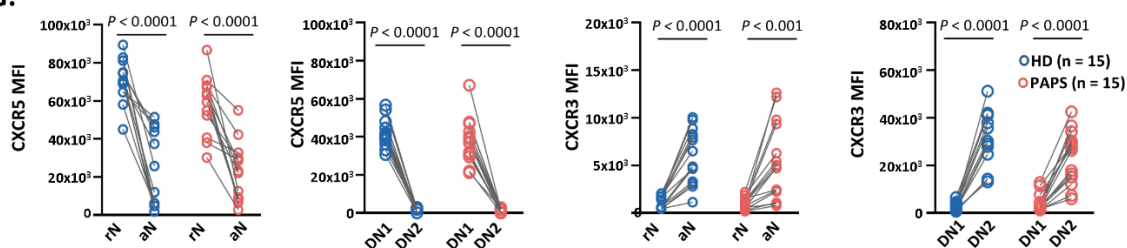


Fig 1. PAPS patients have similar phenotypic B cell features compared to HDs. (A) B cell subsets UMAP projection of composite patient and HD samples (n = 30) Composite sample was derived from 5,000 representative cells analyzed. **(B)** Frequencies of B cell subsets from PAPS patients (n = 15) and HDs (n = 15). **(C)** Composite UMAP projection and frequencies of antigen-experienced B cells. **(D)**, BCR isotype repartition in patients and HD samples. **(E)** Composite UMAP projection and **(F)** frequencies and of aN and DN B cells from patients (n = 15) and HDs (n = 15). **(G)** Surface expression of CXCR5 and CXCR3 chemokines in rN, aN, and DN B cells from both PAPS patients (n=15) and HDs (n=15). Significance was determined using nonparametric Mann-Whitney test. aN, activated naive B cells; DN, double negative; HD, healthy donor; PAPS, primary antiphospholipid syndrome; rN, resting naive B cells.

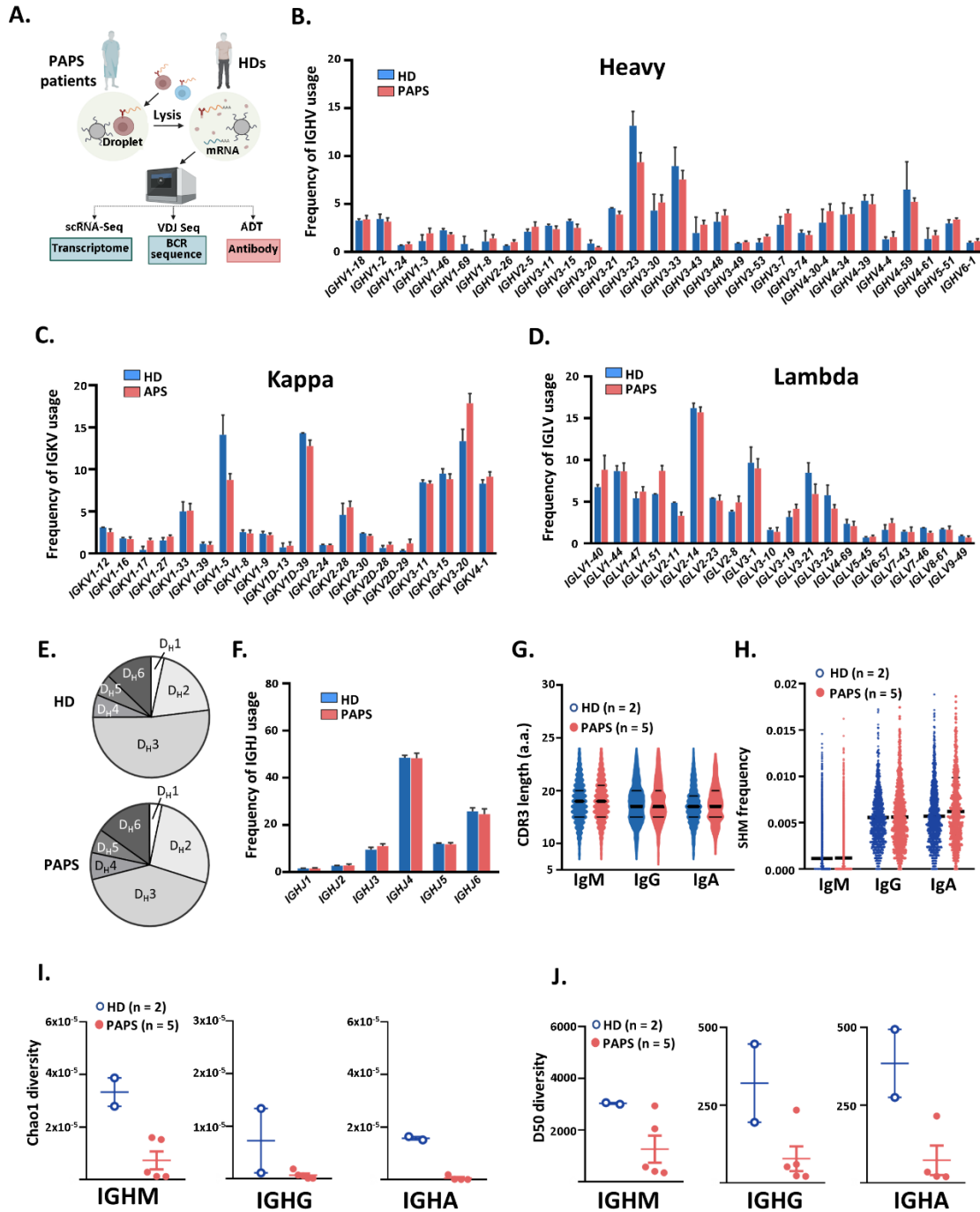


Fig 2. Reduced diversity in BCR repertoire of PAPS patients. (A) Schematic of peripheral B cell isolation from PAPS (n = 5) and HDs (n = 2) blood followed by CITE seq including single-cell transcriptomic, antibody repertoire sequencing and ADT. VDJ sequencing was used to obtain paired heavy- and light-chain V(D)J with an average of 5,231 cells recovered per library. (B-D) *IGHV* gene (B), *IGKV* families (C) and *IGLV* gene (D) usage frequencies in peripheral B cells from PAPS patients (red) and HDs (blue). (E, F) *IGHD* (E) and *IGHJ* (F) gene usage frequencies in peripheral B cells from PAPS patients (red) and HDs (blue). (G, H) CDR3 length (G) and somatic hypermutation per VH segment (H) (nucleotide exchanges compared with the nearest germline gene segment). (I-J) Chao1 (I) and D50 diversity index (J) according to isotype in PAPS patients (red) and HD (blue). ADT, antibody derived tag; HD, healthy donor; PAPS, primary antiphospholipid syndrome.

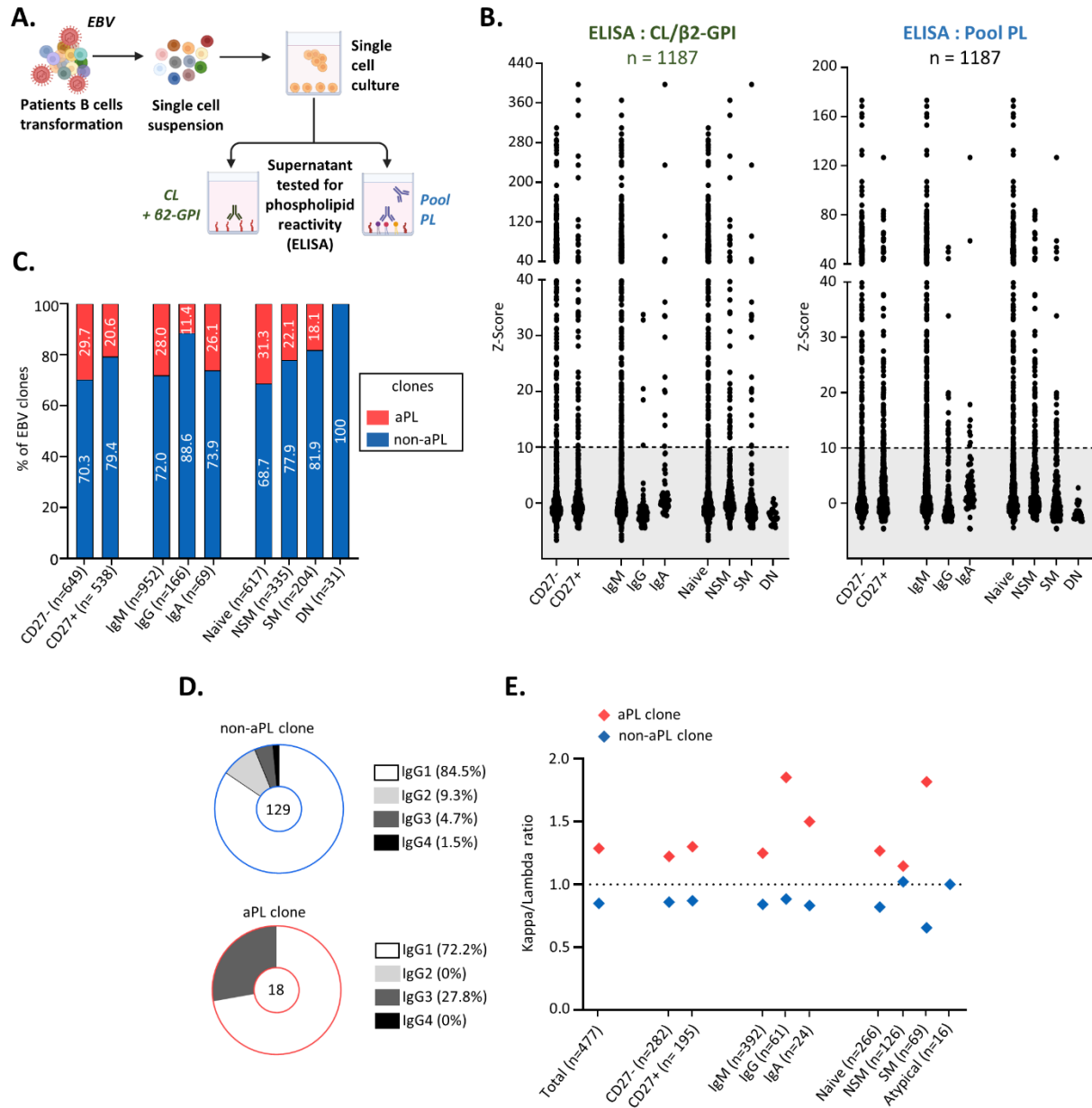


Fig 3. PL reactive B cells are part of the natural repertoire and persist after the naive B cell stage in triple positive PAPS. (A) flowchart of single B cell immortalization. **(B)** Z-score from EBV clones considering cardiolipin/ $\beta 2$ glycoprotein I (CL/B2GP1) and “pool PL” ELISA. **(C)** Frequency of PL reactive in each B cell subsets. **(D)** IgG subclasses repartition in non-PL and PL reactive clones. **(E)** Kappa/lambda ratio of non-PL and PL reactive clones in each B cell subsets. aPL, antiphospholipid antibody; PL, phospholipid.

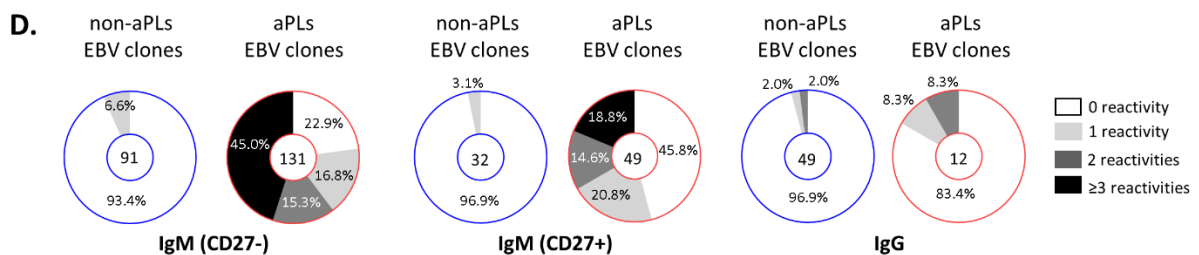
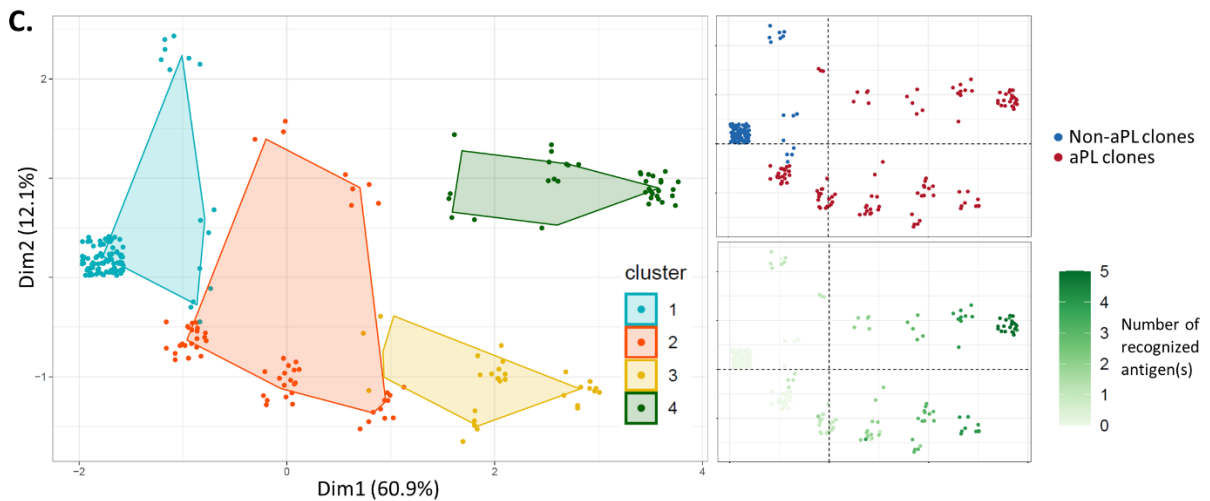
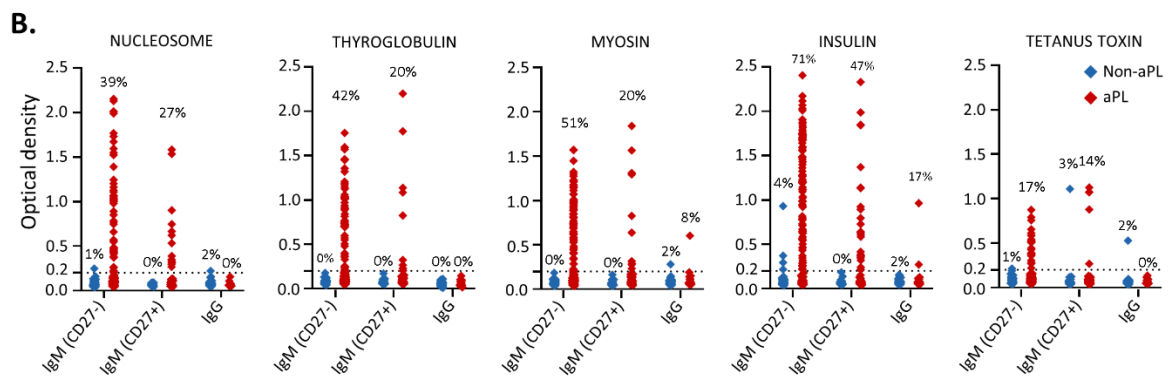
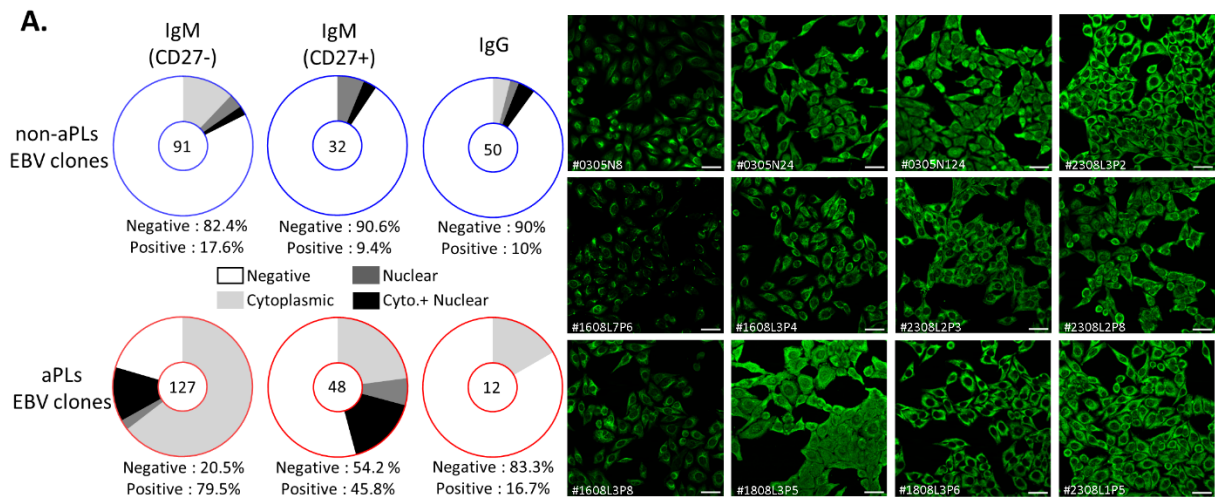


Fig 4. Naive pool of aPL B cells is largely polyreactive. **(A)** HEp-2 reactivity of non-PL and PL reactive clones, derived from PAPS patients, considering IgM⁺CD27⁻, IgM⁺CD27⁺ and IgG clones. Pie charts represent the frequencies of reactive (solid) and nonreactive (open) clones, with the number of clones tested (n) indicated in the center. *Scale* bar, 20 μ m. **(B)** ELISA reactivity of non-PL and PL reactive clones, derived from PAPS patients, against nucleosome, thyroglobulin, myosin, insulin and tetanus toxin. **(C)** K-means clustering plot showing cluster analysis of clones, derived from PAPS patients, reactivity in ELISA (left) and representation of the dimensional repartition of clones according to the PL reactivity (top right) and the number of different antigen recognized among nucleosome, thyroglobulin, myosin, insulin and tetanus toxin (down right) **(D)** Pie charts represent the number of reactivity detected among aPL (solid) and non-aPL clones (open), derived from PAPS patients, with the number of clones tested (n) indicated in the center. Significance was determined using a χ^2 test. aPL, antiphospholipid antibody.

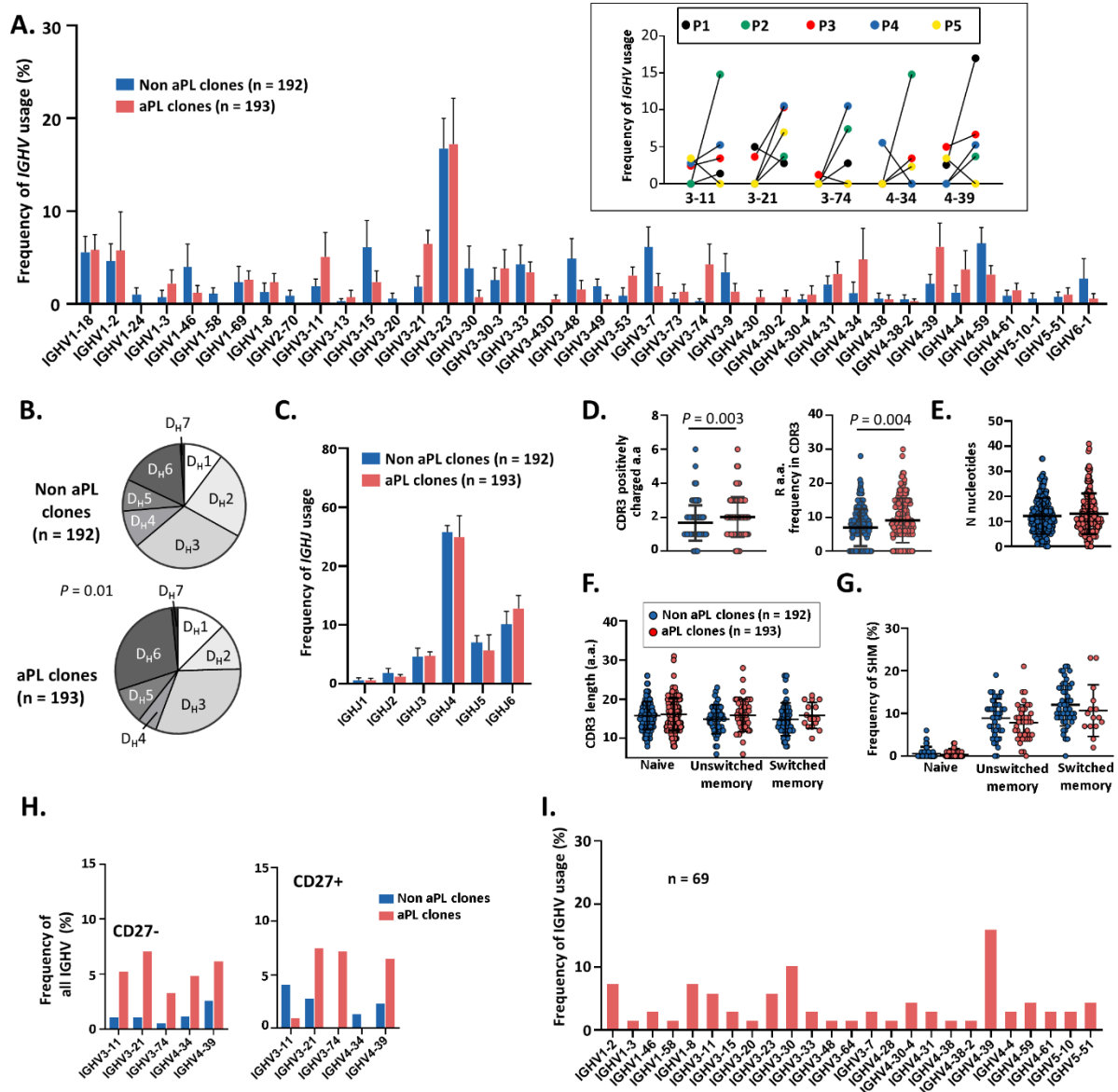


Fig 5. Phospholipid reactive B-cells harbor specific BCR in PAPS patients. 386 variable regions of BCR clones were sequenced **(A)** *IGHV* gene frequency of aPL B-cell clones (red) compared to non-aPL clones (blue). Relative frequencies of *IGHV*3-11, 3-21, 3-74, 4-34 and 4-39 usage in aPL clones and non aPL clones are represented for each PAPS patient. **(B and C)** *IGHD* family **(B)** and *IGHJ* gene **(C)** frequencies of aPL compared to non-aPL clones. **(D-E)** Number of CDR3 positively charged aminoacid and arginine residues in CDR3 **(D)** and number of additional nucleotides **(E)** in aPL compared to non aPL clones. **(F)** Length of CDR3 and in aPL compared to non aPL clones. **(G)** Frequency of SHM per VH segment (nucleotide exchanges compared with the nearest germline gene segment) in naive B cells, unswitched and switched memory B cells in aPL B-cell compared to non-aPL clones. **(H)** *IGHV* gene frequency in CD27⁺ and CD27⁻ population of aPL and non-aPL clones. **(I)** *IGHV* gene frequency of plasma cells from two PAPS patients. Significance was determined using a Two-tailed Mann-Whitney test. aPL, antiphospholipid; HD, healthy donor; PAPS, primary antiphospholipid syndrome; R, arginine; SHM, somatic hypermutation.

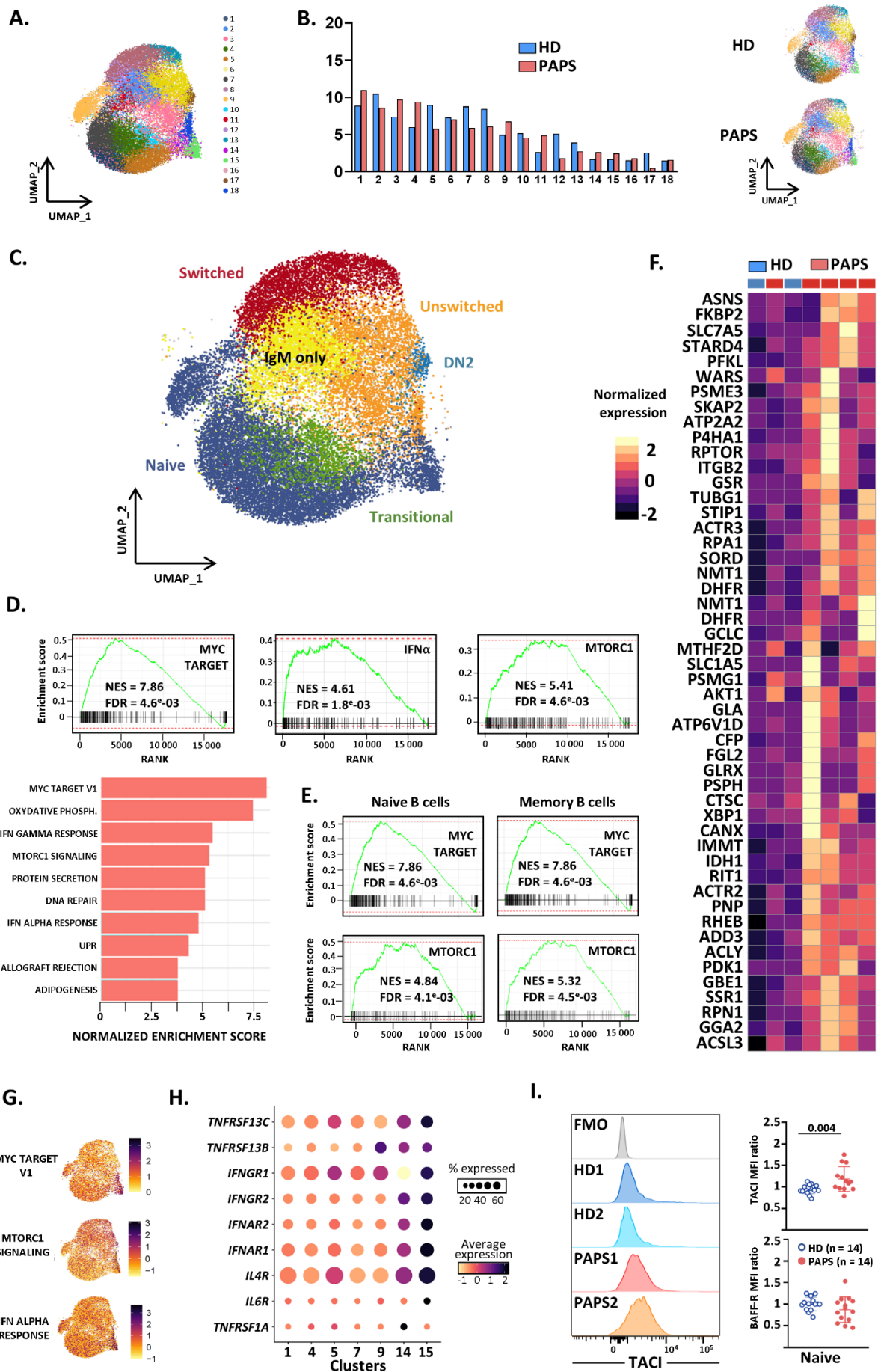


Fig 6. Peripheral B cells from PAPS patients exhibit mTORC1 and MYC transcriptomic signature. **(A)** UMAP projection and clustering of 27,122 B cells analyzed by scRNA-seq. **(B)** Bar plot showing cell frequencies from APS patients and HD that contributed to cluster c1 to c18. **(C)** UMAP projection showing six annotated B cell subtypes. **(D)** Plot showing the top10 pre-ranked Geneset Enrichment Analysis (GSEA) signaling pathway significantly enriched (False Discovery Rate) in total B cells from PAPS patients as opposed to HDs. **(E)** Plot showing some the pre-ranked Geneset Enrichment Analysis (GSEA) signaling pathway significantly enriched (False Discovery Rate) in naive and memory B cells from PAPS patients as opposed to HDs. **(F)** Heatmap listing top 50 genes of mTORC1 signaling pathway enriched in PAPS patients. Samples are clustered based in Euclidian distance. **(G)** Projected enrichment score of indicated pathway example onto UMAP from APS patients. The darker, the higher the enrichment. **(H)** Dot plot for expression of B cell cytokine receptors among naive cluster in all samples. Colors represent minimum-maximum normalized mean expression, and sizes indicate the proportion of cells expressing marker genes. **(I)** TACI MFI on naive B cells from two representative APS and two HDs (left); TACI and BAFF MFI ratio on naive B cells from APS patients as opposed to HDs (right). Differential expression analysis was performed using Wilcoxon rank sum test and a Bonferroni correction to account for multiple comparison. PAPS, primary antiphospholipid syndrome; HD, healthy donor; PAPS, primary antiphospholipid syndrome.

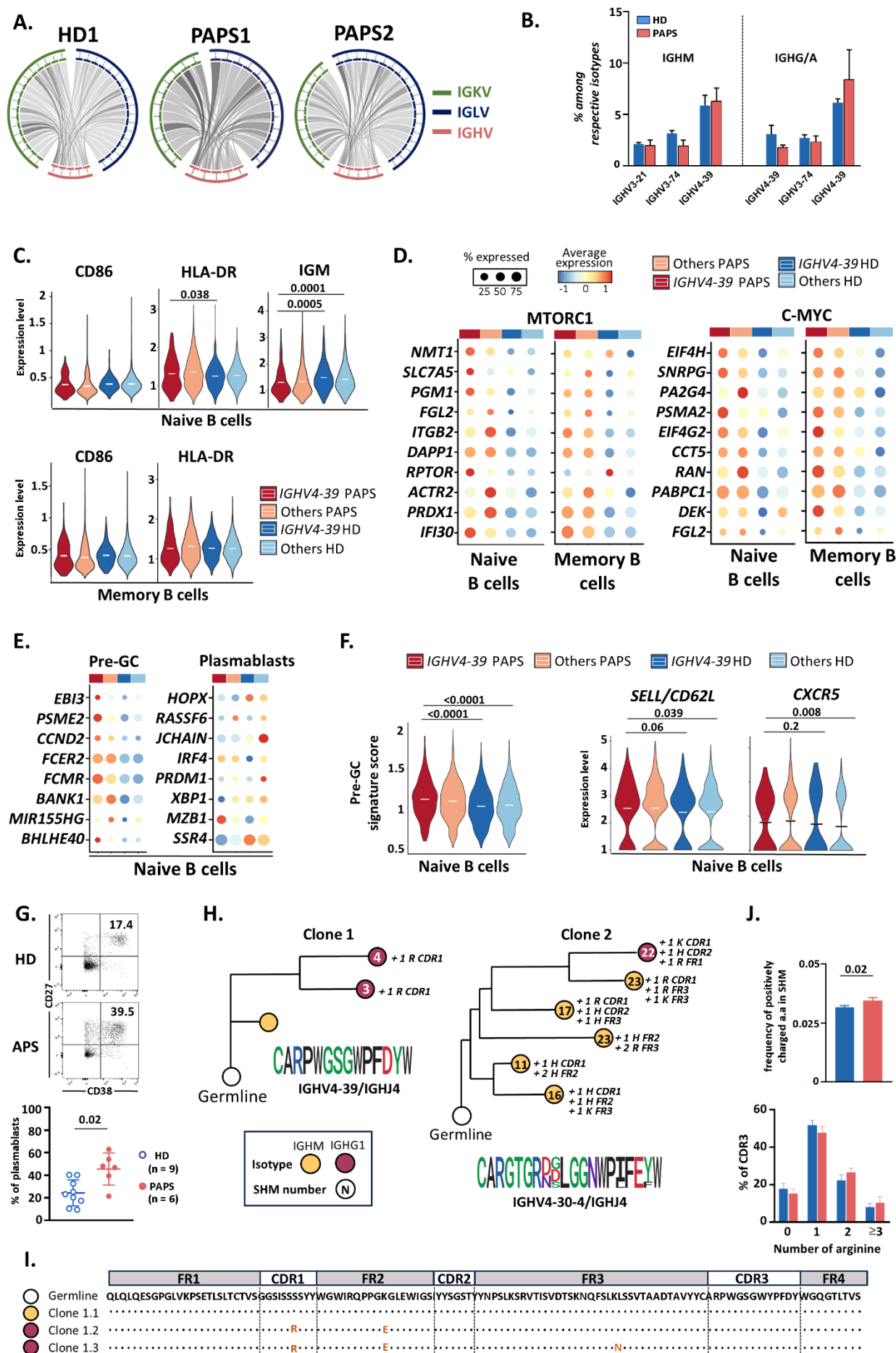


Fig 7. MYC-mTORC1 dysregulation is associated with follicular differentiation and impaired positive selection. **(A)** Circos plot depicting the IGHV:IGLV and IGHV:IGKV pairings for a HD and two representative PAPS patients. Pairing between IGHV3-11, 3-21, 3-74, 4-39 or 4-34 (pink segment), and IGKV (blue segment) or IGLV (green segment) gene are shown by the connecting lines inside the circle with thickness corresponding to pairing frequencies. **(B)** Repartition of *IGHV4-39* clonotypes on scRNA-Seq UMAP projection (left) and frequency of *IGHV4-39* clonotypes in PAPS patients (n = 5) and HDs (n = 2) (right). **(C)** Violin plot representing normalized ADT level for B cell signaling and activation markers in *IGHV4-39* clonotypes from APS patients (dark red), HDs (dark blue), other clonotypes from PAPS patients (light red) and HDs (light blue). **(D)** Dot plot for expression of mTORC1 and MYC selected genes among naive and memory cells according to clonotypes in PAPS patients and HD. **(E)** Dot plot for expression of pre-GC and plasmablast selected genes in naive cells according to clonotypes in PAPS patients and HD. **(F)** Violin plot representing pre-GC signature, *SELL* and *CXCR5* gene expression according to clonotypes in patients and HD. **(G)** Frequency of plasmablast (CD38⁺⁺CD27⁺⁺) after B cell stimulation with CD40L+IL-21+IL-4 for 6 days. Two-tailed Mann-Whitney test was used to compare groups. **(H)** Representative lineage trees for two clones in APS patients. **(I)** Representative amino acid VH alignment for IGHV4-39 clone (clone 1 depicted in (H)) **(J)** Number of positively charged amino acid induced by VH SHM and number of arginine residues in CDR3 of switched IgG/A B cells. ADT, antibody derived tag; HD, healthy donor; MFI, Mean fluorescence intensity; PAPS, primary antiphospholipid syndrome; SHM, somatic hypermutation.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Antiphospholipid B cells emerge from a naive polyreactive pool and, in primary antiphospholipid syndrome, matured through an enhanced mTORC1/MYC activation.

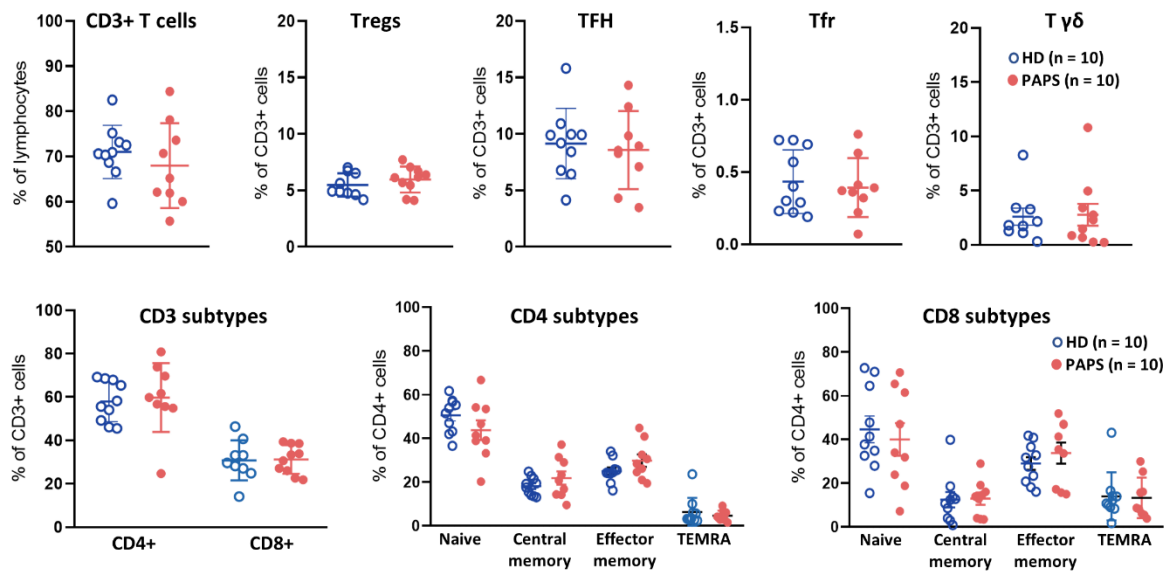
Table S1. Clinical and biological features of patients with triple positive APS and respective analyses performed.

Patient	Sex	Age	Thrombotic Event A/V	Pregnancy complication	CAPS	ANA	LA	Anti- cL IgM	Anti- cL IgG	Anti- β2GPI IgM	Anti- β2GPI IgG	Anti- Annexin V	Anti- PE	Anti- PS	Anti- PT	FCM	EBV clones	CITE- Seq	Cytokine serum screening	ASC differentiation
1	M	36	A/V	-	+	1/1280	+	+	+	+	+	-	+	+	+	X	X	X	X	X
2	M	60	A	-	-	1/160e	+	+	+	+	+	-	+	+	-	X	X	X	X	X
3	F	41	A	+	-	1/640e	+	+	+	+	+	-	-	+	-	X	X	X	X	
4	M	59	A/V	-	-	1/1280	+	-	+	-	+	-	+	+	-	X	X	X	X	
5	F	29	A	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	X	X	X	X	X
6	M	65	A	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	X			X	
7	F	49	V	+	-	1/160e	+	+	+	-	+	+	-	+	-	X			X	
8	F	49	A/V	-	-	1/640e	+	-	+	-	+	-	-	+	-	X				
9	M	48	A/V	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	X			X	
10	F	62	A	-	-	1/320	+	-	+	-	+	-	+	+	+	X			X	
11	M	31	A	-	-	1/320	+	+	+	-	+	-	-	+	-	X			X	X
12	F	44	V	+	-	1/160e	+	-	+	-	+	-	-	-	-	X			X	
13	M	56	A/V	-	-	1/640e	+	-	+	+	+	-	-	+	+	X			X	
14	F	38	A	-	-	1/1280	+	+	+	-	+	-	+	+	+	X			X	
15	F	48	A	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	X			X	X
16	F	32	A/V	+	-	1/640e	+	-	+	-	+	-	+	+	-				X	X

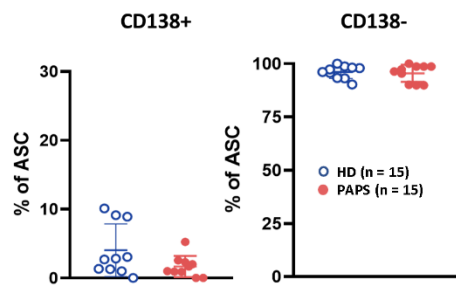
A: arterial; ANA, antinuclear antibodies; ASC, antibody secreting cells; CITE-seq: cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing; CAPS, catastrophic antiphospholipid syndrome; cL, cardiolipin; FCM, flow cytometry; LA, lupus anticoagulant; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PT, prothrombin; V, venous.

FIGURES

A.



B.



C.

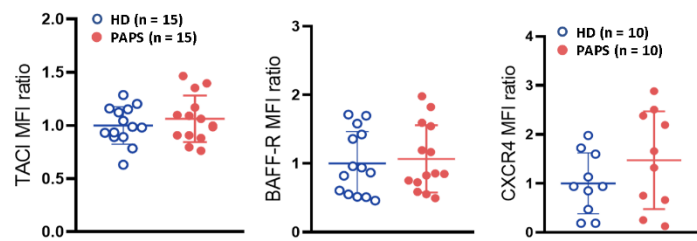


Fig. S1. Peripheral T cell and plasma cells population in PAPS patients. (A) Frequencies of T cell subpopulations in whole blood from PAPS patients (n = 10) and age matched HD (n = 10). **(B)** Frequencies of CD138+ and CD138- ASC in whole blood from PAPS patients (n = 15) and age matched HD (n = 15) **(C)** TACI, BAFF-R and CXCR4 MFI ratio of ASC in PAPS patients and HD. HD, healthy donor; PAPS, primary antiphospholipid syndrome; Treg, regulatory T cell; Tfr, T follicular regulator; T $\gamma\delta$, T gamma delta.

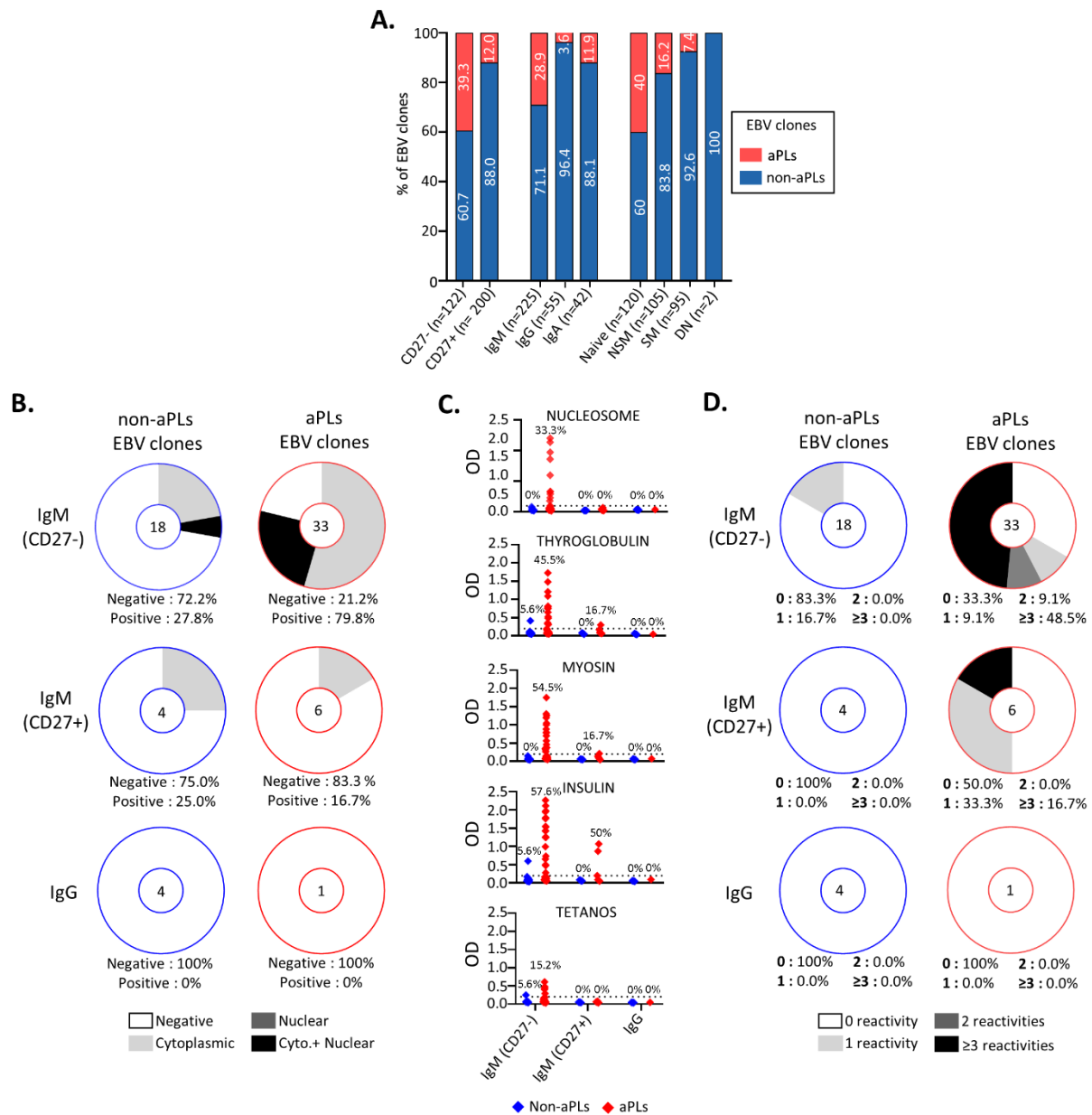


Fig. S2. Features of healthy donor PL reactive B cell clones. (A) Frequency of PL reactivity in each subset. **(B)** Hep-2 reactivity of non-PL and PL reactive clones considering IgM+CD27-, IgM+CD27+ and IgG clones. Pie charts represent the frequencies of reactive (solid) and nonreactive (open) clones, with the number of clones tested (n) indicated in the center **(C)** ELISA reactivity of non-PL and PL reactive clones against nucleosome, thyroglobulin, myosin, insulin and tetanus toxin. **(D)** Pie charts represent the number of reactivity detected among aPL (solid) and non-aPL clones (open), with the number of clones tested (n) indicated in the center.

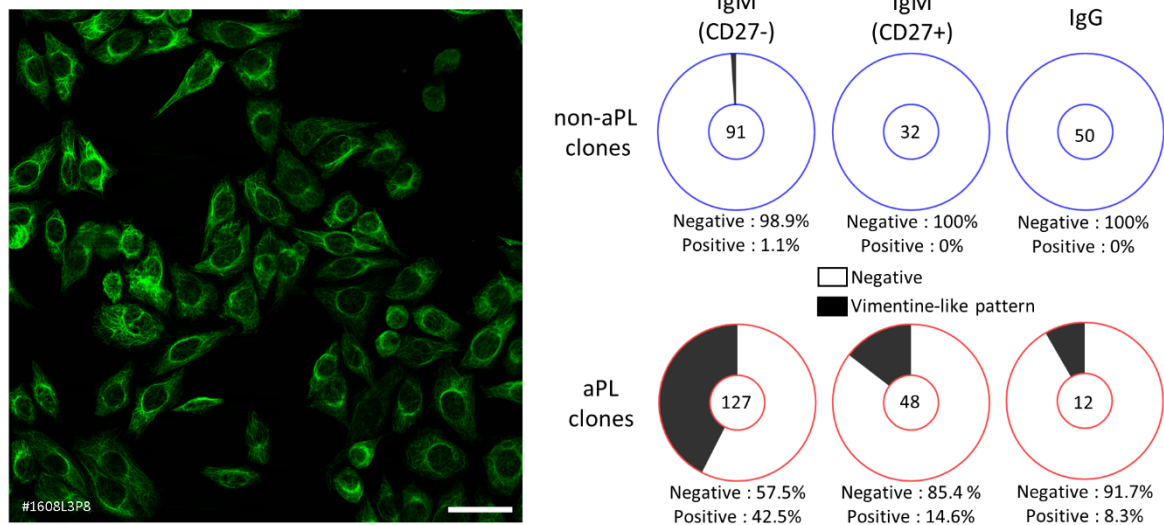


Fig. S3. Vimentin staining pattern of PL-reactive clones. Hep-2 vimentin-like pattern of non-PL and PL reactive clones, derived from PAPS patients, considering IgM+CD27-, IgM+CD27+ and IgG clones. Pie charts represent the frequencies of reactive (solid) and nonreactive (open) clones, with the number of clones tested (n) indicated in the center. *Scale bar, 20 μ m*

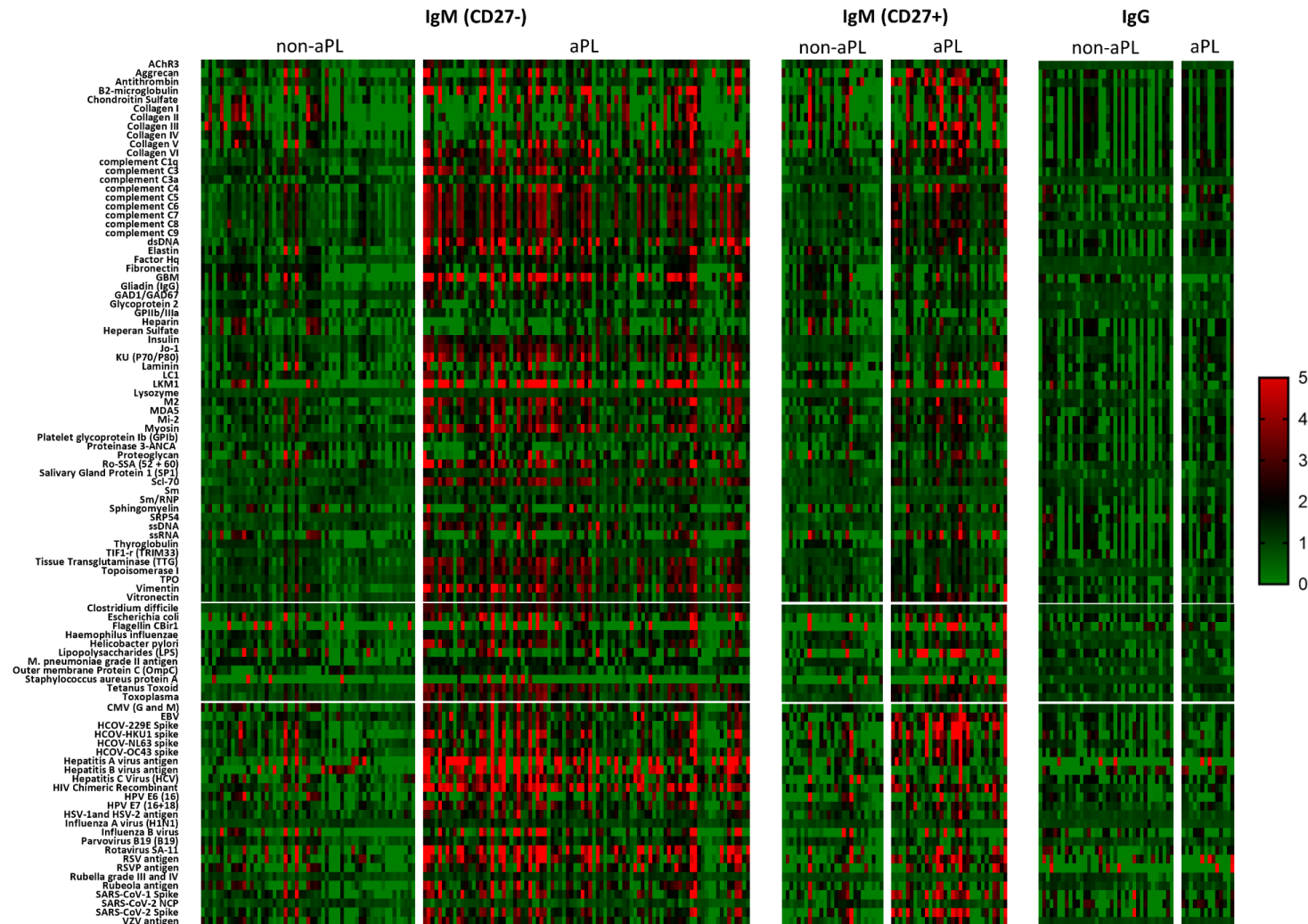


Fig. S4. Progressive loss of polyreactivity during B-cell maturation. Supernatant from 136 aPLs clones and 120 non aPLs clones, derived from PAPS patients, were used to probe autoantigen microarrays featuring 97 different foreign and self-antigens. Data are depicted as a fold change relative to the IgM (CD27⁻), IgM (CD27⁺) or IgG non-aPL group.

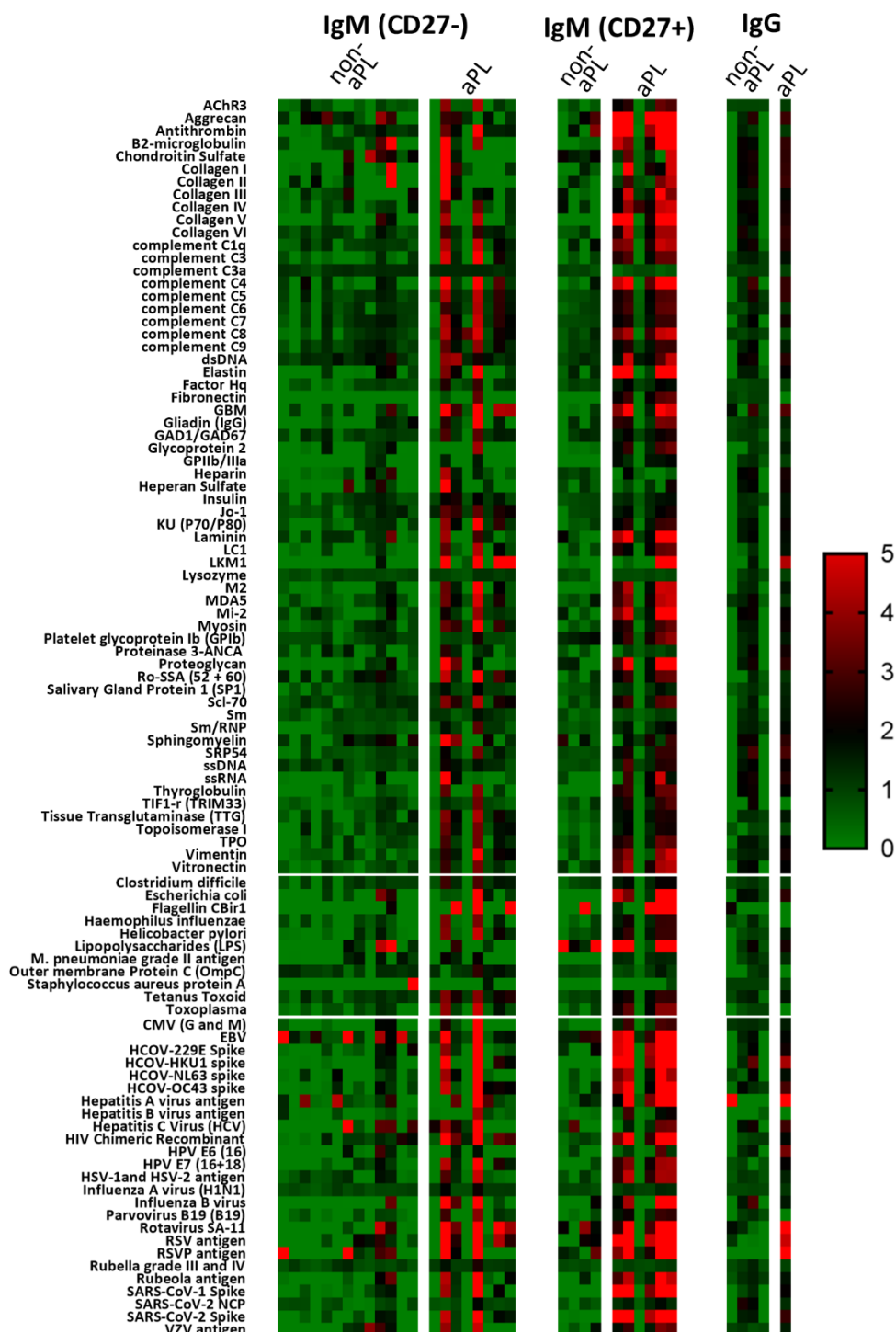


Fig. S5. Similar polyreactive features of PL reactive clones in HD. Supernatants from 20 aPLs clones and 24 non aPLs clones, derived from HD, were used to probe autoantigen microarrays featuring 97 different foreign and self-antigens. Data are depicted as a fold change relative to the IgM (CD27-), IgM (CD27+) or IgG non-aPL group.

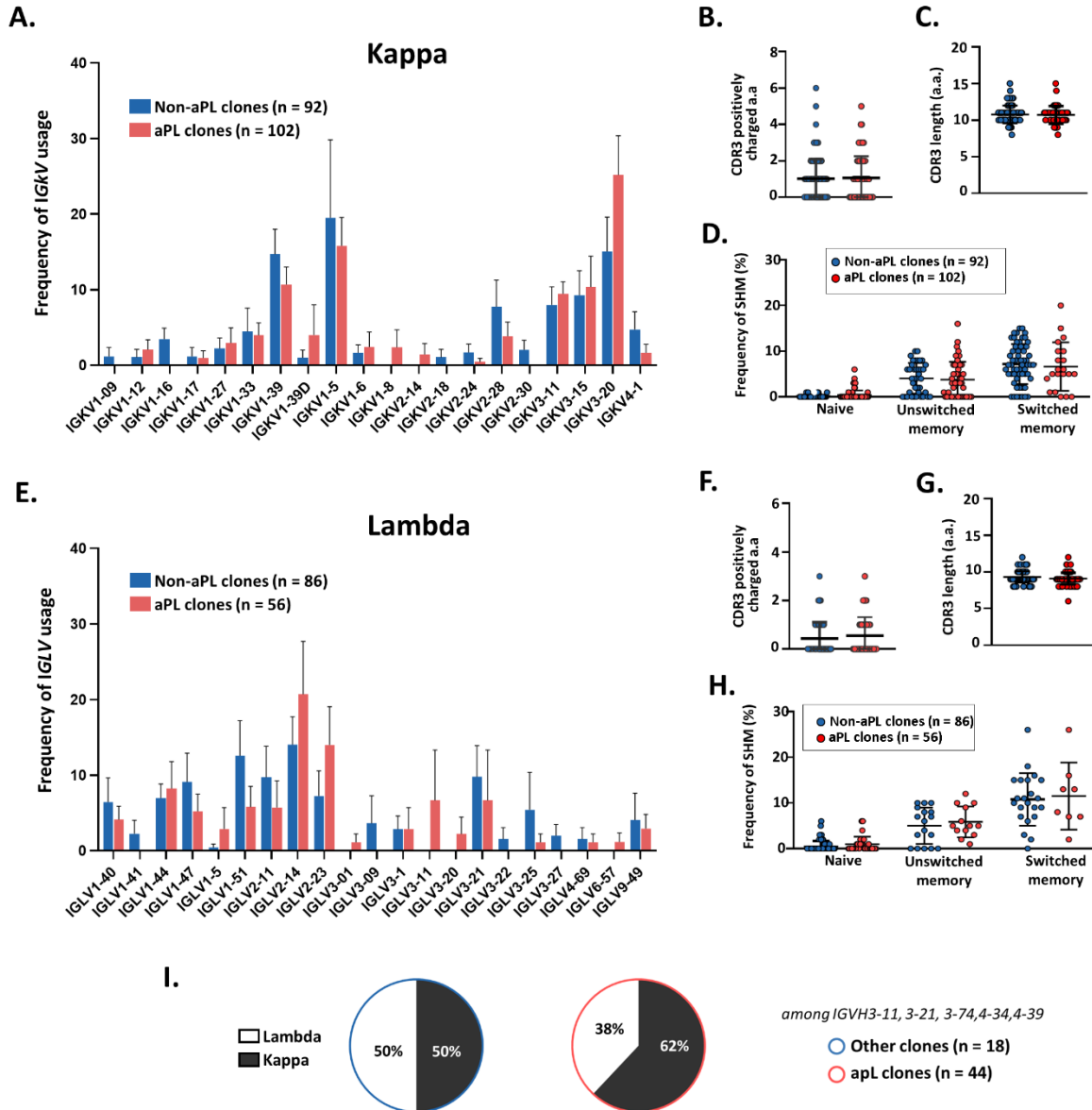


Fig. S6. In depth reactivity and light chain features of phospholipid reactive B-cells in PAPS patients. (A) *IGKV* gene frequency of aPL B-cell clones (red) compared to non-aPL clones (blue). (B to D) Number of CDR3 positively charged amino acid (C), length of CDR3 (D) and frequency of SHM per VK segment according to B cell subpopulation (E) in aPL compared to non aPL clones. (E) *IGLV* gene frequency of aPL B-cell clones (red) compared to non-aPL clones (blue). (F to H) Number of CDR3 positively charged amino acid (G), length of CDR3 (H) and frequency of SHM per VL segment according to B cell subpopulation (I) in aPL compared to non aPL clones. (I) Frequencies of kappa/lambda isotypes among clones with IGHV3-11, 3-21, 3-74, 4-34, 4-39 encoded BCR (n = 62 clones). Two-tailed Mann-Whitney test was used to compare groups. PAPS, primary antiphospholipid syndrome; HD, healthy donor; SHM, somatic hypermutation.

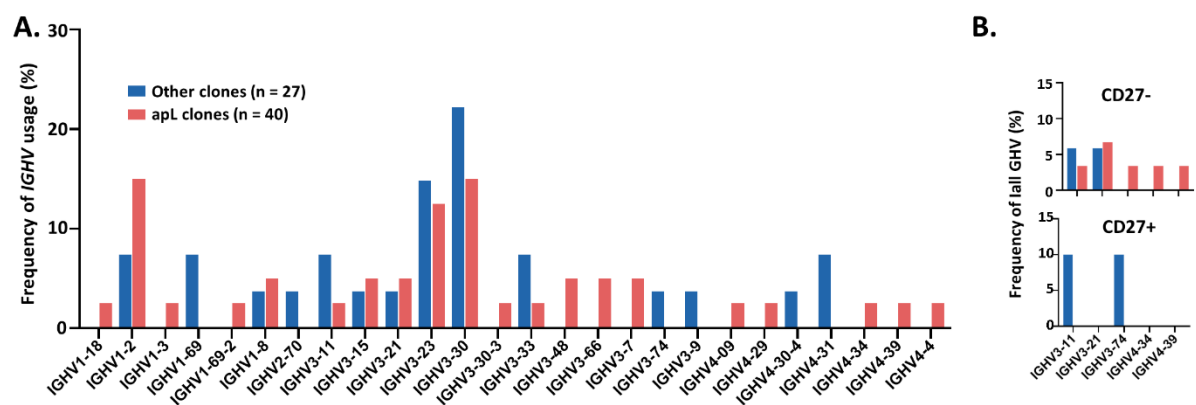


Fig. S7. Features of phospholipid reactive B-cells in HD. (A) *IGHV* gene frequency of aPL B-cell clones (red) compared to non-aPL clones (blue). (B) *IGHV* gene frequency in CD27⁺ and CD27⁻ population of aPL and non-aPL clones. HD, healthy donor.

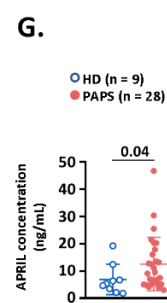
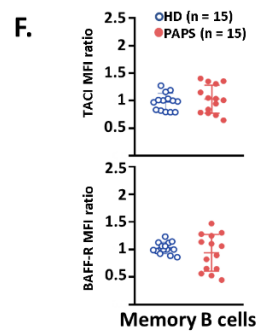
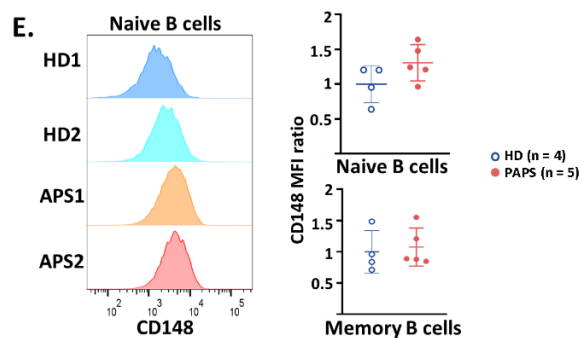
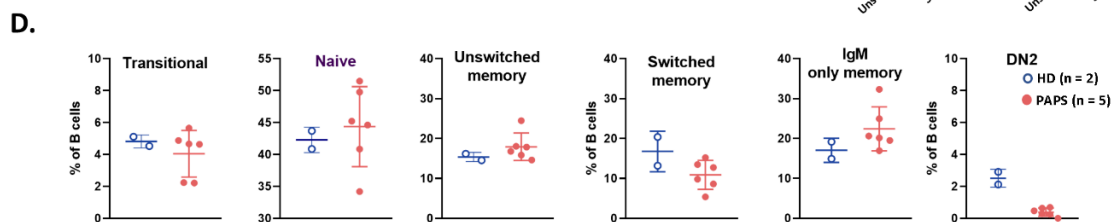
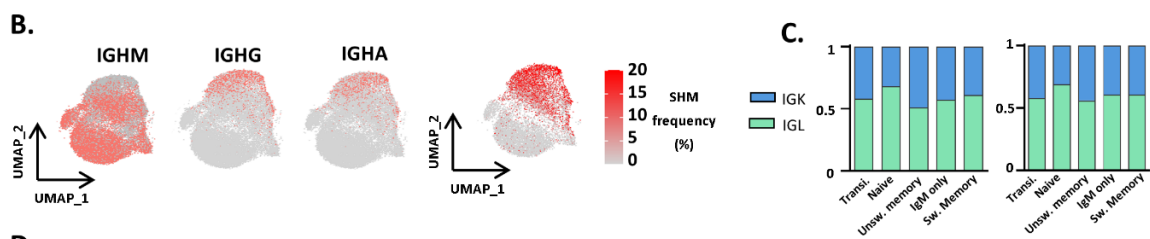
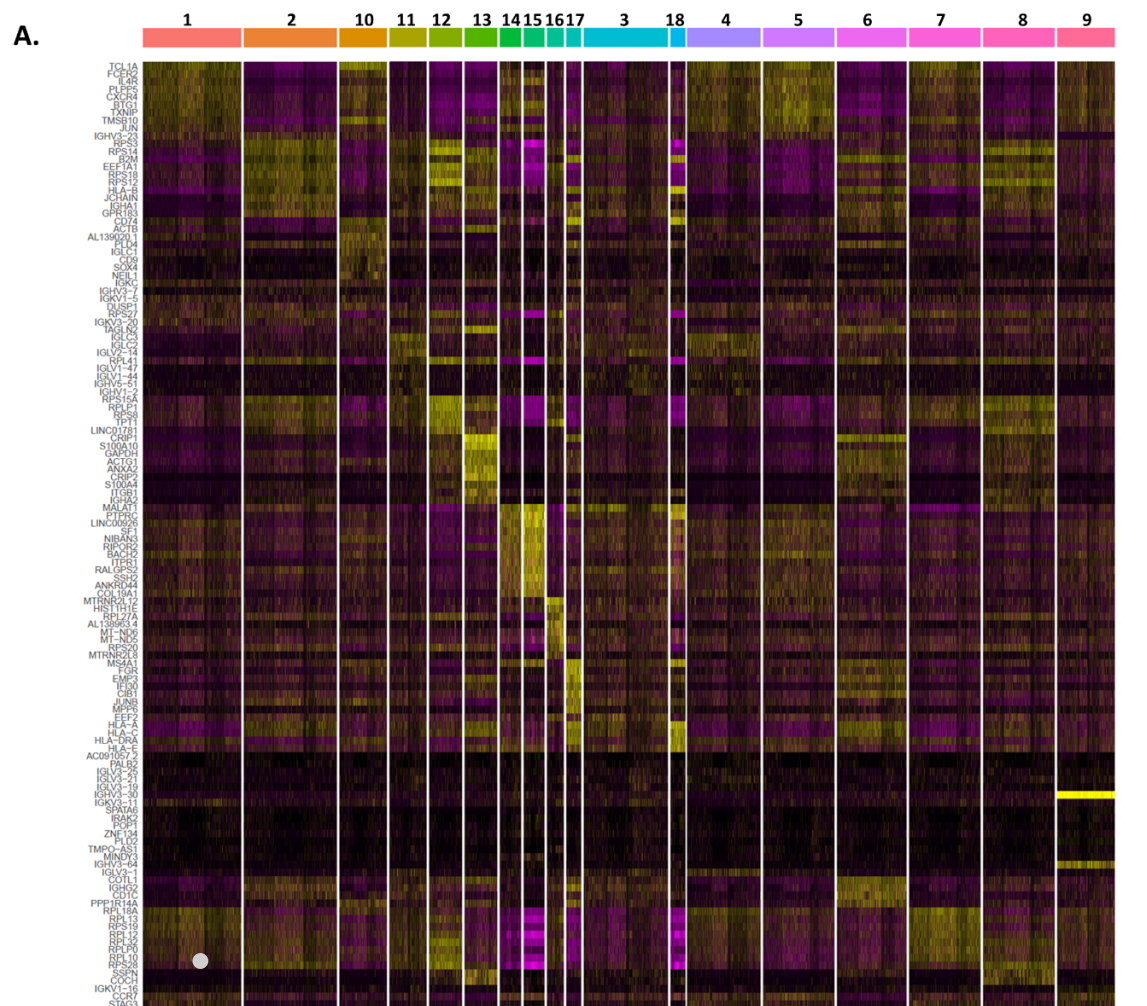


Fig. S8. Single-cell analysis of circulating B cell populations in PAPS patients. **(A)** Heatmap showing the expression of the top 10 DEGs (row) per cluster for each cell (column). **(B)** Projection of heavy chain isotype and SHM frequency on scRNA UMAP projection. **(C)** Light chain isotype repartition among B cell subpopulations defined by scRNAseq clusters. **(D)** Frequencies of B cell subpopulations defined by scRNAseq clusters in whole blood from PAPS patients (n = 5) and HD (n = 2). **(E)** CD148 MFI on naïve B cells from two representative APS and two HD (left) and CD148 MFI ratio on naïve B cells from PAPS (n = 5) patients and HD (n = 4) (right). **(F)** TACI and BAFF-R MFI ratio on memory B cells from APS (n = 15) patients as opposed to HD (n = 15). **(G)** APRIL concentration in the plasma of HD compared to PAPS patients. PAPS, primary antiphospholipid syndrome; HD, healthy donor.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le SAPL primaire est une maladie auto-immune à autoanticorps prototypique (Meroni et al. 2011). Néanmoins, la genèse des aPL pathogènes demeure encore mal comprise pour des raisons déjà évoquées plus haut, du fait de la multiplicité des autoantigènes impliqués et des difficultés à identifier les cellules B spécifiques de ces derniers. Nous avons tenté de relever ces défis chez des patients avec SAPL primaire triple positif, en employant deux techniques à l'échelle d'une cellule unique : i) des lignées clonales de lymphoblastes et ii) une analyse B multimodale sur LB primaires, avec l'objectif de décrire de façon exhaustive les caractéristiques des sous-populations B et des LB spécifiques des PL. Nous avons ainsi pu fournir une description exhaustive du phénotype des LB périphériques et de leur répertoire chez les patients, identifier des caractéristiques communes aux LB PL-spécifiques en termes de région variable d'Ig, de réactivité, et préciser les déterminants de leur différenciation périphérique.

Nous n'avons pas identifié de franche anomalie de répartition des sous-populations B périphériques chez 15 patients. Ces résultats corroborent de précédents travaux effectués chez des patients avec SAPL de phénotype thrombotique ou obstétrical. Chez 11 patients avec SAPL primaire, une fréquence accrue de LB naïfs et de LB transitionnels était notée, associée à une diminution des LB mémoires switchés par rapport à des sujets contrôles ou des patients ayant présenté un événement thrombotique sans aPL (Simonin et al. 2017). Néanmoins, les variations constatées étaient modestes et non retrouvées dans une cohorte plus large de 37 patients avec SAPL primaire (Alvarez-Rodriguez et al. 2018). Par ailleurs, aucune expansion des LB CD27-IgD- n'était retrouvée dans ces études. Le phénotype plus détaillé de nos patients, incluant les marquages CDXC5 et CD11c, indique qu'ils ne présentent pas d'augmentation de la fréquence des LB DN2 ou de leurs précurseurs, les cellules aNaive. L'absence d'expansion de ces LB CD11c+, acteurs de la voie différenciation extra-folliculaire, représente une différence notable avec les anomalies lymphocytaires B décrites dans le LES (Jenks et al. 2018; Tipton et al. 2015). De plus, l'élévation des ASC circulants, autre singularité des patients lupiques (Ignacio Sanz et al. 2023), n'est pas retrouvée chez nos patients SAPL. Ce résultat s'oppose à une étude portant sur 26 patients avec SAPL primaire, où une expansion de plasmablastes était notée, en particulier lorsqu'une signature IFN ou une expression de TLR7 était identifiée (Hisada et al. 2019). La fréquence de ces plasmablastes était néanmoins inférieure à celle de patients lupiques avec SAPL secondaire.

Les points de tolérance déficients dans le SAPL primaire ne sont pas connus. Contrairement au LES ou à d'autres MAI comme les vascularites à ANCA (Bashford-Rogers et al. 2019), nous n'avons pas identifié de biais d'usage de gènes V, que ce soit pour les chaînes H ou L, dans les LB totaux des patients. En considérant la séquence complète des régions variables des chaînes lourdes, tous nos patients présentent une diversité restreinte de leur répertoire B. Cette baisse de diversité est retrouvée dès le stade naif, ce qui peut indiquer un défaut de réarrangement VDJ lors des étapes de différenciation précoce. Les clones B spécifiques des PL sont plus souvent d'isotype κ que chez le sujet sain, ce qui pourrait suggérer un défaut d'édition du récepteur (Chen et al. 2020). L'analyse des segments κ réarrangés à l'échelle des LB totaux ne plaide toutefois pas en faveur d'un défaut de recombinaison secondaire : 18,1% des réarrangements κ impliquent un segment VK distal chez les patients, contre 18,1% chez les sujets sains.

Plusieurs points viennent nuancer l'implication d'une tolérance centrale défectueuse dans la genèse du pool de LB réactifs contre les PL. L'analyse de clones B immortalisés en cellule unique nous a permis de montrer que la fréquence de LB naïfs PL-spécifiques était proche entre les patients et un sujet contrôle. La présence de tels LB réactifs contre les PL chez des sujets sains avait déjà pu être démontrée en contexte de primo-infection EBV (Patricia Lieby et al. 2003). Considérant, de plus, que la plupart des BCR des clones aPL sont polyréactifs chez nos patients, nos données tendent à prouver que les aPL dérivent d'un pool naturel de BCR présent physiologiquement au stade naïf. Nous pouvons alors supposer que les BCR autoréactifs sont éliminés ou leur spécificité modifiée par la tolérance périphérique tardive chez les sujets sains, mais pas chez les patients. En effet, la fréquence des BCR pL-spécifiques est près de trois fois supérieure parmi les clones dérivant des LB mémoires switchés des patients par rapport au sujet contrôle. Leurs BCR ne sont plus polyréactifs et sont mutés, ce qui suggère que les LB dont ils dérivent suivent bien un processus de maturation d'affinité secondaire. La sélection inhérente au compartiment post-antigénique apparaît donc inefficace ou inopérante.

L'analyse détaillée des régions variables du BCR des clones aPL identifie des gènes VH plus fréquemment utilisés. Certains, dont *IGHV4-34* et *IGHV3-11*, ne sont retrouvés que dans les clones dérivant de LB naïfs. De façon générale, chez le sujet sain, les LB exprimant *IGHV4-34* sont fréquents dans le compartiment naif. Ils constituent des BCR largement polyréactifs, notamment vis-à-vis d'épitopes du microbiote, et sont fréquemment

anergiques, ce qui n'autorise pas leur entrée dans les follicules comme le suggère le fait que leur proportion soit faible parmi les LB switchés (Cappione et al. 2005; Sabouri et al. 2014). La rédemption clonale opère de telle sorte que les rares clones mémoires retrouvés chez les sujets sains sont mutés dans l'idiotype 9G4 (Reed et al. 2016; Sabouri et al. 2014). Ces processus sont déficients dans le LES (Burnett et al. 2019). Chez nos patients, le fait que le gène *IGHV4-34* ne soit plus retrouvé dans les BCR des clones issus du compartiment post-antigénique rend improbable leur implication dans la sécrétion d'aPL pathogènes, et distingue singulièrement les mécanismes de rupture de tolérance B dans le SAPL primaire de ceux du LES. A l'opposé, les segments 4-39, 3-21, 3-74 de chaînes H sont retrouvés dans les clones dérivants de LB mémoires. La fréquence importante de gènes *IGHV4-39* dans les Ig de PC des patients est inhabituelle (Scheid et al. 2011). Bien que nous n'ayons pas validé le caractère pathogène de ces Ig, cela laisse penser qu'elles pourraient participer au pool de PC sécréteurs d'aPL. Ce gène avait déjà été décrit dans des contextes d'auto-immunité lié aux aPL. Dans les travaux de R. Bashford *et al.* Les BCR *IGHV4-39* étaient plus fréquemment retrouvés dans les LB périphériques des patients lupiques, à la fois dans le compartiment naïf et post-antigénique, mais sans qu'il soit précisé si ces patients avaient un SAPL secondaire (Bashford-Rogers et al. 2019). Le clonage en cellule unique des LB naïfs de trois patients lupiques pédiatriques révèle que le gène *IGHV4-39* est retrouvé dans respectivement 19% et 6% des BCR de LB matures naïfs des deux patients présentant des anticorps anticardiolipides, alors que ce gène n'était pas retrouvé pour le patient sans biologie aPL (Yurasov et al. 2005). Quant au gène *IGHV3-74*, il a été identifié dans la région variable d'un anticorps anti β 2GPI (JGG9) produit par des hybridomes obtenus à partir de LB d'un patient avec SAPL (Buschmann et al. 2005).

Cet anticorps JGG9 (d'isotype IgM ou IgG1 dans sa forme recombinante rJGG9) reconnaît la CL de façon dépendante de la β 2GPI et a une affinité importante pour le domaine I de celle-ci (Müller-Calleja et al. 2021; Müller-Calleja et al. 2017). Par rapport à la séquence germinale, la chaîne lourde du JGG9 porte diverses mutations, dont plusieurs substitutions d'acides aminés pour des résidus arginine (2 dans la FR3, 2 dans la CDR3) (Buschmann et al. 2005). Le rôle crucial des résidus arginine dans la spécificité β 2GPI avait déjà été démontré par l'étude d'un anticorps monoclonal (IS4), d'isotype IgG et reconnaissant la β 2GPI, exprimé dans des lignées CHO (*Chinese hamster ovary*) (I. Giles et al. 2006). Les quatre résidus arginines présents dans la CDR3 de cet anticorps proviennent

de SHM. La substitution de n'importe laquelle de ces arginines par une sérine réduit l'affinité pour la β 2GPI, alors que seule une substitution d'une des deux arginines les plus distales réduit l'affinité pour la cL, la phosphatidylsérine, la phosphatidylethanolamine. La charge positive de l'arginine, qui faciliterait la liaison à un complexe β 2GPI et PL chargés négativement, n'est probablement pas une explication suffisante pour expliquer l'importance de ces insertions dans les régions CDR. Notre équipe a montré qu'une fois reversé en condition germinale, un aPL (CIC15) ne générait plus de thrombose chez la souris. Cette réversion impliquait le remplacement de 3 résidus asparagine dans la CDR1 de la chaîne légère kappa (Patricia Lieby et al. 2004). De façon intéressante, la version germinale de cet aPL était polyréactive et réagissait contre la thyroglobuline, la myoglobine, l'ADN simple brin, ce qui corrobore notre hypothèse que les aPL dérivent d'un pool naturel d'anticorps polyréactifs. Bien que les acides aminés introduits et les régions d'insertion soient différentes (chaîne H ou L), l'ensemble de ces résultats souligne surtout l'importance des SHM dans la pathogénicité des aPL. Le ratio R/S des SHM constaté dans les anticorps IS4 et CIC15 est en faveur d'un processus drivé par l'antigène, ce qui fait écho aux résultats de W. Ruff *et al.* sur la cross réactivité des IgG anti- β 2GPI avec des épitopes du microbiote qui pourraient participer à la maturation d'affinité de ces anticorps (Chukwuocha et al. 2002; Patricia Lieby et al. 2004; Ruff et al. 2019).

Les processus de tolérance périphérique tardive tels que la rédemption clonale, concerne à la fois les voies de différenciation folliculaire et extra-folliculaire (Ambegaonkar et al. 2022; Burnett et al. 2019). S'ils sont indirects, plusieurs arguments supportent l'hypothèse d'une différenciation folliculaire des LB spécifiques des aPL chez nos patients. Les BCR *IGHV4-39* sont retrouvés dans la moelle osseuse et présentent un phénotype de PC à longue durée de vie. L'ensemble des ASC circulants exprime d'ailleurs d'avantage CXCR4 à leur surface, ce qui pourrait favoriser leur migration dans la MO (Hargreaves et al. 2001). De plus, les LB naïfs des patients, dont les LB exprimant les VH d'intérêt, surexpriment des marqueurs d'adressage aux follicules B dont *CD62L (SELL)* et CXCR5 et, globalement, présentent une signature pré-CG (Jenks et al. 2018; King et al. 2021). Ces données supportent l'idée que le défaut de tolérance périphérique constatée chez nos patients implique des mécanismes intrinsèques au CG.

Dans ce contexte, la dérégulation des voies mTORC1 et C-Myc constatée dans leur LB peut avoir un rôle important. C-Myc est indispensable à la formation et au maintien des CG

(Calado et al. 2012; Dominguez-Sola et al. 2012). Pour les LB de la zone claire, ce facteur de transcription est nécessaire au retour dans la zone sombre du CG et à la reprise des cycles prolifératifs (Inoue and Kurosaki 2023). Chez la souris, C-Myc protège ces cellules B de la zone claire de l'apoptose, y compris celles de faible affinité (Nakagawa et al. 2021). Son activation exacerbée pourrait fournir un avantage sélectif de façon inappropriée à des clones autoréactifs, renforcée par la réponse exacerbée à CD40L que nous identifions lors des tests de différenciation plasmocytaire des LB de nos patients. Cette dernière caractéristique est par ailleurs concordante avec l'expression accrue par les LB des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II qui pourrait faciliter leur interactions avec les TFH (Ise et al. 2014).

Concernant le signal mTORC1, il est intéressant de noter qu'une des formes monogéniques de SAPL, extrêmement rares, implique une mutation gain de fonction de *MTOR* (Rodriguez-Garcia et al. 2012). L'implication de la voie moléculaire mTORC1 dans le SAPL a été démontrée chez des patients atteints de néphropathie associée au SAPL, pour lesquels une activation de cette voie étaient constatée dans les cellules endothéliales (Canaud et al. 2014). Cette activation était aussi retrouvée dans les cellules endothéliales des vaisseaux atteints par un CAPS. Cependant, le rôle de la signalisation MTOR dans les cellules B du SAPL n'a pas été explorée. MTOR est une sérine/thréonine qui interagit avec plusieurs protéines pour former deux complexes distincts nommés mTORC1 (six protéines dont spécifiquement raptor et PRAS40) et mTORC2 (sept protéines dont spécifiquement Rictor et mSin1) (Laplane and Sabatini 2012). La rapamycine est un inhibiteur MTOR : elle forme un complexe avec la protéine K506-binding protein (FKBP12) qui lie et inhibe MTOR dans le complexe mTORC1 mais pas mTORC2. mTORC1 phosphoryle une variété de substrats, aboutissant à un programme anabolique pour la cellule. Il favorise la synthèse protéique en supprimant les inhibiteurs du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E) et en activant les inducteurs ribosomiques S6 de la traduction des protéines. Il participe également à la régulation de la glycolyse, de la synthèse des acides gras, de la biogenèse des mitochondries et du réticulum endoplasmique via différents facteurs de transcription comme (SREBP), le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ), le facteur 1 α induit par l'hypoxie (HIF1 α) et C-Myc (Laplane and Sabatini 2012; Weichhart et al. 2015). mTORC2 favorise la survie cellulaire et la dynamique du cytosquelette via la protéine kinase Akt.

Dans le lignage B, mTORC1 est indispensable au développement des LB de la zone marginale, mais aussi à celui des CG et aux fonction sécrétrices des PC (Cox et al. 2023; Zhang et al. 2013; Limon et al. 2014). Ainsi, chez la souris, la rapamycine empêche le développement des CG et la commutation de classe des LB lors d'une infection par le virus *influenzae* (Keating et al. 2013). Dans un modèle inductible, l'inhibition de *RPTOR* sélective dans les LB matures naïfs empêche le développement des CG en réponse à une immunisation NP-IgG de poulet (*Nonylphenol-chicken γ -globulin*), avec diminution drastique des LB du CG, ainsi que le développement de nouveaux PC (Jones et al. 2016). Des effets similaires sont retrouvés lors du traitement par la rapamycine. Dans le modèle NZB/W, ce traitement ne modifie pas la survie des PC dans la MO mais inhibe leur fonction de synthèse protéique et, de fait, la synthèse d'anticorps, dont les anti-ADNdb.

En plus d'orienter les LB des patients vers le CG et la différenciation en PC de longue durée de vie, la dérégulation de mTORC1 pourrait aussi expliquer le défaut de sélection du CG que nous avons constaté. Nous avons vu que la sélection positive des LB de haute affinité se produit dans la zone claire grâce à un avantage sélectif conféré notamment par les cellules dendritiques folliculaires et l'aide fournie par les TFH (Mesin, Ersching, and Victora 2016). mTORC1 est requis pour assurer le programme anabolique qui précède la transition zone claire – zone sombre et la prolifération (Inoue and Kurosaki 2023). Toujours en réponse à l'infection *influenzae*, la rapamycine modifie le répertoire des anticorps switchés puisque le profil de réactivité vis-à-vis de séquences peptidiques d'hémagglutines est modifié (Keating et al. 2013). La délétion de *RAPTOR* dans les LB reproduit une partie du phénotype et réduit l'expression de *AICDA* (Keating et al. 2013). Lors de l'immunisation par NP-ovalbumine de souris ayant eu un transfert adoptif de LB avec activation constitutive de mTORC1 (*Rrag^{GTP/GTP}*), le séquençage du BCR des LB *Rrag^{GTP/GTP}* du CG triés en *single cell* montre que leur chaîne lourde est mutée, ce qui plaide pour des mécanismes de SHM préservés (Ersching et al. 2017). L'affinité de ces LB pour l'ovalbumine reste faible, ce qui indique qu'une activation exagérée de mTORC1 impacte bien le processus de sélection du CG. Ce défaut de sélection peut être transposé à nos patients. Ainsi, les LB mémoires switchés présentent des niveaux de SHM préservés. Le fait que, après SHM, des acides aminés chargés positivement, dont des résidus arginines, soient plus fréquemment retrouvés dans les LB switchés pourrait être expliqué par une sélection du CG déficiente impliquant un signal mTORC1 dérégulé.

L'activation du complexe mTORC1 dans les LB repose sur différents déterminants tels que les facteurs de croissance (dont IGF-1), les signaux PI3K, MAPK, ou le niveau intracellulaire de certains acides aminés (dont la leucine) (Laplace and Sabatini 2012). Un autre régulateur positif est le récepteur TACI. Dans les LB de la zone marginale humains, une stimulation par APRIL induit une signature mTORC1 et la phosphorylation de la protéine S6 (Sintes et al. 2017). MTOR lie TACI via MYD88 et transduit son signal pour favoriser les programmes métaboliques à l'origine de leur différenciation en PC commutés. Nous identifions une expression accrue de TACI à la surface des LB naïfs de nos patients, de même que des concentrations augmentées d'APRIL. Le lien de causalité avec l'activation mTORC1 n'est pas établi et, dans nos mains, la stimulation par APRIL ne paraît pas être suffisante pour générer une phosphorylation des protéines en aval de mTORC1 (données non montrées). Ce défaut de TACI interroge néanmoins sur son rôle dans la rupture de tolérance périphérique. L'influence de TACI sur la survie des LB naïfs semble moins prépondérante que BAFF-R. APRIL ou BAFF multimérique (60-mer) augmente pourtant la survie de tous les LB murins par un mécanisme TACI dépendant (Bossen et al. 2008). TACI, en particulier son isoforme courte chez l'humain, est connu pour favoriser la réponse T-indépendante et la différenciation en plasmablastes (Jackson and Davidson 2019; von Bülow et al. 2001). Cependant, TACI maintient l'expression de Blimp-1 et soutient la différenciation en PC à longue durée de vie, en particulier son isoforme courte chez l'homme (Tsuji et al. 2011; Garcia-Carmona et al. 2018). De façon concordante, la stimulation par APRIL de LB naïfs murins renforce la réponse à une stimulation en condition T dépendante, notamment la différenciation plasmablastique, en présence de CD40L et IL-4 (Castigli et al. 2007).

L'identification de ces différentes signatures apporte des éléments en faveur du rôle potentiellement bénéfique de thérapies ciblées dans le SAPL. Dans l'étude de G. Canaud *et al.* les patients greffés rénaux en contexte de néphropathie liée au SAPL présentaient une meilleure survie du greffon lorsqu'ils étaient traités par rapamycine, qui prévenait également la récurrence des lésions vasculaires comme la prolifération cellulaire et l'hyperplasie intinale (Canaud et al. 2014). Les auteurs précisent que le titre d'aPL n'était pas modifié significativement à 12 mois de traitement. Cependant, seuls dix patients ont été traités, dont quatre n'avaient qu'un LA (donc pour lesquels une variation de titre d'anticorps n'était pas évaluable) et deux seulement présentaient des anti- β 2GPI.

Plusieurs études ont montré la réduction des titres d'aPL dans les SAPL primaires et secondaires sous belimumab, inhibiteur de BAFF (Emmi et al. 2019; Bettiol et al. 2022; Chatzidionysiou et al. 2020). L'inhibition de TACI chez les mâles NZWxNXSB ne réduit pas le titre d'anticorps mais prévient les lésions rénales (Kahn et al. 2008).

L'IFN peut favoriser la survie des LB spécifiques d'aPL au stade transitionnel/mature, modifier la réponse de ces LB à la signalisation TLR/MYD88, mais aussi limiter leur anergie et ainsi leur permettre d'entrer dans le CG (Ferri et al. 2023). Comme chez nos patients, une telle signature a été retrouvée sur une analyse transcriptomique sur PBMC de patients avec SAPL triple positif. Ainsi, l'étude par *bulk RNA-sequencing* menée chez 62 patients avec SAPL primaire (dont 30 triple positifs) indique que les gènes de réponse à l'IFN sont surexprimés chez les patients avec triple positivité par rapport à des sujets sains, mais aussi aux patients SAPL avec simple ou double positivité (Verrou et al. 2023). Les mêmes résultats ont été retrouvés lors d'une analyse par RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) de six gènes de réponse à l'IFN chez 55 patients avec SAPL primaire (Palli, Kravvariti, and Tektonidou 2019). Dans les modèles murins lupiques, L'IFN α a été identifié comme un des facteurs pouvant favoriser la résistance aux thérapies ciblant BAFF ou APRIL (Z. Liu et al. 2011; Jackson and Davidson 2019). Ces résultats peuvent expliquer pourquoi le belimumab et l'hydroxychloroquine, qui module la sécrétion d'IFN de type I, semblent agir de façon synergique dans le SAPL (J. Banchereau and Pascual 2006; Gies et al. 2020; Bettiol et al. 2022).

Pour résumer, nos résultats permettent de proposer un modèle de la physiopathologie B dans le SAPL primaire (**Figure 17**). Selon ce modèle, les LB spécifiques des PL chez les patients proviendraient d'un pool de cellules B naturellement polyréactives. Ces cellules B, au répertoire BCR restreint, parviendraient à échapper aux mécanismes de tolérance périphérique au stade naïf, soutenues par l'engagement de TACI et d'IFN. Suite à l'exposition à des stimuli antigéniques encore mal identifiés, ces LB seraient autorisés à entrer dans le CG. Leur maturation d'affinité y serait alors inappropriée, avec un défaut de sélection expliqué par une dérégulation des voies mTORC1 et C-Myc, et une réponse accrue à la co-stimulation T, aboutissant à une différenciation en PC à longue durée de vie sécréteurs d'aPL de forte affinité. Au vu des connaissances actuelles, ces aPL pourraient exprimer leur potentiel thrombogène en contexte de terrain génétique prédisposant (thrombophilie, anomalie du complément...) ou lors d'évènements surajoutés tels qu'une activation des acteurs du système immunitaire inné (neutrophiles, monocytes).

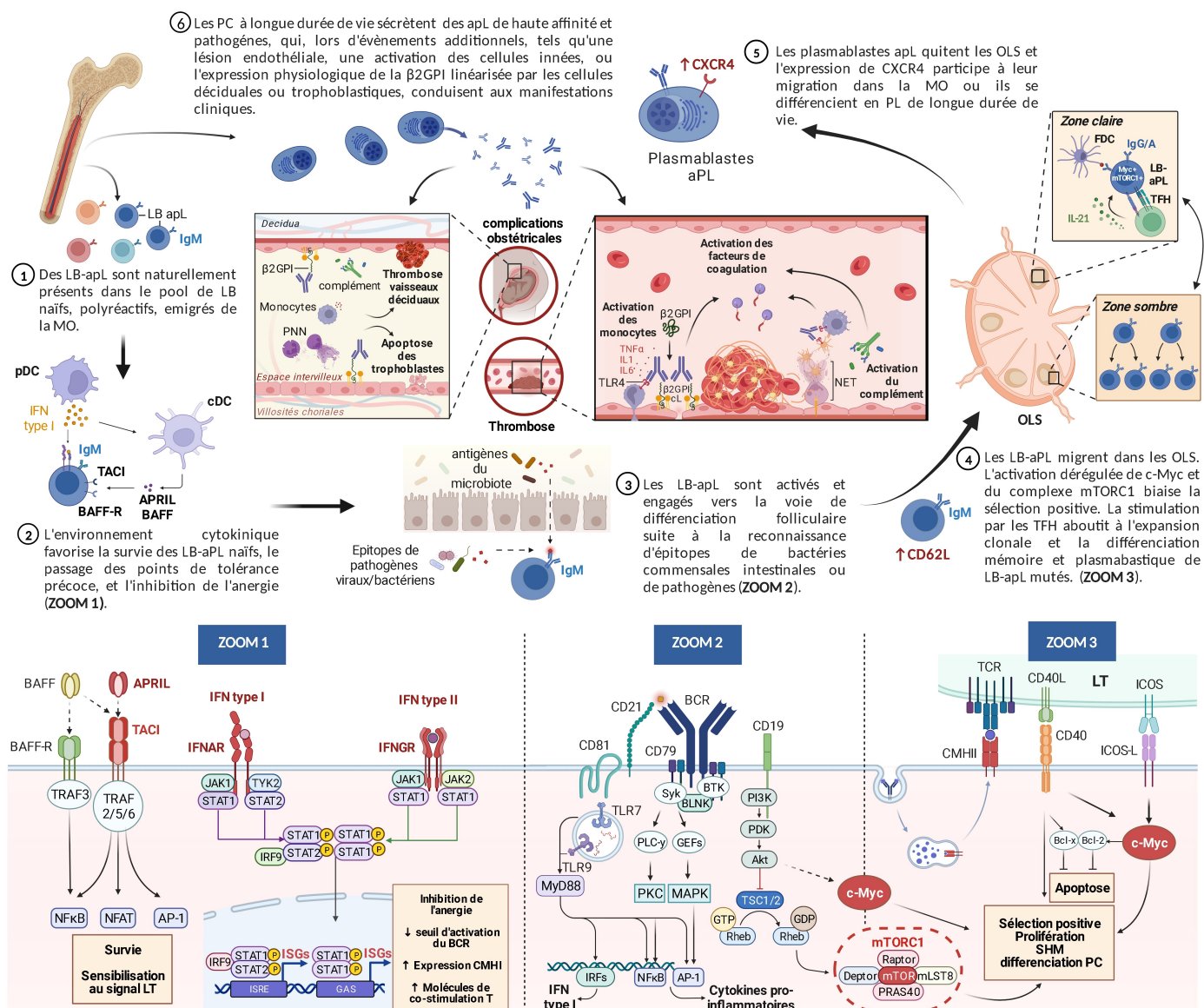


Figure 17 : Physiopathologie des LB dans le SAPL primaire : des LB naïfs naturels aux aPL pathogènes.

La section supérieure représente la différenciation et la maturation d'affinité des LB spécifique des PL. La partie inférieure explicite les voies de signalisation du LB cruciales pour cette différenciation. Les ligands, récepteurs, facteurs de transcription identifiés comme étant surexprimés ou sur-activés dans notre étude sont représentés en rouge. aPL, antiphospholipides ; cDC, cellule dendritique conventionnelle, CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; fDC, cellule dendritique folliculaire ; GAS, *gamma interferon activation site* ; GEFs, *guanine nucleotide exchange factors* ; IFNAR, récepteur à l'interféron α ; IFNGR, récepteur à l'interféron γ ; IFN, interféron ; ISG, *interferon stimulated genes* ; ISRE, *interferon-stimulated responding element* ; IRF, interféron regulating factor ; MO, moelle osseuse, NET, *neutrophile extra-cellular trap* ; PL, phospholipide ; pDC, cellule dendritique plasmacytoïde ; PC, plasmocyte ; PNN, polynucléaire neutrophile, STAT, signal transducer and activator of transcription, TFH, lymphocyte T helper folliculaire ; TSC, Tuberous sclerosis-1. *Fait avec Biorender.*

Notre travail présente plusieurs limites. En premier lieu, l'effectif des patients est restreint, notamment en ce qui concerne l'analyse en *CITE-Seq* qui n'a concerné que 5 patients. Le caractère homogène de notre groupe et le caractère rare du SAPL triple positive fait nuancer cette réserve. Bien qu'elle ait permis de tester un grand nombre de clones, l'utilisation de lignées lymphoblastiques ne représente pas forcément la diversité des LB primaires des patients. La condition de culture en cellule unique a permis de s'affranchir du risque de sélectionner des réarrangements spécifiques, comme cela a pu être montré dans des cultures en « *bulk* ». Cette condition nous a également assuré de conserver le phénotype d'origine de la cellule, puisqu'il a été démontré que l'immortalisation EBV n'induisait pas de commutation de classe en l'absence de stimulation T-dépendante (Heath et al. 2012). L'infection EBV est connue, en revanche, pour induire des mutations dans les régions variables d'Ig à partir de J30 environ (Kalchschmidt et al. 2016). Pour limiter ce biais, chaque patient a été utilisé comme son contrôle interne, avec une durée de culture équivalente des clones pour chaque patient, et ne dépassant pas 3 à 4 semaines. Concernant l'analyse B multimodale, le nombre de cellules relativement réduit analysées pour chaque patient n'a pas permis d'effectuer de lignage clonal détaillé, ni de détecter des CDR3 spécifiques que nous aurions pu identifier dans les clones aPL. L'absence d'ASC parmi les cellules étudiées, lié à la congélation des cellules, a restreint les résultats obtenus sur le compartiment post antigénique. De plus, seules les populations B sanguines ont pu être étudiées. Dans l'optique d'une description plus détaillée des mécanismes défailants dans le CG, l'étude des LB des OLS serait précieuse. Le clonage de PC médullaires pour deux patients nous a néanmoins permis d'identifier les réarrangements préférentiels de ces cellules et d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes de tolérance périphériques tardifs. Enfin, la principale limite réside dans le fait que les BCR des LB spécifiques des aPL n'ont pas été testés pour leur affinité et leur pathogénicité *in vitro*. L'analyse des aPL de forte affinité, notamment pour le domaine I de la β 2GPI, dont on connaît l'importance dans la survenue de manifestations cliniques, permettrait de mieux préciser quels étaient les réarrangements et les SHM déterminants dans la pathogénicité des aPL, et de mieux appréhender le destin cellulaire des LB à leur origine.

En tenant compte de ces limites, notre étude reste la première à explorer de façon détaillée les anomalies lymphocytaires B et le phénotype des LB spécifiques des aPL dans le SAPL

primaire triple positif par l'intermédiaire de techniques novatrices. Il souligne que l'échappement à la tolérance des LB est un processus multifactoriel, au moins partiellement distinct de celui du LES, et conforte les pistes récentes quant à l'utilisation des thérapies ciblées dans le SAPL primaire.

ANNEXES

ANNEXE I

PAPIER

Dieudonné Y. Gies V., Guffroy A., Keime C., Bird A.K., Liesveld J., Barnas J.L., Poindron V., Douiri N., Soulas-Sprauel P., Martin T., Meffre E., Anolik J.H., Korganow A.S.

Transitional B cells in quiescent SLE: An early checkpoint imprinted by IFN

Journal of Autoimmunity. 2019;102:150-158.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

Transitional B cells in quiescent SLE: An early checkpoint imprinted by IFN

Yannick Dieudonné^{a,b,1}, Vincent Gies^{c,d,1}, Aurélien Guffroy^{a,b,e}, Céline Keime^f, Anna K. Bird^g, Jane Liesveld^h, Jennifer L. Barnas^g, Vincent Poindron^{a,b}, Nawal Douiriⁱ, Pauline Soulas-Sprauel^{a,b,j}, Thierry Martin^{a,b,e}, Eric Meffre^k, Jennifer H. Anolik^g, Anne-Sophie Korganow^{a,b,e,*}

^a CNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry”/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France

^b Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Laboratoire d'Immunorhéumatologie Moléculaire, INSERM UMR - S1109, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^d Service d'Immunologie Biologique, Pôle de Biologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^e UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^f IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), INSERM, U1258, CNRS, UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^g Department of Medicine, Division of Allergy, Immunology and Rheumatology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, 14642, USA

^h Blood and Marrow Stem Cell Transplant Program, Department of Internal Medicine and The James P. Wilmut Cancer Center, University of Rochester, New York 14642, USA

ⁱ Department of Infectious Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^j UFR Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Grattenstaden, France

^k Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Systemic lupus erythematosus

Transitional B cells

Interferon

CD19

TLR9

ABSTRACT

Systemic lupus (SLE) is characterized by a break of B cell tolerance that plays a central role in disease pathophysiology. An early checkpoint defect occurs at the transitional stage leading to the survival of autoreactive B cells and consequently the production of pathogenic autoantibodies. The main purpose of our work was to determine whether transitional B cells, as the most immature naïve B cell subset upstream of pathogenic B cells, display specific features compared to healthy non SLE subjects. Through extensive analysis of transitional B cells from untreated or low treated, mostly Caucasian, SLE patients, we demonstrated that transitional (T1 and T2) B cell frequencies were increased in SLE and positively correlated with disease activity. SLE transitional B cells displayed defects in two closely inter-related molecules (i.e. TLR9 defective responses and CD19 down-regulation). RNA sequencing of sorted transitional B cells from untreated patients revealed a predominant overexpression of interferon stimulated genes (ISGs) even out of flares. In addition, early transitional B cells from the bone marrow displayed the highest interferon score, reflecting a B cell interferon burden of central origin. Hence, the IFN signature in transitional B cells is not confined to African American SLE patients and exists in quiescent disease since the medullary stage. These results suggest that in SLE these 3 factors (i.e. IFN imprintment, CD19 downregulation and TLR9 responses impairment) could take part at the early transitional B cell stage in B cell tolerance by-pass, ultimately leading in periphery to the expansion of autoantibodies-secreting cells.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe autoimmune disease characterized by flares and mostly affecting young women. Patients

produce pathogenic autoantibodies, specifically against double-stranded DNA (dsDNA) but also against ribonucleoproteins (SSA/Ro52, Sm) and phospholipids. The etiology of SLE is still not well understood but B cells and their autoantibodies play an essential role in disease

* Corresponding author. CNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry”, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg Cedex, France.

E-mail address: korganow@unistra.fr (A.-S. Korganow).

¹ Y.D. and V.G. contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.002>

Received 20 March 2019; Received in revised form 3 May 2019; Accepted 4 May 2019

Available online 10 May 2019

0896-8411/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

pathophysiology [1,2]. There is currently a debate on SLE B cell fate and on the origin of ANA⁺ IgG⁺ cells [3]. Sequencing studies in young SLE patients and in the NZB/W lupus prone mice recorded greater percentages of ANA⁺ cells in naïve or new emigrant/transitional B cells, and an early breakdown of B tolerance [4,5]. Other studies argue for a late loss of control, as demonstrated by the expansion of IgG⁺ plasma cells in some patients with SLE and in the MRL/lpr model [5].

Strong data support the “early or naïve B cell model” in SLE. Autoreactive B cells including anti-nuclear and *anti*-dsDNA B cells are known to be controlled at the bone marrow (BM) level mainly by deletion or editing [6–8]. There is in patients affected with SLE an increased frequency of ANA⁺ and *anti*-dsDNA⁺ in naïve B cells compared to immature B cells suggesting defective selection at the transitional stage [4]. SLE mature naïve B cells display a specific decrease in the expression of CD19, which is necessary for efficient B cell signaling [9], and an altered *in vitro* toll like receptor 9 (TLR9) responses [10]. The latter observations are in agreement with disease worsening in TLR9 deficient lupus-prone murine models, and with TLR9 preventing the survival of autoreactive naïve B cells when co-engaged with B cell receptor (BCR) via nucleic acid-autoantibodies complexes [11].

Nucleic acid-containing immune complexes also activate myeloid and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) leading to the secretion of type I and II interferons (IFN), key cytokines associated with SLE pathogenesis [12,13]. Mei Liu et al. showed that plasma from Chinese patients enhance transitional B cell survival in a type I IFN dependent manner [14]. In addition, increased levels of IFN- β were particularly detected in transitional B cells from African American SLE patients with nephritis and high levels of anti-ribonucleoproteins autoantibodies [15]. Hence, transitional B cells could be early key actors in SLE pathogenesis.

Considering these critical issues and the fact that transitional B cells are often increased in the blood of SLE patients independently of their ethnicity [10,16,17], we explored in depth transitional B cells from untreated or low treated, mostly Caucasian, SLE patients in quiescent or active phase of their disease. The main purpose of our work was to determine whether transitional B cells, as a potential checkpoint of tolerance and as the most immature naïve B cell subset upstream of pathogenic B cells, display specific features compared to healthy non SLE subjects. The question at hand is very important considering the needs in SLE for targeted or personalized therapy.

We confirm herein the increased frequency of transitional B cells in SLE, and more specifically of T1 and T2 subsets. This increase does not result from a proliferation or apoptosis defect but likely output from the BM. SLE transitional B cells display an abnormal phenotype with a CD19 reduced expression and an impaired response to TLR9 stimuli. In addition, a strong IFN signature, of central origin, is present at this stage, even in quiescent patients. We suggest that these 3 factors (i.e. IFN imprintment, CD19 downregulation and TLR9 response impairment) could take part at the early transitional B cell stage in B cell tolerance by-pass.

2. Materials and methods

2.1. Study approval

The study was conducted in accordance with the principles of Helsinki declaration. Informed consents were obtained from all patients and healthy donors (HDs). The study was approved by the Clinical Research Ethic Committee of Strasbourg's University Hospital and the Human Subjects Institutional Review Board of the University of Rochester Medical Center (URMC).

2.2. Patients and samples

For blood samples, 23 patients (21 females and 2 males; 17 quiescent and 6 active patients) aged from 29 to 68 years with the diagnosis

of systemic lupus erythematosus (SLE) were selected. The main characteristics of SLE patients are listed in [Supplementary Table 1](#). All patients fulfilled the ACR SLE classification criteria [18]. Disease activity was measured by the modified Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI-2K) [19]. A SLEDAI-2K below 5 defines the quiescent patients associated with no activity in major organ systems, no vasculitis, no fever, no haemolytic anaemia, no new features of lupus activity or increase in treatment [20]. Only patients with no treatment (i.e. no immunosuppressive drugs, steroids and hydroxychloroquine within the last 6 months), or treated with low-dose steroids (< 10 mg per day) with or without hydroxychloroquine were included. Patients treated with immunosuppressive drugs within the previous 6 months were systematically excluded. For transcriptomic analysis, only untreated patients were included, as hydroxychloroquine and corticosteroid therapy modify the lymphocyte transcriptomic profile [13]. Routine measurements were performed to determine ANAs (indirect immunofluorescence with Hep-2 cells, Zeus Scientific, USA) and *anti*-dsDNA titers (screened by ELISA; Kallestad *anti*-DNA microplate EIA; BioRad, Hercules, CA, USA). ANAs were considered positive when > 1/160. SSA/Ro60, SSB/La, and Sm antibodies identification was performed using enzyme immunoassays (EuroImmun, Lubeck, Germany) according to manufacturer's specifications. Anticoagulated venous blood was drawn from SLE patients and from ethnicity, age and sex matched HDs and was subjected to density gradient centrifugation to get peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and remove dead cells.

For bone marrow (BM) samples, 4 patients (4 females, all quiescent) aged from 24 to 55 years with the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) were selected. The main characteristics of SLE patients are listed in [Supplementary Table 1](#). Research BM aspirates from SLE patients and HDs were obtained (i) at URMC by aspiration from the iliac crest (n = 3) and (ii) at Strasbourg University Hospital by aspiration from the sternum (n = 1). Paired peripheral blood samples were obtained for 3 SLE patients and 3 HDs (2 at URMC and 1 in Strasbourg). BM aspirate were subjected to density gradient centrifugation to get BM mononuclear cells and remove dead cells.

2.3. Flow cytometry

Cell viability was assessed by incubation of cells with Fixable Viability Dye eFluor[®] 780 (eBioscience, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Samples were incubated with antibodies for 15 min at 4 °C. Intracellular staining was performed, for Ki-67 using True Nuclear[™] Transcription Factor Fix (BioLegend, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The cells were washed twice in PBE (PBS, 0.5% Bovine Serum Albumin, 2 mM EDTA) and analyzed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). For the analysis of protein expression, level of the geometric mean fluorescence intensity (MFI) was used. Fluorescence Minus One (FMO) controls were performed. Data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter) with “logicle” compensation [21]. MFI ratio is determined as follow: [MFI of the considered marker]/[mean of the MFI of the considered marker in HD group]. The following monoclonal anti-human antibodies were used: CD10 (HI10a), CD19 (J3-119) and CD27 (B12701) from Beckman Coulter, Ki67 (c35/ki-67), CD3 (UCHT1), CD19 (HIB19), CD21 (B-ly4), CD24 (ML5), CD27 (M-T271), CD38 (HIT2), CD69 (H1.2F3), CD86 (2331/FUN-1), IgD (HI10a) and IgM (G20-127) from BD Biosciences.

2.4. Apoptosis assay

B cells were purified with magnetic separation with EasySep[™] Human B Cell Isolation Kit (StemCell[™] Technologies, Vancouver, Canada). The resultant post-sort purity was > 95%. Sorted B cells were plated at 100 000 cells/well in a 96 well-plate in RPMI 2% FBS for 8 h, with DMSO 5%, positive control) or left untreated. Classical surface staining, to identify transitional B cells, and annexin V labeling (BD

Bioscience), following the manufacturer's recommendations, were performed. Cells were resuspended in a PBS solution containing DAPI and analyzed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

2.5. B-cell stimulation

B cells from SLE patients without hydroxychloroquine treatment were purified with magnetic separation with EasySep™ Human B Cell Isolation Kit (StemCell™ Technologies). The resultant post-sort purity was > 95%. Sorted B cells were plated at 100 000 cells/well in a 96 well-plate in RPMI 10% FBS and gentamycin 10 µg/ml with 2 µg/ml class B CpG (TLR9 agonist, ODN 2006, InvivoGen, San Diego, CA, USA), 1 µg/ml Gardiquimod (TLR7 agonists, InvivoGen) or 1 µg/ml CD40 ligand (R&D System®, Minneapolis, MN, USA). Expression of surface activation markers was analyzed after 48 h with Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

2.6. Quantitative real-time RT-PCR analysis

For blood samples, B cells were purified, from PBMC of HDs and of SLE patients, with magnetic separation with EasySep™ Human B Cell Isolation Kit (StemCell™ Technologies). Then, transitional B cells (CD19⁺CD27⁻IgM⁺IgD⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺) and mature naïve (CD19⁺CD27⁻IgM⁺IgD⁺CD24⁺CD38⁺) populations were sorted (FACSARIA II, BD Biosciences). For BM samples, pre/proB (CD19⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺IgM⁻IgD⁻), immature (CD19⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺IgM⁺IgD⁻) and early transitional (CD19⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺IgM⁺IgD⁺) populations were sorted. Cell viability was assessed with DAPI (Sigma-Aldrich) and the resultant post-sort purity was > 95%. RNA was isolated using RNeasy Microkit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol, including a DNase digestion. Reverse transcription was performed on a T100™ Thermal cycler (BioRad) using High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's protocol. 5 ng of cDNA were PCR-preamplified for 14 cycles using TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR reactions were performed on a StepOnePlus realtime thermal cycler (Applied Biosystems) using the TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. Assays were plated in triplicate. Relative expression levels were calculated with the comparative Ct method using the mean of the Ct between *GAPDH* and *HPRT1* housekeeping gene for normalization. As defined by Rice et al. [22], the median fold change of the 6 interferon-stimulated genes *IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*, *RSAD2*, *SIGLEC1* were used to create an interferon score for each individual. The following list of TaqMan® probes (Applied Biosystems) was used: *GAPDH* (Hs99999905_m1), *HERC5* (Hs00180943_m1), *HERC6* (Hs00215555_m1), *HPRT1* (Hs01003267_m1), *IFI27* (Hs01086370_m1), *IFI44L* (Hs00199115_m1), *IFIT1* (Hs01675197_m1), *ISG15* (Hs00192713_m1), *RSAD2* (Hs01057264_m1) and *SIGLEC1* (Hs00988063_m1).

2.7. Whole transcriptome sequencing (RNA-seq)

B cells were purified, from PBMC of quiescent (n = 3) and active (n = 3) SLE patients and from PBMC of healthy donors (n = 6), with magnetic separation with EasySep™ Human B Cell Isolation Kit (StemCell™ Technologies). Then, transitional B cells (CD3⁻CD19⁺CD27⁻IgM⁺IgD⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺) populations were sorted (FACSARIA II, BD Biosciences). Cell viability was assessed with DAPI (Sigma-Aldrich) and the resultant post-sort purity was > 95%. RNA was isolated using RNeasy Microkit (Qiagen) following the manufacturer's protocol, including a DNase digest. Sample quality was assessed using Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto,

CA, USA). RNA-seq libraries preparation and sequencing were performed in the GenomEast platform (Strasbourg, France). Full length cDNA was generated from 1 ng of total RNA using Clontech SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France) according to manufacturer's instructions, with 12 cycles of PCR for cDNA amplification by Seq-Amp polymerase. 600 pg of pre-amplified cDNA were then used as input for Tn5 transposon tagmentation using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) followed by 12 cycles of library amplification. Following purification with Agencourt AMPure XP beads (Beckman-Coulter), the size and concentration of libraries were assessed by capillary electrophoresis. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 4000 with 50 bp single-end reads. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapters and low-quality sequences (Phred score < 20) were removed using cutadapt v1.10. After this preprocessing, reads shorter than 40 bases and reads mapping to rRNA sequences were discarded for further analysis. Reads were mapped onto the hg38 assembly of the human genome using STAR v2.5.3a [23]. Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1p1 [24] and gene annotations from Ensembl release 91. Gene expression comparisons between quiescent SLE patients and HDs, active SLE patients and HDs and active versus quiescent SLE patients were performed using the method proposed by Love et al. [25] implemented in the DESeq2 Bioconductor library (v1.16.1). Adjustment for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg method [26]. Results were interpreted using Ingenuity Pathway Analysis 2.3 (Qiagen) and the second generation of the modular transcriptional framework developed by Chaussabel and Baldwin [27]. Considering transcripts with a sum of normalized read count across all samples > 150, a 2-fold change cut-off with an adjusted p-value < 0.01 was set to identify differentially expressed genes. Variant calling was performed according to The GATK Best Practices workflow for variant calling on RNA-seq data [28]. Duplicate reads were marked using MarkDuplicates from Picard version 1.122. Further analyses were performed using GATK version 3.4–46: reads were split into exon segments and sequences overhanging intronic regions were hard-clipped using SplitNCigarReads, variant calling was then performed using HaplotypeCaller. Resulting variants were filtered according to GATK recommendations for RNA-seq data: clusters of at least 3 SNPs within a window of 35 bases were filtered and filtering based on Fisher Strand values (> 30) and Quality by Depth (< 2) values were also performed. Variants were annotated using GATK, SnpSift [29] and SnpEff [30]. ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) was used to assess if variants involved in monogenic forms of SLE, primary immunodeficiencies with SLE-like features or interferonopathies were found (clinical significance value: “pathogenic” or “risk factor”, 28 genes checked).

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 7 (GraphPad software Inc, San Diego, CA, USA). Statistical significances were calculated with two-tailed unpaired Mann-Whitney U test or two-tailed Spearman rank correlation test. All values are mean ± SEM. P values lower than 0.05 were considered statistically significant, or lower than 0.01 for RNA-seq.

3. Results

3.1. Transitional B cell expansion in peripheral blood in SLE

Transitional B cells represent a central developmental stage for B cells, reflecting ontogenesis in the BM before peripheral differentiation and selection into long-lived mature B cells. The classification of human

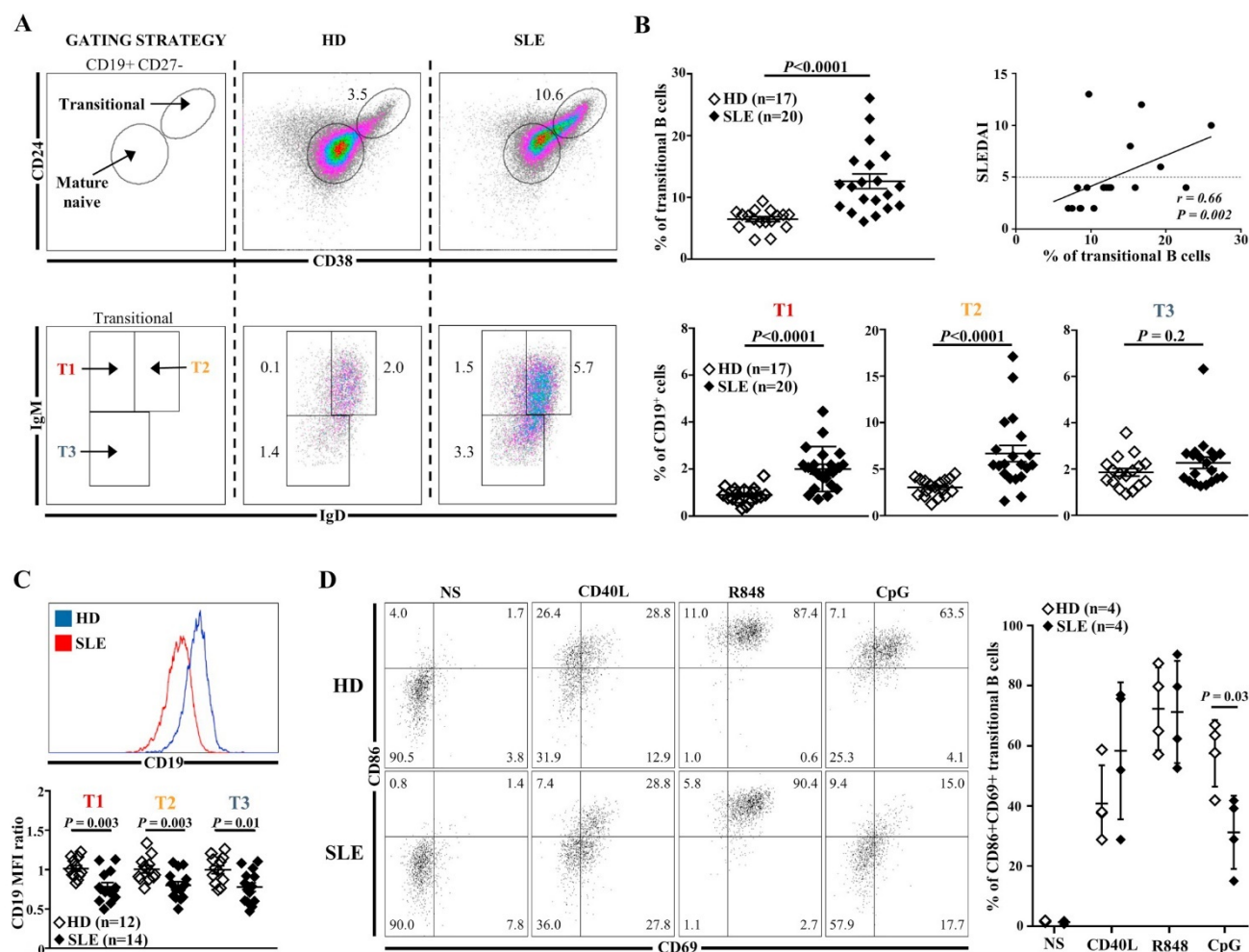


Fig. 1. (A) Representative dot plots of transitional B cells and their subsets in one HD and one SLE patient. (B) Frequency of transitional B cells (top left panel) and their subsets (bottom panel) (% of CD19⁺) in HDs compared to SLE patients. Correlation between transitional B cells (% of CD19⁺) and disease activity assessed by the SLEDAI-2K score (top right panel). (C) MFI of CD19 in transitional B cells subsets from HDs and SLE patients. (D) Frequency of CD86⁺CD69⁺ transitional B cells from HDs or SLE patients after no stimulation (NS) or *in vitro* stimulation with CD40L (CD40 ligand), R848 (TLR7 agonist) or CpG (TLR9 agonist) for 2 days. HDs: healthy donors; MFI: mean of fluorescence intensity; SLE: Systemic lupus erythematosus.

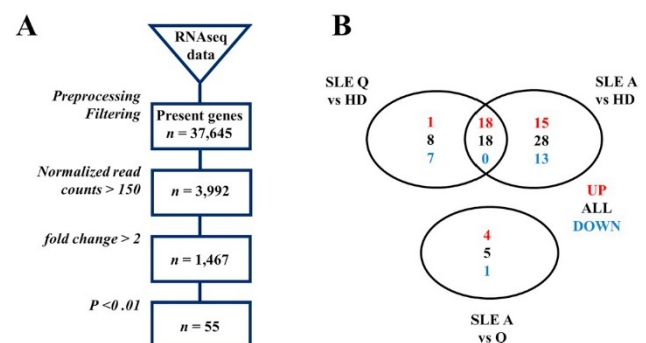


Fig. 2. (A) Flow chart of RNA Sequencing analysis. (B) Venn Diagram representing genes significantly up (in red) or down-regulated (in blue) between quiescent SLE patients, active SLE patients and HDs. A: active; HDs: healthy donors; Q: quiescent; SLE: systemic lupus erythematosus. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

transitional B cells into immature T1, intermediate T2 and T3 subsets is based on the expression of CD24, CD38, IgM, IgD markers in the CD19⁺CD27⁻ lymphocyte gate, as described by Simons et al. and others (Fig. 1A) [17,31,32]. Immature T1 is the predominant subset in the BM while T2 is predominant in the peripheral blood [32]. We carried out detailed phenotypic analysis of these populations in the blood of 20 low treated or untreated SLE patients. All except one patient were Caucasian and their main clinical characteristics are presented in [Supplementary Table 1](#). Most patients were female with at least 4 ACR criteria (see methods) but with different clinical and biological presentations of SLE. All patients were positive for *anti*-dsDNA antibodies. The frequency of transitional B cells (CD19⁺CD27⁻CD24⁺⁺CD38⁺⁺) was significantly higher in SLE patients than in healthy donors (HDs) ($12.6\% \pm 1.2$ versus $6.5\% \pm 0.3$, $p < 0.0001$) and correlated with the SLEDAI-2K score ($r = 0.66$, $p < 0.01$) (Fig. 1A and B). Transitional B cell increase in SLE patients was mostly the consequence of T1 and T2 subsets expansion ($2.0 \pm 0.9\%$ vs $0.9\% \pm 0.3$ and $6.7\% \pm 3.9$ vs $3.0\% \pm 0.9$, respectively; $p < 0.0001$) (Fig. 1B and [Supplementary](#)

Fig. 1). Results were comparable considering either quiescent or active patients (Supplementary Fig. 2).

3.2. Defect in transitional B cell responses to TLR9

Based on our previous recent results [10], we hypothesized that transitional B cells present a lower expression of CD19, concomitantly with an impaired TLR9 response that could influence their selection. As shown in Fig. 1C, SLE transitional T1, T2 and T3 B cells displayed a decrease in CD19 expression. This downregulation was present in transitional B cells from quiescent and active SLE patients (Supplementary Fig. 3). In addition, we further tested TLR9 responses in rare non-treated SLE patients to circumvent hydroxychloroquine interference [10]. We confirmed that the induction of CD86 and CD69 activation markers on transitional B cells was defective after TLR9 activation when compared to HDs ($31.9\% \pm 5.5$ vs $57.3\% \pm 6.1$; $p < 0.05$), while their responses after TLR7/TLR8 and CD40

stimulation were similar to HD counterparts (Fig. 1D).

3.3. IFN signature in SLE PB transitional B cells

These data prompted us to explore if SLE transitional B cells could harbor a specific transcriptomic signature, to explain their increased number, their phenotype, and more generally a breakdown of tolerance at this stage. We performed RNA-sequencing analysis on sorted transitional B cells ($CD19^+CD27^-CD24^{++}CD38^{++}$) from 12 individuals including 3 SLE quiescent patients (mean SLEDAI-2K 3.3), 3 active patients (mean SLEDAI-2K 10) and 6 HDs (see Supplementary Table 1 for the main characteristics of these SLE patients). For transcriptomic analysis, only untreated patients (for the last six months) were included, as even hydroxychloroquine or corticosteroids can modify the lymphocyte transcriptomic profile [13]. All SLE patients selected for this analysis displayed a high percentage of transitional B cells and lower CD19 levels on these cells than HDs. Genes with a minimum of 2-

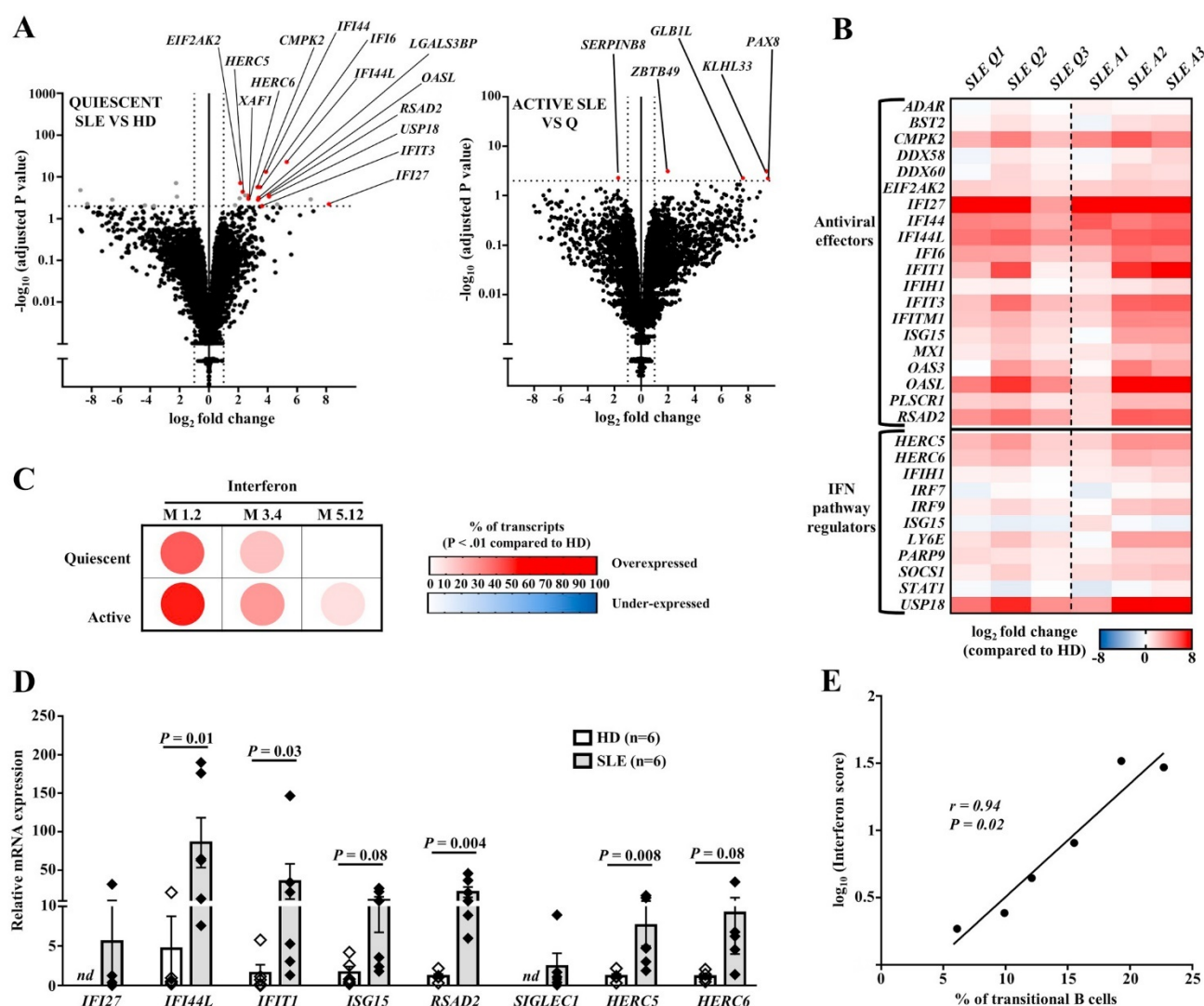


Fig. 3. (A) Volcano plot representation of RNA-Seq data comparing transitional B cells from HDs ($n = 6$) versus untreated quiescent SLE patients ($n = 3$) (left panel) and transitional B cells from untreated quiescent versus active patients ($n = 3$) (right panel). (B) Hierarchical representation of interferon stimulated genes (ISGs) expression in transitional B cells from each patient compared to HDs. (C) Modular analysis of RNA-Seq data representing the % of transcripts over/under-expressed ($P < 0.01$) in untreated SLE patients (quiescent, $n = 3$; active, $n = 3$) compared to HDs ($n = 6$). (D) qRT-PCR of ISGs in sorted transitional B cells of quiescent SLE patients compared to HDs. (E) Correlation between transitional B cells (% of $CD19^+$ cells) and the interferon score. HDs: healthy donors; ND: not detected; SLE: Systemic lupus erythematosus.

fold change and an adjusted p-value < 0.01 were considered as differentially expressed genes (see Materials and Methods section). Comparisons were performed between quiescent SLE patients versus HDs (19 upregulated genes, 7 downregulated genes), active SLE patients versus HDs (33 upregulated genes, 13 downregulated genes), and in active versus quiescent SLE patients (4 upregulated genes, 1 downregulated gene) (Fig. 2 and Supplementary Tables 2–4). No difference was detected between SLE and HD transitional B cells considering the expression of genes involved in TLR7 or TLR9 signaling, of *CD19*, *CD21* and *PAX5* (which encodes a regulator of CD19), or of genes encoding molecules involved in BCR signaling cascade, namely *PI3K*, *BTk*, or *AKT*. These results were consistent with previous q-RT PCR analysis of sorted naive SLE B cells [10]. This approach identified interferon stimulated genes (ISGs) as the most overexpressed genes in SLE patients compared to controls, i.e. 14 and 25 ISGs in sorted transitional B cells from quiescent and active SLE patients compared to HDs, respectively (Fig. 3A and B). Results were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis, and the modular transcriptional repertoire developed by Chaussabel et al. [27], which describes 260 modules of genes sets in blood in various immunological conditions. The three IFN-related modules (M 1.2, M 3.4, and M 5.12) driven by type I IFN but also type II IFN (for M 3.4 and M 5.12), appeared up-regulated in SLE transitional B cells (Fig. 3C). IFN signature was already present in quiescent patients and higher in active patients. The analysis of RNA sequences did not highlight deleterious mutations in genes (SNPs and indels called as described in Materials and Methods section) related to monogenic interferonopathies or to IFN pathway (32 genes, including *TREX1*, *TMEM173*, *RIG-1*, *CECR1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*) [22,33]. Genes coding for IFN were not over-expressed, neither genes coding for IFN receptors compared to controls. We did not detect significant transcriptomic signatures for other cytokines.

IFN signature in whole PBMCs from SLE patients has been previously associated to disease activity [12,13]. To confirm that IFN signature was reproducible in the transitional B cells of quiescent SLE patients (i.e. out of flares), we tested on sorted cells from additional quiescent SLE patients (n = 6, mean SLEDAI-2K 3.3; see Supplementary Table 1 for the main characteristics of these SLE patients) the relative

expression of eight ISGs, some of which (namely *IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*, *RSAD2*, *SIGLEC1*) were previously used to determine an interferon score in inflammatory diseases [20]. *HERC5* and *HERC6* genes were added as they encode positive regulators of IFN pathways [34] and were found over-expressed in our RNA-Seq analysis. Transcripts coding for all these genes were very significantly amplified by RT-qPCR in sorted transitional B cells from quiescent SLE patients compared to HDs (Fig. 3D). Of note, the IFN-score correlated with the frequency of transitional B cells ($r = 0.94$, $p < 0.01$) (Fig. 3E).

3.4. IFN signature in BM B cells

The IFN signature in transitional B cells from SLE patients could be the consequence of higher levels of IFN in the peripheral blood or affecting the early transitional stage in the BM [35]. To assess this point, and despite the rarity of the samples, the IFN score of sorted BM B cells was compared to sorted peripheral B cells subsets in the same SLE patients (Fig. 4A). BM early transitional B cells displayed the highest IFN score, followed by a progressive decrease in the peripheral subsets, revealing a B cell IFN burden of central origin (Fig. 4B and C).

3.5. Activation and proliferation status

Finally, RNA-sequencing analysis of peripheral transitional B cells showed an over-expression of genes related to the regulation of cell-cycle and coding for pro- or anti-apoptotic proteins (Supplementary Tables 2–4). *Per se* transitional B cell activation could not explain such gene regulation as the frequency of CD86⁺ B cells and the intensity of HLA-DR expression in SLE patients were comparable to that of HDs (Supplementary Fig. 4). We tested the hypothesis that SLE transitional B cells proliferate more or die less than HDs transitional B cells. However, flow cytometric analysis did not highlight any difference in proliferation (Fig. 5A) or early apoptosis in freshly isolated transitional SLE B cells (Fig. 5B), arguing for an accelerate differentiation from immature B cells to transitional stage in SLE patients.

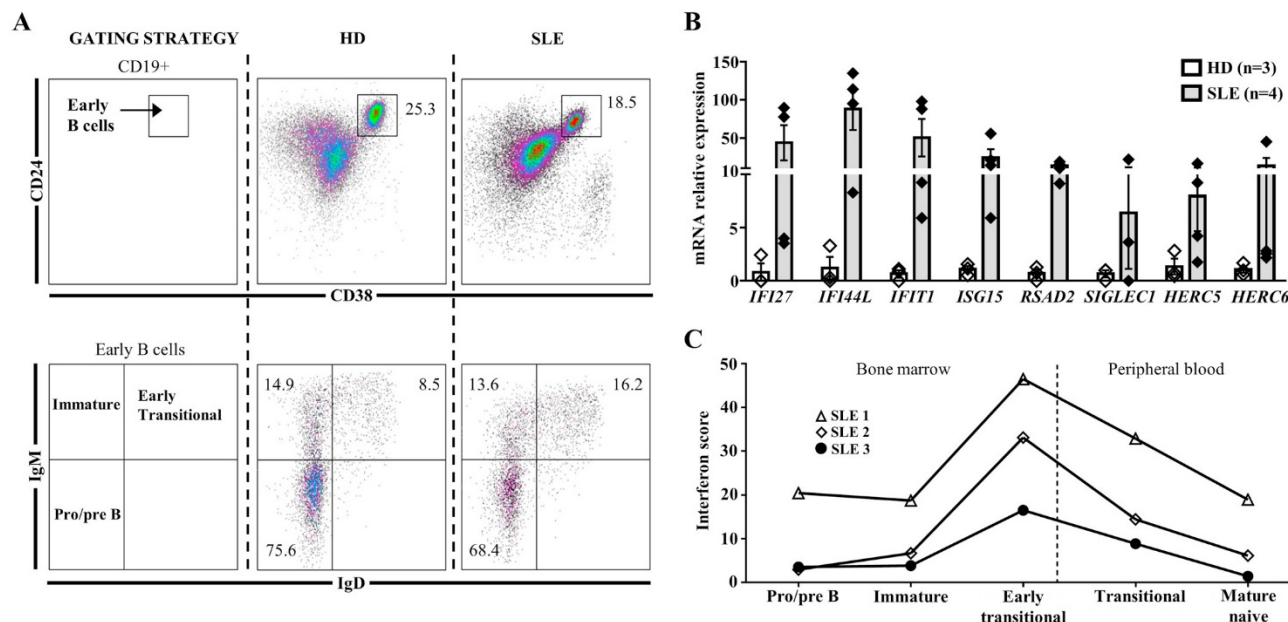


Fig. 4. (A) Gating strategy for BM analysis of pre/proB (CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁻IgD⁻), immature (CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺IgD⁻) and early transitional B cells (CD19⁺CD24⁺CD38⁺IgM⁺IgD⁺). (B) qRT-PCR of eight interferon stimulated genes in sorted early transitional B cells from BM of SLE patients compared to control. (C) Representation of the interferon score in BM and peripheral B cell subpopulations in three SLE patients. BM: Bone marrow; ND: not detected; SLE: Systemic lupus erythematosus.

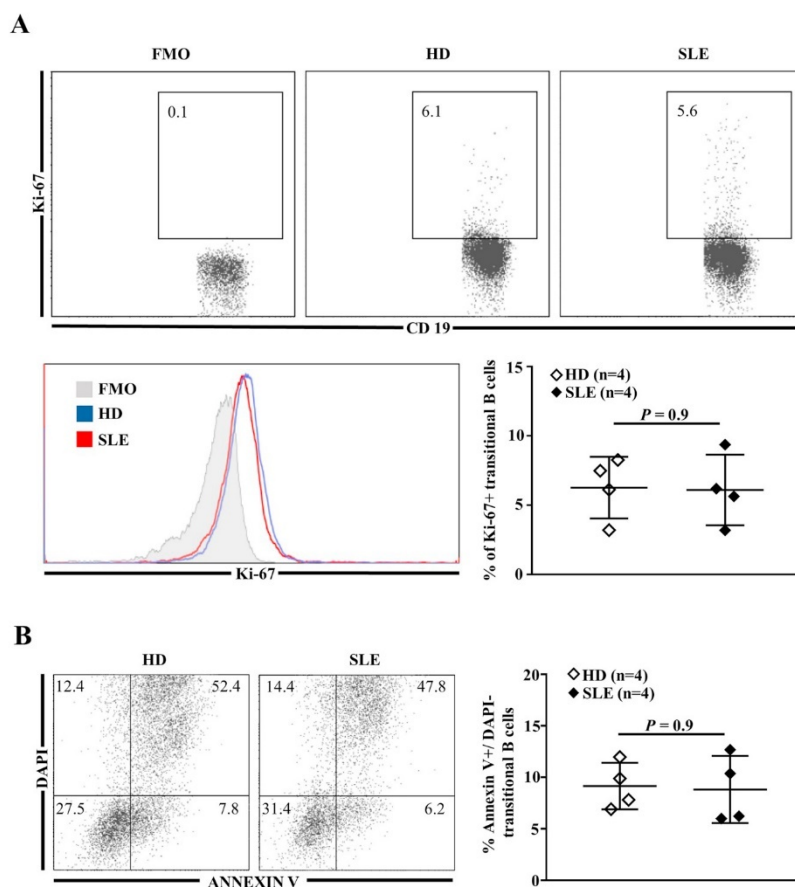


Fig. 5. (A) Representative dot plots of Ki-67⁺ cells (top panel) and Ki-67 MFI (bottom left panel) in gated transitional B cells from one HD and one SLE patient; frequency of Ki-67⁺ transitional B cells from HDs and SLE patients (bottom right panel). (B) Frequency of early apoptotic (DAPI⁻ AnnexinV⁺) transitional B cells in HDs and SLE patients. FMO: Fluorescence Minus One; HDs: healthy donors; MFI: mean of fluorescence intensity; SLE: systemic lupus erythematosus.

4. Discussion

Organ damage in SLE is driven by immune complexes deposition and anti-nuclear antibodies [2]. Hence, lots of work to elucidate SLE pathogenesis focused on the behavior of autoreactive B cells to explain how pathogenic B cells producing high affinity auto-antibodies can arise. Autoreactive B cells are submitted to stringent selection in the BM, via editing and deletion [36–39], and during B cell differentiation their percentage dropped significantly in HDs between the transitional stage and the mature naive stage [6]. However, a percentage of ignorant or anergic autoreactive B cells remain and they will be ultimately control in the periphery [40].

Herein, we describe that transitional B cells in SLE patients displayed, as naive B cells [10], an impairment in TLR9 response, and low levels of CD19 concerning all 3 subsets. TLR9 deficiency in lupus-prone mice leads to disease worsening, and Sindhava et al. showed in humans the crucial role of TLR9 in controlling the survival of autoreactive naive B cells when co-engaged with BCR [11]. CD19 downregulation could participate for diminished TLR9 response in early SLE B cells [9,10]. It may also favor *per se* abnormalities in selection at the BM level, considering autoreactive B cell fate in CD19 deficient patients [41], in CD19 deficient transgenic cell lines [42] or in mice [43]. Thus, the defect in transitional B cells of two closely inter-related molecules (i.e. CD19 and TLR9) may favor the B-cell tolerance breakdown described in SLE at this stage.

We detected an IFN signature in sorted transitional B cells from both peripheral blood and BM. Domeier et al. recently reported in mice, that

type I IFN maintains BCR signaling beyond the threshold required for effective tolerance, driving autoreactive B cell development into the germinal center (GC) pathway [44]. Since IFN influence appears in the BM at the early transitional stage, it could affect the BCR signaling threshold also at the medullary B-cell stages and not only in the periphery.

IFN signature and abnormalities in CD19/TLR9 signaling could have different causes. CD19/TLR9 defects, are undoubtedly present in quiescent SLE patients. Munroe et al. were able to examine type I and type II interferon activities, autoantibodies and cytokines levels in samples collected before and after diagnosis of SLE and it appears that IFN activities precede the disease [45]. Studies in ANA + healthy subjects or in other autoimmune conditions may answer about the causal/relationship of our findings in SLE and in autoantibody mediated diseases. For example, transitional B cells are expanded in Sjögren syndrome [17], although the expression of CD19 remains normal [10]. Thus, investigations in other conditions and in prospective longitudinal cohorts could help to precise if the frequency of transitional B cells is a reflection of IFN burden without real disease specificity and whether or not it can predict the occurrence of some of them.

We confirmed that IFN imprint in SLE is not confined to African American patients, especially to those with nephritis and *anti*-Ro antibodies [15] but also concerns Caucasian patients with *anti*-dsDNA. Transitional B cells from African American SLE patients displayed an autocrine production of IFN- β [15]. However, we did not detect overexpression of genes coding for type I or type II IFN in our cohort, suggesting an extrinsic influence in Caucasian patients, i.e. IFN

secretion by other cells. This is consistent with the low transcription of genes coding for type I IFN in another group of European American SLE patients compared to African American SLE in sorted transitional B cells [15]. In this view, Palanichamy et al. described in SLE a significant production of IFN- α and β by resident BM cells, associated with a reduction in the fraction of precursor B cells and a T1 and T2 B cell subsets expansion [35]. The correlation of the IFN score with the percentage of transitional B cells, together with the normal status of peripheral transitional B cells in terms of activation, proliferation and survival, argue for the influence of IFN on early BM differentiation. We cannot rule out that for some reasons, transitional B cells in SLE are more sensitive to IFN although transcriptional levels of IFN receptors did not differ in our analysis.

In our previous work, we correlated the CD19 low expression on B cells to the presence of anti-dsDNA antibodies, suggesting that apoptotic bodies and immune complexes containing DNA participate to CD19 and TLR9 regulation in B cells in the BM. Immune complexes could also trigger IFN production via TLR7, or directly via DNA-sensors in myeloid cells [46], and favor the output of transitional B cells, interfering with the elimination of autoreactive B cells at this stage [47]. Interestingly, TLR7 can escape X chromosome inactivation in immune cells and its expression is higher after puberty in female and correlates with sex hormones levels [48]. However, we did not observe significant differences in responses of SLE transitional B cells to TLR7/TLR8 agonist compared to controls, neither differences in TLR7/TLR9 transcription in transitional B cells via RNA sequencing analysis. It would be however of great interest to focus on this point.

SLE differs from one patient to another, depending of genetic factors and environment. The idea that central tolerance and early escape of autoreactive B cells participate to the genesis of SLE has been harmed by elegant studies demonstrating the extra-follicular activation of autoreactive B cells and of plasmocytes in periphery [5]. In view of our results, early B cells are abnormal likely since the BM, considering frequency or signaling, in many SLE patients even out of flares. Thus, both early and late mechanisms could interfere with survival and activation of autoreactive B cells in SLE patients and further analysis should clarify at what point it is in a personalized way.

Y.D., V.G., E.M., J.A. and A.S.K. designed the research.

Y.D., V.G., A.G., C.K., B.A., L.J., B.J., N.D., V.P., T.M., J.A. and A.S.K. enrolled patients and performed the experiments.

Y.D., V.G., A.G., C.K., J.A., E.M., T.M., P.S.S. and A.S.K. analyzed the data.

Y.D., V.G., E.M., J.A. and A.S.K. wrote the paper.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

We thank C. Herouard-Molina (IGBMC, Illkirch, France) for expert technical assistance for the whole transcriptome sequencing. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). We thank Dr L. Chiche (Department of Internal Medicine, Hôpital Européen, Marseille, France) and Dr R. Carapito (Genomax Plateform, INSERM 1109, Université de Strasbourg, Strasbourg, France) for assistance with the RNA-Seq analysis.

A.K.B. has been supported by a National Institutes of Health Clinical and Translational Science Award (5UL1TR000042-10) Trainee Pilot and a Center for Musculoskeletal Research Training Grant (2 T32AR053459).

J.L.B. has been supported by a Rheumatology Research Foundation (RRF) Scientist Development Award.

A.S.K. is supported by grants from the French Ministry of Health (PHRC IR 2011), from the Société Nationale Française de Médecine

Interne (SNFMI), from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) and from the EU-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET”.

J.H.A. is supported by AI563262, AI078907, AR071670, the NIAMS Accelerated Medicines Partnership (1UH2AR067690), and the Bertha and Louis Weinstein research fund.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.002>.

References

- [1] M.R. Arbuckle, M.T. McClain, M.V. Rubertone, R.H. Scofield, G.J. Dennis, J.A. James, J.B. Harley, Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1526–1533, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021933>.
- [2] G.C. Tsokos, M.S. Lo, P. Costa Reis, K.E. Sullivan, New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2016) 716–730, <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>.
- [3] G.C. Tsokos, A new checkpoint in lupus, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 1351–1352, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.996>.
- [4] S. Yurasov, H. Wardemann, J. Hammersen, M. Tsuiji, E. Meffre, V. Pascual, M.C. Nussenzweig, Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 703–711, <https://doi.org/10.1084/jem.20042251>.
- [5] J. Suurmond, Y. Atisha-Fregoso, E. Marasco, A.N. Barlev, N. Ahmed, S.A. Calderon, M.Y. Wong, M.C. Mackay, C. Aranow, B. Diamond, Loss of an IgG plasma cell checkpoint in patients with lupus, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 1586–1597, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.041>.
- [6] H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J.W. Young, E. Meffre, M.C. Nussenzweig, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors, *Science* 301 (2003) 1374–1377, <https://doi.org/10.1126/science.1086907>.
- [7] H. Li, Y. Jiang, E.L. Prak, M. Radic, M. Weigert, Editors and editing of anti-DNA receptors, *Immunity* 15 (2001) 947–957.
- [8] C.C. Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, C.G. Vinuesa, Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity, *Nature* 435 (2005) 590–597, <https://doi.org/10.1038/nature03724>.
- [9] H. Morbach, J.-N. Schickel, C. Cunningham-Rundles, M.E. Conley, I. Reisli, J.L. Franco, E. Meffre, CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (2016) 889–898, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.040> e6.
- [10] V. Gies, J.-N. Schickel, S. Jung, A. Joubin, S. Glaury, A.-M. Knapp, A. Soley, V. Poindron, A. Guffroy, J.-Y. Choi, J.-E. Gottenberg, J.H. Anolik, T. Martin, P. Soulas-Sprauel, E. Meffre, A.-S. Korganow, Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus, *JCI Insight* 3 (2018), <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96795>.
- [11] V.J. Sindhu, M.A. Orpello, K. Moody, M. Naradikian, L.E. Higdon, L. Zhou, A. Myles, N. Green, K. Nündel, W. Stohl, A.M. Schmidt, W. Cao, S. Dorta-Estremera, T. Kambayashi, A. Marshak-Rothstein, M.P. Cancro, A TLR9-dependent checkpoint governs B cell responses to DNA-containing antigens, *J. Clin. Invest.* 127 (2017) 1651–1663, <https://doi.org/10.1172/JCI89931>.
- [12] L. Chiche, N. Jourde-Chiche, E. Whalen, S. Presnell, V. Gersuk, K. Dang, E. Anguiano, C. Quinn, S. Burtsey, Y. Berland, G. Kaplanski, J.-R. Harle, V. Pascual, D. Chaussabel, Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type I and type II interferon signatures, *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66 (2014) 1583–1595, <https://doi.org/10.1002/art.38628>.
- [13] R. Banachereau, S. Hong, B. Cantarel, N. Baldwin, J. Baisch, M. Edens, A.-M. Cepika, P. Acs, J. Turner, E. Anguiano, P. Vinod, S. Kahn, G. Obermoser, D. Blankenship, E. Wakeland, L. Nassi, A. Gotte, M. Punaro, Y.-J. Liu, J. Banachereau, J. Rossello-Urgell, T. Wright, V. Pascual, Personalized immunomonitoring uncovers molecular networks that stratify lupus patients, *Cell* 165 (2016) 551–565, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.008>.
- [14] M. Liu, Q. Guo, C. Wu, D. Sterlin, S. Goswami, Y. Zhang, T. Li, C. Bao, N. Shen, Q. Fu, X. Zhang, Type I interferons promote the survival and proinflammatory properties of transitional B cells in systemic lupus erythematosus patients, *Cell. Mol. Immunol.* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0010-6>.
- [15] J.A. Hamilton, Q. Wu, P. Yang, B. Luo, S. Liu, J. Li, A.L. Mattheyses, I. Sanz, W.W. Chatham, H.-C. Hsu, J.D. Mountz, Cutting edge: intracellular IFN- β and distinct type I IFN expression patterns in circulating systemic lupus erythematosus B cells, *J. Immunol.* (2018) j1800791, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800791>.
- [16] G.P. Sims, R. Ettinger, Y. Shirota, C.H. Yarboro, G.G. Illei, P.E. Lipsky, Identification and characterization of circulating human transitional B cells, *Blood* 105 (2005) 4390–4398, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>.
- [17] Q. Simon, J.-O. Pers, D. Cornec, L.L. Pottier, R.A. Mageed, S. Hillion, In-depth characterization of CD24^{high}CD38^{high} transitional human B cells reveals different regulatory profiles, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (2016) 1577–1584, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.014> e10.
- [18] E.M. Tan, A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, J.G. Schaller, N. Talal, R.J. Winchester, The 1982 revised criteria for the

- classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 25 (1982) 1271–1277.
- [19] D.D. Gladman, D. Ibañez, M.B. Urowitz, Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 288–291.
- [20] K. Franklyn, C.S. Lau, S.V. Navarra, W. Louthrenoo, A. Lateef, L. Hamijoyo, C.S. Wahono, S.L. Chen, O. Jin, S. Morton, A. Hoi, M. Huq, M. Nikpour, E.F. Morand, Asia-Pacific lupus collaboration, definition and initial validation of a lupus low disease activity state (LLDAS), *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2016) 1615–1621, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207726>.
- [21] J.W. Tung, K. Heydari, R. Tirouvanziam, B. Sahaf, D.R. Parks, L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg, Modern flow cytometry: a practical approach, *Clin. Lab. Med.* 27 (2007) 453–468, <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.001>.
- [22] G.I. Rice, I. Melki, M.-L. Frémond, T.A. Briggs, M.P. Rodero, N. Kitabayashi, A. Oojageer, B. Bader-Meunier, A. Belot, C. Bodemer, P. Quartier, Y.J. Crow, Assessment of type I interferon signaling in pediatric inflammatory disease, *J. Clin. Immunol.* 37 (2017) 123–132, <https://doi.org/10.1007/s10875-016-0359-1>.
- [23] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29 (2013) 15–21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [24] S. Anders, P.T. Pyl, W. Huber, HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31 (2015) 166–169, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- [25] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014) 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- [26] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57 (1995) 289–300.
- [27] D. Chaussabel, N. Baldwin, Democratizing systems immunology with modular transcriptional repertoire analyses, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 271–280, <https://doi.org/10.1038/nri3642>.
- [28] A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernysky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, M.A. DePristo, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data, *Genome Res.* 20 (2010) 1297–1303, <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
- [29] P. Cingolani, V.M. Patel, M. Coon, T. Nguyen, S.J. Land, D.M. Ruden, X. Lu, Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift, *Front. Genet.* 3 (2012) 35, <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00035>.
- [30] P. Cingolani, A. Platts, L.L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S.J. Land, X. Lu, D.M. Ruden, A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3, *Fly* 6 (2012) 80–92, <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- [31] T.E. Taher, V.H. Ong, J. Bystrom, S. Hillion, Q. Simon, C.P. Denton, J.-O. Pers, D.J. Abraham, R.A. Mageed, Association of defective regulation of autoreactive interleukin-6-producing transitional B lymphocytes with disease in patients with systemic sclerosis, *Arthritis Rheum.* 70 (2018) 450–461, <https://doi.org/10.1002/art.40390>.
- [32] A. Palanichamy, J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, C. Wei, R.J. Looney, I. Sanz, J.H. Anolik, Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy, *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182 (2009) 5982–5993, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>.
- [33] M.P. Rodero, Y.J. Crow, Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: the type I interferonopathies, a conceptual overview, *J. Exp. Med.* 213 (2016) 2527–2538, <https://doi.org/10.1084/jem.20161596>.
- [34] W.M. Schneider, M.D. Chevillotte, C.M. Rice, Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses, *Annu. Rev. Immunol.* 32 (2014) 513–545, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- [35] A. Palanichamy, J.W. Bauer, S. Yalavarthi, N. Meednu, J. Barnard, T. Owen, C. Cistrone, A. Bird, A. Rabinovich, S. Nevarez, J.S. Knight, R. Dedrick, A. Rosenberg, C. Wei, J. Rangel-Moreno, J. Liesveld, I. Sanz, E. Baechler, M.J. Kaplan, J.H. Anolik, Neutrophil-mediated IFN activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus, *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192 (2014) 906–918, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302112>.
- [36] C.C. Goodnow, J.G. Cyster, S.B. Hartley, S.E. Bell, M.P. Cooke, J.I. Healy, S. Akkaraju, J.C. Rathmell, S.L. Pogue, K.P. Shokat, Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development, *Adv. Immunol.* 59 (1995) 279–368.
- [37] M.J. Shlomchik, Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation, *Immunity* 28 (2008) 18–28, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.004>.
- [38] D. Ait-Azzoune, L. Verkoczy, J. Peters, A. Gavin, P. Skog, J.L. Vela, D. Nemazee, An immunoglobulin C κ -reactive single chain antibody fusion protein induces tolerance through receptor editing in a normal polyclonal immune system, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 817–828, <https://doi.org/10.1084/jem.20041854>.
- [39] J. Lang, T. Ota, M. Kelly, P. Strauch, B.M. Freed, R.M. Torres, D. Nemazee, R. Pelanda, Receptor editing and genetic variability in human autoreactive B cells, *J. Exp. Med.* 213 (2016) 93–108, <https://doi.org/10.1084/jem.20151039>.
- [40] C.C. Goodnow, C.G. Vinuesa, K.L. Randall, F. Mackay, R. Brink, Control systems and decision making for antibody production, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 681–688, <https://doi.org/10.1038/ni.1900>.
- [41] M.C. van Zelm, S.J.W. Bartol, G.J. Driessen, F. Mascart, I. Reisli, J.L. Franco, B. Wolska-Kusnier, H. Kanegane, L. Boon, J.J.M. van Dongen, M. van der Burg, Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 (2014) 135–144, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.015> e7.
- [42] L. von Muenchow, C. Engdahl, K. Karjalainen, A.G. Rolink, The selection of mature B cells is critically dependent on the expression level of the co-receptor CD19, *Immunol. Lett.* 160 (2014) 113–119, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.01.011>.
- [43] S. Shviti, N. Leider, O. Sadeh, Z. Kraiem, D. Melamed, Impaired light chain allelic exclusion and lack of positive selection in immature B cells expressing incompetent receptor deficient of CD19, *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168 (2002) 5596–5604.
- [44] P.P. Domeier, S.B. Chodisetti, S.L. Schell, Y.I. Kawasawa, M.J. Fasnacht, C. Soni, Z.S.M. Rahman, B-Cell-Intrinsic type 1 interferon signaling is crucial for loss of tolerance and the development of autoreactive B cells, *Cell Rep.* 24 (2018) 406–418, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.046>.
- [45] M.E. Munroe, R. Lu, Y.D. Zhao, D.A. Fife, J.M. Robertson, J.M. Guthridge, T.B. Niewold, G.C. Tsokos, M.P. Keith, J.B. Harley, J.A. James, Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification, *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2016) 2014–2021, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208140>.
- [46] Y. Kato, J. Park, H. Takamatsu, H. Konaka, W. Aoki, S. Aburaya, M. Ueda, M. Nishide, S. Koyama, Y. Hayama, Y. Kinehara, T. Hirano, Y. Shima, M. Narazaki, A. Kumanogoh, Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 77 (2018) 1507–1515, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-212988>.
- [47] N.V. Giltaiy, C.P. Chappell, X. Sun, N. Kolhatkar, T.H. Teal, A.E. Wiedeman, J. Kim, L. Tanaka, M.B. Buechler, J.A. Hamerman, T. Imanishi-Kari, E.A. Clark, K.B. Elkon, Overexpression of TLR7 promotes cell-intrinsic expansion and autoantibody production by transitional T1 B cells, *J. Exp. Med.* 210 (2013) 2773–2789, <https://doi.org/10.1084/jem.20122798>.
- [48] M. Souyris, C. Cenac, P. Azar, D. Daviaud, A. Canivet, S. Grunewald, C. Pienkowski, J. Chaumeil, J.E. Mejía, J.-C. Guéry, TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells, *Sci. Immunol.* 3 (2018) eaap8855, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aap8855>.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ahuja, Anupama, Jonathan Shupe, Robert Dunn, Michael Kashgarian, Marilyn R. Kehry, and Mark J. Shlomchik. 2007. "Depletion of B Cells in Murine Lupus: Efficacy and Resistance." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (5): 3351–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3351>.
2. Akkaya, Munir, Billur Akkaya, Ann S. Kim, Pietro Miozzo, Haewon Sohn, Mirna Pena, Alexander S. Roesler, et al. 2018. "Toll-like Receptor 9 Antagonizes Antibody Affinity Maturation." *Nature Immunology* 19 (3): 255–66. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0052-z>.
3. Akkaya, Munir, Kihyuck Kwak, and Susan K. Pierce. 2020. "B Cell Memory: Building Two Walls of Protection against Pathogens." *Nature Reviews Immunology* 20 (4): 229–38. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>.
4. Albert, Neisser. 1915. "Paul Ehrlich." *Archiv für Dermatologie und Syphilis* 121 (4): 557–78. <https://doi.org/10.1007/BF01961098>.
5. Alexander, Tobias, Ramona Sarfert, Jens Klotsche, Anja A. Köhl, Andrea Rubbert-Roth, Hannes-Martin Lorenz, Jürgen Rech, et al. 2015. "The Proteasome Inhibitor Bortezomib Depletes Plasma Cells and Ameliorates Clinical Manifestations of Refractory Systemic Lupus Erythematosus." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (7): 1474–78. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206016>.
6. Al-Mayouf, Sulaiman M., Asma Sunker, Reem Abdwani, Safiya Al Abrawi, Fathiya Almurshedi, Nadia Alhashmi, Abdullah Al Sonbul, et al. 2011. "Loss-of-Function Variant in DNASE1L3 Causes a Familial Form of Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Genetics* 43 (12): 1186–88. <https://doi.org/10.1038/ng.975>.
7. Aloisi, Francesca, and Ricardo Pujol-Borrell. 2006. "Lymphoid Neogenesis in Chronic Inflammatory Diseases." *Nature Reviews Immunology* 6 (3): 205–17. <https://doi.org/10.1038/nri1786>.
8. Aloulou, Meryem, Edward J. Carr, Mylène Gador, Alexandre Bignon, Roland S. Liblau, Nicolas Fazilleau, and Michelle A. Linterman. 2016. "Follicular Regulatory T Cells Can Be Specific for the Immunizing Antigen and Derive from Naive T Cells." *Nature Communications* 7 (1): 10579. <https://doi.org/10.1038/ncomms10579>.
9. Alvarez-Rodriguez, Lorena, Leyre Riancho-Zarrabeitia, Jime Calvo-Alén, Marcos López-Hoyos, and Victor Martínez-Taboada. 2018. "Peripheral B-Cell Subset Distribution in Primary Antiphospholipid Syndrome." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020589>.
10. Alves da Costa, Thiago, Jacob N. Peterson, Julie Lang, Jeremy Shulman, Xiayuan Liang, Brian M. Freed, Susan A. Boackle, Pilar Lauzurica, Raul M. Torres, and Roberta Pelanda. 2021. "Central Human B Cell Tolerance Manifests with a Distinctive Cell Phenotype and Is Enforced via CXCR4 Signaling in Hu-Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (16): e2021570118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021570118>.
11. Ambegaonkar, Abhijit A, Prasida Holla, Brian LP Dizon, Haewon Sohn, and Susan K Pierce. 2022. "Atypical B Cells in Chronic Infectious Diseases and Systemic Autoimmunity: Puzzles with Many Missing Pieces." *Current Opinion in Immunology* 77: 102227. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102227>.
12. Andrews, Sarah F, Yunping Huang, Kaval Kaur, Lyubov I. Popova, Irvin Y. Ho, Noel T. Pauli, Carole J. Henry Dunand, et al. 2015. "Immune History Profoundly Affects Broadly

- Protective B Cell Responses to Influenza." *Science Translational Medicine* 7 (316): 316ra192. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad0522>.
13. Anolik, J. H. 2013. "B Cell Biology: Implications for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus." *Lupus* 22 (4): 342–49. <https://doi.org/10.1177/0961203312471576>.
 14. Arachchillage, Deepa R. J., and Mike Laffan. 2017. "Pathogenesis and Management of Antiphospholipid Syndrome." *British Journal of Haematology* 178 (2): 181–95. <https://doi.org/10.1111/bjh.14632>.
 15. Arad, Ariela, Valerie Proulle, Richard A. Furie, Barbara C. Furie, and Bruce Furie. 2011. "B2-Glycoprotein-1 Autoantibodies from Patients with Antiphospholipid Syndrome Are Sufficient to Potentiate Arterial Thrombus Formation in a Mouse Model." *Blood* 117 (12): 3453–59. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-300715>.
 16. Arbuckle, Melissa R., Micah T. McClain, Mark V. Rubertone, R. Hal Scofield, Gregory J. Dennis, Judith A. James, and John B. Harley. 2003. "Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus." *New England Journal of Medicine* 349 (16): 1526–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021933>.
 17. Arce, Sergio, Elke Luger, Gwendolin Muehlinghaus, Giuliana Cassese, Anja Hauser, Alexander Horst, Katja Lehnert, et al. 2004. "CD38 Low IgG-Secreting Cells Are Precursors of Various CD38 High-Expressing Plasma Cell Populations." *Journal of Leukocyte Biology* 75 (6): 1022–28. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603279>.
 18. Aringer, Martin, Karen Costenbader, David Daikh, Ralph Brinks, Marta Mosca, Rosalind Ramsey-Goldman, Josef S. Smolen, et al. 2019. "2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus." *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (9): 1151–59. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214819>.
 19. Asashima, Hiromitsu, Subhasis Mohanty, Michela Comi, William E. Ruff, Kenneth B. Hoehn, Patrick Wong, Jon Klein, et al. 2023. "PD-1highCXCR5–CD4+ Peripheral Helper T Cells Promote CXCR3+ Plasmablasts in Human Acute Viral Infection." *Cell Reports* 42 (1): 111895. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111895>.
 20. Bajic, Goran, Max J. Maron, Yu Adachi, Taishi Onodera, Kevin R. McCarthy, Charles E. McGee, Gregory D. Sempowski, et al. 2019. "Influenza Antigen Engineering Focuses Immune Responses to a Subdominant but Broadly Protective Viral Epitope." *Cell Host & Microbe* 25 (6): 827–835.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.003>.
 21. Banchereau, Jacques, and Virginia Pascual. 2006. "Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases." *Immunity* 25 (3): 383–92. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.010>.
 22. Banchereau, Romain, Seunghee Hong, Brandi Cantarel, Nicole Baldwin, Jeanine Baisch, Michelle Edens, Alma-Martina Cepika, et al. 2016. "Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks That Stratify Lupus Patients." *Cell* 165 (3): 551–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.008>.
 23. Barbhaiya, Medha, Stephane Zuily, Ray Naden, Alison Hendry, Florian Manneville, Mary-Carmen Amigo, Zahir Amoura, et al. 2023. "The 2023 ACR/EULAR Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 75 (10): 1687–1702. <https://doi.org/10.1002/art.42624>.

24. Bashford-Rogers, R. J. M., L. Bergamaschi, E. F. McKinney, D. C. Pombal, F. Mescia, J. C. Lee, D. C. Thomas, et al. 2019. "Analysis of the B Cell Receptor Repertoire in Six Immune-Mediated Diseases." *Nature* 574 (7776): 122–26. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1595-3>.
25. Bekar, Kai W., Teresa Owen, Robert Dunn, Travis Ichikawa, Wensheng Wang, Roger Wang, Jennifer Barnard, et al. 2010. "Prolonged Effects of Short-Term Anti-CD20 B Cell Depletion Therapy in Murine Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis and Rheumatism* 62 (8): 2443–57. <https://doi.org/10.1002/art.27515>.
26. Bekeredjian-Ding, Isabelle Béatrice, Moritz Wagner, Veit Hornung, Thomas Giese, Max Schnurr, Stefan Endres, and Gunther Hartmann. 2005. "Plasmacytoid Dendritic Cells Control TLR7 Sensitivity of Naive B Cells via Type I IFN." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (7): 4043–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4043>.
27. Belot, Alexandre, Paul R. Kasher, Eleanor W. Trotter, Anne-Perrine Foray, Anne-Laure Debaud, Gillian I. Rice, Marcin Szykiewicz, et al. 2013. "Protein Kinase C δ Deficiency Causes Mendelian Systemic Lupus Erythematosus with B Cell-Defective Apoptosis and Hyperproliferation." *Arthritis and Rheumatism* 65 (8): 2161–71. <https://doi.org/10.1002/art.38008>.
28. Bensimon, C., P. Chastagner, and M. Zouali. 1994. "Human Lupus Anti-DNA Autoantibodies Undergo Essentially Primary V Kappa Gene Rearrangements." *The EMBO Journal* 13 (13): 2951–62. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06593.x>.
29. Benson, Micah J., Stacey R. Dillon, Emanuela Castigli, Raif S. Geha, Shengli Xu, Kong-Peng Lam, and Randolph J. Noelle. 2008. "Cutting Edge: The Dependence of Plasma Cells and Independence of Memory B Cells on BAFF and APRIL." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (6): 3655–59. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3655>.
30. Bettiol, Alessandra, Francesca Pregnolato, Savino Sciascia, Giacomo Emmi, Domenico Prisco, and Pier Luigi Meroni. 2022. "Association of Subcutaneous Belimumab and Long-Term Antimalarial Treatment Reduces Antiphospholipid Antibodies Levels in Systemic Lupus Erythematosus: Post-Hoc Analysis of a Randomised Placebo-Controlled Trial-Comment on: 'Effect of Belimumab Treatment on Antiphospholipid Antibody Levels: Post-Hoc Analysis Based on Two Randomised Placebo-Controlled Trials in Systemic Lupus Erythematosus' by Chatzidionysiou et Al." *Annals of the Rheumatic Diseases* 81 (8): e140. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218377>.
31. Bhat, Neelima M., Christopher M. Adams, Yi Chen, Marcia M. Bieber, and Nelson N. H. Teng. 2015. "Identification of Cell Surface Straight Chain Poly-N-Acetyl-Lactosamine Bearing Protein Ligands for VH4-34-Encoded Natural IgM Antibodies." *The Journal of Immunology* 195 (11): 5178–88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501697>.
32. Blair, Paul A., Lina Yassin Noreña, Fabian Flores-Borja, David J. Rawlings, David A. Isenberg, Michael R. Ehrenstein, and Claudia Mauri. 2010. "CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients." *Immunity* 32 (1): 129–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
33. Blanc, Pascal, Ludovic Moro-Sibilot, Lucas Barthly, Ferdinand Jagot, Sébastien This, Simon de Bernard, Laurent Buffat, et al. 2016. "Mature IgM-Expressing Plasma Cells Sense Antigen and Develop Competence for Cytokine Production upon Antigenic

- Challenge." *Nature Communications* 7 (December): 13600. <https://doi.org/10.1038/ncomms13600>.
34. Bogaert, Delfien J., Hye Sun Kuehn, Carolien Bonroy, Katherine R. Calvo, Joke Dehoorne, Arnaud V. Vanlander, Marieke De Bruyne, et al. 2018. "A Novel IKAROS Haploinsufficiency Kindred with Unexpectedly Late and Variable B-Cell Maturation Defects." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1): 432-435.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.019>.
 35. Bombardieri, Michele, Myles Lewis, and Costantino Pitzalis. 2017. "Ectopic Lymphoid Neogenesis in Rheumatic Autoimmune Diseases." *Nature Reviews Rheumatology* 13 (3): 141-54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.217>.
 36. Bona, C. A. 1991. "Postulates Defining Pathogenic Autoantibodies and T Cells." *Autoimmunity* 10 (3): 169-72. <https://doi.org/10.3109/08916939109001886>.
 37. Borg, E. J. ter, G. Horst, E. J. Hummel, P. C. Limburg, and C. G. Kallenberg. 1990. "Measurement of Increases in Anti-Double-Stranded DNA Antibody Levels as a Predictor of Disease Exacerbation in Systemic Lupus Erythematosus. A Long-Term, Prospective Study." *Arthritis and Rheumatism* 33 (5): 634-43.
 38. Bossen, Claudia, Teresa G. Cachero, Aubry Tardivel, Karine Ingold, Laure Willen, Max Dobles, Martin L. Scott, et al. 2008. "TACI, Unlike BAFF-R, Is Solely Activated by Oligomeric BAFF and APRIL to Support Survival of Activated B Cells and Plasmablasts." *Blood* 111 (3): 1004-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110874>.
 39. Bourcy, Charles F. A. de, Cornelia L. Dekker, Mark M. Davis, Mark R. Nicolls, and Stephen R. Quake. 2017. "Dynamics of the Human Antibody Repertoire after B Cell Depletion in Systemic Sclerosis." *Science Immunology* 2 (15): eaan8289. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan8289>.
 40. Boutboul, David, Hye Sun Kuehn, Zoé Van de Wyngaert, Julie E. Niemela, Isabelle Callebaut, Jennifer Stoddard, Christelle Lenoir, et al. 2018. "Dominant-Negative IKZF1 Mutations Cause a T, B, and Myeloid Cell Combined Immunodeficiency." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (7): 3071-87. <https://doi.org/10.1172/JCI98164>.
 41. Bowman, Simon J., Robert Fox, Thomas Dörner, Xavier Mariette, Athena Papas, Thomas Grader-Beck, Benjamin A. Fisher, et al. 2022. "Safety and Efficacy of Subcutaneous Ianalumab (VAY736) in Patients with Primary Sjögren's Syndrome: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2b Dose-Finding Trial." *The Lancet* 399 (10320): 161-71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02251-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02251-0).
 42. Bräuninger, A., T. Goossens, K. Rajewsky, and R. Küppers. 2001. "Regulation of Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements during Early B Cell Development in the Human." *European Journal of Immunology* 31 (12): 3631-37. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200112\)31:12<3631::aid-immu3631>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200112)31:12<3631::aid-immu3631>3.0.co;2-l).
 43. Broeren, Mathijs G. A., Jing J. Wang, Giulia Balzaretto, Patricia J. T. A. Groenen, Barbera D. C. van Schaik, Tim Chataway, Charlotte Kaffa, et al. 2022. "Proteogenomic Analysis of the Autoreactive B Cell Repertoire in Blood and Tissues of Patients with Sjögren's Syndrome." *Annals of the Rheumatic Diseases* 81 (5): 644-52. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221604>.

44. Brown, Grant J., Pablo F. Cañete, Hao Wang, Arti Medhavy, Josiah Bones, Jonathan A. Roco, Yuke He, et al. 2022. "TLR7 Gain-of-Function Genetic Variation Causes Human Lupus." *Nature* 605 (7909): 349–56. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04642-z>.
45. Browne, Cecille D., Christopher J. Del Nagro, Matthew H. Cato, Hart S. Dengler, and Robert C. Rickert. 2009. "Suppression of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Production Is a Key Determinant of B Cell Anergy." *Immunity* 31 (5): 749–60. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.026>.
46. Bülow, Götz-Ulrich von, Jan M van Deursen, and Richard J Bram. 2001. "Regulation of the T-Independent Humoral Response by TACI." *Immunity* 14 (5): 573–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00130-3).
47. Burnet, F. M. 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Nashville: Vanderbilt University Press.
48. Burnett, Deborah L., Joanne H. Reed, Daniel Christ, and Christopher C. Goodnow. 2019. "Clonal Redemption and Clonal Anergy as Mechanisms to Balance B Cell Tolerance and Immunity." *Immunological Reviews* 292 (1): 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12808>.
49. Buschmann, Catharina, Christian Fischer, Viola Ochsenhirt, Carolin Neukirch, Karl J. Lackner, and Philipp Landenberg. 2005. "Generation and Characterization of Three Monoclonal IgM Antiphospholipid Antibodies Recognizing Different Phospholipid Antigens." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1051 (1): 240–54. <https://doi.org/10.1196/annals.1361.065>.
50. Butt, Danyal, Tyani D. Chan, Katherine Bourne, Jana R. Hermes, Akira Nguyen, Aaron Statham, Lorraine A. O'Reilly, et al. 2015. "FAS Inactivation Releases Unconventional Germinal Center B Cells That Escape Antigen Control and Drive IgE and Autoantibody Production." *Immunity* 42 (5): 890–902. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.010>.
51. Buyon, J. P., and R. Winchester. 1990. "Congenital Complete Heart Block. A Human Model of Passively Acquired Autoimmune Injury." *Arthritis and Rheumatism* 33 (5): 609–14. <https://doi.org/10.1002/art.1780330502>.
52. Çakan, Elif, Marie Dominique Ah Kioon, Yolanda Garcia-Carmona, Salomé Glauzy, David Oliver, Natsuko Yamakawa, Andrea Vega Loza, et al. 2023. "TLR9 Ligand Sequestration by Chemokine CXCL4 Negatively Affects Central B Cell Tolerance." *Journal of Experimental Medicine* 220 (12): e20230944. <https://doi.org/10.1084/jem.20230944>.
53. Calado, Dinis Pedro, Yoshiteru Sasaki, Susana A. Godinho, Alex Pellerin, Karl Köchert, Barry P. Sleckman, Ignacio Moreno de Alborán, Martin Janz, Scott Rodig, and Klaus Rajewsky. 2012. "The Cell-Cycle Regulator c-Myc Is Essential for the Formation and Maintenance of Germinal Centers." *Nature Immunology* 13 (11): 1092–1100. <https://doi.org/10.1038/ni.2418>.
54. Canales-Herrerias, Pablo, Etienne Crickx, Matteo Broketa, Aurélien Sokal, Guilhem Chenon, Imane Azzaoui, Alexis Vandenberghe, et al. 2022. "High-Affinity Autoreactive Plasma Cells Disseminate through Multiple Organs in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura." *The Journal of Clinical Investigation* 132 (12): e153580. <https://doi.org/10.1172/JCI153580>.
55. Canaud, Guillaume, Frank Bienaimé, Fanny Tabarin, Guillaume Bataillon, Danielle Seilhean, Laure-Hélène Noël, Marie-Agnès Dragon-Durey, et al. 2014. "Inhibition of the

- mTORC Pathway in the Antiphospholipid Syndrome." *The New England Journal of Medicine* 371 (4): 303–12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312890>.
56. Cancro, Michael P. 2004. "Peripheral B-Cell Maturation: The Intersection of Selection and Homeostasis." *Immunological Reviews* 197: 89–101.
 57. Cancro Michael. 2020. "Age-Associated B Cells." *Annual Review of Immunology* 38 (1): 315–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-092419-031130>.
 58. Cantaert, Tineke, Jean-Nicolas Schickel, Jason M. Bannock, Yen-Shing Ng, Christopher Massad, Tyler Oe, Renee Wu, et al. 2015. "Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance." *Immunity* 43 (5): 884–95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.002>.
 59. Cappione, Amedeo, Jennifer H. Anolik, Aimee Pugh-Bernard, Jennifer Barnard, Paul Dutcher, Gregg Silverman, and Iñaki Sanz. 2005. "Germinal Center Exclusion of Autoreactive B Cells Is Defective in Human Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11): 3205–16. <https://doi.org/10.1172/JCI24179>.
 60. Carbone, Javier, Antonio Gallego, Nallibe Lanio, Joaquin Navarro, Maria Orera, Angel Aguaron, Eduardo Fernandez-Cruz, and Elizabeth Sarmiento. 2009. "Quantitative Abnormalities of Peripheral Blood Distinct T, B, and Natural Killer Cell Subsets and Clinical Findings in Obstetric Antiphospholipid Syndrome." *The Journal of Rheumatology* 36 (6): 1217–25. <https://doi.org/10.3899/jrheum.081079>.
 61. Carbonella, A., G. Mancano, E. Gremese, F. S. Alkuraya, N. Patel, F. Gurrieri, and G. Ferraccioli. 2017. "An Autosomal Recessive DNASE1L3-Related Autoimmune Disease with Unusual Clinical Presentation Mimicking Systemic Lupus Erythematosus." *Lupus* 26 (7): 768–72. <https://doi.org/10.1177/0961203316676382>.
 62. Carsetti, Rita, M. Manuela Rosado, and Hedda Wardmann. 2004. "Peripheral Development of B Cells in Mouse and Man." *Immunological Reviews* 197 (1): 179–91. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0109.x>.
 63. Casellas, Rafael, Tien-An Yang Shih, Markus Kleinewietfeld, Jasna Rakonjac, David Nemazee, Klaus Rajewsky, and Michel C. Nussenzweig. 2001. "Contribution of Receptor Editing to the Antibody Repertoire." *Science* 291 (5508): 1541–44. <https://doi.org/10.1126/science.1056600>.
 64. Cashman, Kevin S., Scott A. Jenks, Matthew C. Woodruff, Deepak Tomar, Christopher M. Tipton, Christopher D. Scharer, F. Eun-Hyung Lee, Jeremy M. Boss, and Iñaki Sanz. 2019. "Understanding and Measuring Human B-Cell Tolerance and Its Breakdown in Autoimmune Disease." *Immunological Reviews* 292 (1): 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12820>.
 65. Castigli, Emanuela, Stephen A. Wilson, Abdallah Elkhail, Esra Ozcan, Lilit Garibyan, and Raif S. Geha. 2007. "Transmembrane Activator and Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor (TACI) Enhances CD40 Driven Plasma Cell Differentiation." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (4): 885–91. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.012>.
 66. Cerutti, Andrea, Montserrat Cols, and Irene Puga. 2013. "Marginal Zone B Cells: Virtues of Innate-like Antibody-Producing Lymphocytes." *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 118–32. <https://doi.org/10.1038/nri3383>.

67. Chan, Lynn G. Hannum, Ann M. Haberman, Michael P. Madaio, and Mark J. Shlomchik. 1999. "A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-Independent Role for B Cells in Murine Lupus." *Journal of Experimental Medicine* 189 (10): 1639–48. <https://doi.org/10.1084/jem.189.10.1639>.
68. Chan, Tyani D., Katherine Wood, Jana R. Hermes, Danyal Butt, Christopher J. Jolly, Antony Basten, and Robert Brink. 2012. "Elimination of Germinal-Center-Derived Self-Reactive B Cells Is Governed by the Location and Concentration of Self-Antigen." *Immunity* 37 (5): 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.017>.
69. Chang, Anthony, Scott G. Henderson, Daniel Brandt, Ni Liu, Riteesha Guttikonda, Christine Hsieh, Natasha Kaverina, et al. 2011. "In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (3): 1849–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001983>.
70. Chappert, Pascal, François Huetz, Marie-Alix Espinasse, Fabrice Chatonnet, Louise Pannetier, Lucie Da Silva, Clara Goetz, et al. 2022. "Human Anti-Smallpox Long-Lived Memory B Cells Are Defined by Dynamic Interactions in the Splenic Niche and Long-Lasting Germinal Center Imprinting." *Immunity* 55 (10): 1872–1890.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.019>.
71. Charles, Edgar D., Claudia Brunetti, Svetlana Marukian, Kimberly D. Ritola, Andrew H. Talal, Kristen Marks, Ira M. Jacobson, Charles M. Rice, and Lynn B. Dustin. 2011. "Clonal B Cells in Patients with Hepatitis C Virus–Associated Mixed Cryoglobulinemia Contain an Expanded Anergic CD21low B-Cell Subset." *Blood* 117 (20): 5425–37. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312942>.
72. Chaturvedi, Shruti, Evan M. Braunstein, Xuan Yuan, Jia Yu, Alice Alexander, Hang Chen, Eleni Gavrilaki, et al. 2020. "Complement Activity and Complement Regulatory Gene Mutations Are Associated with Thrombosis in APS and CAPS." *Blood* 135 (4): 239–51. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003863>.
73. Chatzidionysiou, Katerina, Evangelia Samoli, Petros P. Sfikakis, and Maria G. Tektonidou. 2020. "Effect of Belimumab Treatment on Antiphospholipid Antibody Levels: Post-Hoc Analysis Based on Two Randomised Placebo-Controlled Trials in Systemic Lupus Erythematosus." *Annals of the Rheumatic Diseases* 79 (2): 304–7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216367>.
74. Chen, C., Z. Nagy, M. Z. Radic, R. R. Hardy, D. Huszar, S. A. Camper, and M. Weigert. 1995. "The Site and Stage of Anti-DNA B-Cell Deletion." *Nature* 373 (6511): 252–55. <https://doi.org/10.1038/373252a0>.
75. Chen, Qy, Xc Wang, Wj Wang, Qh Zhou, Dr Liu, and Y Wang. 2018. "B-Cell Deficiency: A De Novo IKZF1 Patient and Review of the Literature." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 28 (1): 53–56. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0207>.
76. Chen, Tyler A. Rice, Jason M. Bannock, Agata A. Bielecka, Juliet D. Strauss, Jason R. Catanzaro, Haowei Wang, et al. 2020. "Autoreactivity in Naïve Human Fetal B Cells Is Associated with Commensal Bacteria Recognition." *Science (New York, N.Y.)* 369 (6501): 320–25. <https://doi.org/10.1126/science.aay9733>.
77. Chen, Spencer T., Thiago Y. Oliveira, Anna Gazumyan, Melissa Cipolla, and Michel C. Nussenzweig. 2023. "B Cell Receptor Signaling in Germinal Centers Prolongs Survival

- and Primes B Cells for Selection." *Immunity* 56 (3): 547-561.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.003>.
78. Chiche, Laurent, Noémie Jourde-Chiche, Elizabeth Whalen, Scott Presnell, Vivian Gersuk, Kristen Dang, Esperanza Anguiano, et al. 2014. "Modular Transcriptional Repertoire Analyses of Adults With Systemic Lupus Erythematosus Reveal Distinct Type I and Type II Interferon Signatures." *Arthritis & Rheumatology* 66 (6): 1583-95. <https://doi.org/10.1002/art.38628>.
 79. Chou, Chun, Daniel J. Verbaro, Elena Tonc, Melanie Holmgren, Marina Cella, Marco Colonna, Deepta Bhattacharya, and Takeshi Egawa. 2016. "The Transcription Factor AP4 Mediates Resolution of Chronic Viral Infection through Amplification of Germinal Center B Cell Responses." *Immunity* 45 (3): 570-82. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.023>.
 80. Christensen, Sean R., Jonathan Shupe, Kevin Nickerson, Michael Kashgarian, Richard A. Flavell, and Mark J. Shlomchik. 2006. "Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus." *Immunity* 25 (3): 417-28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.013>.
 81. Chu, Van Trung, Philipp Enghard, Stefanie Schürer, Gudrun Steinhäuser, Birgit Rudolph, Gabriela Riemekasten, and Claudia Berek. 2009. "Systemic Activation of the Immune System Induces Aberrant BAFF and APRIL Expression in B Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis and Rheumatism* 60 (7): 2083-93. <https://doi.org/10.1002/art.24628>.
 82. Chukwuocha, Reginald U., Min Zhu, Chul Soo Cho, Sudha Visvanathan, Kwan K. Hwang, Anisur Rahman, and Pojen P. Chen. 2002. "Molecular and Genetic Characterizations of Five Pathogenic and Two Non-Pathogenic Monoclonal Antiphospholipid Antibodies." *Molecular Immunology* 39 (5-6): 299-311. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00115-3](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00115-3).
 83. Constantinescu, A., and M. S. Schlissel. 1997. "Changes in Locus-Specific V(D)J Recombinase Activity Induced by Immunoglobulin Gene Products during B Cell Development." *The Journal of Experimental Medicine* 185 (4): 609-20. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.609>.
 84. Coquery, Christine M., and Loren D. Erickson. 2012. "Regulatory Roles of the Tumor Necrosis Factor Receptor BCMA." *Critical Reviews in Immunology* 32 (4): 287-305. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i4.10>.
 85. Cox, Eva-Maria, Mohamed El-Behi, Stefanie Ries, Johannes F. Vogt, Vivien Kohlhaas, Thomas Michna, Benoît Manfroi, et al. 2023. "AKT Activity Orchestrates Marginal Zone B Cell Development in Mice and Humans." *Cell Reports* 42 (4): 112378. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112378>.
 86. Crickx, Etienne, Pascal Chappert, Aurélien Sokal, Sandra Weller, Imane Azzaoui, Alexis Vandenberghe, Guillaume Bonnard, et al. 2021. "Rituximab-Resistant Splenic Memory B Cells and Newly Engaged Naïve B Cells Fuel Relapses in Patients with Immune Thrombocytopenia." *Science Translational Medicine* 13 (589): eabc3961. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3961>.
 87. Crotty, Shane. 2019. "T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases." *Immunity* 50 (5): 1132-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.

88. Crouzier, R., T. Martin, and J. L. Pasquali. 1995. "Heavy Chain Variable Region, Light Chain Variable Region, and Heavy Chain CDR3 Influences on the Mono- and Polyreactivity and on the Affinity of Human Monoclonal Rheumatoid Factors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154 (9): 4526–35.
89. Cyster, Jason G., and Christopher D. C. Allen. 2019. "B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions." *Cell* 177 (3): 524–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>.
90. Delaloy, Céline, Wolfgang Schuh, Hans-Martin Jäck, Amélie Bonaud, and Marion Espéli. 2022. "Single-Cell Resolution of Plasma Cell Fate Programming in Health and Disease." *European Journal of Immunology* 52 (1): 10–23. <https://doi.org/10.1002/eji.202149216>.
91. Deng, Yun, and Betty P. Tsao. 2014. "Advances in Lupus Genetics and Epigenetics." *Current Opinion in Rheumatology* 26 (5): 482–92. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000086>.
92. Deriano, Ludovic, and David B. Roth. 2013. "Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage." *Annual Review of Genetics* 47: 433–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155540>.
93. Desbois, Anne Claire, Patrice Cacoub, and David Saadoun. 2019. "Cryoglobulinemia: An Update in 2019." *Joint Bone Spine* 86 (6): 707–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2019.01.016>.
94. Di Niro, Roberto, Seung-Joo Lee, Jason A. Vander Heiden, Rebecca A. Elsner, Nikita Trivedi, Jason M. Bannock, Namita T. Gupta, et al. 2015. "Salmonella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed by Extrafollicular Affinity Maturation." *Immunity* 43 (1): 120–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.013>.
95. Di Zenzo, Giovanni, Giulia Di Lullo, Davide Corti, Valentina Calabresi, Anna Sinistro, Fabrizia Vanzetta, Biagio Didona, et al. 2012. "Pemphigus Autoantibodies Generated through Somatic Mutations Target the Desmoglein-3 Cis-Interface." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (10): 3781–90. <https://doi.org/10.1172/JCI64413>.
96. Dieudonné, Aurélien Guffroy, Olivier Vollmer, Raphael Carapito, and Anne-Sophie Korganow. 2019. "IKZF1 Loss-of-Function Variant Causes Autoimmunity and Severe Familial Antiphospholipid Syndrome." *Journal of Clinical Immunology* 39 (4): 353–57. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00643-2>.
97. Dieudonné, Yannick, Vincent Gies, Aurélien Guffroy, Céline Keime, Anna K. Bird, Jane Liesveld, Jennifer L. Barnas, et al. 2019. "Transitional B Cells in Quiescent SLE: An Early Checkpoint Imprinted by IFN." *Journal of Autoimmunity* 102: 150–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.002>.
98. Dobrowolski, Chrisanna, and Doruk Erkan. 2019. "Treatment of Antiphospholipid Syndrome beyond Anticoagulation." *Clinical Immunology* 206: 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.03.001>.
99. Dominguez-Sola, David, Gabriel D. Vitoria, Carol Y. Ying, Ryan T. Phan, Masumichi Saito, Michel C. Nussenzweig, and Riccardo Dalla-Favera. 2012. "The Proto-Oncogene MYC Is Required for Selection in the Germinal Center and Cyclic Reentry." *Nature Immunology* 13 (11): 1083–91. <https://doi.org/10.1038/ni.2428>.

100. Doorenspleet, M. E., P. L. Klarenbeek, M. J. H. de Hair, B. D. C. van Schaik, R. E. E. Esveldt, A. H. C. van Kampen, D. M. Gerlag, et al. 2014. "Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue Harbours Dominant B-Cell and Plasma-Cell Clones Associated with Autoreactivity." *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (4): 756–62. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202861>.
101. Duan, Meixue, Doan C. Nguyen, Chester J. Joyner, Celia L. Saney, Christopher M. Tipton, Joel Andrews, Sagar Lonial, et al. 2023. "Understanding Heterogeneity of Human Bone Marrow Plasma Cell Maturation and Survival Pathways by Single-Cell Analyses." *Cell Reports* 42 (7): 112682. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112682>.
102. Duarte-García, Ali, Michael M. Pham, Cynthia S. Crowson, Shreyasee Amin, Kevin G. Moder, Rajiv K. Pruthi, Kenneth J. Warrington, and Eric L. Matteson. 2019. "The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study." *Arthritis & Rheumatology* 71 (9): 1545–52. <https://doi.org/10.1002/art.40901>.
103. Duty, J. Andrew, Peter Szodoray, Nai-Ying Zheng, Kristi A. Koelsch, Qingzhao Zhang, Mike Swiatkowski, Melissa Mathias, et al. 2009. "Functional Anergy in a Subpopulation of Naive B Cells from Healthy Humans That Express Autoreactive Immunoglobulin Receptors." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 139–51. <https://doi.org/10.1084/jem.20080611>.
104. Ebert, Lisa M., Michael P. Horn, Alois B. Lang, and Bernhard Moser. 2004. "B Cells Alter the Phenotype and Function of Follicular-Homing CXCR5+ T Cells." *European Journal of Immunology* 34 (12): 3562–71. <https://doi.org/10.1002/eji.200425478>.
105. Edwards, Jonathan C. W., Leszek Szczepanski, Jacek Szechinski, Anna Filipowicz-Sosnowska, Paul Emery, David R. Close, Randall M. Stevens, and Tim Shaw. 2004. "Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis." *The New England Journal of Medicine* 350 (25): 2572–81. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032534>.
106. Ehrlich, Paul. 1906. *Collected Studies on Immunity*. 1st ed. 1st thousand. New York: J. Wiley & sons.
107. Ehrlichn Paul. 1997. "Croonian Lecture. On Immunity with Special Reference to Cell Life." *Proceedings of the Royal Society of London* 66 (424–433): 424–48. <https://doi.org/10.1098/rspl.1899.0121>.
108. Elsner, Rebecca A., and Mark J. Shlomchik. 2019. "IL-12 Blocks Tfh Cell Differentiation during Salmonella Infection, Thereby Contributing to Germinal Center Suppression." *Cell Reports* 29 (9): 2796–2809.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.069>.
109. Elsner, Rebecca A., and Mark J. 2020. "Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity." *Immunity* 53 (6): 1136–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.006>.
110. Emmi, Giacomo, Alessandra Bettiol, Boaz Palterer, Elena Silvestri, Gianfranco Vitiello, Paola Parronchi, and Domenico Prisco. 2019. "Belimumab Reduces Antiphospholipid Antibodies in SLE Patients Independently of Hydroxychloroquine Treatment." *Autoimmunity Reviews* 18 (3): 312–14. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.11.002>.
111. Enders, Anselm, Philippe Bouillet, Hamsa Puthalakath, Yuekang Xu, David M. Tarlinton, and Andreas Strasser. 2003. "Loss of the Pro-Apoptotic BH3-Only Bcl-2 Family Member Bim Inhibits BCR Stimulation-Induced Apoptosis and Deletion of Autoreactive B Cells."

- The Journal of Experimental Medicine* 198 (7): 1119–26.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030411>.
112. Erkan, Doruk, JoAnn Vega, Glendalee Ramón, Elizabeth Kozora, and Michael D. Lockshin. 2013. "A Pilot Open-Label Phase II Trial of Rituximab for Non-Criteria Manifestations of Antiphospholipid Syndrome." *Arthritis & Rheumatism* 65 (2): 464–71.
<https://doi.org/10.1002/art.37759>.
 113. Ersching, Jonatan, Alejo Efeyan, Luka Mesin, Johanne T. Jacobsen, Giulia Pasqual, Brian C. Grabiner, David Dominguez-Sola, David M. Sabatini, and Gabriel D. Victora. 2017. "Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase." *Immunity* 46 (6): 1045–1058.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.005>.
 114. Eskandarian, Zoya, Manfred Fliegau, Alla Bulashevskaya, Michele Proietti, Rosie Hague, Cristian Roberto Smulski, Desirée Schubert, Klaus Warnatz, and Bodo Grimbacher. 2019. "Assessing the Functional Relevance of Variants in the IKAROS Family Zinc Finger Protein 1 (IKZF1) in a Cohort of Patients With Primary Immunodeficiency." *Frontiers in Immunology* 10: 568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00568>.
 115. Espéli, Marion, Rachael Bashford-Rogers, John M. Sowerby, Nagham Alouche, Limy Wong, Alice E. Denton, Michelle A. Linterman, and Kenneth G. C. Smith. 2019. "FcγRIIb Differentially Regulates Pre-Immune and Germinal Center B Cell Tolerance in Mouse and Human." *Nature Communications* 10 (1): 1970. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09434-0>.
 116. Ferri, Dario M., Carol Nassar, Kieran P. Manion, Michael Kim, Yuriy Baglaenko, Carolina Muñoz-Grajales, and Joan E. Wither. 2023. "Elevated Levels of Interferon-α Act Directly on B Cells to Breach Multiple Tolerance Mechanisms Promoting Autoantibody Production." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 75(9): 1542–1555.
<https://doi.org/10.1002/art.42482>.
 117. Figgett, William A., Devy Deliyanti, Kirsten A. Fairfax, Pin Shie Quah, Jennifer L. Wilkinson-Berka, and Fabienne Mackay. 2015. "Deleting the BAFF Receptor TACI Protects against Systemic Lupus Erythematosus without Extensive Reduction of B Cell Numbers." *Journal of Autoimmunity* 61: 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.007>.
 118. Figgett, William A., Kirsten Fairfax, Fabien B. Vincent, Mélanie A. Le Page, Indzi Katik, Devy Deliyanti, Pin Shie Quah, et al. 2013. "The TACI Receptor Regulates T-Cell-Independent Marginal Zone B Cell Responses through Innate Activation-Induced Cell Death." *Immunity* 39 (3): 573–83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.019>.
 119. Finklin, Shlomo, Harald Hartweg, Thiago Y. Oliveira, Ervin E. Kara, and Michel C. Nussenzweig. 2019. "Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity." *Immunity* 51 (2): 324–336.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.013>.
 120. Fonseca, Válder R., Filipa Ribeiro, and Luis Graca. 2019. "T Follicular Regulatory (Tfr) Cells: Dissecting the Complexity of Tfr-Cell Compartments." *Immunological Reviews* 288 (1): 112–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12739>.
 121. Foreman, Angela Lee, Judy Van de Water, Marie-Lise Gougeon, and M. Eric Gershwin. 2007. "B Cells in Autoimmune Diseases: Insights from Analyses of Immunoglobulin

- Variable (Ig V) Gene Usage." *Autoimmunity Reviews* 6 (6): 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.12.005>.
122. Francis, Olivia L, Jonathon L Payne, Rui-Jun Su, and Kimberly J Payne. 2011. "Regulator of Myeloid Differentiation and Function: The Secret Life of Ikaros." *World Journal of Biological Chemistry* 2 (6): 119–25. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i6.119>.
 123. Fraser, Louise D., Yuan Zhao, Pamela M. K. Lutalo, David P. D'Cruz, John Cason, Joselli S. Silva, Deborah K. Dunn-Walters, Saba Nayar, Andrew P. Cope, and Jo Spencer. 2015. "Immunoglobulin Light Chain Allelic Inclusion in Systemic Lupus Erythematosus." *European Journal of Immunology* 45 (8): 2409–19. <https://doi.org/10.1002/eji.201545599>.
 124. Fulcher, D. A., and A. Basten. 1994. "Reduced Life Span of Anergic Self-Reactive B Cells in a Double-Transgenic Model." *The Journal of Experimental Medicine* 179 (1): 125–34. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.125>.
 125. Galli, Monica, Davide Luciani, Guido Bertolini, and Tiziano Barbui. 2003. "Lupus Anticoagulants Are Stronger Risk Factors for Thrombosis than Anticardiolipin Antibodies in the Antiphospholipid Syndrome: A Systematic Review of the Literature." *Blood* 101 (5): 1827–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0441>.
 126. Garcia, David, and Doruk Erkan. 2018. "Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome." Edited by Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 378 (21): 2010–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705454>.
 127. García de Vinuesa, C., P. O'Leary, D. M. Sze, K. M. Toellner, and I. C. MacLennan. 1999. "T-Independent Type 2 Antigens Induce B Cell Proliferation in Multiple Splenic Sites, but Exponential Growth Is Confined to Extrafollicular Foci." *European Journal of Immunology* 29 (4): 1314–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199904\)29:04<1314::AID-IMMU1314>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1314::AID-IMMU1314>3.0.CO;2-4).
 128. Garcia-Carmona, Yolanda, Adrian T. Ting, Lin Radigan, Sai Krishna Athuluri Divakar, Jose Chavez, Eric Meffre, Andrea Cerutti, and Charlotte Cunningham-Rundles. 2018. "TACI Isoforms Regulate Ligand Binding and Receptor Function." *Frontiers in Immunology* 9: 2125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02125>.
 129. Garimalla, Swetha, Doan C. Nguyen, Jessica L. Halliley, Christopher Tipton, Alexander F. Rosenberg, Christopher F. Fucile, Celia L. Saney, et al. 2019. "Differential Transcriptome and Development of Human Peripheral Plasma Cell Subsets." *JCI Insight* 4 (9): e126732, 126732. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126732>.
 130. Gatto, Dominique, Didrik Paus, Antony Basten, Charles R. Mackay, and Robert Brink. 2009. "Guidance of B Cells by the Orphan G Protein-Coupled Receptor EBI2 Shapes Humoral Immune Responses." *Immunity* 31 (2): 259–69. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.016>.
 131. Gay, D., T. Saunders, S. Camper, and M. Weigert. 1993. "Receptor Editing: An Approach by Autoreactive B Cells to Escape Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 177 (4): 999–1008. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.999>.
 132. Gent, D. C. van, K. Mizuuchi, and M. Gellert. 1996. "Similarities between Initiation of V(D)J Recombination and Retroviral Integration." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5255): 1592–94. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1592>.

133. Getahun, Andrew. 2022. "Role of Inhibitory Signaling in Peripheral B Cell Tolerance*." *Immunological Reviews* 307 (1): 27–42. <https://doi.org/10.1111/imr.13070>.
134. Getahun, Andrew, Nicole A. Beavers, Sandy R. Larson, Mark J. Shlomchik, and John C. Cambier. 2016. "Continuous Inhibitory Signaling by Both SHP-1 and SHIP-1 Pathways Is Required to Maintain Unresponsiveness of Anergic B Cells." *Journal of Experimental Medicine* 213 (5): 751–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20150537>.
135. Gies, Vincent, Nassima Bekaddour, Yannick Dieudonné, Aurélien Guffroy, Quentin Frenger, Frédéric Gros, Mathieu Paul Rodero, Jean-Philippe Herbeuval, and Anne-Sophie Korganow. 2020. "Beyond Anti-Viral Effects of Chloroquine/Hydroxychloroquine." *Frontiers in Immunology* 11: 1409. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01409>.
136. Gies, Vincent, Jean-Nicolas Schickel, Sophie Jung, Aurélie Joublin, Salomé Glauzy, Anne-Marie Knapp, Anne Soley, et al. 2018. "Impaired TLR9 Responses in B Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *JCI Insight* 3 (5): e96795. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96795>.
137. Giles, Ian, Nancy Lambrianides, Nisha Pattni, David Faulkes, David Latchman, Pojen Chen, Silvia Pierangeli, David Isenberg, and Anisur Rahman. 2006. "Arginine Residues Are Important in Determining the Binding of Human Monoclonal Antiphospholipid Antibodies to Clinically Relevant Antigens." *The Journal of Immunology* 177 (3): 1729–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1729>.
138. Giles, Ian P., Joanna D. Haley, Sylvia Nagl, David A. Isenberg, David S. Latchman, and Anisur Rahman. 2003. "A Systematic Analysis of Sequences of Human Antiphospholipid and Anti-B2-Glycoprotein I Antibodies: The Importance of Somatic Mutations and Certain Sequence Motifs." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 32 (4): 246–65. <https://doi.org/10.1053/sarh.2003.49994>.
139. Giltiay, Natalia V., Craig P. Chappell, Xizhang Sun, Nikita Kolhatkar, Thomas H. Teal, Alice E. Wiedeman, Jinoh Kim, et al. 2013. "Overexpression of TLR7 Promotes Cell-Intrinsic Expansion and Autoantibody Production by Transitional T1 B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (12): 2773–89. <https://doi.org/10.1084/jem.20122798>.
140. Glaros, Vassilis, René Rauschmeier, Artem V. Artemov, Annika Reinhardt, Sebastian Ols, Aikaterini Emmanouilidi, Charlotte Gustafsson, et al. 2021. "Limited Access to Antigen Drives Generation of Early B Cell Memory While Restraining the Plasmablast Response." *Immunity* 54 (9): 2005–2023.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.017>.
141. Glass, David R., Albert G. Tsai, John Paul Oliveria, Felix J. Hartmann, Samuel C. Kimmey, Ariel A. Calderon, Luciene Borges, et al. 2020. "An Integrated Multi-Omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity." *Immunity* 53 (1): 217–232.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.013>.
142. Glauzy, Brennan Olson, Christopher K. May, Daniele Parisi, Christopher Massad, James E. Hansen, Changwan Ryu, Erica L. Herzog, and Eric Meffre. 2022. "Defective Early B Cell Tolerance Checkpoints in Patients With Systemic Sclerosis Allow the Production of Self Antigen-Specific Clones." *Arthritis & Rheumatology* 74 (2): 307–17. <https://doi.org/10.1002/art.41927>.
143. Glauzy, Salomé, Joel Sng, Jason M. Bannock, Jacques-Eric Gottenberg, Anne-Sophie Korganow, Patrice Cacoub, David Saadoun, and Eric Meffre. 2017. "Defective Early B Cell

- Tolerance Checkpoints in Sjögren's Syndrome Patients." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 69 (11): 2203–8. <https://doi.org/10.1002/art.40215>.
144. Goldman, Frederick D., Zafer Gurel, Duha Al-Zubeidi, Ari J. Fried, Michael Icardi, Chunhua Song, and Sinisa Dovat. 2012. "Congenital Pancytopenia and Absence of B Lymphocytes in a Neonate with a Mutation in the Ikaros Gene." *Pediatric Blood & Cancer* 58 (4): 591–97. <https://doi.org/10.1002/pbc.23160>.
 145. Gomez-Bañuelos, Eduardo, Yikai Yu, Jessica Li, Kevin S. Cashman, Merlin Paz, Maria Isabel Trejo-Zambrano, Regina Bugrovsky, et al. 2023. "Affinity Maturation Generates Pathogenic Antibodies with Dual Reactivity to DNase1L3 and dsDNA in Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Communications* 14 (1): 1388. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37083-x>.
 146. Goodnow. 2007. "Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease." *Cell* 130 (1): 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.033>.
 147. Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, and K. Raphael. 1988. "Altered Immunoglobulin Expression and Functional Silencing of Self-Reactive B Lymphocytes in Transgenic Mice." *Nature* 334 (6184): 676–82. <https://doi.org/10.1038/334676a0>.
 148. Goodnow, Christopher C. 2007. "Nossal and Pike 1975: A Turning Point in the Effort to Define Self-Tolerance Mechanisms." *The Journal of Immunology* 179 (9): 5617–18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5617>.
 149. Goodnow, Christopher C., Jonathon Sprent, Barbara Fazekas de St Groth, and Carola G. Vinuesa. 2005. "Cellular and Genetic Mechanisms of Self Tolerance and Autoimmunity." *Nature* 435 (7042): 590–97. <https://doi.org/10.1038/nature03724>.
 150. Greaves, Sarah A., Jacob N. Peterson, Pamela Strauch, Raul M. Torres, and Roberta Pelanda. 2019. "Active PI3K Abrogates Central Tolerance in High-Avidity Autoreactive B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 216 (5): 1135–53. <https://doi.org/10.1084/jem.20181652>.
 151. Groom, Joanna R., Carrie A. Fletcher, Stacey N. Walters, Shane T. Grey, Sally V. Watt, Mathew J. Sweet, Mark J. Smyth, Charles R. Mackay, and Fabienne Mackay. 2007. "BAFF and MyD88 Signals Promote a Lupuslike Disease Independent of T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 204 (8): 1959–71. <https://doi.org/10.1084/jem.20062567>.
 152. Groot, P. G. De, B. Lutters, R. H. W. M. Derksen, T. Lisman, J. C. M. Meijers, and F. R. Rosendaal. 2005. "Lupus Anticoagulants and the Risk of a First Episode of Deep Venous Thrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (9): 1993–97. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01485.x>.
 153. Gross, J. A., J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S. R. Dillon, K. Madden, W. Xu, et al. 2000. "TACI and BCMA Are Receptors for a TNF Homologue Implicated in B-Cell Autoimmune Disease." *Nature* 404 (6781): 995–99. <https://doi.org/10.1038/35010115>.
 154. Groth, Daniel J., Madhavi M. Lakkaraja, Johanna O. Ferreira, Elizabeth J. Feuille, Jennifer A. Bassetti, and Shipra M. Kaicker. 2020. "Management of Chronic Immune Thrombocytopenia and Presumed Autoimmune Hepatitis in a Child with IKAROS Haploinsufficiency." *Journal of Clinical Immunology* 40 (4): 653–57. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00781-y>.

155. Hägglöf, Thomas, Melissa Cipolla, Maximilian Loewe, Spencer T. Chen, Luka Mesin, Harald Hartweger, Mohamed A. ElTanbouly, et al. 2023. "Continuous Germinal Center Invasion Contributes to the Diversity of the Immune Response." *Cell* 186 (1): 147-161.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.032>.
156. Halliley, Jessica L., Christopher M. Tipton, Jane Liesveld, Alexander F. Rosenberg, Jaime Darce, Ivan V. Gregoretti, Lana Popova, et al. 2015. "Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19–CD38hiCD138+ Subset in Human Bone Marrow." *Immunity* 43 (1): 132–45. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.016>.
157. Han, Jian-Wen, Hou-Feng Zheng, Yong Cui, Liang-Dan Sun, Dong-Qing Ye, Zhi Hu, Jin-Hua Xu, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study in a Chinese Han Population Identifies Nine New Susceptibility Loci for Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Genetics* 41 (11): 1234–37. <https://doi.org/10.1038/ng.472>.
158. Hargreaves, Diana C., Paul L. Hyman, Theresa T. Lu, Vu N. Ngo, Afshin Bidgol, Gen Suzuki, Yong-Rui Zou, Dan R. Littman, and Jason G. Cyster. 2001. "A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (1): 45–56.
159. Hartl, Johannes, Lee Serpas, Yueyang Wang, Ali Rashidfarrokhi, Oriana A. Perez, Benjamin Sally, Vanja Sisirak, et al. 2021. "Autoantibody-Mediated Impairment of DNASE1L3 Activity in Sporadic Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Experimental Medicine* 218 (5): e20201138. <https://doi.org/10.1084/jem.20201138>.
160. Hartley, S. B., M. P. Cooke, D. A. Fulcher, A. W. Harris, S. Cory, A. Basten, and C. C. Goodnow. 1993. "Elimination of Self-Reactive B Lymphocytes Proceeds in Two Stages: Arrested Development and Cell Death." *Cell* 72 (3): 325–35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90111-3).
161. Hartley, Suzanne B., Jeffrey Crosbie, Robert Brink, Aaron B. Kantor, Antony Basten, and Christopher C. Goodnow. 1991. "Elimination from Peripheral Lymphoid Tissues of Self-Reactive B Lymphocytes Recognizing Membrane-Bound Antigens." *Nature* 353 (6346): 765–69. <https://doi.org/10.1038/353765a0>.
162. Hauser, Anja E., Gudrun F. Debes, Sergio Arce, Giuliana Cassese, Alf Hamann, Andreas Radbruch, and Rudolf A. Manz. 2002. "Chemotactic Responsiveness toward Ligands for CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts during the Time Course of a Memory Immune Response." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (3): 1277–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1277>.
163. He, Bing, Raul Santamaria, Weifeng Xu, Montserrat Cols, Kang Chen, Irene Puga, Meimei Shan, et al. 2010. "The Transmembrane Activator TACI Triggers Immunoglobulin Class Switching by Activating B Cells through the Adaptor MyD88." *Nature Immunology* 11 (9): 836–45. <https://doi.org/10.1038/ni.1914>.
164. Heath, Emily, Noelia Begue-Pastor, Sridhar Chaganti, Debbie Croom-Carter, Claire Shannon-Lowe, Dieter Kube, Regina Feederle, Henri-Jacques Delecluse, Alan B. Rickinson, and Andrew I. Bell. 2012. "Epstein-Barr Virus Infection of Naïve B Cells In Vitro Frequently Selects Clones with Mutated Immunoglobulin Genotypes: Implications for Virus Biology." *PLOS Pathogens* 8 (5): e1002697. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002697>.

165. Heizmann, Beate, Philippe Kastner, and Susan Chan. 2013. "Ikaros Is Absolutely Required for Pre-B Cell Differentiation by Attenuating IL-7 Signals." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (13): 2823–32. <https://doi.org/10.1084/jem.20131735>.
166. Henley, Thomas, Dorottya Kovesdi, and Martin Turner. 2008. "B-Cell Responses to B-Cell Activation Factor of the TNF Family (BAFF) Are Impaired in the Absence of PI3K Delta." *European Journal of Immunology* 38 (12): 3543–48. <https://doi.org/10.1002/eji.200838618>.
167. Hisada, Ryo, Masaru Kato, Eri Sugawara, Masatoshi Kanda, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, et al. 2019. "Circulating Plasmablasts Contribute to Antiphospholipid Antibody Production, Associated with Type I Interferon Upregulation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 17 (7): 1134–43. <https://doi.org/10.1111/jth.14427>.
168. Hoshino, Akihiro, David Boutboul, Yuan Zhang, Hye Sun Kuehn, Jérôme Hadjadj, Nihal Özdemir, Tiraje Celkan, et al. 2022. "Gain-of-Function IKZF1 Variants in Humans Cause Immune Dysregulation Associated with Abnormal T/B Cell Late Differentiation." *Science Immunology* 7 (69): eabi7160. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi7160>.
169. Hoshino, Akihiro, Satoshi Okada, Kenichi Yoshida, Naonori Nishida, Yusuke Okuno, Hiroo Ueno, Motoi Yamashita, et al. 2017. "Abnormal Hematopoiesis and Autoimmunity in Human Subjects with Germline IKZF1 Mutations." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (1): 223–31. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.029>.
170. Huang, Haochu, John F. Kearney, Michael J. Grusby, Christophe Benoist, and Diane Mathis. 2006. "Induction of Tolerance in Arthritogenic B Cells with Receptors of Differing Affinity for Self-Antigen." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3734–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600214103>.
171. Huang, Hsin-Ying, Ana Rivas-Caicedo, François Renevey, Hélène Cannelle, Elisa Peranzoni, Leonardo Scarpellino, Debbie L. Hardie, et al. 2018. "Identification of a New Subset of Lymph Node Stromal Cells Involved in Regulating Plasma Cell Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (29): E6826–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712628115>.
172. Hwang, Sun-Hee, Huiyin Lee, Miwako Yamamoto, Leigh A. Jones, Jivanaah Dayalan, Richard Hopkins, Xin J. Zhou, et al. 2012. "B Cell TLR7 Expression Drives Anti-RNA Autoantibody Production and Exacerbates Disease in Systemic Lupus Erythematosus-Prone Mice." *The Journal of Immunology* 189 (12): 5786–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202195>.
173. Inoue, Takeshi, and Tomohiro Kurosaki. 2023. "Memory B Cells." *Nature Reviews Immunology*, July, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00897-3>.
174. Ise, Wataru, Takeshi Inoue, James B. McLachlan, Kohei Kometani, Masato Kubo, Takaharu Okada, and Tomohiro Kurosaki. 2014. "Memory B Cells Contribute to Rapid Bcl6 Expression by Memory Follicular Helper T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (32): 11792–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404671111>.
175. Ise, Wataru, and Tomohiro Kurosaki. 2019. "Plasma Cell Differentiation during the Germinal Center Reaction." *Immunological Reviews* 288 (1): 64–74. <https://doi.org/10.1111/imr.12751>.

176. Isenberg, D., M. Spellerberg, W. Williams, M. Griffiths, and F. Stevenson. 1993. "Identification of the 9G4 Idiotope in Systemic Lupus Erythematosus." *British Journal of Rheumatology* 32 (10): 876–82. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/32.10.876>.
177. Isho, Baweleta, Alexandra Florescu, Angela A. Wang, and Jennifer L. Gommerman. 2021. "Fantastic IgA Plasma Cells and Where to Find Them." *Immunological Reviews* 303 (1): 119–37. <https://doi.org/10.1111/imr.12980>.
178. Isnardi, Isabelle, Yen-Shing Ng, Iva Srdanovic, Roja Motaghedi, Sergei Rudchenko, Horst von Bernuth, Shen-Ying Zhang, et al. 2008. "IRAK-4/MyD88-Dependent Pathways Are Essential for the Removal of Developing Autoreactive B Cells in Humans." *Immunity* 29 (5): 746. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.015>.
179. Jackson, Shaun W, and Anne Davidson. 2019. "BAFF Inhibition in SLE—Is Tolerance Restored?" *Immunological Reviews* 292 (1): 102–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12810>.
180. Jackson, Shaun W., Nicole E. Scharping, Nikita S. Kolhatkar, Socheath Khim, Marc A. Schwartz, Quan-Zhen Li, Kelly L. Hudkins, Charles E. Alpers, Denny Liggitt, and David J. Rawlings. 2014. "Opposing Impact of B Cell-Intrinsic TLR7 and TLR9 Signals on Autoantibody Repertoire and Systemic Inflammation." *The Journal of Immunology* 192 (10): 4525–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400098>.
181. Jacobs, Holly M., Christopher D. Thouvenel, Sarah Leach, Tanvi Arkatkar, Genita Metzler, Nicole E. Scharping, Nikita S. Kolhatkar, David J. Rawlings, and Shaun W. Jackson. 2016. "Cutting Edge: BAFF Promotes Autoantibody Production via TACI-Dependent Activation of Transitional B Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (9): 3525–31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600017>.
182. James, J. A., T. Gross, R. H. Scofield, and J. B. Harley. 1995. "Immunoglobulin Epitope Spreading and Autoimmune Disease after Peptide Immunization: Sm B/B'-Derived PPPGMRPP and PPPGIRGP Induce Spliceosome Autoimmunity." *The Journal of Experimental Medicine* 181 (2): 453–61. <https://doi.org/10.1084/jem.181.2.453>.
183. Janda, Ales, Klaus Schwarz, Mirjam van der Burg, Werner Vach, Hanna Ijspeert, Myriam Ricarda Lorenz, Magdeldin Elgizouli, et al. 2016. "Disturbed B-Lymphocyte Selection in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome." *Blood* 127 (18): 2193–2202. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-642488>.
184. Jenks, Scott A., Kevin S. Cashman, Matthew C. Woodruff, F. Eun-Hyung Lee, and Ignacio Sanz. 2019. "Extrafollicular Responses in Humans and SLE." *Immunological Reviews* 288 (1): 136–48. <https://doi.org/10.1111/imr.12741>.
185. Jenks, Scott A., Kevin S. Cashman, Esther Zumaquero, Urko M. Marigorta, Aakash V. Patel, Xiaoqian Wang, Deepak Tomar, et al. 2018. "Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus." *Immunity* 49 (4): 725–739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>.
186. Jiang, Simon H., Vicki Athanasopoulos, Julia I. Ellyard, Aaron Chuah, Jean Cappello, Amelia Cook, Savit B. Prabhu, et al. 2019. "Functional Rare and Low Frequency Variants in BLK and BANK1 Contribute to Human Lupus." *Nature Communications* 10 (1): 2201. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10242-9>.
187. Jones, Derek D., Brian T. Gaudette, Joel R. Wilmore, Irene Chernova, Alexandra Bortnick, Brendan M. Weiss, and David Allman. 2016. "mTOR Has Distinct Functions in Generating

- versus Sustaining Humoral Immunity." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (11): 4250–61. <https://doi.org/10.1172/JCI86504>.
188. Kahn, Philip, Meera Ramanujam, Ramalingam Bethunaickan, Weiqing Huang, Haiou Tao, Michael P. Madaio, Stephen M. Factor, and Anne Davidson. 2008. "Prevention of Murine Antiphospholipid Syndrome by BAFF Blockade." *Arthritis and Rheumatism* 58 (9): 2824–34. <https://doi.org/10.1002/art.23764>.
 189. Kalchschmidt, Jens S., Rachael Bashford-Rogers, Kostas Paschos, Adam C. T. Gillman, Christine T. Styles, Paul Kellam, and Martin J. Allday. 2016. "Epstein-Barr Virus Nuclear Protein EBNA3C Directly Induces Expression of AID and Somatic Mutations in B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 213 (6): 921–28. <https://doi.org/10.1084/jem.20160120>.
 190. Karnell, Jodi L., Varsha Kumar, Jingya Wang, Shu Wang, Elisaveta Voynova, and Rachel Ettinger. 2017. "Role of CD11c⁺ T-Bet⁺ B Cells in Human Health and Disease." *Cellular Immunology*, Special Issue: T-bet expressing B cells, 321: 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.008>.
 191. Kastner, Philippe, Arnaud Dupuis, Marie-Pierre Gaub, Raoul Herbrecht, Patrick Lutz, and Susan Chan. 2013. "Function of Ikaros as a Tumor Suppressor in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *American Journal of Blood Research* 3 (1): 1–13.
 192. Kawasaki, Aya, Hiroshi Furukawa, Yuya Kondo, Satoshi Ito, Taichi Hayashi, Makio Kusaoi, Isao Matsumoto, et al. 2011. "TLR7 Single-Nucleotide Polymorphisms in the 3' Untranslated Region and Intron 2 Independently Contribute to Systemic Lupus Erythematosus in Japanese Women: A Case-Control Association Study." *Arthritis Research & Therapy* 13 (2): R41. <https://doi.org/10.1186/ar3277>.
 193. Kay, Jonathan, and Katherine S. Upchurch. 2012. "ACR/EULAR 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria." *Rheumatology (Oxford, England)* 51 Suppl: vi5-9. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes279>.
 194. Keating, Rachael, Tomer Hertz, Marie Wehenkel, Tarsha L. Harris, Benjamin A. Edwards, Jennifer L. McClaren, Scott A. Brown, et al. 2013. "The Kinase mTOR Modulates the Antibody Response to Provide Cross-Protective Immunity to Lethal Infection with Influenza Virus." *Nature Immunology* 14 (12): 1266–76. <https://doi.org/10.1038/ni.2741>.
 195. Keller, Baerbel, Valentina Strohmeier, Ina Harder, Susanne Unger, Kathryn J. Payne, Geoffroy Andrieux, Melanie Boerries, et al. 2021. "The Expansion of Human T-Bet^{high} CD21^{low} B Cells Is T Cell Dependent." *Science Immunology* 6 (64): eabh0891. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abh0891>.
 196. Kellner, Erinn S., Christa Krupski, Hye Sun Kuehn, Sergio D. Rosenzweig, Nao Yoshida, Seiji Kojima, David Boutboul, et al. 2019. "Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Outcomes for Patients with Dominant Negative IKZF1/IKAROS Mutations." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 144 (1): 339–42. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.025>.
 197. Kenter, Amy L., Saurabh Priyadarshi, and Ellen B. Drake. 2023. "Locus Architecture and RAG Scanning Determine Antibody Diversity." *Trends in Immunology* 44 (2): 119–28. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.12.005>.
 198. Kerr, W. G., M. D. Cooper, L. Feng, P. D. Burrows, and L. M. Hendershot. 1989. "Mu Heavy Chains Can Associate with a Pseudo-Light Chain Complex (ψ L) in Human Pre-B Cell

- Lines." *International Immunology* 1 (4): 355–61.
<https://doi.org/10.1093/intimm/1.4.355>.
199. Kikuchi, Kazu, Anne Y. Lai, Chia-Lin Hsu, and Motonari Kondo. 2005. "IL-7 Receptor Signaling Is Necessary for Stage Transition in Adult B Cell Development through up-Regulation of EBF." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (8): 1197–1203.
<https://doi.org/10.1084/jem.20050158>.
 200. Kim, Min-Sung, Mikalai Lapkouski, Wei Yang, and Martin Gellert. 2015. "Crystal Structure of the V(D)J Recombinase RAG1-RAG2." *Nature* 518 (7540): 507–11.
<https://doi.org/10.1038/nature14174>.
 201. King, Hamish W., Nara Orban, John C. Riches, Andrew J. Clear, Gary Warnes, Sarah A. Teichmann, and Louisa K. James. 2021. "Single-Cell Analysis of Human B Cell Maturation Predicts How Antibody Class Switching Shapes Selection Dynamics." *Science Immunology* 6 (56): eabe6291. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe6291>.
 202. Kinnunen, Tuure, Nicolas Chamberlain, Henner Morbach, Jinyoung Choi, Sangtaek Kim, Joseph Craft, Lloyd Mayer, et al. 2013. "Accumulation of Peripheral Autoreactive B Cells in the Absence of Functional Human Regulatory T Cells." *Blood* 121 (9): 1595–1603.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457465>.
 203. Kirstetter, Peggy, Mireille Thomas, Andrée Dierich, Philippe Kastner, and Susan Chan. 2002. "Ikaros Is Critical for B Cell Differentiation and Function." *European Journal of Immunology* 32 (3): 720–30. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<720::AID-IMMU720>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<720::AID-IMMU720>3.0.CO;2-P).
 204. Kissel, Theresa, Changrong Ge, Lise Hafkenscheid, Joanneke C. Kwekkeboom, Linda M. Slot, Marco Cavallari, Yibo He, et al. 2022. "Surface Ig Variable Domain Glycosylation Affects Autoantigen Binding and Acts as Threshold for Human Autoreactive B Cell Activation." *Science Advances* 8 (6): eabm1759.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abm1759>.
 205. Knight, Jason S., D. Ware Branch, and Thomas L. Ortel. 2023. "Antiphospholipid Syndrome: Advances in Diagnosis, Pathogenesis, and Management." *BMJ* 380 (February): e069717. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069717>.
 206. Korbet, Stephen M., Melvin M. Schwartz, Joni Evans, Edmund J. Lewis, and for the Collaborative Study Group. 2007. "Severe Lupus Nephritis: Racial Differences in Presentation and Outcome." *Journal of the American Society of Nephrology* 18 (1): 244.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006090992>.
 207. Korganow, Anne-Sophie, Anne-Marie Knapp, Hélène Nehme-Schuster, Pauline Soulas-Sprauel, Vincent Poindron, Jean-Louis Pasquali, and Thierry Martin. 2010. "Peripheral B Cell Abnormalities in Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Quiescent Phase: Decreased Memory B Cells and Membrane CD19 Expression." *Journal of Autoimmunity* 34 (4): 426–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.002>.
 208. Kuehn, Brigitte Boast, and Sergio D. Rosenzweig. 2023. "Inborn Errors of Human IKAROS: LOF and GOF Variants Associated with Primary Immunodeficiency." *Clinical and Experimental Immunology* 212 (2): 129–36. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac109>.
 209. Kuehn, H. S., B. Boisson, C. Cunningham-Rundles, J. Reichenbach, A. Stray-Pedersen, E. W. Gelfand, P. Maffucci, et al. 2016. "Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS." *The New England Journal of Medicine* 374 (11): 1032–43.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512234>.

210. Kuehn, Hye Sun, Cristiane J. Nunes-Santos, and Sergio D. Rosenzweig. 2021. "IKAROS-Associated Diseases in 2020: Genotypes, Phenotypes, and Outcomes in Primary Immune Deficiency/Inborn Errors of Immunity." *Journal of Clinical Immunology* 41 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00936-x>.
211. Kuehn, Julie E. Niemela, Jennifer Stoddard, Sara Ciullini Mannurita, Tala Shahin, Shubham Goel, Mary Hintermeyer, et al. 2020. "Germline IKAROS Dimerization Haploinsufficiency Causes Hematologic Cytopenias and Malignancies." *Blood* 137(3): 349–363. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007292>.
212. Kuhn, Kristine A., Liudmila Kulik, Beren Tomooka, Kristin J. Braschler, William P. Arend, William H. Robinson, and V. Michael Holers. 2006. "Antibodies against Citrullinated Proteins Enhance Tissue Injury in Experimental Autoimmune Arthritis." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (4): 961–73. <https://doi.org/10.1172/JCI25422>.
213. Kuraoka, Masayuki, Eric Meffre, and Garnett Kelsoe. 2018. "The First B-Cell Tolerance Checkpoint in Mice and Humans: Control by AID." *Advances in Immunology* 139: 51–92. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.04.001>.
214. Kuraoka, Masayuki, Pilar B. Snowden, Takuya Nojima, Laurent Verkoczy, Barton F. Haynes, Daisuke Kitamura, and Garnett Kelsoe. 2017. "BCR and Endosomal TLR Signals Synergize to Increase AID Expression and Establish Central B Cell Tolerance." *Cell Reports* 18 (7): 1627–35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.050>.
215. Lam, Wing Y., Amy M. Becker, Krista M. Kennerly, Rachel Wong, Jonathan D. Curtis, Elizabeth M. Llufrío, Kyle S. McCommis, et al. 2016. "Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells." *Immunity* 45 (1): 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.011>.
216. Lamagna, Chrystelle, Yongmei Hu, Anthony L. DeFranco, and Clifford A. Lowell. 2014. "B Cell-Specific Loss of Lyn Kinase Leads to Autoimmunity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (3): 919–28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301979>.
217. Lang, Julie, Takayuki Ota, Margot Kelly, Pamela Strauch, Brian M. Freed, Raul M. Torres, David Nemazee, and Roberta Pelanda. 2016. "Receptor Editing and Genetic Variability in Human Autoreactive B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 213 (1): 93–108. <https://doi.org/10.1084/jem.20151039>.
218. Laplante, Mathieu, and David M. Sabatini. 2012. "mTOR Signaling in Growth Control and Disease." *Cell* 149 (2): 274–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
219. Leadbetter, Elizabeth A., Ian R. Rifkin, Andreas M. Hohlbaum, Britte C. Beaudette, Mark J. Shlomchik, and Ann Marshak-Rothstein. 2002. "Chromatin-IgG Complexes Activate B Cells by Dual Engagement of IgM and Toll-like Receptors." *Nature* 416 (6881): 603–7. <https://doi.org/10.1038/416603a>.
220. Lederberg, J. 1959. "Genes and Antibodies." *Science (New York, N.Y.)* 129 (3364): 1649–53. <https://doi.org/10.1126/science.129.3364.1649>.
221. Lee, Jae-Yun, Panos Stathopoulos, Sasha Gupta, Jason M. Bannock, Richard J. Barohn, Elizabeth Cotzomi, Mazen M. Dimachkie, et al. 2016. "Compromised Fidelity of B-Cell Tolerance Checkpoints in AChR and MuSK Myasthenia Gravis." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3 (6): 443–54. <https://doi.org/10.1002/acn3.311>.
222. Lee, Sau K., Robert J. Rigby, Dimitra Zotos, Louis M. Tsai, Shimpei Kawamoto, Jennifer L. Marshall, Roybel R. Ramiscal, et al. 2011. "B Cell Priming for Extrafollicular Antibody

- Responses Requires Bcl-6 Expression by T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (7): 1377–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20102065>.
223. Lefranc, Marie-Paule. 2014. "Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes: IMGT® and the Birth and Rise of Immunoinformatics." *Frontiers in Immunology* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00022>.
 224. Leibler, Claire, Shinu John, Rebecca A. Elsner, Kayla B. Thomas, Shuchi Smita, Stephen Joachim, Russell C. Levack, et al. 2022. "Genetic Dissection of TLR9 Reveals Complex Regulatory and Cryptic Proinflammatory Roles in Mouse Lupus." *Nature Immunology* 23 (10): 1457–69. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01310-2>.
 225. Li, Yan-Feng, Shengli Xu, Xijun Ou, and Kong-Peng Lam. 2014. "Shp1 Signalling Is Required to Establish the Long-Lived Bone Marrow Plasma Cell Pool." *Nature Communications* 5 (1): 4273. <https://doi.org/10.1038/ncomms5273>.
 226. Lieby, P., A. Soley, H. Levallois, B. Hugel, J. M. Freyssinet, M. Cerutti, J. L. Pasquali, and T. Martin. 2001. "The Clonal Analysis of Anticardiolipin Antibodies in a Single Patient with Primary Antiphospholipid Syndrome Reveals an Extreme Antibody Heterogeneity." *Blood* 97 (12): 3820–28. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3820>.
 227. Lieby, Patricia, Vincent Poindron, Stamatiki Roussi, Cyril Klein, Anne-Marie Knapp, Jean-Claude Garaud, Martine Cerutti, Thierry Martin, and Jean-Louis Pasquali. 2004. "Pathogenic Antiphospholipid Antibody: An Antigen-Selected Needle in a Haystack." *Blood* 104 (6): 1711–15. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0462>.
 228. Lieby, Patricia, Anne Soley, Anne-Marie Knapp, Martine Cerutti, Jean-Marie Freyssinet, Jean-Louis Pasquali, and Thierry Martin. 2003. "Memory B Cells Producing Somatically Mutated Antiphospholipid Antibodies Are Present in Healthy Individuals." *Blood* 102 (7): 2459–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0180>.
 229. Limon, Jose J., Lomon So, Stefan Jellbauer, Honyin Chiu, Juana Corado, Stephen M. Sykes, Manuela Raffatellu, and David A. Fruman. 2014. "mTOR Kinase Inhibitors Promote Antibody Class Switching via mTORC2 Inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (47): E5076–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407104111>.
 230. Lin, Wen-Hsuan W., William C. Adams, Simone A. Nish, Yen-Hua Chen, Bonnie Yen, Nyanza J. Rothman, Radomir Kratchmarov, Takaharu Okada, Ulf Klein, and Steven L. Reiner. 2015. "Asymmetric PI3K Signaling Driving Developmental and Regenerative Cell Fate Bifurcation." *Cell Reports* 13 (10): 2203–18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.072>.
 231. Lindquist, Randall L., Raluca A. Niesner, and Anja E. Hauser. 2019. "In the Right Place, at the Right Time: Spatiotemporal Conditions Determining Plasma Cell Survival and Function." *Frontiers in Immunology* 10: 788.
 232. Lino, Andreia C., Van Duc Dang, Vicky Lampropoulou, Anna Welle, Jara Joedicke, Jelka Pohar, Quentin Simon, et al. 2018. "LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells." *Immunity* 49 (1): 120–133.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.007>.
 233. Litinskiy, Mikhail B., Bernardetta Nardelli, David M. Hilbert, Bing He, Andras Schaffer, Paolo Casali, and Andrea Cerutti. 2002. "DCs Induce CD40-Independent Immunoglobulin Class Switching through BlyS and APRIL." *Nature Immunology* 3 (9): 822–29. <https://doi.org/10.1038/ni829>.

234. Liu, Dan, Heping Xu, Changming Shih, Zurong Wan, Xiaopeng Ma, Weiwei Ma, Dan Luo, and Hai Qi. 2015. "T-B-Cell Entanglement and ICOSL-Driven Feed-Forward Regulation of Germinal Centre Reaction." *Nature* 517 (7533): 214–18. <https://doi.org/10.1038/nature13803>.
235. Liu, Zheng, Ramalingam Bethunaickan, Weiqing Huang, Meera Ramanujam, Michael P. Madaio, and Anne Davidson. 2011. "IFN- α Confers Resistance of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis to Therapy in NZB/W F1 Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (3): 1506–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004142>.
236. Lobo, Elizabeth O, Zhifang Zhang, and John E Shively. 2009. "Pivotal Advance: CEACAM1 Is a Negative Coreceptor for the B Cell Receptor and Promotes CD19-Mediated Adhesion of B Cells in a PI3K-Dependent Manner." *Journal of Leukocyte Biology* 86 (2): 205–18. <https://doi.org/10.1189/jlb.0109037>.
237. Looney, R. John, Jennifer H. Anolik, Debbie Campbell, Raymond E. Felgar, Faith Young, Lois J. Arend, James A. Sloand, Joseph Rosenblatt, and Iñaki Sanz. 2004. "B Cell Depletion as a Novel Treatment for Systemic Lupus Erythematosus: A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Rituximab." *Arthritis and Rheumatism* 50 (8): 2580–89. <https://doi.org/10.1002/art.20430>.
238. Ludwig, Ralf J., Karen Vanhoorelbeke, Frank Leypoldt, Ziya Kaya, Katja Bieber, Sandra M. McLachlan, Lars Komorowski, et al. 2017. "Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology." *Frontiers in Immunology* 8: 603. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00603>.
239. Lund, Frances E. 2008. "Cytokine-Producing B Lymphocytes – Key Regulators of Immunity." *Current Opinion in Immunology* 20 (3): 332–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.003>.
240. Luo, Wei, Florian Weisel, and Mark J. Shlomchik. 2018. "B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the C-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells." *Immunity* 48 (2): 313–326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.008>.
241. Ma, Yunmei, Ulrich Pannicke, Klaus Schwarz, and Michael R. Lieber. 2002. "Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination." *Cell* 108 (6): 781–94. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2).
242. Mackay, Fabienne, Stephen A. Woodcock, Pornsri Lawton, Christine Ambrose, Manfred Baetscher, Pascal Schneider, Jurg Tschopp, and Jeffrey L. Browning. 1999. "Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (11): 1697–1710.
243. Mackensen, Andreas, Fabian Müller, Dimitrios Mougiakakos, Sebastian Böltz, Artur Wilhelm, Michael Aigner, Simon Völkl, et al. 2022. "Anti-CD19 CAR T Cell Therapy for Refractory Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Medicine* 28 (10): 2124–32. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02017-5>.
244. Maddison, P. J., and M. Reichlin. 1979. "Deposition of Antibodies to a Soluble Cytoplasmic Antigen in the Kidneys of Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis and Rheumatism* 22 (8): 858–63. <https://doi.org/10.1002/art.1780220808>.
245. Mahévas, Matthieu, Pauline Patin, François Huetz, Marc Descatoire, Nicolas Cagnard, Christine Bole-Feysot, Simon Le Gallou, et al. 2013. "B Cell Depletion in Immune

- Thrombocytopenia Reveals Splenic Long-Lived Plasma Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (1): 432–42. <https://doi.org/10.1172/JCI65689>.
246. Malle, Louise, Roosheel S. Patel, Marta Martin-Fernandez, O. Jay Stewart, Quentin Philpott, Sofija Buta, Ashley Richardson, et al. 2023. "Autoimmunity in Down's Syndrome via Cytokines, CD4 T Cells and CD11c+ B Cells." *Nature* 615 (7951): 305–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05736-y>.
 247. Manjarrez-Orduño, Nataly, Emiliano Marasco, Sharon A. Chung, Matthew S. Katz, Jenna F. Kiridly, Kim R. Simpfendorfer, Jan Freudenberg, et al. 2012. "CSK Regulatory Polymorphism Is Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Influences B-Cell Signaling and Activation." *Nature Genetics* 44 (11): 1227–30. <https://doi.org/10.1038/ng.2439>.
 248. Manzo, Antonio, Samantha Paoletti, Maresa Carulli, Mark C. Blades, Francesca Barone, Ghada Yanni, Oliver Fitzgerald, et al. 2005. "Systematic Microanatomical Analysis of CXCL13 and CCL21 in Situ Production and Progressive Lymphoid Organization in Rheumatoid Synovitis." *European Journal of Immunology* 35 (5): 1347–59. <https://doi.org/10.1002/eji.200425830>.
 249. Matsuda, F., K. Ishii, P. Bourvagnet, K. i Kuma, H. Hayashida, T. Miyata, and T. Honjo. 1998. "The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (11): 2151–62. <https://doi.org/10.1084/jem.188.11.2151>.
 250. Matthes, Thomas, Isabelle Dunand-Sauthier, Marie-Laure Santiago-Raber, Karl-Heinz Krause, Olivier Donze, Jakob Passweg, Tomas McKee, and Bertrand Huard. 2011. "Production of the Plasma-Cell Survival Factor a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) Peaks in Myeloid Precursor Cells from Human Bone Marrow." *Blood* 118 (7): 1838–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332940>.
 251. McGlothlin, John, Jithma Abeykoon, Eyad Al-Hattab, Aneel A. Ashrani, Michelle Elliott, C. Christopher Hook, Animesh Pardanani, et al. 2023. "Bortezomib and Daratumumab in Refractory Autoimmune Hemolytic Anemia." *American Journal of Hematology*, 98(10):E263-E265. <https://doi.org/10.1002/ajh.27025>.
 252. Meffre, E., M. Milili, C. Blanco-Betancourt, H. Antunes, M. C. Nussenzweig, and C. Schiff. 2001. "Immunoglobulin Heavy Chain Expression Shapes the B Cell Receptor Repertoire in Human B Cell Development." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 879–86. <https://doi.org/10.1172/JCI13051>.
 253. Meffre, Eric, and Kevin C. O'Connor. 2019. "Impaired B-Cell Tolerance Checkpoints Promote the Development of Autoimmune Diseases and Pathogenic Autoantibodies." *Immunological Reviews* 292 (1): 90–101. <https://doi.org/10.1111/imr.12821>.
 254. Melamed, D., R. J. Benshop, J. C. Cambier, and D. Nemazee. 1998. "Developmental Regulation of B Lymphocyte Immune Tolerance Compartmentalizes Clonal Selection from Receptor Selection." *Cell* 92 (2): 173–82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80912-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80912-5).
 255. Melamed, D., and D. Nemazee. 1997. "Self-Antigen Does Not Accelerate Immature B Cell Apoptosis, but Stimulates Receptor Editing as a Consequence of Developmental Arrest." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (17): 9267–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9267>.

256. Menard, Laurence, David Saadoun, Isabelle Isnardi, Yen-Shing Ng, Greta Meyers, Christopher Massad, Christina Price, et al. 2011. "The PTPN22 Allele Encoding an R620W Variant Interferes with the Removal of Developing Autoreactive B Cells in Humans." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9): 3635–44. <https://doi.org/10.1172/JCI45790>.
257. Menon, Madhvi, Paul A. Blair, David A. Isenberg, and Claudia Mauri. 2016. "A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus." *Immunity* 44 (3): 683–97. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.012>.
258. Meroni, Pier Luigi, M. Orietta Borghi, Elena Raschi, and Francesco Tedesco. 2011. "Pathogenesis of Antiphospholipid Syndrome: Understanding the Antibodies." *Nature Reviews Rheumatology* 7 (6): 330–39. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.52>.
259. Meroni, Pier Luigi, Maria Orietta Borghi, Claudia Grossi, Cecilia Beatrice Chighizola, Paolo Durigutto, and Francesco Tedesco. 2018. "Obstetric and Vascular Antiphospholipid Syndrome: Same Antibodies but Different Diseases?" *Nature Reviews Rheumatology* 14 (7): 433–40. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0032-6>.
260. Mesin, Luka, Jonatan Ersching, and Gabriel D. Victora. 2016. "Germinal Center B Cell Dynamics." *Immunity* 45 (3): 471–82. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>.
261. Mietzner, Brun, Makoto Tsuiji, Johannes Scheid, Klara Velinzon, Thomas Tiller, Klaus Abraham, Jose B. Gonzalez, et al. 2008. "Autoreactive IgG Memory Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Arise from Nonreactive and Polyreactive Precursors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (28): 9727–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803644105>.
262. Miyakis, S., M. D. Lockshin, T. Atsumi, D. W. Branch, R. L. Brey, R. Cervera, R. H. W. M. Derksen, et al. 2006. "International Consensus Statement on an Update of the Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome (APS)." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 4 (2): 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
263. Mohr, Elodie, Karine Serre, Rudolf A. Manz, Adam F. Cunningham, Mahmood Khan, Deborah L. Hardie, Roger Bird, and Ian C. M. MacLennan. 2009. "Dendritic Cells and Monocyte/Macrophages That Create the IL-6/APRIL-Rich Lymph Node Microenvironments Where Plasmablasts Mature." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (4): 2113–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802771>.
264. Moir, Susan, Jason Ho, Angela Malaspina, Wei Wang, Angela C. DiPoto, Marie A. O'Shea, Gregg Roby, et al. 2008. "Evidence for HIV-Associated B Cell Exhaustion in a Dysfunctional Memory B Cell Compartment in HIV-Infected Viremic Individuals." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (8): 1797–1805. <https://doi.org/10.1084/jem.20072683>.
265. Mond, J. J., A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. "T Cell-Independent Antigens Type 2." *Annual Review of Immunology* 13: 655–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.003255>.
266. Morand, Eric F., Richard A. Furie, Ian N. Bruce, Edward M. Vital, Maria Dall'Era, Emmanuelle Maho, Lilia Pineda, and Raj Tummala. 2022. "Efficacy of Anifrolumab across Organ Domains in Patients with Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus: A Post-Hoc Analysis of Pooled Data from the TULIP-1 and TULIP-2

- Trials." *The Lancet Rheumatology* 4 (4): e282–92. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00317-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00317-9).
267. Morbach, Henner, Jean-Nicolas Schickel, Charlotte Cunningham-Rundles, Mary Ellen Conley, Ismail Reisli, Jose Luis Franco, and Eric Meffre. 2016. "CD19 Controls Toll-like Receptor 9 Responses in Human B Cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (3): 889–898.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.040>.
 268. Müller-Calleja, N., A. Hollerbach, F. Häuser, A. Canisius, C. Orning, and K. J. Lackner. 2017. "Antiphospholipid Antibody-induced Cellular Responses Depend on Epitope Specificity : Implications for Treatment of Antiphospholipid Syndrome." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15 (12): 2367–76. <https://doi.org/10.1111/jth.13865>.
 269. Müller-Calleja, Nadine, Anne Hollerbach, Jennifer Royce, Svenja Ritter, Denise Pedrosa, Thati Madhusudhan, Sina Teifel, et al. 2021. "Lipid Presentation by the Protein C Receptor Links Coagulation with Autoimmunity." *Science* 371 (6534): eabc0956. <https://doi.org/10.1126/science.abc0956>.
 270. Mullighan, Charles G., Xiaoping Su, Jinghui Zhang, Ina Radtke, Letha A.A. Phillips, Christopher B. Miller, Jing Ma, et al. 2009. "Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia." *New England Journal of Medicine* 360 (5): 470–80. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808253>.
 271. Navarra, Sandra V., Renato M. Guzmán, Alberto E. Gallacher, Stephen Hall, Roger A. Levy, Renato E. Jimenez, Edmund K.-M. Li, et al. 2011. "Efficacy and Safety of Belimumab in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus: A Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 377 (9767): 721–31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61354-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61354-2).
 272. Nemazee, David. 2006. "Receptor Editing in Lymphocyte Development and Central Tolerance." *Nature Reviews Immunology* 6 (10): 728–40. <https://doi.org/10.1038/nri1939>.
 273. Nemazee, David. 2017. "Mechanisms of Central Tolerance for B Cells." *Nature Reviews Immunology* 17 (5): 281–94. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>.
 274. Ng, Yen-Shing, Hedda Wardemann, James Chelnis, Charlotte Cunningham-Rundles, and Eric Meffre. 2004. "Bruton's Tyrosine Kinase Is Essential for Human B Cell Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 200 (7): 927–34. <https://doi.org/10.1084/jem.20040920>.
 275. Nickerson, Kevin M., Sean R. Christensen, Jonathan Shupe, Michael Kashgarian, Daniel Kim, Keith Elkon, and Mark J. Shlomchik. 2010. "TLR9 Regulates TLR7- and MyD88-Dependent Autoantibody Production and Disease in a Murine Model of Lupus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (4): 1840–48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902592>.
 276. Niewold, Timothy B. 2015. "Advances in Lupus Genetics." *Current Opinion in Rheumatology* 27 (5): 440–47. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000205>.
 277. Nossal, G. J., and B. L. Pike. 1980. "Clonal Anergy: Persistence in Tolerant Mice of Antigen-Binding B Lymphocytes Incapable of Responding to Antigen or Mitogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (3): 1602–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1602>.

278. Nutt, Stephen L., and Barbara L. Kee. 2007. "The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment." *Immunity* 26 (6): 715–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.010>.
279. Nutt, Stephen L., Nadine Taubenheim, Jhagvaral Hasbold, Lynn M. Corcoran, and Philip D. Hodgkin. 2011. "The Genetic Network Controlling Plasma Cell Differentiation." *Seminars in Immunology* 23 (5): 341–49. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.08.010>.
280. Obukhanych, Tetyana V., and Michel C. Nussenzweig. 2006. "T-Independent Type II Immune Responses Generate Memory B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (2): 305–10. <https://doi.org/10.1084/jem.20052036>.
281. Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. "RAG-1 and RAG-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination." *Science (New York, N.Y.)* 248 (4962): 1517–23. <https://doi.org/10.1126/science.2360047>.
282. Olatunde, Adesola C., J. Scott Hale, and Tracey J. Lamb. 2021. "Cytokine-Skewed Tfh Cells: Functional Consequences for B Cell Help." *Trends in Immunology* 42 (6): 536–50. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.04.006>.
283. Ostendorf, Lennard, Marie Burns, Pawel Durek, Gitta Anne Heinz, Frederik Heinrich, Panagiotis Garantziotis, Philipp Enghard, et al. 2020. "Targeting CD38 with Daratumumab in Refractory Systemic Lupus Erythematosus." *The New England Journal of Medicine* 383 (12): 1149–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023325>.
284. Palanichamy, Arumugam. 2014. "Immunoglobulin Class-Switched B Cells Form an Active Immune Axis between CNS and Periphery in Multiple Sclerosis." *Science Translational Medicine* 6 (248). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008930>.
285. Palanichamy, Arumugam, Jennifer Barnard, Bo Zheng, Teresa Owen, Tam Quach, Chungwen Wei, R. John Looney, Iñaki Sanz, and Jennifer H. Anolik. 2009. "Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy." *The Journal of Immunology* 182 (10): 5982–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>.
286. Palanichamy, Arumugam, Jason W. Bauer, Srilakshmi Yalavarthi, Nida Meednu, Jennifer Barnard, Teresa Owen, Christopher Cistrone, et al. 2014. "Neutrophil-Mediated IFN Activation in the Bone Marrow Alters B Cell Development in Human and Murine Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (3): 906–18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302112>.
287. Palli, Eleni, Evrydiki Kravvariti, and Maria G. Tektonidou. 2019. "Type I Interferon Signature in Primary Antiphospholipid Syndrome: Clinical and Laboratory Associations." *Frontiers in Immunology* 10: 487. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00487>.
288. Papathanasiou, Peter, Andrew C. Perkins, Bradley S. Cobb, Roger Ferrini, Rupa Sridharan, Gerard F. Hoyne, Keats A. Nelms, Stephen T. Smale, and Christopher C. Goodnow. 2003. "Widespread Failure of Hematolymphoid Differentiation Caused by a Recessive Niche-Filling Allele of the Ikaros Transcription Factor." *Immunity* 19 (1): 131–44. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00168-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00168-7).
289. Parkes, Miles, Adrian Cortes, David A. van Heel, and Matthew A. Brown. 2013. "Genetic Insights into Common Pathways and Complex Relationships among Immune-Mediated Diseases." *Nature Reviews Genetics* 14 (9): 661–73. <https://doi.org/10.1038/nrg3502>.

290. Pelanda, Roberta. 2014. "Dual Immunoglobulin Light Chain B Cells: Trojan Horses of Autoimmunity?" *Current Opinion in Immunology* 27: 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.012>.
291. Pelanda, Roberta, Sarah A. Greaves, Thiago Alves da Costa, Lena M. Cedrone, Margaret L. Campbell, and Raul M. Torres. 2022. "B-Cell Intrinsic and Extrinsic Signals That Regulate Central Tolerance of Mouse and Human B Cells*." *Immunological Reviews* 307 (1): 12–26. <https://doi.org/10.1111/imr.13062>.
292. Pengo, Alessandra Biasiolo, Cinzia Pegoraro, Umberto Cucchini, Franco Noventa, and Sabino Iliceto. 2005. "Antibody Profiles for the Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome." *Thrombosis and Haemostasis* 93 (06): 1147–52. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0839>.
293. Pengo, Amelia Ruffatti, Cristina Legnani, Sophie Testa, Tiziana Fierro, Francesco Marongiu, Valeria De Micheli, et al. 2011. "Incidence of a First Thromboembolic Event in Asymptomatic Carriers of High-Risk Antiphospholipid Antibody Profile: A Multicenter Prospective Study." *Blood* 118 (17): 4714–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340232>.
294. Pengo, V., A. Tripodi, G. Reber, J. H. Rand, T. L. Ortel, M. Galli, P. G. De Groot, and Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009. "Update of the Guidelines for Lupus Anticoagulant Detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 7 (10): 1737–40. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x>.
295. Peperzak, Victor, Ingela Vikström, Jennifer Walker, Stefan P. Glaser, Melanie LePage, Christine M. Coquery, Loren D. Erickson, et al. 2013. "Mcl-1 Is Essential for the Survival of Plasma Cells." *Nature Immunology* 14 (3): 290–97. <https://doi.org/10.1038/ni.2527>.
296. Pereira, João P., Lisa M. Kelly, Ying Xu, and Jason G. Cyster. 2009. "EBI2 Mediates B Cell Segregation between the Outer and Centre Follicle." *Nature* 460 (7259): 1122–26. <https://doi.org/10.1038/nature08226>.
297. Petri, Michelle. 2020. "Antiphospholipid Syndrome." *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 225: 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.006>.
298. Petro, James B., Rachel M. Gerstein, John Lowe, Robert S. Carter, Nicholas Shinnars, and Wasif N. Khan. 2002. "Transitional Type 1 and 2 B Lymphocyte Subsets Are Differentially Responsive to Antigen Receptor Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48009–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200305200>.
299. Pierangeli, Guillermina Girardi, Mariano Vega-Ostertag, Xiaowei Liu, Ricardo G. Espinola, and Jane Salmon. 2005. "Requirement of Activation of Complement C3 and C5 for Antiphospholipid Antibody-Mediated Thrombophilia." *Arthritis & Rheumatism* 52 (7): 2120–24. <https://doi.org/10.1002/art.21157>.
300. Pierangeli, M. E Vega-Ostertag, E. Raschi, X. Liu, Z. Romy-Penabad, V. De Micheli, M. Galli, et al. 2007. "Toll-like Receptor and Antiphospholipid Mediated Thrombosis: In Vivo Studies." *Annals of the Rheumatic Diseases* 66 (10): 1327–33. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.065037>.

301. Pinto, Dora, Erica Montani, Martin Bolli, Guido Garavaglia, Federica Sallusto, Antonio Lanzavecchia, and David Jarrossay. 2013. "A Functional BCR in Human IgA and IgM Plasma Cells." *Blood* 121 (20): 4110–14. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-459289>.
302. Pisitkun, Prapaporn, Jonathan A. Deane, Michael J. Difilippantonio, Tatyana Tarasenko, Anne B. Satterthwaite, and Silvia Bolland. 2006. "Autoreactive B Cell Responses to RNA-Related Antigens Due to TLR7 Gene Duplication." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5780): 1669–72. <https://doi.org/10.1126/science.1124978>.
303. Platt, Jeffrey L., Mayara Garcia de Mattos Barbosa, and Marilia Cascalho. 2019. "The Five Dimensions of B Cell Tolerance." *Immunological Reviews* 292 (1): 180–93. <https://doi.org/10.1111/imr.12813>.
304. Portugal, Silvia, Christopher M. Tipton, Haewon Sohn, Younoussou Kone, Jing Wang, Shanping Li, Jeff Skinner, et al. 2015. "Malaria-Associated Atypical Memory B Cells Exhibit Markedly Reduced B Cell Receptor Signaling and Effector Function." *eLife* 4: e07218. <https://doi.org/10.7554/eLife.07218>.
305. Prak, E. L., M. Trounstein, D. Huszar, and M. Weigert. 1994. "Light Chain Editing in Kappa-Deficient Animals: A Potential Mechanism of B Cell Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 180 (5): 1805–15. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1805>.
306. Pugh-Bernard, A. E., G. J. Silverman, A. J. Cappione, M. E. Villano, D. H. Ryan, R. A. Insel, and I. Sanz. 2001. "Regulation of Inherently Autoreactive VH4-34 B Cells in the Maintenance of Human B Cell Tolerance." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (7): 1061–70. <https://doi.org/10.1172/JCI12462>.
307. Pulendran, B., G. Kannourakis, S. Nouri, K. G. Smith, and G. J. Nossal. 1995. "Soluble Antigen Can Cause Enhanced Apoptosis of Germinal-Centre B Cells." *Nature* 375 (6529): 331–34. <https://doi.org/10.1038/375331a0>.
308. Purtha, Whitney E., Thomas F. Tedder, Syd Johnson, Deepta Bhattacharya, and Michael S. Diamond. 2011. "Memory B Cells, but Not Long-Lived Plasma Cells, Possess Antigen Specificities for Viral Escape Mutants." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (13): 2599–2606. <https://doi.org/10.1084/jem.20110740>.
309. Rantapää-Dahlqvist, Solbritt, Ben A. W. de Jong, Ewa Berglin, Göran Hallmans, Göran Wadell, Hans Stenlund, Ulf Sundin, and Walther J. van Venrooij. 2003. "Antibodies against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 48 (10): 2741–49. <https://doi.org/10.1002/art.11223>.
310. Rawlings, David J., Genita Metzler, Michelle Wray-Dutra, and Shaun W. Jackson. 2017. "Altered B Cell Signalling in Autoimmunity." *Nature Reviews. Immunology* 17 (7): 421–36. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.24>.
311. Ray, R. J., C. J. Paige, C. Furlonger, S. D. Lyman, and R. Rottapel. 1996. "Flt3 Ligand Supports the Differentiation of Early B Cell Progenitors in the Presence of Interleukin-11 and Interleukin-7." *European Journal of Immunology* 26 (7): 1504–10. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260715>.
312. Reed, Joanne H. 2022. "Transforming Mutations in the Development of Pathogenic B Cell Clones and Autoantibodies*." *Immunological Reviews* 307 (1): 101–15. <https://doi.org/10.1111/imr.13064>.

313. Reed, Joanne H., Mirosław K. Gorny, Liuzhe Li, Timothy Cardozo, Jill P. Buyon, and Robert M. Clancy. 2017. "Ro52 Autoantibodies Arise from Self-Reactive Progenitors in a Mother of a Child with Neonatal Lupus." *Journal of Autoimmunity* 79: 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.004>.
314. Reed, Joanne H., Jennifer Jackson, Daniel Christ, and Christopher C. Goodnow. 2016. "Clonal Redemption of Autoantibodies by Somatic Hypermutation Away from Self-Reactivity during Human Immunization." *The Journal of Experimental Medicine* 213 (7): 1255–65. <https://doi.org/10.1084/jem.20151978>.
315. Richardson, Christopher, Asiya Seema Chida, Diana Adlowitz, Lin Silver, Erin Fox, Scott A. Jenks, Elise Palmer, et al. 2013. "Molecular Basis of 9G4 B Cell Autoreactivity in Human Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (10): 4926–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202263>.
316. Rincon-Arevalo, Hector, Annika Wiedemann, Ana-Luisa Stefanski, Marie Lettau, Franziska Szelinski, Sebastian Fuchs, Andreas Philipp Frei, et al. 2021. "Deep Phenotyping of CD11c+ B Cells in Systemic Autoimmunity and Controls." *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.635615>.
317. Roco, Jonathan A., Luka Mesin, Sebastian C. Binder, Christian Nefzger, Paula Gonzalez-Figueroa, Pablo F. Canete, Julia Ellyard, et al. 2019. "Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers." *Immunity* 51 (2): 337–350.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>.
318. Rodríguez-García, Jose Luis, Maria Laura Bertolaccini, Maria Jose Cuadrado, Giovanni Sanna, Oier Ateka-Barrutia, and Munther A. Khamashta. 2012. "Clinical Manifestations of Antiphospholipid Syndrome (APS) with and without Antiphospholipid Antibodies (the so-Called 'Seronegative APS')." *Annals of the Rheumatic Diseases* 71 (2): 242–44. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200614>.
319. Rodríguez-Pintó, Ignasi, Marta Moitinho, Irene Santacreu, Yehuda Shoenfeld, Doruk Erkan, Gerard Espinosa, Ricard Cervera, and CAPS Registry Project Group (European Forum on Antiphospholipid Antibodies). 2016. "Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS): Descriptive Analysis of 500 Patients from the International CAPS Registry." *Autoimmunity Reviews* 15 (12): 1120–24. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.010>.
320. Romberg, Neil, Nicolas Chamberlain, David Saadoun, Maurizio Gentile, Tuure Kinnunen, Yen Shing Ng, Manmeet Virdee, et al. 2013. "COVID-Associated TACI Mutations Affect Autoreactive B Cell Selection and Activation." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (10): 4283–93. <https://doi.org/10.1172/JCI69854>.
321. Rönnblom, Lars, and Gunnar V. Alm. 2001. "A Pivotal Role for the Natural Interferon α -Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) in the Pathogenesis of Lupus." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (12): f59–64. <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.f59>.
322. Rowland, Sarah L., Corinne L. DePersis, Raul M. Torres, and Roberta Pelanda. 2010. "Ras Activation of Erk Restores Impaired Tonic BCR Signaling and Rescues Immature B Cell Differentiation." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (3): 607–21. <https://doi.org/10.1084/jem.20091673>.
323. Roy, Bishnudeo, Ralf S. Neumann, Omri Snir, Rasmus Iversen, Geir Kjetil Sandve, Knut E. A. Lundin, and Ludvig M. Sollid. 2017. "High-Throughput Single-Cell Analysis of B Cell

- Receptor Usage among Autoantigen-Specific Plasma Cells in Celiac Disease." *The Journal of Immunology* 199 (2): 782–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700169>.
324. Rubtsov, Anatoly V., Kira Rubtsova, John W. Kappler, Jordan Jacobelli, Rachel S. Friedman, and Philippa Marrack. 2015. "CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (1): 71–79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500055>.
 325. Rubtsov, Anatoly V., Kira Rubtsova, John W. Kappler, and Philippa Marrack. 2013. "TLR7 Drives Accumulation of ABCs and Autoantibody Production in Autoimmune-Prone Mice." *Immunologic Research* 55 (3): 210–16. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8365-8>.
 326. Rubtsova, Kira, Anatoly V. Rubtsov, Linda F. van Dyk, John W. Kappler, and Philippa Marrack. 2013. "T-Box Transcription Factor T-Bet, a Key Player in a Unique Type of B-Cell Activation Essential for Effective Viral Clearance." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34): E3216–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312348110>.
 327. Rubtsova, Kira, Anatoly V. Rubtsov, Joshua M. Thurman, Johanna M. Mennona, John W. Kappler, and Philippa Marrack. 2017. "B Cells Expressing the Transcription Factor T-Bet Drive Lupus-like Autoimmunity." *The Journal of Clinical Investigation* 127 (4): 1392–1404. <https://doi.org/10.1172/JCI91250>.
 328. Ruff, William E., Carina Dehner, Woo J. Kim, Odelya Pagovich, Cassyenne L. Aguiar, Andrew T. Yu, Alexander S. Roth, et al. 2019. "Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity." *Cell Host & Microbe* 26 (1): 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.003>.
 329. Sabouri, Zahra, Peter Schofield, Keisuke Horikawa, Emily Spierings, David Kipling, Katrina L. Randall, David Langley, et al. 2014. "Redemption of Autoantibodies on Anergic B Cells by Variable-Region Glycosylation and Mutation Away from Self-Reactivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (25): E2567–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406974111>.
 330. Sáez Moya, Manuel, Rebeca Gutiérrez-Cózar, Joan Puñet-Ortiz, María Luisa Rodríguez de la Concepción, Julià Blanco, Jorge Carrillo, and Pablo Engel. 2021. "Autoimmune B Cell Repertoire in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome." *Frontiers in Immunology* 12: 666545. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.666545>.
 331. Sage, Peter T., Noga Ron-Harel, Vikram R. Juneja, Debattama R. Sen, Seth Maleri, Waradon Sungnak, Vijay K. Kuchroo, et al. 2016. "Suppression by TFR Cells Leads to Durable and Selective Inhibition of B Cell Effector Function." *Nature Immunology* 17 (12): 1436–46. <https://doi.org/10.1038/ni.3578>.
 332. Samuels, Jonathan, Yen-Shing Ng, Claire Coupillaud, Daniel Paget, and Eric Meffre. 2005. "Impaired Early B Cell Tolerance in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Journal of Experimental Medicine* 201 (10): 1659–67. <https://doi.org/10.1084/jem.20042321>.
 333. Sanz, Ignacio, Weirong Chen, So-Hee Hong, Scott Jenks, Fabliha Anam, Christopher Tipton, Matthew Woodruff, et al. 2023. "SLE Antibody-Secreting Cells Are Characterized by Enhanced Peripheral Maturation and Survival Programs." *Research Square*, rs.3.rs-3016327. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3016327/v1>.
 334. Sanz, Ignacio, Chungwen Wei, Scott A. Jenks, Kevin S. Cashman, Christopher Tipton, Matthew C. Woodruff, Jennifer Hom, and F. Eun-Hyung Lee. 2019. "Challenges and

- Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations." *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02458>.
335. Sanz, Iñaki. 2014. "Rationale for B Cell Targeting in SLE." *Seminars in Immunopathology* 36 (3): 365–75. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0430-z>.
 336. Scheid, J. F., H. Mouquet, J. Kofer, S. Yurasov, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. 2011. "Differential Regulation of Self-Reactivity Discriminates between IgG+ Human Circulating Memory B Cells and Bone Marrow Plasma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (44): 18044–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113395108>.
 337. Schickel, Jean-Nicolas, Marcel Kuhny, Alessia Baldo, Jason M. Bannock, Christopher Massad, Haowei Wang, Nathan Katz, et al. 2016. "PTPN22 Inhibition Resets Defective Human Central B Cell Tolerance." *Science Immunology* 1 (1): aaf7153. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaf7153>.
 338. Schroeder, Harry W., and Perry M. Kirkham. 2000. "Marriage, Divorce, and Promiscuity in Human B Cells." *Nature Immunology* 1 (3): 187–88. <https://doi.org/10.1038/79717>.
 339. Schwickert, Tanja A., Hiromi Tagoh, Karina Schindler, Maria Fischer, Markus Jaritz, and Meinrad Busslinger. 2019. "Ikaros Prevents Autoimmunity by Controlling Anergy and Toll-like Receptor Signaling in B Cells." *Nature Immunology* 20 (11): 1517–29. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0490-2>.
 340. Sebastiani, Gian Domenico, Annamaria Iuliano, Luca Cantarini, and Mauro Galeazzi. 2016. "Genetic Aspects of the Antiphospholipid Syndrome: An Update." *Autoimmunity Reviews* 15 (5): 433–39. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.005>.
 341. Sellars, Maclean, Philippe Kastner, and Susan Chan. 2011. "Ikaros in B Cell Development and Function." *World Journal of Biological Chemistry* 2 (6): 132–39. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i6.132>.
 342. Sfrikakis, Petros P., Vassiliki Karali, Konstantinos Lilakos, George Georgiou, and Panayiotis Panayiotidis. 2009. "Clonal Expansion of B-Cells in Human Systemic Lupus Erythematosus: Evidence from Studies before and after Therapeutic B-Cell Depletion." *Clinical Immunology* 132 (1): 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.02.010>.
 343. Shaffer, A. L., Kuo I. Lin, Tracy C. Kuo, Xin Yu, Elaine M. Hurt, Andreas Rosenwald, Jena M. Giltman, et al. 2002. "Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program." *Immunity* 17 (1): 51–62. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00335-7).
 344. Shen, Nan, Qiong Fu, Yun Deng, Xiaoxia Qian, Jian Zhao, Kenneth M. Kaufman, Yee Ling Wu, et al. 2010. "Sex-Specific Association of X-Linked Toll-like Receptor 7 (TLR7) with Male Systemic Lupus Erythematosus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (36): 15838–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001337107>.
 345. Shi, Wei, Yang Liao, Simon N. Willis, Nadine Taubenheim, Michael Inouye, David M. Tarlinton, Gordon K. Smyth, Philip D. Hodgkin, Stephen L. Nutt, and Lynn M. Corcoran. 2015. "Transcriptional Profiling of Mouse B Cell Terminal Differentiation Defines a Signature for Antibody-Secreting Plasma Cells." *Nature Immunology* 16 (6): 663–73. <https://doi.org/10.1038/ni.3154>.

346. Shokat, Kevan M., and Christopher C. Goodnow. 1995. "Antigen-Induced B-Cell Death and Elimination during Germinal-Centre Immune Responses." *Nature* 375 (6529): 334–38. <https://doi.org/10.1038/375334a0>.
347. Simon, Quentin, Jacques-Olivier Pers, Divi Cornec, Laëtitia Le Pottier, Rizgar A. Mageed, and Sophie Hillion. 2016. "In-Depth Characterization of CD24(High)CD38(High) Transitional Human B Cells Reveals Different Regulatory Profiles." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (5): 1577-1584.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.014>.
348. Simonin, Laurent, Elisabeth Pasquier, Christophe Leroyer, Divi Cornec, Julie Lemerle, Boutahar Bendaoud, Sophie Hillion, Jacques-Olivier Pers, Francis Couturaud, and Yves Renaudineau. 2017. "Lymphocyte Disturbances in Primary Antiphospholipid Syndrome and Application to Venous Thromboembolism Follow-Up." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 53 (1): 14–27. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8568-1>.
349. Sims, Gary P., Rachel Ettinger, Yuko Shirota, Cheryl H. Yarboro, Gabor G. Illei, and Peter E. Lipsky. 2005. "Identification and Characterization of Circulating Human Transitional B Cells." *Blood* 105 (11): 4390–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>.
350. Sindhava, Vishal J., Michael A. Oropallo, Krishna Moody, Martin Naradikian, Lauren E. Higdon, Lin Zhou, Arpita Myles, et al. 2018. "A TLR9-Dependent Checkpoint Governs B Cell Responses to DNA-Containing Antigens." *The Journal of Clinical Investigation* 127 (5): 1651–63. <https://doi.org/10.1172/JCI89931>.
351. Singh, Mandeep, Katherine J. L. Jackson, Jing J. Wang, Peter Schofield, Matt A. Field, David Koppstein, Timothy J. Peters, et al. 2020. "Lymphoma Driver Mutations in the Pathogenic Evolution of an Iconic Human Autoantibody." *Cell* 180 (5): 878-894.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.029>.
352. Sintes, Jordi, Maurizio Gentile, Shuling Zhang, Yolanda Garcia-Carmona, Giuliana Magri, Linda Cassis, Daniel Segura-Garzón, et al. 2017. "mTOR Intersects Antibody-Inducing Signals from TACI in Marginal Zone B Cells." *Nature Communications* 8 (1): 1462. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01602-4>.
353. Smulski, Cristian R., and Hermann Eibel. 2018. "BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival." *Frontiers in Immunology* 9: 2285. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02285>.
354. Sng, Joel, Burcu Ayoglu, Jeff W. Chen, Jean-Nicolas Schickel, Elise M. N. Ferre, Salomé Glauzy, Neil Romberg, et al. 2019. "AIRE Expression Controls the Peripheral Selection of Autoreactive B Cells." *Science Immunology* 4 (34): eaav6778. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav6778>.
355. Sokal, Aurélien, Giovanna Barba-Spaeth, Lise Hunault, Ignacio Fernández, Matteo Broketa, Annalisa Meola, Slim Fourati, et al. 2023. "SARS-CoV-2 Omicron BA.1 Breakthrough Infection Drives Late Remodeling of the Memory B Cell Repertoire in Vaccinated Individuals." *Immunity* 56 (9): 2137-2151.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.07.007>.
356. Song, Wenzhi, Olivia Q. Antao, Emily Condiff, Gina M. Sanchez, Irene Chernova, Krzysztof Zembrzuski, Holly Steach, et al. 2022. "Development of Tbet- and CD11c-Expressing B Cells in a Viral Infection Requires T Follicular Helper Cells Outside of Germinal Centers." *Immunity* 55 (2): 290-307.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.01.002>.

357. Soni, Chetna, Oriana A. Perez, William N. Voss, Joseph N. Pucella, Lee Serpas, Justin Mehl, Krystal L. Ching, et al. 2020. "Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA." *Immunity* 52 (6): 1022-1038.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.015>.
358. Sriaroon, Panida, Yenhui Chang, Boglarka Ujhazi, Krisztian Csomos, Hemant R. Joshi, Qin Zhou, Devin W. Close, Jolan E. Walter, and Attila Kumánovics. 2019. "Familial Immune Thrombocytopenia Associated With a Novel Variant in IKZF1." *Frontiers in Pediatrics* 7: 139. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00139>.
359. Stadanlick, Jason E., Mary Kaileh, Fredrick G. Karnell, Jean L. Scholz, Juli P. Miller, William J. Quinn III, Randall J. Brezski, et al. 2008. "Tonic B Cell Antigen Receptor Signals Supply an NF- κ B Substrate for Prosurvival BLyS Signaling." *Nature Immunology* 9 (12): 1379–87. <https://doi.org/10.1038/ni.1666>.
360. Steri, Maristella, Valeria Orrù, M. Laura Idda, Maristella Pitzalis, Mauro Pala, Ilenia Zara, Carlo Sidore, et al. 2017. "Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk." *New England Journal of Medicine* 376 (17): 1615–26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1610528>.
361. Stone, John H., Peter A. Merkel, Robert Spiera, Philip Seo, Carol A. Langford, Gary S. Hoffman, Cees G.M. Kallenberg, et al. 2010. "Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-Associated Vasculitis." *New England Journal of Medicine* 363 (3): 221–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909905>.
362. Su, Kuei-Ying, Akiko Watanabe, Chen-Hao Yeh, Garnett Kelsoe, and Masayuki Kuraoka. 2016. "Efficient Culture of Human Naïve and Memory B Cells for Use as APCs." *The Journal of Immunology* 197 (10): 4163–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502193>.
363. Sutton, Henry J., Racheal Aye, Azza H. Idris, Rachel Vistein, Eunice Nduati, Oscar Kai, Jedida Mwacharo, et al. 2021. "Atypical B Cells Are Part of an Alternative Lineage of B Cells That Participates in Responses to Vaccination and Infection in Humans." *Cell Reports* 34 (6): 108684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684>.
364. Suurmond, Jolien, Yemil Atisha-Fregoso, Emiliano Marasco, Ashley N. Barlev, Naveed Ahmed, Silvia A. Calderon, Mei Yin Wong, Meggan C. Mackay, Cynthia Aranow, and Betty Diamond. 2019. "Loss of an IgG Plasma Cell Checkpoint in Patients with Lupus." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (4): 1586–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.041>.
365. Taylor, Justin J., Kathryn A. Pape, Holly R. Steach, and Marc K. Jenkins. 2015. "Apoptosis and Antigen Affinity Limit Effector Cell Differentiation of a Single Naïve B Cell." *Science* 347 (6223): 784–87. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1342>.
366. Te, Taher, Parikh K, Flores-Borja F, Mletzko S, Isenberg Da, Peppelenbosch Mp, and Mageed Ra. 2010. "Protein Phosphorylation and Kinome Profiling Reveal Altered Regulation of Multiple Signaling Pathways in B Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis and Rheumatism* 62 (8): 2412–23. <https://doi.org/10.1002/art.27505>.
367. Tedder, T. F., M. Inaoki, and S. Sato. 1997. "The CD19-CD21 Complex Regulates Signal Transduction Thresholds Governing Humoral Immunity and Autoimmunity." *Immunity* 6 (2): 107–18. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80418-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80418-5).

368. Tektonidou, Maria G., Laura Andreoli, Marteen Limper, Zahir Amoura, Ricard Cervera, Nathalie Costedoat-Chalumeau, Maria Jose Cuadrado, et al. 2019. "EULAR Recommendations for the Management of Antiphospholipid Syndrome in Adults." *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (10): 1296–1304. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215213>.
369. Tellier, Julie, Wei Shi, Martina Minnich, Yang Liao, Simon Crawford, Gordon K. Smyth, Axel Kallies, Meinrad Busslinger, and Stephen L. Nutt. 2016. "Blimp-1 Controls Plasma Cell Function through the Regulation of Immunoglobulin Secretion and the Unfolded Protein Response." *Nature Immunology* 17 (3): 323–30. <https://doi.org/10.1038/ni.3348>.
370. Theander, Elke, Roland Jonsson, Bitte Sjöström, Karl Brokstad, Peter Olsson, and Gunnel Henriksson. 2015. "Prediction of Sjögren's Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling." *Arthritis & Rheumatology* 67 (9): 2427–36. <https://doi.org/10.1002/art.39214>.
371. Thien, Marilyn, Tri Giang Phan, Sandra Gardam, Michelle Amesbury, Antony Basten, Fabienne Mackay, and Robert Brink. 2004. "Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches." *Immunity* 20 (6): 785–98. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.010>.
372. Thorn, Mitchell, Rita H. Lewis, Alice Mumbey-Wafula, Stefan Kantrowitz, and Linda A. Spatz. 2010. "BAFF Overexpression Promotes Anti-dsDNA B-Cell Maturation and Antibody Secretion." *Cellular Immunology* 261 (1): 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.10.004>.
373. Tiegs, S. L., D. M. Russell, and D. Nemazee. 1993. "Receptor Editing in Self-Reactive Bone Marrow B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 177 (4): 1009–20. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1009>.
374. Tiller, Thomas, Makoto Tsuiji, Sergey Yurasov, Klara Velinzon, Michel C. Nussenzweig, and Hedda Wardemann. 2007. "Autoreactivity in Human IgG+ Memory B Cells." *Immunity* 26 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.009>.
375. Tilstra, Jeremy S., Shinu John, Rachael A. Gordon, Claire Leibler, Michael Kashgarian, Sheldon Bastacky, Kevin M. Nickerson, and Mark J. Shlomchik. 2020. "B Cell-Intrinsic TLR9 Expression Is Protective in Murine Lupus." *The Journal of Clinical Investigation* 130 (6): 3172–87. <https://doi.org/10.1172/JCI132328>.
376. Tipton, Christopher M., Christopher F. Fucile, Jaime Darce, Asiya Chida, Travis Ichikawa, Ivan Gregoretti, Sandra Schieferl, et al. 2015. "Diversity, Cellular Origin and Autoreactivity of Antibody-Secreting Cell Population Expansions in Acute Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Immunology* 16 (7): 755–65. <https://doi.org/10.1038/ni.3175>.
377. Toellner, Kai-Michael, William E. Jenkinson, Dale R. Taylor, Mahmood Khan, Daniel M.-Y. Sze, David M. Sansom, Carola G. Vinuesa, and Ian C. M. MacLennan. 2002. "Low-Level Hypermutation in T Cell-Independent Germinal Centers Compared with High Mutation Rates Associated with T Cell-Dependent Germinal Centers." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (3): 383–89. <https://doi.org/10.1084/jem.20011112>.

378. Toes, René, and David S. Pisetsky. 2019. "Pathogenic Effector Functions of ACPA: Where Do We Stand?" *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (6): 716–21. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215337>.
379. Tokoyoda, Koji, Takeshi Egawa, Tatsuki Sugiyama, Byung-Il Choi, and Takashi Nagasawa. 2004. "Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development." *Immunity* 20 (6): 707–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.001>.
380. Tonegawa, S. 1983. "Somatic Generation of Antibody Diversity." *Nature* 302 (5909): 575–81. <https://doi.org/10.1038/302575a0>.
381. Tran, Ngoc Lan, Pascal Schneider, and Marie-Laure Santiago-Raber. 2017. "TACI-Dependent APRIL Signaling Maintains Autoreactive B Cells in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus." *European Journal of Immunology* 47 (4): 713–23. <https://doi.org/10.1002/eji.201646630>.
382. Tsubata, Takeshi. 2018. "Ligand Recognition Determines the Role of Inhibitory B Cell Co-Receptors in the Regulation of B Cell Homeostasis and Autoimmunity." *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02276>.
383. Tsuiji, Makoto, Sergey Yurasov, Klara Velinzon, Saskia Thomas, Michel C. Nussenzweig, and Hedda Wardemann. 2006. "A Checkpoint for Autoreactivity in Human IgM+ Memory B Cell Development." *Journal of Experimental Medicine* 203 (2): 393–400. <https://doi.org/10.1084/jem.20052033>.
384. Tsuji, Shoichiro, Catarina Cortesão, Richard J. Bram, Jeffrey L. Platt, and Marilia Cascalho. 2011. "TACI Deficiency Impairs Sustained Blimp-1 Expression in B Cells Decreasing Long-Lived Plasma Cells in the Bone Marrow." *Blood* 118 (22): 5832–39. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-353961>.
385. Tunyaplin, Chainarong, A. L. Shaffer, Cristina D. Angelin-Duclos, Xin Yu, Louis M. Staudt, and Kathryn L. Calame. 2004. "Direct Repression of Prdm1 by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (2): 1158–65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1158>.
386. Uccellini, Melissa B., Liliana Busconi, Nathaniel M. Green, Patricia Busto, Sean R. Christensen, Mark J. Shlomchik, Ann Marshak-Rothstein, and Gregory A. Viglianti. 2008. "Autoreactive B Cells Discriminate CpG-Rich and CpG-Poor DNA and This Response Is Modulated by IFN-Alpha." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (9): 5875–84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5875>.
387. Van Nieuwenhove, Erika, Josselyn E. Garcia-Perez, Christine Helsen, Princess D. Rodriguez, Pauline A. van Schouwenburg, James Dooley, Susan Schlenner, et al. 2018. "A Kindred with Mutant IKAROS and Autoimmunity." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142 (2): 699–702.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.008>.
388. Vergroesen, Rochelle D., Linda M. Slot, Lise Hafkenscheid, Marvyn T. Koning, Ellen I. H. van der Voort, Christine A. Grooff, George Zervakis, et al. 2018. "B-Cell Receptor Sequencing of Anti-Citrullinated Protein Antibody (ACPA) IgG-Expressing B Cells Indicates a Selective Advantage for the Introduction of N-Glycosylation Sites during Somatic Hypermutation." *Annals of the Rheumatic Diseases* 77 (6): 956–58. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212052>.
389. Verrou, Kleio-Maria, Petros P. Sfrikakis, and Maria G. Tektonidou. 2023. "Whole Blood Transcriptome Identifies Interferon-Regulated Genes as Key Drivers in Thrombotic

- Primary Antiphospholipid Syndrome." *Journal of Autoimmunity* 134 : 102978. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102978>.
390. Victora, Gabriel D., and Michel C. Nussenzweig. 2022. "Germinal Centers." *Annual Review of Immunology* 40: 413–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-120419-022408>.
 391. Victora, Gabriel D., Tanja A. Schwickert, David R. Fooksman, Alice O. Kamphorst, Michael Meyer-Hermann, Michael L. Dustin, and Michel C. Nussenzweig. 2010. "Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter." *Cell* 143 (4): 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>.
 392. Vigolo, Michele, Melissa G. Chambers, Laure Willen, Dehlia Chevalley, Klaus Maskos, Alfred Lammens, Aubry Tardivel, et al. 2018. "A Loop Region of BAFF Controls B Cell Survival and Regulates Recognition by Different Inhibitors." *Nature Communications* 9 (1): 1199. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03323-8>.
 393. Vinuesa, Carola G., Amalie Grenov, and George Kassiotis. 2023. "Innate Virus-Sensing Pathways in B Cell Systemic Autoimmunity." *Science* 380 (6644): 478–84. <https://doi.org/10.1126/science.adg6427>.
 394. Vinuesa, Carola G., Nan Shen, and Thuvaraka Ware. 2023. "Genetics of SLE: Mechanistic Insights from Monogenic Disease and Disease-Associated Variants." *Nature Reviews. Nephrology* 19 (9): 558–72. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00732-x>.
 395. Vollenhoven, R. F. van, M. M. Bieber, M. J. Powell, P. K. Gupta, N. M. Bhat, K. L. Richards, S. A. Albano, and N. N. Teng. 1999. "VH4-34 Encoded Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus: A Specific Diagnostic Marker That Correlates with Clinical Disease Characteristics." *The Journal of Rheumatology* 26 (8): 1727–33.
 396. Wahl, DG, F. Guillemin, E. de Maistre, C. Perret, T. Lecompte, and G. Thibaut. 1997. "Risk for Venous Thrombosis Related to Antiphospholipid Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus—A Meta-Analysis." *Lupus* 6 (5): 467–73. <https://doi.org/10.1177/096120339700600510>.
 397. Wang, Jin-Hong, Aliko Nichogiannopoulou, Li Wu, Lei Sun, Arlene H. Sharpe, Michael Bigby, and Katia Georgopoulos. 1996. "Selective Defects in the Development of the Fetal and Adult Lymphoid System in Mice with an Ikaros Null Mutation." *Immunity* 5 (6): 537–49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80269-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80269-1).
 398. Wang, Shu, Jingya Wang, Varsha Kumar, Jodi L. Karnell, Brian Naiman, Phillip S. Gross, Saifur Rahman, et al. 2018. "IL-21 Drives Expansion and Plasma Cell Differentiation of Autoreactive CD11c Hi T-Bet + B Cells in SLE." *Nature Communications* 9 (1): 1758. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>.
 399. Wardemann, Hedda, Sergey Yurasov, Anne Schaefer, James W. Young, Eric Meffre, and Michel C. Nussenzweig. 2003. "Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors." *Science* 301 (5638): 1374–77. <https://doi.org/10.1126/science.1086907>.
 400. Warnatz, Klaus, Claudia Wehr, Ruth Dräger, Sigune Schmidt, Hermann Eibel, Michael Schlesier, and Hans-Hartmut Peter. 2002. "Expansion of CD19(Hi)CD21(Lo/Neg) B Cells in Common Variable Immunodeficiency (CVID) Patients with Autoimmune Cytopenia." *Immunobiology* 206 (5): 502–13. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00198>.

401. Watanabe, Akiko, Kuei-Ying Su, Masayuki Kuraoka, Guang Yang, Alexander E. Reynolds, Aaron G. Schmidt, Stephen C. Harrison, Barton F. Haynes, E. William St Clair, and Garnett Kelsoe. 2019. "Self-Tolerance Curtails the B Cell Repertoire to Microbial Epitopes." *JCI Insight* 4 (10): 122551. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122551>.
402. Weichhart, Thomas, Markus Hengstschl ger, and Monika Linke. 2015. "Regulation of Innate Immune Cell Function by mTOR." *Nature Reviews. Immunology* 15 (10): 599–614. <https://doi.org/10.1038/nri3901>.
403. Weisel, Florian J., Griselda V. Zuccarino-Catania, Maria Chikina, and Mark J. Shlomchik. 2016. "A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells." *Immunity* 44 (1): 116–30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.004>.
404. Weller, Sandra, Moritz C. Braun, Bruce K. Tan, Andreas Rosenwald, Corinne Cordier, Mary Ellen Conley, Alessandro Plebani, et al. 2004. "Human Blood IgM 'Memory' B Cells Are Circulating Splenic Marginal Zone B Cells Harboring a Prediversified Immunoglobulin Repertoire." *Blood* 104 (12): 3647–54. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0346>.
405. Wentink, Marjolein W. J., Tomas Kalina, Martin Perez-Andres, Lucia del Pino Molina, Hanna IJspeert, François G. Kavelaars, Arjan C. Lankester, et al. 2019. "Delineating Human B Cell Precursor Development With Genetically Identified PID Cases as a Model." *Frontiers in Immunology* 10: 2680. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02680>.
406. Wilber, A., T. P. O'Connor, M. L. Lu, A. Karimi, and M. C. Schneider. 2003. "Dnase1l3 Deficiency in Lupus-Prone MRL and NZB/W F1 Mice." *Clinical and Experimental Immunology* 134 (1): 46–52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02267.x>.
407. Wilson, W. A., A. E. Gharavi, T. Koike, M. D. Lockshin, D. W. Branch, J. C. Piette, R. Brey, et al. 1999. "International Consensus Statement on Preliminary Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome: Report of an International Workshop." *Arthritis and Rheumatism* 42 (7): 1309–11. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199907\)42:7<1309::AID-ANR1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199907)42:7<1309::AID-ANR1>3.0.CO;2-F).
408. Woodruff, Matthew C., Richard P. Ramonell, Doan C. Nguyen, Kevin S. Cashman, Ankur Singh Saini, Natalie S. Haddad, Ariel M. Ley, et al. 2020. "Extrafollicular B Cell Responses Correlate with Neutralizing Antibodies and Morbidity in COVID-19." *Nature Immunology* 21 (12): 1506–16. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>.
409. Wu, Xiang-ni, Yan-xia Ye, Jing-wen Niu, Yang Li, Xin Li, Xin You, Hua Chen, et al. 2014. "Defective PTEN Regulation Contributes to B Cell Hyperresponsiveness in Systemic Lupus Erythematosus." *Science Translational Medicine* 6 (246): 246ra99. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009131>.
410. Wu, Yu-Chang, David Kipling, Hui Sun Leong, Victoria Martin, Alexander A. Ademokun, and Deborah K. Dunn-Walters. 2010. "High-Throughput Immunoglobulin Repertoire Analysis Distinguishes between Human IgM Memory and Switched Memory B-Cell Populations." *Blood* 116 (7): 1070–78. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275859>.
411. Yarwood, Annie, Tom W. J. Huizinga, and Jane Worthington. 2016. "The Genetics of Rheumatoid Arthritis: Risk and Protection in Different Stages of the Evolution of RA." *Rheumatology (Oxford, England)* 55 (2): 199–209. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu323>.

412. Yin, Hong, Maria Orietta Borghi, Angélica M. Delgado-Vega, Angela Tincani, Pier-Luigi Meroni, and Marta E. Alarcón-Riquelme. 2009. "Association of STAT4 and BLK, but Not BANK1 or IRF5, with Primary Antiphospholipid Syndrome." *Arthritis and Rheumatism* 60 (8): 2468–71. <https://doi.org/10.1002/art.24701>.
413. Yoshitomi, Hiroyuki, and Hideki Ueno. 2021. "Shared and Distinct Roles of T Peripheral Helper and T Follicular Helper Cells in Human Diseases." *Cellular & Molecular Immunology* 18 (3): 523–27. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00529-z>.
414. Yun, Zelin, Lizhi Duan, Xiangjun Liu, Qingmeng Cai, and Chun Li. 2023. "An Update on the Biologics for the Treatment of Antiphospholipid Syndrome." *Frontiers in Immunology* 14: 1145145. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1145145>.
415. Yung, Susan, and Tak Mao Chan. 2012. "Autoantibodies and Resident Renal Cells in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Getting to Know the Unknown." *Clinical & Developmental Immunology* 2012: 139365. <https://doi.org/10.1155/2012/139365>.
416. Yurasov, Sergey, Hedda Wardemann, Johanna Hammersen, Makoto Tsuiji, Eric Meffre, Virginia Pascual, and Michel C. Nussenzweig. 2005. "Defective B Cell Tolerance Checkpoints in Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (5): 703–11. <https://doi.org/10.1084/jem.20042251>.
417. Zhang, Shuling, Margaret Pruitt, Dena Tran, Wendy Du Bois, Ke Zhang, Rushi Patel, Shelley Hoover, et al. 2013. "B Cell-Specific Deficiencies in mTOR Limit Humoral Immune Responses." *The Journal of Immunology* 191 (4): 1692–1703. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201767>.
418. Zikherman, Julie, Ramya Parameswaran, and Arthur Weiss. 2012. "Endogenous Antigen Tunes the Responsiveness of Naive B Cells but Not T Cells." *Nature* 489 (7414): 160–64. <https://doi.org/10.1038/nature11311>.
419. Zuo, Yu, Srilakshmi Yalavarthi, Kelsey Gockman, Jacqueline A. Madison, Johann E. Gudjonsson, J. Michelle Kahlenberg, W. Joseph McCune, Paula L. Bockenstedt, David R. Karp, and Jason S. Knight. 2020. "Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibodies and Impaired Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Antiphospholipid Syndrome." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 72 (12): 2130–35. <https://doi.org/10.1002/art.41460>.

Les cellules B dans le syndrome des antiphospholipides primaire : approche à partir d'une cohorte de patients avec triple positivité

Résumé

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL), dit primaire lorsqu'il n'est pas associé au lupus, est une maladie auto-immune rare caractérisée par la présence d'auto-anticorps (antiphospholipides ou aPL) pro-coagulants, dirigés contre les phospholipides (PL), comme la cardiolipine (cL), ou leurs cofacteurs, comme la β 2-glycoprotéine I (β 2-GP1). Les patients développent des complications thrombotiques ou obstétricales. Les patients avec SAPL triple positif présentent des anti-cL, des anti- β 2-GP1, et un lupus anticoagulant, qui reflète la capacité des aPL à allonger les temps de coagulation *in vitro*, et sont ceux avec le risque de thrombose le plus élevé. Nous avons étudié les caractéristiques des lymphocytes B (LB) périphériques au sein d'une cohorte de patients avec SAPL primaire triple positif. Dans un premier temps, nous avons pu montrer qu'il n'existe pas de franche anomalie du phénotype des LB périphériques de 15 patients par une analyse en cytométrie en flux. Le séquençage haut débit du BCR a révélé une baisse de diversité du répertoire de ces LB. Par le biais d'une immortalisation en cellule unique, nous avons pu identifier les LB PL-réactifs des patients et montré que ces cellules sont polyréactives et appartiennent à un pool de LB naturels également présents chez le sujet sain. Les BCR de ces clones présentent des caractéristiques communes telles que l'usage préférentiel de certaines familles V et une fréquence accrue d'acides aminés de charge positive, dont l'arginine, dans leur région variable de chaîne lourde. Ces clones ne sont pas épurés du répertoire mémoire et plasmocytaire chez les patients, suggérant un défaut de tolérance périphérique. Dans un deuxième temps, une analyse B multimodale en *single cell*; combinant séquençage VDJ et *CITE-Seq*; nous a permis d'explorer le profil transcriptomique et d'expression protéique des LB, en se focalisant sur les BCR présentant les caractéristiques des clones PL-réactifs. L'identification d'une forte expression de surface de TACI et d'une signature IFN suggère que l'environnement cytokinique joue un rôle clé au stade naïf. Chez les patients, les LB présentent globalement une voie de différenciation folliculaire, associée à une activation des voies mTORC1 et c-Myc. Ces anomalies de signal pourraient être impliquées dans un défaut de sélection positive, favorisant l'émergence de clones mutés, enrichis en arginine, dont la différenciation en plasmocytes est facilitée par une sensibilité accrue à une stimulation T dépendante. Notre étude, la première s'attachant à explorer les anomalies B dans le SAPL primaire triple positif, souligne que divers acteurs peuvent favoriser la survie et la maturation d'aPL naturels vers des auto-anticorps maturés et délétères.

Mots clés : Tolérance, auto-immunité, lymphocyte B, syndrome des antiphospholipides

Abstract

The antiphospholipid syndrome (APS), referred to as primary when not associated with lupus, is a rare autoimmune disease characterized by the presence of pro-coagulant autoantibodies (antiphospholipid antibodies or aPL) directed against phospholipids (PL), including cardiolipin (cL), or their cofactors, such as β 2-glycoprotein I (β 2-GP1). Patients develop thrombotic or obstetric complications. Patients with triple-positive APS, i.e. positive for anti-cL, β 2-GP1, and lupus anticoagulant which reflects the ability of aPL to prolong the clotting time *in vitro*, have the highest risk of thrombosis. Here, we studied the features of peripheral B cells in triple-positive primary APS patients. First, we demonstrated that there were no clear phenotype abnormalities in peripheral B cells from 15 patients using flow cytometry analysis. High-throughput sequencing of the B cell receptor (BCR) revealed a decreased diversity in the repertoire of these B cells. Through single-cell immortalization of patients' B cells, we identified PL-reactive B cells and showed that these cells are polyreactive and belong to a pool of natural B cells also found in healthy individual. The BCRs of these clones share common features, such as the preferential use of certain V gene families and an increased frequency of positively charged amino acids, including arginine, in their heavy chain variable region. These clones are not purged from the memory and plasma cell repertoires in patients, suggesting a late peripheral tolerance defect. Subsequently, a multimodal single-cell B cell analysis combining VDJ sequencing and CITE-Seq allowed us to explore the transcriptomic and protein expression profiles of B cells, focusing on BCR with characteristics similar to PL-specific clones. The identification of increased TACI surface expression and of an IFN signature suggests that the cytokine environment plays a key role at the naive stage. In patients, B cells exhibit a follicular differentiation pathway, associated with the activation of mTORC1 and c-Myc pathways. These signaling dysregulation could be involved in a defective positive selection, promoting the emergence of mutated clones enriched in arginine, whose differentiation into plasma cells is facilitated by an increased sensitivity to T-cell-dependent stimulation. Our study, the first to investigate B cell abnormalities in triple-positive primary APS, highlights various factors that may promote the survival and maturation of natural aPL toward deleterious autoantibodies.

Key words : tolerance, autoimmunity, B cell, antiphospholipid syndrome