



HAL
open science

Caractérisation des lymphocytes B auto-réactifs dans le syndrome de Sjögren

Nedra Chriti

► **To cite this version:**

Nedra Chriti. Caractérisation des lymphocytes B auto-réactifs dans le syndrome de Sjögren. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0081 . tel-03712022

HAL Id: tel-03712022

<https://theses.hal.science/tel-03712022>

Submitted on 2 Jul 2022

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

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

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Ecole Doctorale n° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Immunologie*

Par

Nedra CHRITI

CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES B AUTO-REACTIFS DANS LE SYNDROME DE SJÖGREN

Thèse présentée et soutenue à BREST, le 19 Novembre 2021
Unité de recherche : UBO U1227 - LBAI

Rapporteurs avant soutenance :

Sylvaine YOU DR2 CNRS-Institut Cochin, Université de Paris
Claire DAIEN PU-PH INSERM, Université de Montpellier

Composition du Jury :

Président : Sylvaine YOU DR2 CNRS-Institut Cochin, Université de Paris
Examineurs : Claire DAIEN PUPH INSERM, Université de Montpellier
Hugo MOUQUET DR INSERM, Institut Pasteur
Yves ALLENBACH PU-PH INSERM, Faculté de Médecine Sorbonne université
Dir. de thèse : Divi CORNEC PU-PH INSERM, Université de Bretagne occidentale

"J'éprouve l'émotion la plus forte devant le mystère de la vie. Ce sentiment fonde le beau et le vrai, il suscite l'art et la science. Si quelqu'un ne connaît pas cette sensation ou ne peut plus ressentir étonnement ou surprise, il est un mort vivant et ses yeux sont désormais aveugles." Albert Einstein, Flammarion, Paris 1979.

لازمي

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à Dr Sylvaine YOU et Dr Claire DAIEN pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et de prendre de leur temps pour l'évaluer.

Je remercie également Dr Hugo Mouquet et Dr Yves Allenbach qui ont accepté de faire partie du jury. Je vous remercie également pour votre accompagnement pendant ces 3 années de thèse. Vos conseils m'ont permis de faire avancer ce projet. Votre participation à ce jury constitue pour moi un honneur.

Mes remerciements vont ensuite pour mon encadrant, Dr Divi Cornec. Je vous remercie pour la confiance accordée dans la réalisation de ce projet, l'accompagnement, l'autonomie dont j'ai disposé ainsi que vos qualités humaines et professionnelles qui m'ont permis d'apprendre énormément. Je vous remercie également pour vos conseils, qui étaient des moteurs précieux pour progresser.

Je remercie également le Dr Sophie Hillion, qui a participé à l'encadrement et à la réalisation de ce projet. J'adresse toute ma gratitude, pour votre soutien, disponibilité, accompagnement ainsi que le sens de la rigueur et de la critique scientifique que j'ai développé en travaillant à vos côtés.

Je remercie spécialement le Pr Jacques-Olivier Pers pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour son engagement. Je tiens à vous remercier également de m'avoir ouvert votre porte, pour votre aide sur l'avancement de ce projet et votre écoute. C'est un honneur de vous avoir comme directeur de laboratoire.

Mes remerciements s'adressent à l'ensemble des membres du laboratoire : techniciens, ingénieurs et chercheurs, qui ont participé à ma formation pratique et à l'élaboration de mon savoir-faire technique. Dr Laëtitia le Pottier, Dr Christophe Jamin, Dr Patrice Hemon, Dr Pierre Pochard, Dr Olivier Mignen, Pr Anne Bordron, Mme Nadège Marec, Dr Christelle le Dantec et Stéphanie Deshayes, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude. Je remercie aussi les membres du personnel technique

clinique et du secrétariat, Nelly, Carole, Christine, Sylvie, Christine, Valérie, Missilya, je vous remercie pour les moments partagés à la pause-café.

La thèse est une expérience enrichissante professionnelle certes mais surtout humaine. Nous faisons la connaissance des gens formidables, avec qui on partage des moments forts, qui sont là pour vous soutenir dans les moments difficiles mais qui vous permettent d'avancer et de vous pousser vers le haut.

Je commence par mes colocataires du bureau des doctorants et mes amis. Je pense spécialement à Fiona « maman fio », ma voisine de bureau. Merci pour ton aide et soutien moral, le temps accordé pour lire ce manuscrit, les moments partagés mais surtout les apéros à la petite poésie.

Marina, c'était un plaisir de partager ces années avec toi. Bonne continuation pour la suite, je suis sûr que tu trouveras ton chemin et ton équilibre.

Ma petite Marie, t'es parfaite comme tu es. J'ai eu le plaisir et la chance de t'avoir connue pendant cette dernière année de thèse. Merci pour ton soutien, les moments de rigolades au bureau et dehors, ainsi nos soirées. T'es courageuse et tu vas arriver au bout.

Yvonne « la fofolle », voilà je n'ai pas dit l'autre mots, surtout ne change pas. Garde cette âme joyeuse jeune. T'es le soleil de ce labo. J'ai aussi eu le plaisir et la chance de t'avoir connue pendant cette dernière année de thèse. Et surtout merci pour les choix des couleurs.

Et bien sûr ma Mag d'amour. Magalie, merci d'être là ces dernières années avec moi. Le 1^{er} jour où t'es venue avec ton pull jaune et ton jolie sourire, t'as apporté du soleil dans ma vie à Brest. Je te remercie pour ces années de thèse à tes cotés. Courage pour cette dernière année, tu y presque.

Anthony, merci pour les petites pauses crêpes... Sara, Laura, Cristian et tous les doctorants merci pour les soirées de folies à Brest.

C'est tout naturellement, que je remercie ma famille en or dont je ne cesserais jamais de les remercier : la meilleure des mamans Sonia, Aida, Rim, Khali Ali et Mhamed, Youssef, Mehdi, Khadija, Khalil, Tata-mima... la liste est encore très longue. J'ai fait un long schéma, certes, loin de vous ces dernières années mais je n'aurais

jamais pu le faire sans votre amour et votre présence. Je suis bénie de vous avoir comme famille.

Bien sûr un grand merci à ma Sœur Nawel, merci de faire en sorte que je me sens moins seule ici au bout du monde avec nos longues conversations au téléphone...Je paye très cher mes factures de téléphone à cause de toi. Je t'aime.

Mes amis, c'est la famille dont on choisit. On dit que les amis sont là pour les moments de joie et bonheur, mais les amis sont surtout là pour faire en sorte que tout soit facile. Chacun de vous a eu la générosité de m'apporter quelque chose d'unique et authentique. Wiem, Cyrine, Ftayta, Atef, Mon cher Raed, Red, Haloutmi...je ne pourrais pas citer tous les noms. Mais merci de faire partie de ma vie et la rendre plus belle.

Mes derniers remerciements seront pour l'homme de ma vie et mon meilleur ami, mon Taafouch, la personne que sans elle je ne serais pas ici à écrire ces remerciements sur ce manuscrit. Te remercier ne serait pas suffisant devant l'immense gratitude que je te dois, pour m'avoir redonné du courage pour retrouver un sens à ma vie, de se battre et continuer mon schéma malgré tous ce que j'ai pu endurer. A nos prochains chapitres ensemble (tu ne t'ennuieras jamais à mes côtés, toujours à t'embarquer dans une nouvelle aventure). Nhbk

Merci à tous ceux qui m'ont accompagnée dans mon parcours.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	13
1.INTRODUCTION.....	15
1.1 L'IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE.....	15
1.2 LE LYMPHOCYTE B.....	16
1.2.1 BCR, IMMUNOGLOBULINES ET ANTICORPS.....	16
1.2.2 LE REPERTOIRE DES LB.....	18
1.2.2.1 LA RECOMBINAISON VDJ.....	18
1.2.2.2 LES DIFFERENTS ISOTYPES DES IMMUNOGLOBULINES.....	18
1.2.3 ONTOGENIE DES LB.....	19
1.2.3.1 LES DIFFERENTES SOUS POPULATIONS DES LB.....	20
1.3 LA TOLERANCE.....	28
1.3.1 LA TOLERANCE CENTRALE.....	28
1.3.2 LA TOLERANCE PERIPHERIQUE.....	30
1.4 LES MALADIES AUTO-IMMUNES.....	35
LE SYNDROME DE SJÖGREN.....	35
1.4.1 CRITERES ET CLASSIFICATION.....	36
1.4.2 SCORES D'ACTIVITE.....	38
1.4.3 EPIDEMIOLOGIE DU SSP.....	39
1.4.4 PHYSIOPATHOLOGIE DU SSP.....	39
1.5 IMPLICATION DES LB DANS LE SSP.....	43
1.5.1 LES SOUS POPULATIONS DES LB DANS LE SSP.....	43
1.5.1.1 AU NIVEAU SANGUIN.....	43
1.5.1.2 AU NIVEAU DES GLANDES SALIVAIRES.....	46
1.5.2 ACTIVATION DES LB.....	47
1.5.3 LES AUTOANTICORPS.....	48
2. OBJECTIFS DE LA THESE.....	51
3. RESULTATS.....	52
PARTIE 1: ARTICLE.....	53
PARTIE 2 : ANALYSES FONCTIONNELLES DES LB REACTIFS A LA SSA.....	90
1. OBJECTIFS.....	91
2. MATERIEL ET METHODE.....	92

2.1- SUJETS HUMAINS ET ISOLATION DES PBMCS.....	92
2.2- ISOLATION ET CULTURE DES CELLULES.....	92
2.3- DOSAGE DES ANTICORPS PAR ELISA	93
2.4- DETERMINATION DES CHAINES LOURDES ET LEGERES	93
3 RESULTATS	94
3.1- STRATEGIE D'ISOLEMENT DES LB SPECIFIQUES DE LA SSA.....	94
3.2- ELISA POUR DETECTER LA SECRETION TOTALE DES IMMUNOGLOBINES.....	95
3.3- MISE AU POINT D'ELISA SPECIFIQUE DE LA SSA.....	97
3.4- DETECTION DES ANTICORPS ANTI-SSA	101
3.5- SEQUENÇAGE DE REPERTOIRE DES LB SPECIFIQUES DE SSA.....	102
4 CONCLUSION	104
PARTIE 3 : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES DES LB REACTIFS A LA SSA.	106
1 OBJECTIFS.....	107
2. MATERIELS ET METHODES.....	108
2.1 ISOLATION DES LB REACTIFS A LA SSA CHEZ UN SUJET SAIN	108
2.2 SINGLE CELL RNA-SEQ : SEQUENÇAGE D'ARN MONOCELLULAIRE PAR L'AUTOMATE CHROMIUM 10X	108
2.3 ANALYSE DES DONNEES DU SEQUENÇAGE	109
3 RESULTATS	112
3.1 PURETE DE L'ISOLATION DES CELLULES	112
3.2 ANALYSE DES DONNEES ET CONTROLE QUALITE	115
3.3 EXPLORATION DE LA SIGNATURE TRANSCRIPTIONNELLE DES LB SSA ⁺ ET SSA ⁻	117
4 CONCLUSION	134
DISCUSSION	135
CONCLUSION GENERALE.....	154
RÉFÉRENCES	156
ANNEXES	176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ACR: American College of Rheumatology

ASC: cellule productrice d'anticorps

B

B1: lymphocyte B 1

BAFF: B-cell activating factor belonging to the TNF family

Bcl-6 : B-cell lymphoma 6 protein

BCR : récepteur des lymphocytes B

BLIMP-1: B lymphocyte induced maturation protein1

C

CD : cluster de différenciation

CpG : Dinucléotide Cytosine-phosphate-Guanine

CG : centre germinatif

CMV : cytomégalovirus

CSR : Commutation Isotypique

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand

D

DEG : gènes différentiellement exprimés

DC : cellules dendritiques

DN : LB CD27- IgD-

E

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

EBF: Early B Cell Factor 1

EULAR: European League Against Rheumatism

EIF2AK: Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2

F

FasL: Fas ligand

FC: fold-change

FDR: False discovery rate

FT: facteur de transcription

FCER2: Fc Fragment of IgE Receptor II

G

GC: Centre germinatif

GRCh38 ou hg38: Génome humain de référence v. 38

GWAS : Genome-wide Association Study

GO-BP : ontologies génétiques des processus biologiques

GrB : granzyme B

I

Ig : Immunoglobuline (IgH : chaîne lourde des Ig, IgK : chaîne *kappa* des Ig, ...)

IL6: Interleukine 6

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4

ID2: Inhibitor of DNA Binding 2

ITGB2: Integrin Subunit Beta 2

ITGAX: Integrin Subunit Alpha X

IFN: interferon

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

IFITM1: Interferon Induced Transmembrane Protein 1

I κ B α : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

J

JCHAIN: Joining Chain of Multimeric IgA and IgM

JUN: jun Proto-Oncogene,

AP-1: Transcription Factor Subunit

K

KO: Knock out

L

LB: lymphocyte B

LB CG : lymphocytes B du centre germinatif

LT: lymphocyte T

LRF: lymphoma/leukemia-related factor

M

MO: moelle osseuse

mTOR: mechanistic target of rapamycin

MZB : lymphocyte B de la zone marginale

MS4A1: Membrane Spanning 4-Domains A1

MX1 : MX Dynamin Like GTPase 1

N

NGS: Next Generation Sequencing

NK: Natural killer

NFKB1: Nuclear Factor Kappa B Subunit 1

NOTCH1: Notch homolog 1

NOTCH 2: Notch Homolog Protein 2

O

OLS : organe lymphoïde secondaire

P

PCR : Réaction en Chaîne par polymérase

PAMP : motif associé au pathogène

pDC: cellule dendritique plasmacytoïde

PR : polyarthrite rhumatoïde

PAX5: Paired Box 5

POU2F2: POU Class 2

Homeobox 2

PU.1 : Spi-C Transcription Factor (Spi-1/PU.1 Related)

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

R

RNA-seq : le séquençage des ARN

S

scRNA-seq : Single-cell RNA sequencing

SHM : Mutation hypersomatique

SwM : lymphocyte B mémoire commuté

UnSW : lymphocyte B mémoire non commuté

SS : syndrome de sjögren

SSp: syndrome de sjögren primitif

SLE: lupus érythémateux

STAT: Signal transducers and activators of transcription

T

TACI: Transmembrane activator and CAML interactor

T-BET: "T-box protein expressed in T"

TGF-β: Transforming growth factor-beta

TLR: toll like recepteur

TFH: lymphocytes T folliculaires

Th: lymphocyte T helper

Treg : lymphocytes T régulateurs naturels

TdT : Terminal

désoxynucléotidyl Transférase

TNF: Tumor Necrosis Factor

U

UMI: Identifiant

Moléculaire unique

X

XBPI: X-Box Binding Protein 1

TABLES DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : LB ET SIGNALISATION CELLULAIRE.	17
FIGURE 2 : ONTOLOGIE DES LB ET LES DIFFERENTS POINTS DE CONTROLES.	27
FIGURE 3 : MECANISMES DE LA TOLERANCE CENTRALE POUR CONTROLER LA DIFFERENCIATION DES LB AUTO-REACTIFS	30
FIGURE 4 : MECANISMES DE LA TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE POUR CONTROLER LA DIFFERENCIATION DES LB AUTO-REACTIFS.	34
FIGURE 5 : SCHEMA RECAPITULATIF DU SCENARIO DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE SSP.	50
FIGURE 6 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR CARACTERISER LES LB SPECIFIQUES A LA SSA.	95
FIGURE 7 : DOSAGE DE LA SECRETION D'IMMUNOGLOBULINES PAR ELISA DANS LES CULTURES DES LB.....	96
FIGURE 8 : SCHEMA EXPLICATIF DES CLONES GENERES A PARTIR DES ECHANTILLONS ET SELON LE TYPE CELLULAIRE LB SSA ⁺ OU LB SSA ⁻	97
FIGURE 9 : DOSAGE DE LA SECRETION D'IMMUNOGLOBULINES IGM TOTALE OU IGM ANTI-SSA.	98
FIGURE 10 : DOSAGE DE LA SECRETION DES ANTICORPS ANTI-SSA.	99
FIGURE 11 : DOSAGE DE LA SECRETION DES ANTICORPS ANTI-SSA PAR DIFFERENTS PROTOCOLES.	100
FIGURE 12 : DOSAGE DE LA SECRETION DES ANTICORPS ANTI-SSA CHEZ LES PATIENTS SSP ET UN SUJET SAIN.....	101
FIGURE 13 : ANALYSE DES SEQUENCES IGHV ET IGLV A PARTIR DES CLONES SSA+.	103
FIGURE 14 : SEQUENÇAGE D'ARN MONOCELLULAIRE PAR L'AUTOMATE CHROMIUM 10X	109
FIGURE 15 : DETERMINATION DE LA "DIMENSIONNALITE" DE L'ENSEMBLE DE DONNEES AVEC LA METHODE JACKSTRAW A GAUCHE ET ELBOWPLOT A DROITE.	111
FIGURE 16 : ANALYSE DE LA PURETE DU TRI DES LB REACTIFS A LA SSA PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	113
FIGURE 17 : PIPELINE POUR L'ANALYSE DES DONNEES SCRNA SEQ.	114
FIGURE 18 : CARACTERISTIQUES DES JEUX DE DONNEES DES GROUPES SSA ⁺ ET SSA ⁻	116
FIGURE 19 : L'ANALYSE UNICELLULAIRE REVELE LA DIVERSITE DES POPULATIONS DES LB CIRCULANTS POUR UN INDIVIDU SAIN.....	117
FIGURE 20 : ROLE DE PKCB DANS LA DIFFERENCIATION DES PLASMOCYTES.	120
FIGURE 21 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 0.....	121

FIGURE 22 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 1.....	123
FIGURE 23 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 2.....	125
FIGURE 24 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 3.....	128
FIGURE 25 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 4.....	129
FIGURE 26 : COMPARAISON DE LA SIGNATURE DU GROUPE 4 AVEC LA LITTERATURE.	130
FIGURE 27: VNPLLOT POUR L'EXPRESSION DU GENE IGHV-34.....	131
FIGURE 28 : LES GENES DE LA SIGNATURE MOLECULAIRE DU GROUPE 5.....	133
FIGURE 29 : PHENOTYPE DES LB SSA ⁺ CHEZ LES PATIENTS PSS ET SUJETS SAINS.....	140
FIGURE 30 : SCHEMA PROPOSE POUR LA RUPTURE DE LA TOLERANCE ET ACCUMULATION DES LB CD21 ^{LOW} DANS LE SSP.	143
FIGURE 31 : RUPTURE DE LA TOLERANCE DES LB CD21 ^{LOW} DANS LE SSP.	146
FIGURE 32 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ETUDE PHENOTYPIQUE DES LB SSA ⁺ DANS LE SSP	147
FIGURE 33 : HYPOTHESE D'ACTIVATION DES LB REACTIFS A LA SSA DANS LE SSP AVEC UNE AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DE CD72	153
TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES SOUS-POPULATIONS DES LB CHEZ L'HOMME.....	22
TABLEAU 2 : CRITERES DE CLASSIFICATIONS DU SYNDROME DE SJÖGREN ACR/EULAR 2016	37
TABLEAU 3: TABLEAU RECAPITULATIF DES 6 SEQUENCES BCR OBTENUES A PARTIR DES LB SPECIFIQUES A LA SSA.....	105

AVANT-PROPOS

Le syndrome de Sjögren primitif (SSp) est une maladie auto-immune, définie par une rupture de la tolérance du soi du système immunitaire et la production d'autoanticorps, dirigés contre les complexes ribonucléoprotéiques cellulaires Ro (SSA) et La (SSB). Plusieurs études ont exploré l'implication des lymphocytes B (LB) dans le SSp, en essayant de comprendre les mécanismes conduisant à la rupture de la tolérance immunitaire (Mariette and Criswell, 2018). L'implication des LB été principalement prouvée par la formation des structures lymphoïdes ectopiques dans les glandes exocrines, la production d'autoanticorps et les anomalies de distribution des sous populations des LB. Au-delà de leur rôle de production des autoanticorps, les LB contribuent dans la mise en place d'un état inflammatoire par la présentation des autoantigènes aux lymphocyte T auto-réactifs ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Daridon et al., 2007b) (Youinou and Pers, 2011).

La sécrétion des autoanticorps représente aujourd'hui un outil important pour le diagnostic du SSp. Une étude a reporté que les patients atteints de SSp développent des autoanticorps jusqu'à 18 à 20 ans avant l'apparition des symptômes et le diagnostic (Theander et al., 2015). Cette production d'autoanticorps nécessite la présence de LB/plasmocytes auto-réactifs. Cependant, aucune étude n'a caractérisé jusqu'à présent les LB auto-réactifs dans le SSp. La caractérisation des LB spécifiques de la SSA, ciblée par des auto-anticorps chez 80% des patients, est primordiale pour comprendre les mécanismes de développement du SSp.

Une rupture de la tolérance a été proposée pour définir les maladies auto-immunes. Une étude dans un modèle de SSp (B6.Aec1/2), a montré une déficience dans la tolérance centrale dans ce modèle, suite à une diminution des pré-B dans la moelle osseuse (Meng et al., 2012). Chez les patients SSp, une étude de l'auto-réactivité des anticorps monoclonaux obtenus à partir des LB naïfs, LB mémoires ayant subis la commutation de classe ou non, a montré une augmentation des LB auto-réactifs dans le compartiment des LB naïfs mais aussi LB mémoires. Ces résultats mettent en évidence une rupture de la tolérance centrale mais aussi périphérique au niveau de centre germinatif (Corsiero et al., 2014). Cependant ces études ont été élaborées sur les LB totaux ce qui les limite à des populations hétérogènes avec des spécificités à l'antigène différentes.

Cette thèse constitue la première étude des LB spécifiques de la SSA dans le SSp. Dans le premier chapitre de l'introduction, j'aborderai la manière dont le système immunitaire opère et plus précisément le développement des LB, notamment les recombinaisons VDJ à l'origine de la diversité du répertoire lymphocytaire ainsi que les mécanismes de la tolérance centrale et périphérique, présents durant le développement des LB. Ces mécanismes sont nécessaires pour contrôler la différenciation des LB auto-réactifs capables de reconnaître les constituants du « SOI ». Les mécanismes impliqués dans le développement du SSp ainsi que l'implication des LB seront expliqués. Par la suite, les résultats de ce projet seront présentés, avec tout d'abord l'article regroupant la première analyse phénotypique des LB réactifs à la SSA dans le SSp, puis les résultats de ma mobilité au centre médical universitaire de Leiden, et pour finir, les résultats d'une première analyse des caractéristiques transcriptionnelles des LB réactifs à la SSA chez un sujet sain.

1.INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, il a été découvert que notre organisme nous protégeait des infections. Au XV^e siècle, Edward Jenner, le fondateur de l'immunologie, met en lumière le système immunitaire. Comment notre organisme nous protège-t-il du monde extérieur ? et comment cela fonctionne-t-il ?

Le système immunitaire joue un rôle complexe dans notre organisme, notamment dans la protection contre les pathogènes infectieux, les cellules cancéreuses...Ces derniers émettent des signaux de « danger » responsables de son activation. Pour se défendre suite à ce type d'agression, le système immunitaire met en place une batterie de mécanismes qui se sont complexifiés au cours de l'évolution. Leur ultime but est de développer une réponse immunitaire contre ce potentiel danger afin de l'éliminer. On distingue deux types de réponse immunitaire : la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative.

1.1 L'IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE

L'immunité « innée », comme son nom l'indique, est l'immunité présente dès la naissance. C'est la 1^{ère} réponse de notre organisme qui se déclenche immédiatement sans une reconnaissance spécifique. Elle est induite par la reconnaissance d'un signal danger émis suite à l'interaction entre des molécules du non-soi appelées PAMP « Pathogen Associated Molecular Patterns », présent au niveau des microorganismes, et des récepteurs du soi appelés PRR « Pattern Recognition Receptors », exprimés sur la surface des cellules immunitaires de l'immunité innée : les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les cellules NK (« *natural killer* »), les polynucléaires, les mastocytes et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires, cellules épithéliales). Une fois activées, les fonction principales du système immunitaire inné seront la clairance des complexes immuns et des débris cellulaires, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la libération d'enzymes protéolytiques et la production de chimiokines et de cytokines tel que le facteur de nécrose tumorale (TNF), et les interleukines (Medzhitov, 2007) (Smith and Germolec, 1999). Un des

rôles des cellules de l'immunité innée est le recrutement et l'activation des cellules immunitaires adaptatives.

L'immunité adaptative, quant à elle, est acquise pendant notre développement. La réponse immunitaire adaptative se met en place dans un 2^{ème} temps et qui implique une réponse plus spécifique et plus robuste. La réponse immune adaptative est assurée principalement par les lymphocytes T (LT) et LB. Ces cellules par reconnaissance spécifique de l'antigène par leurs récepteurs de surface sont capables de s'activer, entraînant une expansion, différenciation et une mémoire immunologique à vie contrairement à une réponse innée qui dure seulement quelques jours.

1.2 LE LYMPHOCYTE B

Les LB sont au centre du système immunitaire humoral adaptatif. Ils sont responsables de la production des anticorps dirigés contre un antigène. Dans les années 1960, Max Cooper fut le 1^{er} à les découvrir, il a démontré que la production d'anticorps était altérée chez les poulets irradiés après l'ablation chirurgicale de la bourse de Fabricius (le site principal du développement des LB chez les oiseaux) d'où le nom attribué à ces cellules. Le LB, représentant 5 à 10% des lymphocytes circulants, est défini par la présence d'immunoglobulines de surface.

1.2.1 BCR, Immunoglobulines et Anticorps

Les immunoglobulines à la surface jouent un rôle important de récepteur pour la reconnaissance de l'antigène sous forme membranaire « BCR » et sous forme soluble en tant que anticorps. Le BCR, identifié en 1970 (Raff et al., 1970), est un complexe composé de trois parties, une extracellulaire composée de deux domaines immunoglobulines reliés par un pont disulfure (Igm), qui sont liés à un dimère Igα (CD79a) - Igβ (CD79b), et la partie intracellulaire des dimères qui va permettre la transmission du signal à l'intérieur de LB en cas d'activation du BCR grâce à des molécules appelées ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Packard and Cambier, 2013). Ces motifs servent de messenger vers le milieu cytoplasmique ainsi que les protéines de voie de signalisation. Des corécepteurs présents à la surface

du LB participent à l'augmentation du signal du BCR, on cite le CD19, CD21 ainsi que le CD81. Une déficience de CD19 chez des souris altère la réponse des LB envers un antigène (Charles A Janeway et al., 2001). Néanmoins, le signal du BCR est contrôlé et régulé négativement par des co-récepteurs comme CD22 ou CD72.

Quant à la partie immunoglobuline, elle est constituée de deux chaînes lourdes H (pour Heavy) et deux chaînes légères L (pour Light) qui sont caractérisées par une région variable V (extrémité N-terminale) qui est le site de liaison à l'antigène, et par une région constante C (extrémité C-terminale) (Figure1).

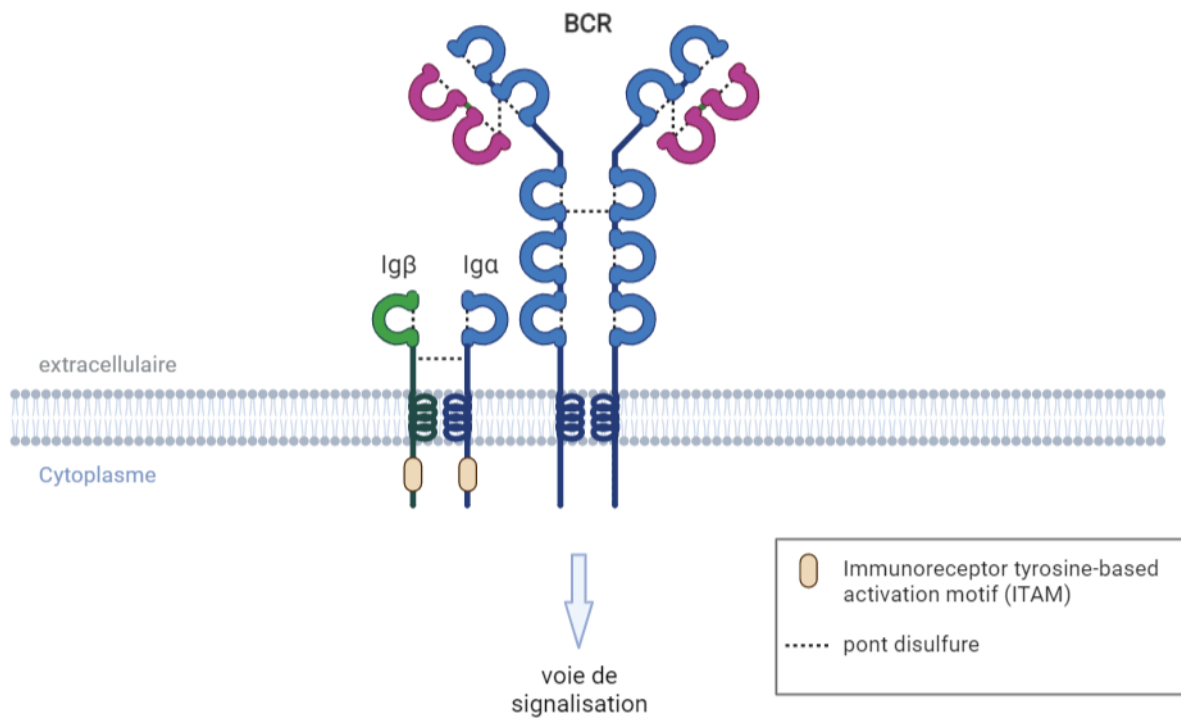


Figure 1 : LB et signalisation cellulaire.

Le BCR est composé d'immunoglobulines liées à la membrane (mIg) associées à un hétérodimère avec une liaison disulfure de CD79a (Igα) et CD79b (Igβ). Lors de l'activation du BCR, les ITAM deviennent phosphorylés via syk et lyn, et à leur tour déclenchent une cascade d'activation/ phosphorylation d'autres protéines de la voie de la signalisation (Packard and Cambier, 2013). (Figure créée sur BioRender.com)

1.2.2 Le répertoire des LB

1.2.2.1 La recombinaison VDJ

La formation des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (BCR et anticorps) va résulter d'un réarrangement somatique des gènes V, D et J codant les deux chaînes, appelée **recombinaison VDJ**. Ce mécanisme qui se fait complètement par hasard permet d'assurer **la diversité du répertoire de LB** (Tonegawa, 1983). Le réarrangement se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, les régions variables des chaînes lourdes sont obtenues par l'association d'un gène D avec un gène J, puis d'un gène V avec la juxtaposition DJ précédente, le tout aboutit à la formation d'un exon VDJ. Quant à la formation des régions variables des chaînes légères, elles sont générées seulement par la jonction de segments VL et JL pour former un exon VJ. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes H et des chaînes L sont ensuite associés aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes. La recombinaison par la suite s'effectue dans un ordre bien précis coordonné par deux enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2, qui vont permettre l'approchement des gènes cibles. Vient ensuite la TdT (pour Terminal désoxynucléotidyl Transférase) qui permet l'addition ou la délétion de bases d'ADN aux extrémités des gènes cibles et ceci de manière aléatoire. Ce phénomène induit un degré supplémentaire de diversité et on parle de **diversité jonctionnelle**. Un réarrangement productif de la chaîne lourde va permettre l'expression de l'immunoglobuline à la surface du LB au début avec une chaîne de légère de substitution V-pré B, ce qui déclenche le réarrangement des gènes de la chaîne légère (Bassing et al., 2002).

1.2.2.2 Les différents isotypes des immunoglobulines

Il existe plusieurs isotypes d'immunoglobulines. La classe des immunoglobulines est déterminée par les variations de structure de la région constante de la chaîne lourde. Le premier isotype exprimé à la surface de la LB est l'IgM. Suite à une primo-infection, ce sont également ces anticorps de type IgM qui sont produits. Contrairement aux IgM membranaires, qui sont monomériques, les IgM solubles sont pentamériques. Au

stade des LB transitionnels et naïfs, les LB coexpriment un autre isotype, IgD. Après l'activation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires, une commutation de classe se produit donnant suite à trois autres isotopes. Les IgG, sous forme monomérique, sont des anticorps circulants qui interviennent dans un 2^{ème} temps suite à une infection. Ils ont la caractéristique d'activer le complément ainsi que de passer aisément à travers les parois des vaisseaux sanguins et du placenta, procurant ainsi une défense immunitaire au fœtus (Palmeira et al., 2012). Les IgA se trouvent plutôt au niveau des muqueuses (digestives, respiratoires, génito-urinaire), empêchant la fixation des agents pathogènes aux surfaces des cellules épithéliales. Elles sont sécrétées sous forme de dimère. Les IgE jouent un rôle important dans les mécanismes allergiques.

1.2.3 Ontogénie des LB

Le développement des LB commence dans le foie fœtal avant la naissance, avant de se poursuivre dans la moelle osseuse tout au long de la vie. Au sein de la moelle osseuse, les LB proviennent des cellules souches hématopoïétiques qui sont à l'origine de toutes les cellules sanguines. Ainsi sous l'action de facteurs de transcription EBF et LRF, ils vont se différencier en cellules pré-ProB. Ainsi, PAX5, qui lui inhibe NOTCH1, assure la différenciation en pro-B. A ce stade, les réarrangements des gènes d'immunoglobulines commencent à se mettre en place. En effet une déficience de *pax5* chez des souris entraînait une altération de la recombinaison VDJ (Nutt et al., 1997). En outre, une signalisation du BCR est primordiale pour la survie des LB étant donné qu'un développement de BCR correct va induire la sélection vers un stade pré-B. Ainsi des délétions dans les gènes RAG1/2 codant les gènes des dimères montraient une inhibition dans le développement des LB (Gong and Nussenzweig, 1996). Une fois sélectionnés, grâce à un signal BCR, les LB sont sujets à un processus de sélection négative au cours duquel les LB possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées. Les LB immatures peuvent rester dans la moelle osseuse ou migrer dans la rate où ils terminent leur développement. Chez la souris, le développement des LB est classifié en 3 sous populations : les lymphocytes B1, les LB folliculaires B2 et les LB de zone marginale « MZB ». Deux voies de classification sont ainsi identifiées à partir des B2

i) une voie de centre germinatif classique qui permet la génération des plasmocytes et LB mémoires de longue durée de vie ii) une voie extra folliculaire qui va plutôt générer des plasmocytes à courte durée de vie (MacLennan et al., 2003).

1.2.3.1 Les différentes sous populations des LB

L'étude des LB humains a été conduite à partir de sang périphérique ou des amygdales (Sanz et al., 2019). Plusieurs sous-populations de LB ont été définies et possèdent des fonctions distinctes dans les réponses immunitaires. Nous pouvons les classer selon leur stade de maturation classique ou les marqueurs de surface (Figure 2).

LB transitionnels

Les LB immatures, qui ont quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, le stade LB transitionnel. C'est chez la souris qu'ils furent d'abord décrits sur le plan phénotypique et fonctionnel. A la sortie de la moelle osseuse, les LB acquièrent d'autres marqueurs de surface comme l'IgD, CD21, CD22. Chez l'homme, l'étude phénotypique de ces cellules, a permis de les décrire comme étant des CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD27⁻ (Sims et al., 2005). Selon les marqueurs de surface, trois types de LB transitionnels ont été également décrits : les LB T1, T2 et T3. Ces LB diffèrent par rapport à l'expression de leurs marqueurs. Les T1 : CD24⁺⁺⁺CD38⁺⁺⁺CD10⁺CD21^{faible}CD23^{faible}IgM^{fort}IgD^{faible}. Les T2 diffèrent par l'augmentation de l'expression des marqueurs CD21, IgD. Dans la rate humaine, des LB précurseurs des MZB partagent des caractéristiques avec ces T2 comme des niveaux élevés de CD21 (Palanichamy et al., 2009). Concernant les T3 (CD24⁺CD38⁺CD10^{+/-}CD21⁺IgM⁺ IgD⁺) ils sont proposés chez la souris d'être des cellules anergiques (Merrell et al., 2006) ou des précurseurs des LB naïfs matures (Allman et al., 2001). Ainsi, chez l'homme, les T3 ont été définis comme des cellules précurseurs des naïves, qui apparaissent temporellement après les LB T1 et T2 dans le compartiment périphérique après déplétion des LB par le Rituximab (Palanichamy et al., 2009). Également, chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique

(SLE), les T3 sont proposés comme une phase précoce de l'activation des LB naïfs (Scharer et al., 2019).

Il a été suggéré que la maturation des LB suivait un schéma bien linéaire et que les LB transitionnels poursuivaient leur chemin dans la rate en MZB ou dans un organe folliculaire. Cependant, de plus en plus d'évidences viennent remettre en cause ce schéma classique et proposent plusieurs voies que peuvent emprunter les LB. La décision d'engagement dans une voie de différenciation semble dépendre de la signalisation du BCR. En effet, chez des souris transgéniques, il semble que la nature de l'antigène joue un rôle aussi pour la décision de s'engager dans une voie ou une autre. Il semble qu'une reconnaissance des autoantigènes ou avec une faible affinité d'un antigène va plutôt induire une différenciation en MZB afin d'éviter la sélection négative (Cariappa et al., 2001).

Les LB de la zone marginale : MZB

La zone marginale (ZM) représente une partie de la rate qui sépare la pulpe rouge de la pulpe blanche. Les LB de la ZM (MZB) représentent environ 10% des LB spléniques. Ainsi, les MZB sont spécialisées dans la réponse aux agents pathogènes provenant de la circulation sanguine. Bien que les MZB aient été d'abord définis par leur localisation anatomique, ils possèdent des critères phénotypiques particuliers. Chez l'homme, ils sont CD21^{fort}CD23^{faible}IgM^{fort}IgD^{faible}CD27⁺ et CD1c^{fort} (Palm and Kleinau, 2021). La caractérisation de leur phénotype a permis de mettre en évidence la présence de MZB dans le sang périphérique et donc de démontrer que ces cellules sont capables de recirculer (Weller et al., 2004). Les MZB ont un répertoire antigénique relativement restreint, et sont responsables de la sécrétion rapide et T-indépendante d'anticorps polypécifiques et peu affins. Ces anticorps sont principalement dirigés contre les Ag polysaccharidiques des bactéries encapsulées. Contrairement aux LB folliculaires, il semble que les MZB expriment plutôt un BCR polyréactif et sont capables de produire des autoanticorps avec une faible affinité dans le but d'éliminer les cellules en apoptose. Avec leur sensibilité par rapport à une stimulation TLR, elles

sont capables de répondre rapidement et se différencier en plasmocytes en absence des LT pour produire ces autoanticorps (Palm et al., 2015).

Tableau 1 : Classification des sous-populations des LB chez l'Homme.

Sous-populations des LB		Marqueurs	Localisation
Transitionnels	T1	CD24 ⁺⁺⁺ CD38 ⁺⁺⁺ CD10 ⁺ CD21 ^{faible} CD23 ^{faible} IgM ^{fort} IgD ^{faible} CD27 ⁻	Rate
	T2	CD24 ⁺⁺⁺ CD38 ⁺⁺⁺ CD10 ^{faible} CD21 ^{fort} CD23 ^{fort} IgM ⁺⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻	Rate
	T3	CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ^{faible} CD21 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻	Rate
MZB		CD21 ^{fort} CD23 ^{faible} IgM ^{fort} IgD ^{faible} CD27 ⁺ et CD1c ^{fort}	Rate
Naïfs	Repos	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺ IgM ⁺ CD11c ⁻	OLS
	Activés	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD24 ⁻ CD38 ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻ IgM ⁺ CD11c ⁺ T-bet ⁺	OLS
	Anergiques	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD24 ⁺ CD38 ^{+/-} CD21 ⁻ CD23 ⁻ IgM ^{+/-} CD11c ⁻	OLS
Mémoires	Non commutés	IgD ⁺ CD27 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{+/-} CD21 ⁺ IgM ⁺	OLS
	Commutés « IgM-only »	IgD ⁻ CD27 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{+/-} CD21 ⁺ IgM ⁺	OLS
	Commutés	IgD ⁻ CD27 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{+/-} CD21 ⁺ IgG/IgA ⁺	OLS
DN	DN1	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD21 ⁺ IgM/IgG/IgA ⁺ CD11c ⁻	OLS
	DN2	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD24 ⁻ CD38 ⁻ CD21 ⁻ IgM/IgG/IgA ⁺ CD11c ⁺ T-bet ⁺	OLS
	DN3	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD21 ⁻ IgM/IgG/IgA ⁺ CD11c ⁻	OLS
PB		IgD ⁻ CD27 ⁺⁺ CD24 ⁻ CD38 ⁺⁺ IgM/IgG/IgA ⁺ BLIMP-1 ⁺ CD138 ⁺	OLS

Les LB de la zone folliculaire

Les LB naïfs

Les LB entrent dans les organes lymphoïdes folliculaires primaires grâce à l'action de chimiokines comme CXCL13. La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques folliculaires et l'activation du BCR, sont déterminants pour la suite de la différenciation. En cas de non activation, les LB retournent dans la circulation en tant que LB naïfs circulants. Les LB naïfs diffèrent phénotypiquement des LB transitionnels par une diminution de l'expression CD38 et CD24. Contrairement aux LB transitionnels, les LB naïfs n'expriment pas le CD10. Également, ces LB naïfs présentent une expression variée d'IgM (Sanz et al., 2019). D'ailleurs une fraction des LB naïfs avec une absence/ diminution d'expression d'IgM a été montrée comme étant des LB hautement auto-réactifs et sont fonctionnellement anergiques, déduit par leur incapacité à faire circuler le calcium après stimulation du BCR (Quách et al., 2011) (Duty et al., 2009). Cependant une diminution d'IgM n'est pas forcément un signe d'anergie et peut être également le résultat d'une activation du BCR.

L'activation des LB va induire la migration vers les follicules lymphoïdes de la rate et des ganglions lymphatiques où ils vont rencontrer les LT et leur présenter l'antigène (Allman and Pillai, 2008) (Jin et al., 2020). Deux voies de différenciation sont alors possibles (Nutt et al., 2015):

- Une voie **extra folliculaire** pour donner des plasmocytes à courte durée de vie avec de faibles niveaux d'hypermutations, et qui se produit généralement dans les cordons médullaires des ganglions lymphatiques et dans le bord de la pulpe rouge de la zone T de la rate. Les anticorps produits sont généralement d'isotype IgM, mais peuvent aussi être commutés en IgG ou IgA.
- Une voie folliculaire avec la formation des **centres germinatifs (CG)** dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LB par sélection par rapport à leur affinité à l'antigène, subissent une commutation isotypique de classe et une hypermutation somatique sur les domaines variables des deux chaînes d'immunoglobulines à l'aide d'une enzyme clé dans ce processus, la cytidine

désaminase (AID). Ce processus permettra de générer des plasmocytes à longue durée de vie capable de produire des anticorps à haute affinité et des LB mémoires.

Les voies de différenciation des LB en une des voies : plasmocytes à courte durée de vie, des LB mémoires ou des plasmocytes à longue durée de vie, dépend de plusieurs mécanismes moléculaires qui sont en régulation continue pour maintenir les LB CG ou les différencier en plasmocytes. Alors que les LB matures expriment les facteurs de transcription PAX5, PU.1, IRF8, BCL6 et BACH2, une expression plus élevée d'IRF4, va réprimer l'expression de BCL6 en faveur de BLIMP-1 (*PRDM1*), et XBP1 (Nutt et al., 2015). IRF4 joue un rôle important dans la régulation de cette différenciation. Des niveaux d'expression élevés d'*IRF4*, vont induire plutôt la différenciation des plasmocytes, alors qu'un niveau plus faible va plutôt induire le maintien des LB de CG (Ochiai et al., 2013).

Les LB mémoires

Les LB mémoires sont les cellules matures de longue durée de vie qui ont rencontré l'antigène et le gardent en mémoire pour répondre plus rapidement à la prochaine rencontre. Etant donné que l'identification de ces LB sur la base de leur rencontre avec l'antigène est difficile chez l'homme, d'autres marqueurs de surface ont pu être identifiés pour décrire ces cellules, comme le CD27. Les LB mémoires peuvent également être identifiées par l'absence du marqueur ABCB1 ou une glycosylation de CD45RB (Bemark, 2015).

Le compartiment des LB mémoires humains est plus complexe qu'on ne le pensait à l'origine et se compose en réalité de divers sous-ensembles issus de réponses fonctionnellement distinctes (Berkowska et al., 2011). Plusieurs sous-populations ont été reportées sur la base d'autres marqueurs de surface. On note les LB mémoires CD27⁺ IgD⁺ (LB mémoires qui n'ont pas subi de commutation de classe) ainsi que les LB mémoires CD27⁺ IgD⁻ (LB mémoires qui ont subi une commutation de classe) (Seifert and Küppers, 2016). Sur la base de l'isotype de l'immunoglobuline de membrane, on peut encore définir d'autres sous populations :

- Les CD27⁺IgD⁺ contiennent des LB CD27⁺IgD⁺IgM⁺ mais aussi une petite fraction CD27⁺IgD⁺IgM⁻ « Des mémoires IgD only » (Shi et al., 2003).
- Les CD27⁺IgD⁻ contiennent des LB IgM⁺CD27⁺ « IgM-only », des mémoires IgG⁺, IgA⁺ ou IgE⁺ (Klein et al., 1998).

La séparation de la population des LB CD27⁺IgD⁺ IgM⁺ des LB CD27⁺ IgM⁺ « IgM-only » a été élucidée à partir d'une étude sur des patients hyper IgM liés à l'X, qui ont une anomalie génétique caractérisée par une mutation du gène CD40L et non formation de centres germinatifs. Ils rapportent l'existence de la formation de la population mémoire IgD⁺IgM⁺CD27⁺ avec une Ig somatiquement mutée suggérant ainsi la maturation de ces cellules en absence d'une interaction LB-LT. De façon remarquable, l'absence de la population CD27⁺IgM⁺ only « IgM-only » et des LB CD27⁺IgD⁻ commutés chez ces patients suggère que la population CD27⁺ IgD⁺ IgM⁺ appartient à une voie de diversification distincte (Weller et al., 2001). Plus tard, un séquençage des immunoglobulines de différents LB mémoires à partir des PBMCs des sujets sains, montre que le répertoire mémoire IgM est distinct de celui de la mémoire à commutation de classe (Wu et al., 2010). La caractérisation de ces LB CD27⁺IgD⁻ « IgM only » montre qu'ils ont subi plusieurs cycles de division et portent plusieurs mutations similaires aux LB de CG suggérant ainsi qu'ils sont passés par un CG contrairement aux LB CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺, qui portent moins de mutations et moins de cycles de divisions (Berkowska et al., 2011). Il a été suggéré que ces LB IgD⁺IgM⁺CD27⁺ peuvent être des LB MZB en circulation (Weller et al., 2004) mais plus tard d'autres études ont montré qu'elles ont également une origine de CG (Seifert et al., 2015). Finalement, bien que le rôle physiologique de la population CD27⁺ IgD⁺ IgM⁻ reste à clarifier, une caractérisation de ces LB montre qu'ils présentent aussi une hypermutation somatique (Liu et al., 1996) et qu'ils sont enrichis en LB auto-réactifs (Koelsch et al., 2007).

Une autre fraction de ces LB mémoires a été également décrite, caractérisée par l'absence du marqueur typique de LB mémoires le CD27. Il a été rapporté que ces LB ont subi une commutation de classe et expriment des isotypes d'immunoglobuline de membrane comme IgA ou IgG1/3 mais rarement des IgG2. Ils présentent une mutation des gènes de leur immunoglobuline mais avec une fréquence moins importante par rapport aux LB IgG⁺CD27⁺ (Fecteau et al., 2006). Ces LB sont caractérisés aujourd'hui en tant que « DN » (double négatif pour le CD27 et l'IgD) qui ont été identifiés du fait

de leur expansion dans le SLE (Wei et al., 2007). Cette population présente également une hétérogénéité. En se basant sur d'autres marqueurs comme le CD21, CD11c et CXCR5, on peut définir les DN1 (CD21⁺ CD11c⁻ CXCR5⁻) représente la majorité des DN, et DN2 (CD21⁻ CD11c⁺ CXCR5⁺). Récemment, des études transcriptomiques et du répertoire de ces deux populations ont suggéré que les DN1 pouvaient être les précurseurs des LB mémoires alors que les DN2 seraient plutôt des précurseurs des plasmocytes dérivés par voie extra folliculaire des naïves activées (Jenks et al., 2018). Une population DN3, récemment décrite, définie par l'absence du CD21 et du CD11c. Le rôle de ces cellules reste à élucidé, mais quelques études suggèrent qu'ils pouvaient être des précurseurs des plasmocytes par voie extrafolliculaire (Woodruff et al., 2020).

Les plasmocytes / plasmablastes

Principale source de la sécrétion des anticorps, les plasmocytes dérivent d'un état intermédiaire appelé plasmablastes (PB). Cette différenciation dépend de la reconnaissance de l'antigène et la signalisation du BCR. Comme évoqué précédemment, les plasmocytes peuvent provenir de deux voies de développement : l'une se produisant à l'extérieur du follicule et l'autre à l'intérieur du centre germinatif. Les plasmocytes de longue durée de vie quittent les organes lymphoïdes secondaires pour gagner la moelle osseuse. En effet, il a été montré que l'environnement de la moelle osseuse permet de donner le signal nécessaire pour la survie de ces cellules (Chu and Berek, 2013). Chez l'homme l'étude des PB a été généralement effectuée à partir du sang périphérique. Trois facteurs de transcription majeurs caractérisent la différenciation des PB comme évoqué avant : BLIMP-1, IRF4 et XBP1. L'expression du CD138 est une caractéristique aussi des plasmocytes en circulation, malgré leur faible nombre en circulation (Garimalla et al., 2019).

Toutes ces études sur les populations de LB montrent la complexité du développement de ces cellules et que le schéma classique suggéré dans la littérature est probablement loin d'être aussi simple. La différenciation des LB et la réponse à une stimulation avec l'antigène sont sous le contrôle de la tolérance que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

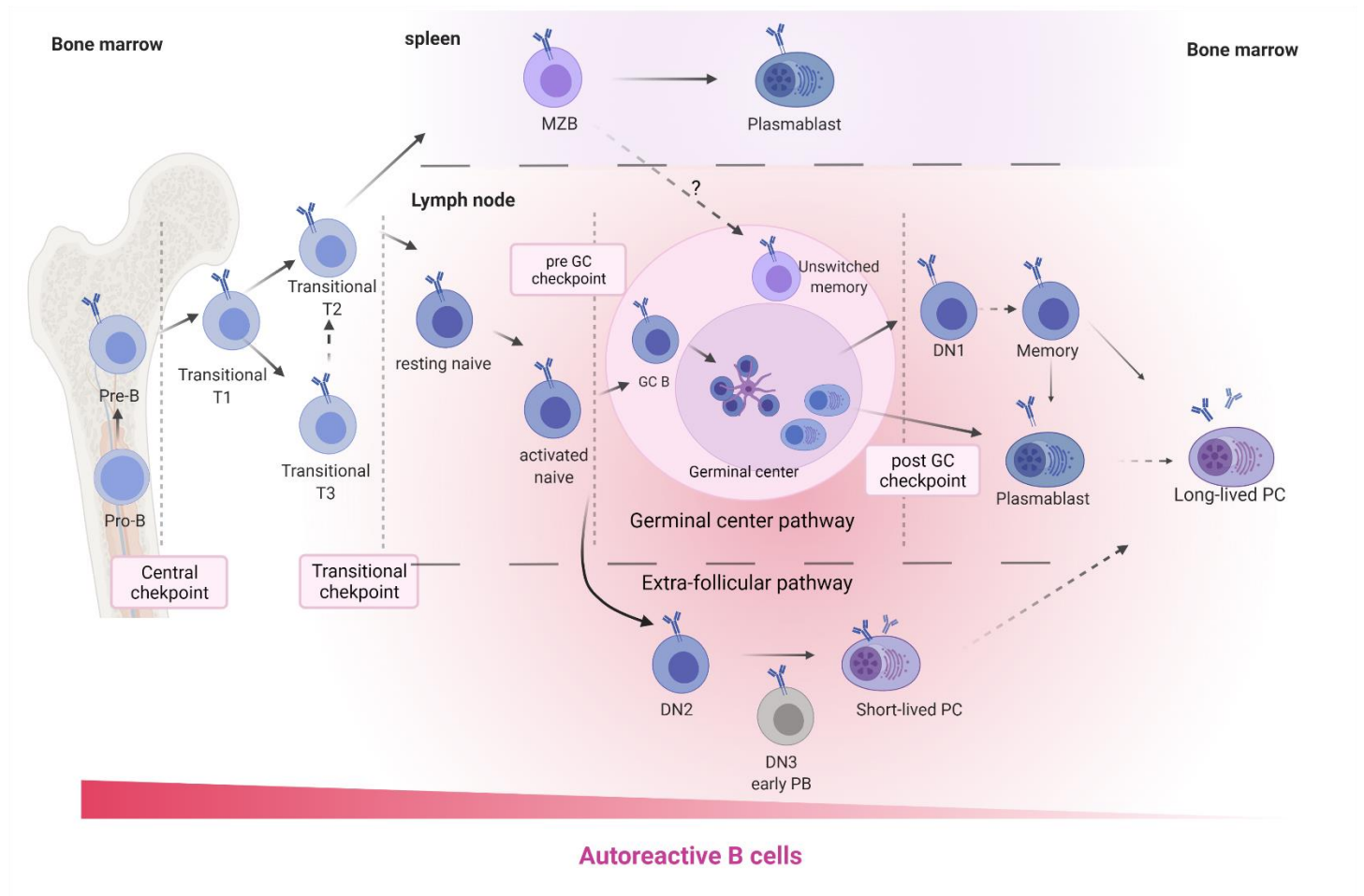


Figure 2 : Ontologie des LB et les différents points de contrôles.

Bone marrow = moelle osseuse, centrale checkpoint = point de contrôle centrale, Transitional checkpoint = point de contrôle transitionnels, pre and post GC checkpoint = point de contrôle avant et après centre germinatif, spleen = rate, lymph node = ganglion lymphatique, germinal center pathway = voie du centre germinatif, extra-follicular pathway = voie extra-folliculaire. (Figure créée sur BioRender.com)

1.3 LA TOLERANCE

Par définition, la tolérance est l'action de non réponse du système immunitaire. Ce mécanisme permet à notre système immunitaire de distinguer entre le « SOI » et le « non-SOI » et de ne pas déclencher une réaction contre les propres constituants du corps humain. On parle de l'auto-tolérance.

Tout au long de leur développement, les cellules du système immunitaire sont sous le contrôle de cette tolérance et doivent passer par plusieurs niveaux de surveillance (points de contrôle ou checkpoints). En 1^{er} lieu, il y a la tolérance centrale qui se déroule pendant les premières étapes du développement au niveau de la moelle osseuse pour les LB et le thymus pour les LT. Par la suite vient la tolérance périphérique qui se déroule dans la circulation générale et les organes lymphoïdes secondaires (Gururajan et al., 2014).

1.3.1 La tolérance centrale

La sélection des LB ainsi que la spécificité de la production des anticorps ont été le sujet de 3 grandes hypothèses. La Théorie Talmage, connue sous le nom d'hypothèse 'instructive', repose sur un modèle direct avec l'idée que l'antigène sert de modèle contre lequel la spécificité d'anticorps est synthétisée. Une autre hypothèse proposée par Jerne en 1955 a vu le jour par la suite. Il proposa ainsi un modèle plus indirect pour la sélection des LB, se basant sur le fait que l'antigène se lierait à un anticorps par hasard et que, lors de cet appariement, il se fabriquerait beaucoup plus d'anticorps que d'antigènes, formant un réseau idiotypique. Ce modèle de sélection naturelle a été critiqué parce qu'il supposait l'existence de tous les anticorps possibles préalablement dans notre organisme. En 1957, Burnet vient améliorer cette hypothèse en proposant que la production du BCR se fait par hasard selon différentes liaisons possibles des gènes (le réarrangement chromosomique). Ainsi il inventa également la notion de sélection clonale qui vit le jour en 1976 : l'idée que chaque LB, sur la base de la spécificité de son immunoglobuline de surface, serait sélectionné par un antigène qui lui est bien spécifique, lui permettant ainsi une prolifération et une différenciation. À partir de cette idée est née la notion de la tolérance, qui suggère que les LB

possédant un BCR de forte affinité pour les protéines du « soi » seront éliminés avant qu'ils deviennent matures (Burnet, 1976) (Burnet, 1959). Ce n'est que dans les années 70, grâce à l'étude de modèles murins, que la théorie de la sélection clonale a été vérifiée et validée (Denman and Frenkel, 1968).

Il paraît clair aujourd'hui que le 1^{er} point de contrôle des LB se fait au niveau de la moelle osseuse qui est fondamentale pour générer un répertoire de LB contenant un BCR réactif contre les antigènes exogènes mais dépourvue d'auto-réactivité (Gururajan et al., 2014) (Rajewsky, 1996) (Pelanda and Torres, 2012). Au cours de leur développement, les LB créent leur immunoglobuline de surface (BCR) par réarrangement des gènes codant une chaîne légère et une chaîne lourde. Une sélection basée sur la reconnaissance d'un antigène se fait avant la sortie de la moelle osseuse des LB (Monroe et al., 2003) (Healy and Goodnow, 1998) (Nemazee et al., 2000). Toute cellule avec un BCR déficient ou une reconnaissance des protéines de « soi » très élevée (LB auto-réactifs) sera sélectionnée négativement. Des études chez l'homme avec des techniques de clonage des LB et production des anticorps, ont permis de montrer une augmentation également d'une poly-réactivité des cellules immatures. Il est estimé que chez l'homme, entre 50 et 70 % des LB immatures dans la moelle osseuse sont auto-réactifs (Meffre and Wardemann, 2008).

La tolérance peut se faire selon trois mécanismes qui dépendent des signaux BCR (Hippen et al., 2005) : (1) une forte signalisation avec l'autoantigène permet le 1^{er} mécanisme, la délétion clonale, qui permet l'élimination des LB auto-réactifs. Des signaux intermédiaires vont plutôt favoriser les deux autres mécanismes : (2) la réédition du récepteur qui permet la génération d'un BCR avec une nouvelle réactivité antigénique entraînant la perte de l'auto-réactivité avec le changement de la chaîne légère κ en un deuxième isotope λ (Tiegs et al., 1993) (Halverson et al., 2004) (Radic et al., 1993) (Sandel and Monroe, 1999) (Hertz and Nemazee, 1997) ; ou (3) l'anergie clonale, état d'inactivation fonctionnelle de la LB auto-réactifs suite à une stimulation par l'autoantigène. Les LB présentent une diminution soit de l'expression du BCR soit des signaux d'activation (Figure 3).

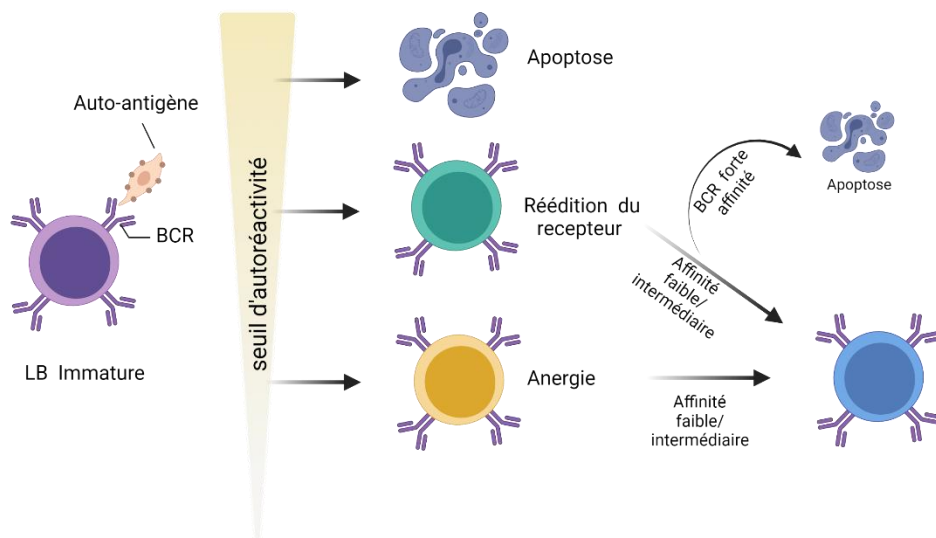


Figure 3: Mécanismes de la tolérance centrale pour contrôler la différenciation des LB auto-réactifs (Figure créée sur BioRender.com).

1.3.2 La tolérance périphérique

Bien que la majorité des LB auto-réactifs soient éliminés par la tolérance centrale, quelques LB échappent à ce point de contrôle et arrivent à atteindre la périphérie. Les LB continuent leur différenciation en LB transitionnels puis LB matures naïfs avant de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps (Cashman et al., 2019). Le 1^{er} point de contrôle périphérique des LB se fait au niveau des LB immatures transitionnels. La survie et la maturation repose sur la signalisation induite par BCR mais aussi aux signaux reçus par des protéines/ cytokines impliquées dans la survie cellulaire mais aussi d'autres cellules du système immunitaire. Des expériences d'ablation du BCR sur des modèles murins, ont montré un arrêt de développement des LB à ce stade immature (Kraus et al., 2004) (Su and Rawlings, 2002).

Comme la tolérance centrale, la tolérance périphérique est contrôlée par les mécanismes de délétion clonale, réédition du BCR ainsi que l'anergie (Nossal and Pike, 1980) (Eris et al., 1994). De plus, une immuno-régulation des LB auto-réactifs

par des cellules régulatrices à activité suppressive ou par d'autres facteurs tels que des facteurs de croissance ou des médiateurs pro-inflammatoires joue un rôle important dans la tolérance et sélection des LB. On note en 1^{er} le rôle de la protéine BAFF (facteur d'activation des LB) dans la tolérance périphérique. Une délétion de BAFF ou BAFF-R (récepteur de BAFF) chez des souris résulte en une dérégulation dans le développement des LB transitionnels T2 et T3 ainsi que les MZB, suggérant le rôle crucial que joue cette protéine dans la survie des LB (Schiemann et al., 2001). BAFF est un facteur d'activation appartenant à la famille des TNF. Comme son nom l'indique, il est indispensable pour le développement des LB matures. Dans la rate des souris, le récepteur de BAFF (BAFF-R) commence à être plus exprimé sur la surface des LB T2, les LB matures et les MZB, par rapport au T1 ainsi que les LB du centre germinatif (Gross et al., 2001) (Thompson et al., 2001). Néanmoins, l'expression de BAFF par les LB peut avoir ses limites. Schneider et al, mettent en évidence le lien de la sécrétion excessive de BAFF et l'émergence des LB auto-réactifs dans des modèles murins ou chez l'Homme (Schneider et al., 1999), suggérant ainsi qu'une surexpression de BAFF peut aboutir au développement des maladies auto-immunes (Khare et al., 2000) (Mackay et al., 1999).

Des modèles de souris transgéniques ont suggéré l'implication des LT CD4⁺, qui pourraient jouer un rôle important dans l'élimination des LB auto-réactifs périphériques par le biais du récepteur CMH de classe II ; Interactions CD40/CD40L et apoptose via Fas/FasL (Rathmell et al., 1995). Des souris déficientes en Fas (souris transgénique *lpr/lpr*) ont une augmentation des LB auto-réactifs (Komano et al., 1999). Chez des patients, il semble que les Treg, une sous population des LT avec un rôle régulateur pour maintenir l'homéostasie immunitaire, jouent également un rôle important dans la suppression des LB auto-réactifs via une interaction CD40- CD40L. Une diminution de ces Treg engendre l'accumulation des LB naïfs auto-réactifs (Hervé et al., 2007).

En plus du checkpoint au niveau transitionnel, l'exclusion folliculaire vient par la suite jouer un rôle très important dans l'élimination des LB auto-réactifs, les empêchant ainsi d'entrer dans les centres germinatifs (Cyster et al., 1994). Les LB dits anergiques sont incapables de proliférer après une signalisation du BCR, avec des niveaux de calcium intracellulaire élevés. Une diminution des taux de BAFF engendre leur exclusion des follicules (Ekland et al., 2004). Les LB auto-réactifs entrent également en compétition avec les autres LB pour l'entrée dans le centre germinatif ce qui provoque leur mort

(Cyster et al., 1994). Selon des études murines, plusieurs mécanismes contribuent à la tolérance au niveau des centres germinatifs, comme évoqué précédemment par l'apoptose via Fas (Koncz and Hueber, 2012). D'autres mécanismes de contrôle de LB auto-réactifs ont été décrits, comme le rôle du FcγRIIb pour empêcher l'émergence de LB auto-réactifs en régulant la signalisation du BCR (Tiller et al., 2010) (Espéli et al., 2019).

Si les LB parviennent à échapper à l'exclusion folliculaire et entrer dans les centres germinatifs, ils doivent passer un autre point de contrôle qui leur permettra de s'activer et se différencier en LB mémoires ou cellules productrices d'anticorps. Deux cellules et mécanismes sont au centre de cette étape : présentation d'antigène par les cellules dendritiques folliculaires (FDC), et co-stimulation grâce au recrutement des LT folliculaires « helper » (T_{FH}). Les FDC présentent l'antigène internalisé dépendante du complément par CD2 (CD21) au LB, qui délivre un deuxième signal favorisé par CD35/CD21 en plus de la signalisation BCR (Fischer et al., 1998). Ce deuxième signal est primordial pour l'activation des LB. Ce mécanisme est important pour empêcher les LB auto-réactifs de s'activer. En effet, les autoantigènes exprimés sur la surface des FDC semblent ne pas activer le système de complément et par ailleurs ne permettent pas de procurer le deuxième signal essentiel pour l'activation des LB (Yau et al., 2013). Les FDC sont essentielles aussi pour le recrutement des T_{FH} et la formation de centres germinatifs. Seules les LB recevant des signaux de survie des T_{FH} peuvent quitter les centres germinatifs (Linterman and Vinuesa, 2010).

L'activation des LB induit une hypermutation somatique. Ainsi la spécificité des anticorps des LB à un antigène peut être améliorée par ces hypermutations somatiques aléatoires (SHM) sur les gènes IgH et IgL. La sélection de clones de LB est effectuée par l'augmentation de l'affinité du BCR exprimée pour l'antigène. Les LB auto-réactifs de faible affinité à l'antigène entrent en compétition avec d'autres LB et peuvent être éliminés par apoptose (Reed et al., 2016). Néanmoins, dans certains cas, ces hypermutations somatiques peuvent introduire plus d'auto-réactivité. Ce phénomène a été décrit chez des patients avec des maladie auto-immunes (exemple: pemphigus vulgaire) (Zenko et al., 2012). Ce phénomène peut être expliqué par une cross-réactivité entre l'autoantigène et un antigène exogène (Reijm et al., 2020). Il semble également que les anticorps auto réactifs naturels IgG de faible affinité trouvés dans le sérum de sujets normaux ont été créés par hypermutation somatique lors de

la transition entre les LB naïfs matures et mémoires IgG⁺ (Tiller et al., 2007a). Il est même suggéré que ces anticorps IgG polyréactifs jouent un rôle important dans la phase précoce de l'infection.

Néanmoins, l'émergence des organes lymphoïdes tertiaires ainsi que la différenciation extrafolliculaire viennent compliquer ce schéma, dans lequel les LB peuvent se différencier en plasmocytes en empruntant d'autres voies. Ainsi d'autres points de contrôles pour la différenciation en MZB ou mémoires IgM⁺ (Tsuiji et al., 2006) restent inconnus à ce jour (Figure 4).

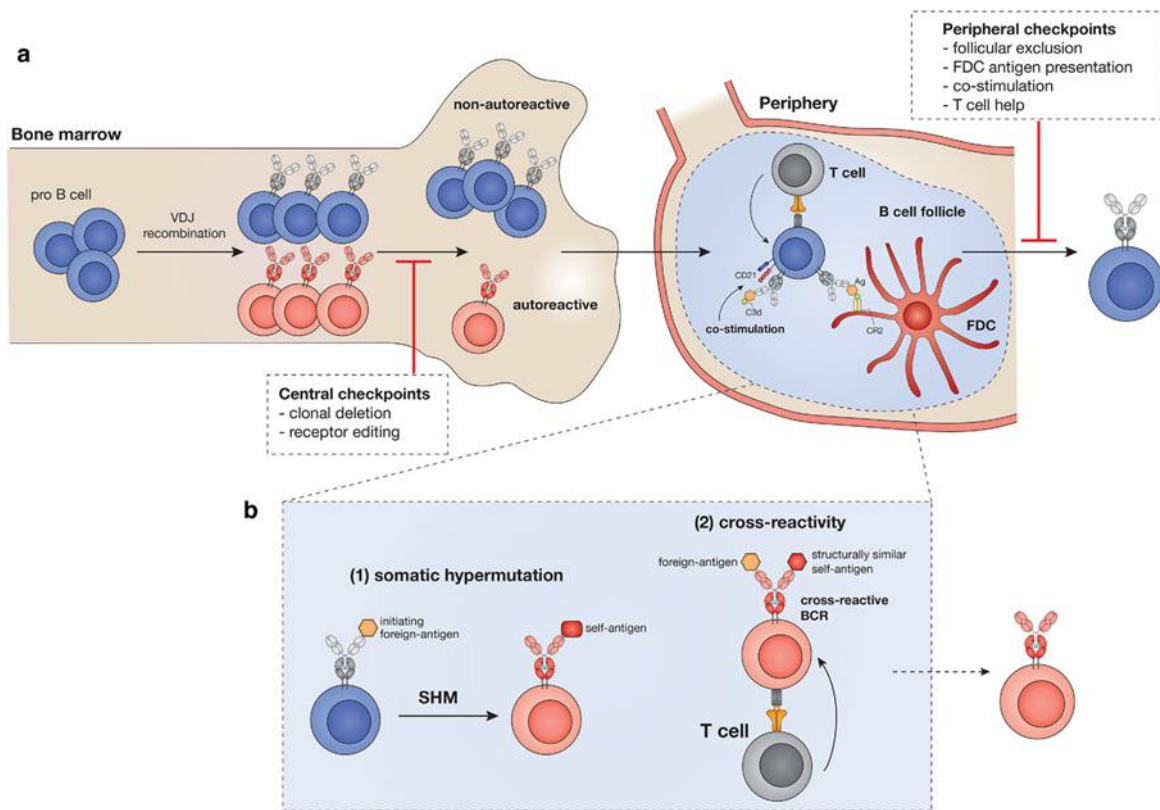


Figure 4 : Mécanismes de la tolérance centrale et périphérique pour contrôler la différenciation des LB auto-réactifs.

Abréviations : FDC, cellules Dendritiques folliculaires ; SMH = hypermutation somatique, Ag= antigène ; CR2 = Complement receptor 2, Bone marrow = moelle osseuse, centrale checkpoint = point de contrôle centrale, peripheral checkpoint = point de contrôle périphérique (Reijm et al., 2020).

1.4 LES MALADIES AUTO-IMMUNES

Malgré tous les mécanismes de tolérance, la présence des LB auto-réactifs reste une caractéristique physiologique normale. Ces LB auto-réactifs naturels ont un rôle dans le maintien de l'homéostasie ainsi que la régulation du système immunitaire. Les LB naturels, bien que restant sous contrôle de la tolérance, sont capables de produire des autoanticorps naturels qui représentent une partie importante des immunoglobulines circulantes. Néanmoins, au cours des maladies auto-immunes, nous observons une hyperactivation de ces LB auto-réactifs générant des autoanticorps. On dit qu'il y a rupture **des mécanismes de tolérance définissant ainsi les maladies auto-immunes.**

Le concept d'auto-immunité a été établi pour la première fois en 1900 par l'immunologiste Paul Ehrlich qui a inventé le terme « horror autotoxicus » pour décrire la réticence du système immunitaire à cibler son propre corps. Les maladies auto-immunes touchent 5% de la population générale. La physiopathologie de ces maladies reste complexe avec un déterminisme multifactoriel, mettant en jeu des facteurs génétiques et environnementaux. Les maladies auto-immunes sont hétérogènes avec une évolution dans le temps. Elles peuvent être classées en deux catégories : Les maladies auto-immunes spécifiques d'un seul organe (exemple : Diabète type I, Sclérose en plaque...) ou maladies auto-immunes systémiques, qui touchent plusieurs organes (exemple : lupus érythémateux systémique, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren...)

Le Syndrome de Sjögren

Le Syndrome de Sjögren est une maladie auto-immune systémique rare caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines, particulièrement les glandes lacrymales et salivaires, induisant une sécheresse des yeux et de la bouche. Le Syndrome de Sjögren tire son nom de l'Ophthalmologiste Henrik Sjögren qui fut le premier à le décrire. Au-delà de la sécheresse oculaire et buccale, le syndrome de Sjögren se répercute sur l'ensemble du corps, entraînant des symptômes généraux

comme la fatigue, la baisse des performances, l'épuisement et la fièvre. Il peut aussi toucher les articulations, les muscles et les organes internes. On estime qu'1/3 des patients développent des atteintes systémiques, pulmonaires, rénales et neurologiques. De plus, 5% des patients peuvent également développer des lymphomes (Nocturne and Mariette, 2013). Le Syndrome de Sjögren se caractérise par la présence d'autoanticorps dirigés contre deux ribonucléoprotéines : SS-A (Ro) chez 80% des patients et SS-B (La) chez 40% des patients. Des facteurs rhumatoïdes sont aussi détectés dans 50 à 70 % des patients.

1.4.1 Critères et classification

Le syndrome de Sjögren est classé comme primitif (SSp) en l'absence d'autres maladies auto-immunes systémiques, ou associé s'il existe une autre maladie auto-immune concomitante. Jusqu'à 30% des patients porteurs de polyarthrite rhumatoïde (PR), SLE, sclérodémie, connectivite mixte, thyroïdite d'Hashimoto, cirrhose biliaire primitive ou hépatite auto-immune chronique développent un syndrome de Sjögren. Le diagnostic reste difficile et repose sur des critères subjectifs et objectifs correspondant à l'atteinte des yeux, de la bouche et des glandes salivaires, d'un examen histologique des glandes salivaires ainsi que la présence des autoanticorps spécifiques. Pour faciliter la prise en charge des patients, des critères de classification ont été mis en place selon les symptômes. En 2002, le groupe de consensus américano-européen ou AECG (American European Consensus Group) a développé et validé des critères pour classer les patients et permettre aux médecins de poser leur diagnostic comme montré dans le tableau ci-après (Vitali et al., 2002). Le diagnostic de SSp est basé sur la présence de 4 critères sur 6 avec présence obligatoire du critère 5 ou de critère 6, ou la présence de 3 des 4 critères objectifs (critère 3 à 6). En 2016, une révision de ces critères a été effectuée sous l'égide de l'ACR (American College of Rheumatology) et de l'EULAR (European League Against Rheumatism) (Shiboski et al., 2017). Dans l'ensemble, les critères AECG 2002 et ACR/EULAR 2016 se ressemblent beaucoup en prenant en compte comme critères l'atteinte des glandes oculaires et salivaires ainsi que la présence d'autoanticorps (Le Goff et al., 2017). L'importante différence entre les critères ACR/EULAR 2016 et AECG 2002 est que les individus qui sont positifs pour les anti-La/SSB mais négatifs pour les

anti-Ro/SSA ne seront plus diagnostiqués avec SSp à moins d'avoir une biopsie positive. Des discussions de groupes d'experts et une étude de Baer et al. montrant que la présence sérologique d'anti-La/SSB sans anti-Ro/SSA n'est pas significativement associée aux caractéristiques phénotypiques du SSp (Baer et al., 2015). Il est à noter que les critères d'entrée ont été élargis avec ACR/EULAR 2016, prenant en compte l'existence d'atteinte systémique définie par un score ESSDAI non nul. En plus, les critères d'exclusion ont également été améliorés avec la prise en compte du syndrome hyper IgG4, une définition plus restrictive de l'infection par le virus de l'hépatite C, et la disparition du lymphome préexistant (Nocturne, 2019)

Tableau 2 : Critères de classifications du syndrome de Sjögren ACR/EULAR 2016 (Shiboski et al., 2017).

	POIDS
1. Symptômes oculaires Glande salivaire labiale avec sialadénite lymphocytaire focale et score de foyer ≥ 1 foyer/4 mm ²	3
2. Autoanticorps : Présence d'anticorps anti-SS-A (Ro)	3
3. Score de coloration oculaire 5 (ou score de van Bijsterveld ≥ 4) dans au moins un œil	1
4. Test de Schirmer ≤ 5 mm/5 min dans au moins un œil	1
5. Débit de salive entière non stimulée $\leq 0,1$ mL/min	1
Critères d'exclusion des critères ACR/EULAR	
- antécédents de radiothérapie de la tête et du cou traitement, - infection active de l'hépatite C (avec confirmation par PCR), SIDA, sarcoïdose, amylose, maladie du greffon contre l'hôte et maladie liée aux IgG4	
Ces critères sont applicables à tout patient présentant au moins un symptôme de sécheresse oculaire ou buccale ou chez qui il existe une suspicion de syndrome de Sjögren (SS) selon l'ESSDAI (au moins un domaine avec un item positif).	

1.4.2 Scores d'activité

-L'ESSDAI (EULAR Sjogren's Syndrome Disease activity Index) est un score d'activité systémique basé sur l'évaluation par le clinicien de 12 domaines. Chacun de ces domaines est pondéré et coté selon le niveau d'activité (absence, activité faible, modérée ou élevée). Un score ≥ 5 définit une maladie active (Seror et al., 2010).

-L'ESSPRI (EULAR Sjögren's Syndrome Patient reported Index) est un score permettant l'évaluation des symptômes (sécheresse, fatigue, douleurs). Il correspond à la moyenne de l'évaluation par le patient (EVA) des trois symptômes du SSp : douleur, sécheresse et fatigue (Seror et al., 2011).

Comme pour la majorité des maladies auto-immunes, il n'y a pas de traitement immunomodulateur spécifique jusqu'à présent dont l'efficacité a été prouvée. Le traitement est habituellement symptomatique visant à atténuer le syndrome sec. Une étude clinique randomisée a montré l'efficacité de deux médicaments pour le traitement de la sécheresse oculaire et buccale : pilocarpine hydrochloride et cevimeline hydrochloride. Pour le traitement des douleurs, des antalgiques peuvent être administrés aux patients. Aujourd'hui, l'émergence des thérapies biologiques donne espoir pour le traitement de cette maladie. Par exemple, le rituximab, un anticorps monoclonal anti CD20 qui cible les LB, a été évalué dans 4 essais cliniques mais avec des résultats discordants. Récemment, des études de phase 2 évaluant des molécules innovantes modulant l'activation des LB se sont révélées positives pour la première fois citant l'ianalumab (VAY736), anticorps monoclonal bloquant les récepteurs de BAFF (Dörner et al., 2019) et l'iscalimab (CFZ533), un anticorps monoclonal anti-CD40 (Fisher et al., 2020). Cependant ils nécessitent une validation au cours d'essais cliniques de phase 3. Les essais cliniques restent pour le moment difficiles à mener du fait de la complexité de la maladie : une amélioration des critères cliniques en même temps que les symptômes restent un objectif difficile à atteindre (Mariette and Criswell, 2018).

1.4.3 Epidémiologie du SSp

Le syndrome de Sjögren primitif a une prévalence de 0.3 à 1 par 1000 personnes (Qin et al., 2015) (Maciel et al., 2017) (Cornec and Chiche, 2015). La maladie est plus fréquente chez la femme adulte ; elle touche 9 femmes pour 1 homme. L'âge moyen de développement de la maladie est de 40-50 ans (Mariette and Criswell, 2018).

1.4.4 Physiopathologie du SSp

La physiopathologie de la maladie reste jusqu'à aujourd'hui incomplètement élucidée avec des preuves de l'implication des acteurs du système immunitaire inné, adaptatif mais aussi des facteurs génétiques qui conduisent à la dérégulation du système immunitaire et à la rupture de la tolérance. Dans ce volet, je vais citer les études sur les modèles murins ainsi les études translationnelles qui ont permis d'identifier les facteurs impliqués, notamment la présence d'une signature IFN de type I et II, une hyperactivation des LB, activation des T_H1 , T_H17 mais aussi l'implication des cellules épithéliales (Negrini et al., 2021). Tous ces facteurs impliqués rendent la schématisation du scénario pathogénique difficile.

L'implication de l'immunité innée

En 2005 Bave et al, mettent en évidence la présence d'une signature IFN, en montrant la présence des cellules produisant IFN- α dans les glandes salivaires des patients SSp (Båve et al., 2005). Ils proposent également une interaction entre le système IFN et l'activation des LB ; en effet le sérum des patients contenant des anticorps anti-SSA ou SSB induit plus la production d'IFN- α . Cette signature IFN a été validée chez les patients avec SSp par des études transcriptomiques (Gottenberg et al., 2006). La production d'autoanticorps chez les patients SSp est corrélée à la production d'IFN et aux gènes induits par le système interféron (Emamian et al., 2009).

Comment ce système s'active-t-il ? Une des hypothèses est l'implication des facteurs environnementaux notamment les infections par des virus. Cette hypothèse a été illustrée par une étude sur des souris C57Bl/6-lpr/lpr génétiquement prédisposées à faire une MAI systémique, qui après avoir été infectées par le cytomégalovirus (CMV), ont développé une atteinte salivaire proche du SSp (Fleck et al., 1998). En outre, la présence de l'EBV a été trouvée dans les glandes lacrymales et salivaires des patients

(Wen et al., 1996). Une infection par l'EBV (Epstein–Barr virus) semble induire une signalisation du récepteur Toll-like 3 (TLR3), capteur de l'ARN double brin (ARNdb) viral et induire également la voie d'IFN de type I et les cytokines pro-inflammatoires (Iwakiri et al., 2009). De façon remarquable, une infection par EBV semble également induire la libération des protéines RO/ SSA et La/SSB - deux autoantigènes de SSp - suite à la mort des cellules épithéliales. En outre, une signalisation TLR semble induire la voie interféron dans le SSp. Les Toll-like receptors (TLRs) sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'immunité innée, grâce à leur capacité à reconnaître des motifs moléculaires appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), d'origines principalement bactériennes, virales ou parasitaires. Deshmukh et al en 2009, mettent en évidence les effets *in vivo* de l'engagement de TLR3 sur la fonction de la glande salivaire. Dans un modèle murin, un traitement par le poly (I:C) (qui active les réponses immunitaires innées par l'engagement de TLR3) entraîne la production de cytokines inflammatoires dans la glandes salivaires et une perte significative de la fonction glandulaire caractéristique du SSp. Ces études suggèrent le rôle joué par les TLRs dans la physiopathologie et une éventuelle implication d'une infection virale probablement au stade préclinique de la maladie. A l'exception du virus de l'hépatite C, qui est capable exceptionnellement d'induire un SSp clinique, biologique et histologique, ce qui a conduit à l'exclure des critères de classification du SSp (Ramos-Casals et al., 2001), aucune association entre une infection virale et le développement de la maladie n'a pu être confirmée. D'autres hypothèses physiopathologiques avancées proposent un possible mimétisme moléculaire entre certaines protéines virales et un autoantigène présent dans les cellules exocrines (Vitali, 2011).

Une dérégulation dans l'activation de la voie de NFκB, conséquence probablement d'une stimulation de système immunitaire innée, a été remontée par plusieurs études suggérant aussi l'implication de cette voie de la réponse immunitaire innée dans le développement du SSp. Différentes études montrent qu'une déficience d'un gène impliqué dans la régulation de la voie NFκB, IκBα, induit le développement du SSp dans un modèle murin, une lignée de souris knock-in avec des modifications dans le promoteur IκBα (Peng et al., 2010). Ceci a été appuyé également par une hyperactivation de la voie NFκB dans les cellules épithéliales chez des patients atteints de SSp (Sisto et al., 2011). En outre, dans une étude GWAS (Li et al., 2017), une

association a été montrée entre la maladie et le gène *TNIP1* codant pour la protéine TNFAIP3-interacting protein 1, impliquée dans la régulation de la voie NFκB. Ces études soutiennent fortement l'idée du rôle que joue l'immunité innée dans la physiopathologie de SSp.

Rôle des cellules épithéliales

Le SSp est caractérisé par une destruction des cellules épithéliales suite à une hyper activation du système immunitaire. Alors que leurs rôles se résument à être des spectateurs innocents dans la maladie, de plus en plus de preuves suggèrent le rôle plus actif qu'elles peuvent y jouer. Les cellules épithéliales jouent un double rôle en étant les cibles mais aussi probablement les déclencheurs. En 1^{er} lieu, ces cellules sont capables d'interagir avec des molécules de costimulation, exprimées par les LT telles que le CD86 (Kapsogeorgou et al., 2001). Une fois stimulées, les cellules épithéliales des glandes salivaires libèrent des cytokines telles que BAFF et IL-21, favorisant ainsi le développement des T_{FH} et LB (Ittah et al., 2006) (Gong et al., 2014). En exprimant aussi des chimiokines comme CXCL12/ CXCL13 (Amft et al., 2001), elles sont capables de favoriser l'infiltration des leucocytes. Plus important, l'expression des complexes ribonucléoprotéiques Ro/SSA et La/SSB, autoantigènes de SSp suite à l'apoptose des cellules épithéliales pourrait également être une caractéristique de ces cellules dans le SSp (van Venrooij and Pruijn, 1995).

Implication des Lymphocytes T et l'immunité adaptative

Le rôle des LT a été attribué en raison de leur prédominance dans les glandes exocrines et par la suggestion de l'importance de la présentation des autoantigènes dans la pathogenèse. Les 1^{er} études GWAS viennent renforcer le rôle des LT, en montrant une association entre les allèles du CMH de classe II et le SSp particulièrement HLA-DRA, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 (Cruz-Tapias et al., 2012) (Ice et al., 2012). De façon remarquable, cette association semble être liée exclusivement à la production des autoanticorps anti-SSA et anti-SSB chez les patients SSp (Gottenberg et al., 2003). Ceci suggère éventuellement l'induction des plasmocytes producteurs d'autoanticorps par les LT auto-réactifs. Une augmentation des cytokines pro inflammatoire produites par les T_{H1} comme IFN-γ et TNF, a été également trouvée dans le SSp suggérant ainsi une polarisation vers T_{H1} (Kolkowski et al., 1999). D'autres preuves de cette polarisation ont été démontrées par la surexpression de

l'IL12 chez des souris, une cytokine induisant l'IFN- γ et jouant un rôle important la polarisation des T_H1. Cette surexpression entraîne le développement des anomalies bronchiques et alvéolaires similaires à celles observées dans les poumons des patients atteints de SSp (McGrath-Morrow et al., 2006). L'association de SSp avec le polymorphisme dans les allèles STAT4 et IL12 trouvée dans des études GWAS, appuie encore l'hypothèse de l'implication des T_H1 (Lessard et al., 2013). Il est à noter que STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4) est un facteur de transcription principalement activé par l'IL12, qui favorise la sécrétion d'interféron (IFN) de type 2 par les T_H1. Un polymorphisme de STAT4 a été rapporté comme un facteur de risque du développement du SSp, avec également une corrélation entre le niveau d'ARNm codant pour STAT4 α chez les patients atteints de SSp et l'expression de *EIF2AK2* (codant pour PKR), *IFITM1* et *MX1,12* qui sont des gènes induits par la signalisation de l'IFN de type I (Gestermann et al., 2010) suggérant ainsi l'implication de la voie d'interféron de type 1 et 2.

D'autres sous-populations de LT ont été identifiées dans le SSp, y compris les cellules T_H17 et les T_{FH}. Le Taux de IL17 a été trouvé augmenté dans le sérum et les glandes salivaires des patients SSp par rapport aux sujets sains (Katsifis et al., 2009). Bien qu'aucune corrélation claire n'ait été établie entre l'augmentation de l'activité des cellules T_H17 et les symptômes de la maladie, plusieurs études sur des patients ou modèles murins (Lin et al., 2015) ont montré la présence des T_H17 chez les patients SSp. Le rôle exact des T_H17 dans la pathogenèse du SSp reste flou, peut-être en raison de la plasticité des T_H17 (Verstappen et al., 2018). La différenciation des T_H17 et Treg est réciproque : l'augmentation de la fréquence des cellules T_H17 (cellules pro-inflammatoires) s'accompagne souvent d'une diminution de la fréquence des cellules Treg (qui ont un effet antagoniste). Un équilibre entre T_H17 et Treg semble être perturbé dans plusieurs maladies auto-immunes (Noack and Miossec, 2014). Une augmentation de la fréquence des Treg a été montrée dans des glandes salivaires et dans le sang des patients SSp, en particulier chez les patients présentant une forte activité de la maladie (ESSDAI > 5) (Verstappen et al., 2017). Les études sur les Treg restent aussi contradictoires, ce qui pourrait être expliqué par les différentes stratégies utilisées pour les définir. Toutes ces études montrent une implication des LT dans le développement du SSp, directement par la mise en place d'un état inflammatoire mais également en agissant sur l'hyperactivation des LB.

1.5 IMPLICATION DES LB DANS LE SSp

Les LB sont au cœur de la physiopathologie du SSp notamment par la sécrétion des autoanticorps, mais pas seulement... Aujourd'hui, nous savons qu'ils jouent d'autres rôles impliquant la production des cytokines ou encore la présentation de l'autoantigène aux LT. Le rôle de BAFF dans l'implication des LB au cours du SSp est majeur, puisque la souris transgénique pour BAFF développe une maladie semblable initialement au lupus érythémateux systémique puis semblable au SSp (Mackay et al., 1999). Ce processus auto-immun résulte d'une altération de la tolérance au soi des LB et s'avère être indépendant des LT. L'hyperactivité des LB (Kroese et al., 2014) et les anomalies biologiques qui en résultent sont une caractéristique du SSp. Ces anomalies sont caractérisées par une hyper-gammaglobulinémie, un taux élevé des chaînes légères libres et de la b2-microglobuline, des anticorps anti-SSA et anti-SSB ainsi qu'une distribution anormale des LB matures dans le sang périphérique (Mielle et al., 2019).

1.5.1 Les sous populations des LB dans le SSp

Chez les patients atteints de SSp, une altération de la distribution des sous populations de LB a été observée. Ces anomalies ne sont trouvées que chez patients avec SSp par rapport aux patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde ou du lupus érythémateux disséminés ou aux sujets normaux. Aujourd'hui ce profil phénotypique ou « signature lymphocytaire » qui semble être bien particulier au SSp, pourrait être utile comme marqueur diagnostique (Cornec et al., 2014) (Binard et al., 2009).

1.5.1.1 Au niveau sanguin

Comme évoqué dans le chapitre de différenciation des LBs, à la sortie de la moelle osseuse, les LB transitionnels peuvent emprunter deux chemins de différenciation, en LB de zone marginale (T-indépendant) ou LB naïfs vers le centre germinatif (T-dépendant). En se basant sur l'expression de l'IgD ainsi que le CD38, on peut définir les Bm2 (IgD+CD38+) : des LB naïfs sélectionnés après leur passage dans la zone riche en LT d'un organe lymphoïde secondaire, ainsi que des Bm2' (IgD+CD38+) :

cellules fondatrices de centres germinatifs ayant rencontré une cellule dendritique et des LT spécifiques de leur antigène (Bohnhorst et al., 2001) . Ces sous-populations matures spécifiques des organes lymphoïdes secondaires sont détectées dans le sang périphérique ce qui suggère qu'elles rejoignent la circulation. Chez les patients atteints de SSp, une augmentation de ces deux populations a été décrite dans plusieurs études (Bohnhorst et al., 2001) (Hansen et al., 2004). Une autre anomalie observée chez les patients est la nette diminution des LB mémoires CD27⁺ dans la circulation (LBm5). L'augmentation des LB mémoires dans les glandes salivaires laisse penser à la migration de celle-ci vers les organes, ce qui expliquerait leur diminution dans la circulation (Hansen et al., 2002). L'autre hypothèse, serait une différenciation aberrante en plasmocytes, suggérée par l'augmentation de CD27 solubles dans le sérum des patients également corrélée avec le taux d'IgG (Bohnhorst et al., 2002). Une étude phénotypique utilisant la technologie CyTOF, sur une cohorte de 49 patients et 45 sujets sains, a permis de bien montrer l'implication des LB mémoires mais aussi des PB dans le SSp. Dans le sang périphérique des patients, ils reportent une diminution des LB mémoires, des LT CD4⁺, et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) mais une augmentation de PB. Dans les glandes salivaires, les LB et PB sont trouvés augmentés (Mingueneau et al., 2016). De façon remarquable, le taux élevé des PB dans le sang et les glandes salivaires est trouvé corrélé avec le taux d'IgG dans le sérum, l'activité de la maladie ainsi que la présence d'autoanticorps chez les patients. Dans cette étude, une fraction des plasmocytes CD38⁺ CD27⁺ sont négatifs pour le corécepteur CD19, un phénotype spécifique aux plasmocytes à longue durée de vie, suggérant ainsi que la production des anticorps anti-SSA et anti-SSB pourrait dériver de ces cellules.

Une autre population serait impliquée dans la pathogenèse du SSp : les **MZB**. Une déplétion de ces cellules dans des modèles murins (souris transgéniques IL14aTG croisées avec des C57BL/6.CD19Cre.RBP-J^{-/-}, pour éliminer les MZB), permet l'amélioration des manifestations salivaires empêchant ainsi la production des autoanticorps chez ces souris (Shen et al., 2016). En 2006, notre équipe a pu mettre en évidence une infiltration lymphocytaire dans les glandes salivaires, notamment des T2 et MZB (Daridon et al., 2006). Contrairement à la souris, chez l'homme aucune étude n'a pu mettre en évidence l'implication directe de ces cellules. Cependant le développement de lymphome associée au Syndrome de Sjogren dans les MALT,

organe où réside des MZB, laisse penser à l'implication de cette sous-population dans la pathogenèse (Nocturne and Mariette, 2015).

Des LB avec fonction immunosuppressive, les LB régulateurs (LBreg), semblent également être impliqués dans l'auto-immunité (Fillatreau et al., 2002). Les LBreg, utilisent différents mécanismes immunosuppresseurs tels que la production d'IL-10, de granzyme B (GZMB) et de TGF- β pour réguler d'autres cellules immunitaires. Ils vont généralement réguler négativement la prolifération des LT pro-inflammatoire T_{H1} et T_{H17} et induire la prolifération des Treg. Bien qu'un phénotype bien précis de ces LBreg n'ait pas été établi jusqu'à aujourd'hui, leur découverte a suscité l'intérêt pour un potentiel lien avec les LB transitionnels en raison de similitudes phénotypiques et fonctionnelles. Récemment plusieurs études ont montré le rôle régulateur des LB transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} (Blair et al., 2010) mais la fonction de ces LB semble être altéré en auto-immunité. Chez les patients avec SSp, les LB transitionnels CD24^{hi}CD38^{hi} sont augmentés par rapport aux sujets sains. La caractérisation des sous-ensembles de cette population, reporte que les LB CD38^{hi} CD24^{hi} CD27⁺ et les T2 définis par CD24^{hi} CD38^{hi} CD19⁺ CD10⁺ CD21⁺CD5^{low} après stimulation avec CpG étaient capables de produire de l'IL10 ainsi que réduire la sécrétion de l'IFN γ et du TNF α (Simon et al., 2016).

En physiologie, les pDC induisent la production d'IL10 par les LBreg et le contrôle des PB par l'IFN α , en retour les LBreg contrôlent la production de l'IFN α . Au cours du SLE, ce système de régulation est altéré : dû à une exposition chronique d'IFN, les pDC sont hyperactives entraînant ainsi l'activation des PB, leur expansion et la production des autoanticorps. Cependant, les pDC sont incapables d'induire la production d'IL10 par les LBreg (Candando et al., 2014). Cette fonction régulatrice n'est certainement pas associée qu'aux LB producteurs d'IL10. Récemment, des études ont montré le rôle régulateur qui peut jouer la cytokine IL35. Dans deux études sur des modèles murins, des LB induits par l'IL35, *in vivo*, se différencient en LB régulateurs et sécrètent de l'IL10 et IL35 à leur tour. Ainsi ces LBreg IL35⁺ en inhibant la prolifération des T_{H1} et T_{H17}, permettent la réduction de l'inflammation ainsi qu'une protection (Wang et al., 2014). Donc les LB IL35⁺ semblent avoir un rôle protecteur dans le contexte d'auto-immunité chez des souris (Shen et al., 2014). Récemment, une dérégulation de la balance anti- inflammatoire IL35 et pro-inflammatoire IL12 a été décrite au cours du SSp. Le taux de l'IL35 dans le sérum est trouvé diminué chez les patients avec SSp

par rapport à l'IL12, qui est augmenté. De plus, l'augmentation du taux de l'IL35 semble être corrélée avec une activité réduite de la maladie (Fogel et al., 2018). Une étude plus approfondie des fonctions des LB régulateurs dans le SSp est nécessaire.

Finalement, en plus des anomalies quantitatives des sous-populations des LB, il existe également des anomalies qualitatives des LB circulants. Le CD19 ou CD21 sont deux corécepteurs nécessaires pour moduler (abaisser l'affinité du BCR à l'antigène). De façon remarquable, l'expression de CD19 est fortement augmentée à la surface des sous-populations Bm2/Bm2 chez les patients avec SSp (d'Arbonne et al., 2006). Une autre étude a mis en évidence aussi l'augmentation d'une population de LB CD21^{low} autoréactive présentant une anergie fonctionnelle chez les patients de SSp (Saadoun et al., 2013). Ceci suggère une augmentation de la possibilité de reconnaître plus facilement les autoantigènes par ces cellules mais aussi un scénario d'échappement à la tolérance.

1.5.1.2 Au niveau des glandes salivaires

L'infiltration des LB au sein des glandes salivaires est une caractéristique essentielle de la SSp, favorisée par une interaction entre les cellules épithéliales et les LB via 3 grands mécanismes : i) Une aberration de la production de CXCL13 par les cellules épithéliales qui favorise la migration des LB vers les glandes salivaires (Amft et al., 2001) ii) une activation de ces LB suite à la surexpression de BAFF par ces mêmes cellules épithéliales ; iii) un relargage des autoantigènes par les cellules épithéliales ainsi qu'une surexpression de CD40, qui crée un terrain favorable pour une activation chronique des LB et la production des anticorps (Campos et al., 2016). L'ensemble de ces mécanismes entraînerait une formation des centres germinatifs ectopiques (Mielle et al., 2019). Les structures de ces centres germinatifs partagent des caractéristiques morphologiques avec les centres germinatifs classiques et participent à l'hypermutation somatique, l'édition du BCR et la commutation de classe des immunoglobulines. Ces structures sont trouvées dans 10 à 30 % des glandes salivaires des patients avec SSp (Risselada et al., 2013). Par ailleurs, des LB « MZB-like » et LB T2 sont également augmentées dans les glandes salivaires chez les patients atteints de SSp (Daridon et al., 2006). Le maintien de ces structures est favorisé par 3 facteurs différents des centres germinatifs classiques. On cite l'axe de

CXCL13 et son récepteur CCR5 qui sont directement impliqués dans l'organisation du tissu lymphoïde réactif ectopique dans les glandes salivaires des patients de SSp (Barone et al., 2008). Une augmentation du taux de l'IL21 dans le sérum et les glandes salivaires des patients favorise aussi l'idée de l'implication des T_{FH} (Kang et al., 2011). Ces cellules jouent un rôle important dans la différenciation et la production des anticorps par les LB dans les centres germinatifs (Ma et al., 2012). Un taux élevé de T_{FH} est trouvé associé avec l'activité de la maladie ainsi qu'avec les taux d'anticorps IgG sériques chez des patients avec SSp avec des manifestations extraglandulaires (Szabo et al., 2013).

Pour finir, la présence d'une niche de plasmablasts / plasmocytes dans les glandes salivaires des SSp est aussi une caractéristique des patients. En effet, les plasmocytes, chez les sujets sains, se retrouvent dans la moelle osseuse où ils reçoivent des signaux de survie (CXCL12, IL-6). De façon intéressante, une expression excessive de CXCL12 et IL6 est trouvée dans les glandes salivaires des patients SSp avec un score focus élevé, associé à une infiltration des plasmocytes CD138⁺ (Szyszko et al., 2011).

1.5.2 Activation des LB

L'activation des LB nécessite un signal BCR et un deuxième signal de co-activation. Cette activation semble être altérée dans le SSp par également la surexpression de CD19 (d'Arbonne et al., 2006), des TLR ainsi qu'une surexpression de BAFF que nous détaillerons par la suite. Un taux élevé de CD40L soluble (Goules et al., 2006) et du corécepteur CD72 chez les patients a été également trouvé par rapport aux sujets sains (Smith et al., 2004).

BAFF : membre de la famille TNF, permet la prolifération et la maturation des LB. Il est produit à la suite de l'activation de l'immunité innée et favorise ainsi l'activation des LB, jouant ainsi un rôle médiateur entre l'immunité innée et l'auto-immunité effectué par le système immunitaire adaptatif. Comme évoqué plus haut, sa surexpression chez des souris transgéniques (Souris BAFF-tg) favorise le développement d'un lupus et des manifestations cliniques (sialadénite) caractéristiques du SSp (Mackay et al., 1999). Ces souris ont également plus de risque

de développer des lymphomes par rapport aux contrôles (Batten et al., 2004). Depuis, plusieurs études ont essayé d'élucider le rôle joué par cette protéine dans la physiopathologie ainsi que dans la rupture de la tolérance. Chez des patients atteints de SSp, le taux de BAFF est élevé dans le sérum (Daridon et al., 2007a) et les glandes salivaires. Ce taux élevé a été montré comme étant corrélé aux taux des autoanticorps anti-SSA et anti-SSB (Mariette et al., 2003). La production de cette protéine n'est pas exclusive aux monocytes/ macrophages mais elle est également produite par les cellules épithéliales, les LT et même les LB. Une stimulation avec IFN α , *in vitro*, des LT, LB, monocytes et cellules épithéliales montre des niveaux d'ARNm de BAFF significativement plus élevé chez les patients SSp (Lavie et al., 2008). Une corrélation entre le taux de BAFF et la présence d'une signature interféron, illustre bien ce lien entre le système inné et adaptatif dans le SSp. L'activation des cellules épithéliales par les virus (Ittah et al., 2008) qui induit la production de BAFF par voie d'interféron, qui à son tour va activer les LB. Ainsi, en présence d'un taux élevé de BAFF et d'IFN, on pourra émettre l'hypothèse que les LB auto-réactifs échappent à l'élimination.

1.5.3 Les autoanticorps

La majorité (80%) des patients atteints de SSp possèdent des autoanticorps anti-SSA et/ou anti-SSB. La présence de ces autoanticorps est associée à une pathologie plus sévère. En dehors de leur très probable toxicité directe au niveau du myocarde fœtal, ces autoanticorps ne semblent pas posséder de pouvoir pathogène en eux-mêmes (Manoussakis et al., 2014). D'autres autoanticorps sont également présents au cours du SSp, comme les facteurs rhumatoïdes (RF) et associés aux manifestations extra-glandulaires. Des autoanticorps contre les récepteurs muscariniques de type M3, impliqués dans la production de la salive, semblent jouer un rôle direct dans la physiopathologie du SSp en altérant la fonction des salives dans les patients (Chen et al., 2016) . Ces autoanticorps sont encore controversés et ne sont actuellement pas recherchés en routine dans les laboratoires.

Pour conclure, le SSp est une maladie auto-immune complexe et hétérogène avec une étiologie multifactorielle. Plusieurs modèles murins, induits ou génétiques, ont été utilisés pour comprendre la pathogenèse de SSp humain. Ils ont été un outil très puissant pour identifier l'implication de nombreux facteurs essentiels tels qu'une éventuelle infection virale, l'hyperréactivité des LB, les auto-anticorps, les LT autoréactifs ainsi que l'apoptose des cellules épithéliales (Gao et al., 2020). Cependant, aucun modèle de souris n'a pu regrouper toutes les manifestations immunologiques et cliniques du syndrome de Sjögren (Figure 5).

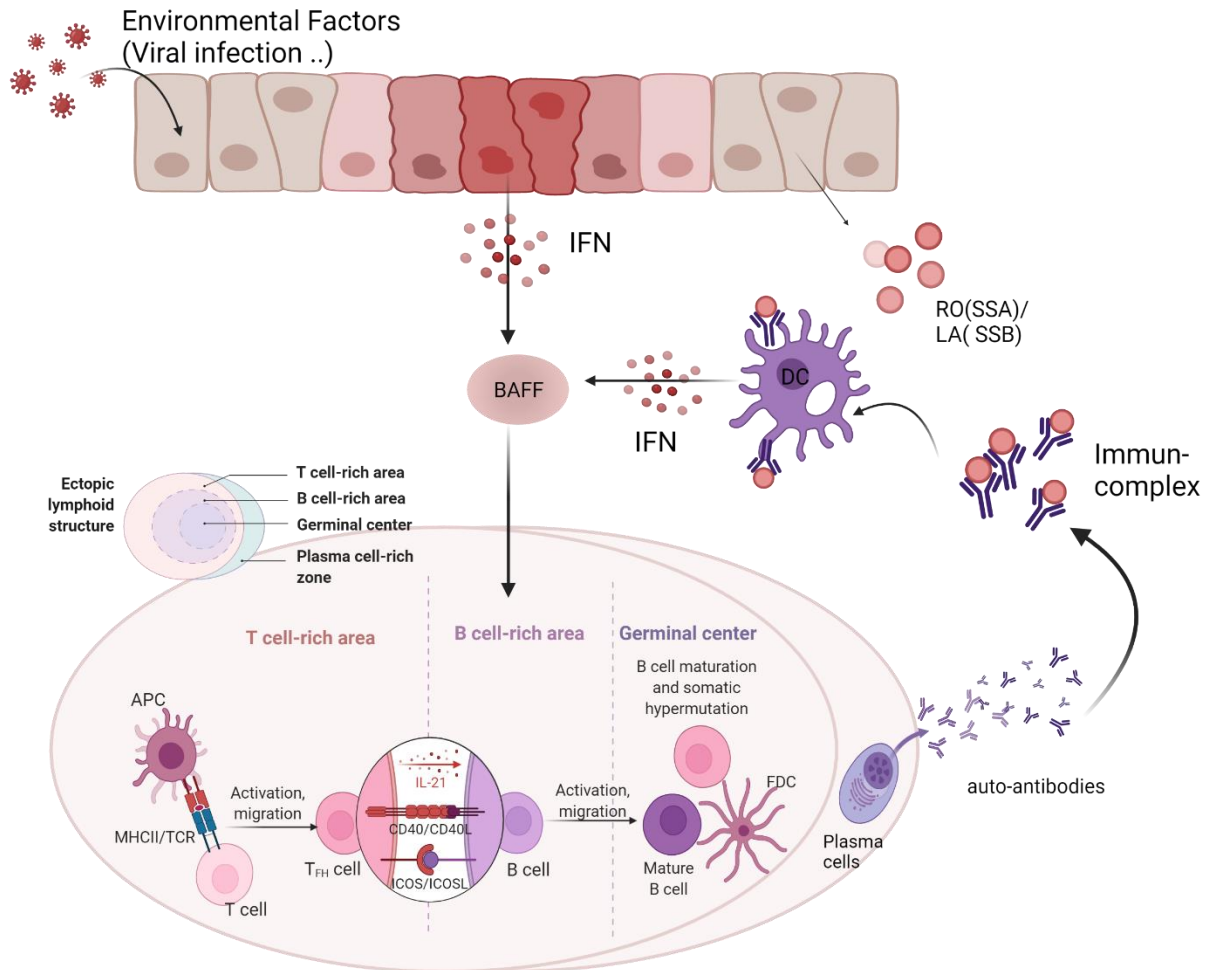


Figure 5 : Schéma récapitulatif du scénario de la physiopathologie de SSp.

L'activation de l'immunité innée, par des virus ou autres facteurs, engendre l'activation des cellules épithéliales. Une fois activées, ces cellules induisent la production de BAFF par voie de l'interféron, qui à son tour va activer les LB. Les cellules dendritiques également activées, vont à leur tour activer les LTh1, qui augmentent la production d'IFN. L'augmentation de sécrétion d'IFN, le relargage des autoantigènes par les cellules épithéliales, la sécrétion de BAFF excessive ainsi qu'une surexpression de CD40, crée un terrain favorable pour une activation chronique des LB et la production des autoanticorps. L'ensemble de ces mécanismes entraînerait une formation des centres germinatifs ectopiques. Abréviations : BAFF, B-cell-activating factor ; FDC, cellules Dendritiques folliculaires ; TFH, LT folliculaires ; TH1, type 1 T- helper ; IFN : Interferon (Figure créée sur BioRender.com).

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Les preuves de l'implication des LB dans la physiopathologie du SSp se sont multipliées ces dernières années, notamment par la formation des structures ectopiques dans les glandes exocrines, la production d'autoanticorps et les anomalies de distribution des sous populations des LB. Les LB auto-réactifs contribuent au développement du SSp en produisant divers autoanticorps, notamment des autoanticorps anti-SSA, mais aussi probablement par la présentation d'antigène et la production des cytokines (Daridon et al., 2007b) (Youinou and Pers, 2011).

L'hypothèse : les LB auto-réactifs reconnaissant la SSA peuvent être détectés parmi les LB circulants, mais échapperaient aux mécanismes de tolérance périphérique et seraient capables de se transformer en cellules sécrétant des IgG de haute affinité, responsables de la sécrétion des autoanticorps anti-SSA détectés dans le sérum des patients.

La présente étude a pour **objectifs** d'explorer, pour la première fois, les caractéristiques des LB réactifs à la SSA. Les résultats seront présentés en 3 parties. En premier lieu, **un article** décrit les caractéristiques phénotypiques des LB réactifs à la SSA dans une cohorte de patients atteints de SSp par rapport aux contrôles sains (HC). Par la suite, une analyse fonctionnelle et la génération des clones SSA⁺, réalisée au cours de ma mobilité au LUMC-Pays-Bas. Pour terminer, une première étude sur la caractéristique transcriptionnelle des LB réactifs à la SSA effectuée chez un sujet sain.

3. RESULTATS

Partie 1: Article

SSA-Reactive B Cells Escape Peripheral Tolerance Checkpoints in patients with primary Sjögren's syndrome

Nedra Chriti, Alice Tison, Emmanuelle Porchet, Nadège Marec, Valérie Devauchelle-
Pensec, Jacques-Olivier Pers, Sophie Hillion, Divi Cornec

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

Dans cette étude, nous avons effectué une caractérisation phénotypique des LB réactifs à la SSA dans une cohorte de patients atteints de SSp par rapport aux contrôles sains (HC). Nous avons mis au point une méthode de détection des LB auto-réactifs circulants, basée sur la spécificité de leur récepteur à l'antigène (BCR) envers la SSA. Nous avons testé, par ELISPOT, leur capacité à sécréter des immunoglobulines spécifiques de SSA *in vitro* après stimulation.

L'étude a inclus 51 patients atteints de SSp et 44 HC. Les patients SSp avaient une fréquence plus élevée des LB SSA⁺ (3,2 % [1 %-7,45 %]) par rapport aux HC (2,5 % [0,7 %-5,27 %]), $p < 0,05$. Nous avons pu montrer que les LB SSA⁺ triés des sujets sains étaient capables de sécréter des IgM *in vitro* mais pas des immunoglobulines IgG anti-SSA. Alors que la proportion des LB SSA⁺ parmi les LB transitionnels et naïfs était similaire chez les patients et les HC, leur proportion dans le compartiment mémoire était plus élevée chez les patients SSp. Une étude approfondie des sous populations montre une expansion des LB SSA⁺ dans un sous-ensemble des LB naïfs CD19⁺IgD⁺CD27⁻CD21^{low/-}CD11c⁻SSA⁺, chez les patients atteints de SSp. Les LB SSA⁺ étaient également enrichis dans un sous-ensemble des LB mémoires non commutés IgM^{low} chez les patients, ainsi que dans les LB mémoires double négatifs (IgD⁻CD27⁻) et LB mémoires commutés des différents isotypes.

En conclusion, nous montrons que chez les patients SSp, les LB SSA⁺ sont enrichis dans le compartiment des LB mémoires, suggérant que ces cellules échappent aux différents points de contrôle de la tolérance périphérique et se différencient *in vivo* en cellules sécrétrice des autoanticorps anti-SSA en SSp.

L'article a été soumis dans le journal *Arthritis and Rheumatology*.

SSA-Reactive B Cells Escape Peripheral Tolerance Checkpoints in patients with primary Sjögren's syndrome

Nedra Chriti, Alice Tison, Emmanuelle Porchet, Nadège Marec, Valérie Devauchelle-Pensec, Jacques-Olivier Pers, Sophie Hillion, Divi Cornec

INSERM UMR1227, Lymphocytes B et Autoimmunité, University of Brest, CHRU Brest, Brest, France

Correspondance : Divi Cornec, INSERM U1227 "B cell and AutoImmunity", University of Brest, CHRU Brest, Bd Tanguy Prigent, 29609 Brest cedex, Brest, France (divi.cornec@chu-brest.fr), Tel : +33298347264

Key words

Sjögren's syndrome; B cells; autoreactive B cells; autoimmunity; tolerance checkpoints

Disclosures

The authors declare no conflicts of interest concerning this work.

Abstract

Background and objectives

B cells play a central role in primary Sjögren's syndrome (pSS), but little is known about the auto-reactive B cells that secrete autoantibodies against the autoantigen SSA. Here, we aimed to characterize the circulating SSA-specific B cells (SSA⁺ B cells), in order to better understand the mechanisms leading to the breakdown of self-tolerance in patients with pSS.

Patients and Methods

Using a flow-cytometry-based method, we detected and phenotypically characterized SSA⁺ B cells among peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from patient with pSS and from healthy controls (HCs). We tested, by ELISPOT, their ability to secrete SSA-specific immunoglobulins *in vitro* following stimulation.

Results

We included 51 patients with pSS and 44 HCs. pSS patients had a higher frequency of SSA⁺ B cells (3.2% [1%-7.45%]) compared to HCs (2.5% [0.7%-5.27%]), $p < 0.05$. Sorted SSA⁺ B cells from HCs were able to secrete *in vitro* IgM but not IgG anti-SSA immunoglobulins. While the proportion of SSA⁺ B cells among transitional and naïve B cells were similar in patients and HCs, their proportion within the memory compartment was higher in pSS patients. Expansion of a CD19⁺IgD⁺CD27⁻CD21^{low}-CD11c⁺SSA⁺ naïve B-cell subset with a downregulated B cell receptor was observed in pSS patients. SSA⁺ B cells were also enriched within the IgM^{low} unswitched memory B-cell subset in patients, as well as in double negative (IgD⁻CD27⁻) and switched memory B cells of the different isotypes.

Conclusions

In pSS patients, autoreactive SSA⁺ B cells mature and reach the memory compartment, suggesting that they escape to the different layers of peripheral tolerance checkpoints and differentiate *in vivo* into anti-SSA antibody-secreting cells.

Introduction

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a chronic autoimmune disease characterized by a lymphocytic infiltration of the salivary and lacrimal glands, leading to dryness of the mouth and eyes referred to as sicca symptoms (1). A third of the patients also develop systemic complications, such as pulmonary, renal or neurological involvement, and 5 to 10% of the patients may develop B-cell lymphoma (2) (3). The prevalence of pSS ranges from 0.9 to 6 per 1,000 individuals with a female-to-male predominance of 9:1 and peak incidence at approximately 50 years of age (1) (4) (5). Although the pathogenesis of pSS remains unclear, many different factors lead to the dysregulation of the immune system and disease occurrence. B cells play a central role (6) (7), as suggested notably by the dysregulation of the cytokine BAFF (8). Although no drug is currently approved for the disease, different B-cell targeting agents are currently evaluated in clinical trials (1). Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies are a hallmark of pSS, that can be detected respectively in 70% and 50% of pSS patients (9).

During B cell development, autoreactive B cells are eliminated by central and peripheral tolerance checkpoints. At the peripheral level, they are first selected at **transitional checkpoint**, then at other peripheral checkpoints, including follicular exclusion, antigen presentation of follicular dendritic cells, co-stimulation and T cell help (described as **pre and post germinal center checkpoints**) (10). In normal conditions, some autoreactive B cells are able to secrete low-affinity autoantibodies, mostly of the IgM isotype, a phenomenon described as natural autoimmunity. However, some of them escape central and peripheral B cell tolerance mechanisms in patients with autoimmune diseases, as suggested by the increase of the frequencies of transitional, mature naïve and memory B cells expressing autoreactive antibodies in

patients with pSS or systemic lupus erythematosus, leading to the secretion of high-affinity autoantibodies of the IgG isotype (11) (12) (14).

On the other hand, a modest self-reactivity could be a positive selection factor in normal early B-cell development steps. Transgenic mice models harboring self-reactive B cells have described that most of autoreactive B cells responses could be restrained by functional silencing referred as to clonal anergy. Anergy is characterized by an impairment of B cell receptor (BCR) signaling through a broad range of mechanisms mainly dependent on the BCR specificity (15) (16). In humans, anergic B cells were characterized in the periphery as B cells expressing low amount of BCR molecules at their surface and a downregulation of its co-receptor CD21 (17). An accumulation of CD21^{low} B cells has been reported in patients with pSS (18). These CD21^{low} B cell populations were found increased in other conditions of chronic antigen stimulation and are usually considered as anergic or exhausted (14) but other studies showed activated populations among these cells in autoimmune diseases such as SLE (19).

Studies of antigen-specific autoreactive B cells showed impairment of central and peripheral tolerance in patients with different autoimmune diseases (20)(21). Citrullinated peptide-specific B cells display markers of class-switched memory B cells in patients with RA (22) (23). Circulating proteinase 3 (PR3)-specific B-cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis (AAV), were also found increased with the maturation of B cells suggesting also an impairment of peripheral tolerance checkpoints (24). Insulin-binding B cells (IBCs) were reported to be enriched in the anergic CD21^{low} B cell compartment and a loss of this compartment was observed in patients with type 1 diabetes (T1D) (25).

We therefore hypothesized that autoreactive B cells recognizing SSA can be detected among circulating B cells in healthy individuals and patients with pSS. However, their maturation process would be restrained in healthy individuals, whereas in patients these SSA-specific B cells would escape the mechanisms of peripheral tolerance, and would be able to secrete the anti-SSA autoantibodies detectable in the serum. The present research explored, for the first time, the phenotype of SSA-reactive B cells in a cohort of patients with pSS compared to healthy controls (HCs). We observed that B cells reactive to SSA accumulated through B-cell maturation stages in pSS patients, suggesting that they escape the peripheral tolerance checkpoints.

METHODS

Patients and controls

Blood from 51 patients with pSS and 44 HCs was collected. pSS diagnosis was based on the ACR/EULAR criteria (3). Patients' characteristics are shown in **Table 1**. Patients were recruited during routine evaluation within the rheumatology department at the University Hospital of Brest. All subjects provided written informed consent, and the study was approved by an ethical committee (CPP Sud Ouest et Outre Mer III, ID912, n°18.07.30.65537).

Flow-cytometry method to detect circulating auto-reactive B cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with pSS and HCs were obtained by density-gradient centrifugation. Cells ($5 \cdot 10^5$) were stained in PBS 1% BSA with 0.25 μg SSA-biotin (Ro[SSA]-60 ATR02, AROTEC DIAGNOSTICS/ Lightning-Link® Rapid Biotin Type A Labeling Kit; ref 370-0005, adapted from a previously described method (24)), and different antibodies (anti-CD19-APC-Alexa Fluor 700, anti-CD27-PC7, anti-CD38-PC5.5, anti-CD21 Pacific blue, anti-CD11c PE and anti-CD24-APC-Alexa Fluor 750, obtained from Beckman Coulter, anti IgM BV650 from Biolegend, anti-Human IgD-APC from BD, anti-Human IgG-BV521 from BD on ice for 15 min, washed 3 times in PBS 1% BSA at 400g, incubated for 15 min with streptavidin-FITC (BD-554060), washed in PBS 1% BSA at 400g. For each experiment, unstained cells were used as negative control. Fluorescence was measured on a flow cytometer Cytoflex S (Beckman Coulter). FACS data were analyzed and graphed using KALUZA (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) and FlowJo (Ashland, Oregon) softwares.

Functional analysis of auto-reactive B cells by ELISPOT

We measured by ELISPOT the ability of SSA-reactive B cells (SSA⁺ B cells) to secrete in vitro immunoglobulins of different isotypes against SSA, following the manufacturer's instructions (Mabtech, Nacka Strand, Sweden). Briefly, PBMC enriched in B cells from HCs were FACS-sorted based on FITC-streptavidin expression to isolate SSA⁺ B cells and the depleted fraction (SSA⁻ B cells). SSA⁺ B cells and SSA⁻ B cells were cultured and stimulated for 24h with 1 µg/ml R848 (TLR7/8 agonist) (Mabtech) and 10 ng/ml recombinant human (rh)IL-2 (Mabtech). MSIP Multiscreen plates (Millipore) pre-wetted with 35% ethanol were coated with 15 µg/ml anti-IgG or anti-IgM in PBS overnight at 4°C. Blank controls were incubated in PBS only. Coating was followed by incubation with blocking buffer solution (RPMI containing 10% FCS) for at least 30 min at room temperature (RT). Pre-stimulated cells were then added to the plate with 100µl cell suspension/well for an incubation between 18-21h (for a cell concentration of 10,000cells / well and 30,000 cells / well for anti-SSA⁺ B cells, anti-SSA⁻ B cells respectively). After steps of washing, biotinylated SSA (1µg/ml) was used for detection of autoreactive antibodies. Followed with incubation with streptavidin (diluted 1/1000 in PBS supplemented with 0.5% FCS) conjugated with horseradish peroxidase (Mabtech) for 1h at RT and then incubated with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (Mabtech) for another 25 min at RT for detection of antibodies binding. The reaction was stopped by rinsing the plate with tap water and the plate was left to dry in darkness. Plates were analyzed with the AID plate Reader (AID GmbH).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad prism software version 8. Groups were compared using non-parametric Mann-Whitney test. The data are

expressed as the mean of frequency +/- standard deviation or median [interquartile range (IQR)]. P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

TABLE 1 | Features of patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and healthy controls (HCs). (NA: Not applicable, MSGB: minor salivary gland biopsy)

	pSS (N=51)	HCs (N = 44)	P
Age at study entry (median. [IQR])	57 [47.5;71]	52 [43;68.75]	0.244
Sex (male/female). n (%)	6 (11.8) / 45 (88.2)	10 (24.4) / 31 (75.6)	0.03
Disease duration			
n < 5 years (%)	14 (28.5)	NA	
5 ≤ n < 10 years (%)	13 (26.5)	NA	
10 ≤ n < 20 years (%)	15 (30.6)	NA	
n ≥ 20 years (%)	7 (14.3)	NA	
Laboratory data			
Lymphocytes. Giga/L (median. [IQR])	1.49 [1.2;1.9]	1.9 [1470;2193]	0.012
CRP. mg/L (median. [IQR])	1.9 [0.6;3.6]	NA	
IgA. g/L (median. [IQR])	3.12 [2.4;3.7]	NA	
IgG. g/L (median. [IQR])	15.7 [11.3;17.8]	NA	
IgM. g/L (median. [IQR])	1.1 [0.9;1.8]	NA	
C4. g/L (median. [IQR])	0.21 [0.18;0.27]	NA	
positive AAN. n (%)	35 (68.6)	NA	
positive SSA. n (%)	40 (78.4)	NA	
positive SSB. n (%)	16 (31.4)	NA	
positive FR. n (%)	25 (49.0)	NA	
ESSDAI score			
1 to 5 (mild or moderate)	44	NA	
> 5 (severe)	7	NA	
ESSPRI Score			
<5	21	NA	
≥5	30	NA	
Abnormal MSGB: focus score ≥ 1. n (%)	32 (62.7)	NA	

Results

Alteration of circulating B-Cell distribution in pSS patients

Previous studies have shown an abnormal distribution of circulating B cell subsets in pSS patients (26) (27). Using a multiparametric flow cytometry approach, we first studied the frequency of primary B-cell subsets in 51 patients with pSS and 44 HCs. Using our approach, we first segregated total CD19⁺ B cells into CD38⁺CD24⁺ mature B cells and CD38^{hi}CD24^{hi} transitional B cells, and CD38⁺CD24⁻ plasmablasts (PB). Mature B cells were further subdivided into 4 populations based on the expression of IgD and CD27 (**Figure 1a**) i) IgD⁺CD27⁻ naïve B cells, ii) IgD⁺CD27⁺ unswitched memory (UnSW) B cells, iii) IgD⁻CD27⁺ switched memory (SwM) B cells and, iv) IgD⁻CD27⁻ double negative (DN) B Cells. Finally, plasmablasts (PB) were defined among CD19⁺ B cells based on the high expression of CD27 and CD38.

Our results confirmed the alteration of B-cell subset distribution in pSS patients (**Figure 1b**). pSS patients were characterized by the increase of CD38^{hi}CD24^{hi} transitional and IgD⁺CD27⁻ naïve B cells and the decrease of CD27⁺ memory B cells when compared to HCs (**Figure 1c**).

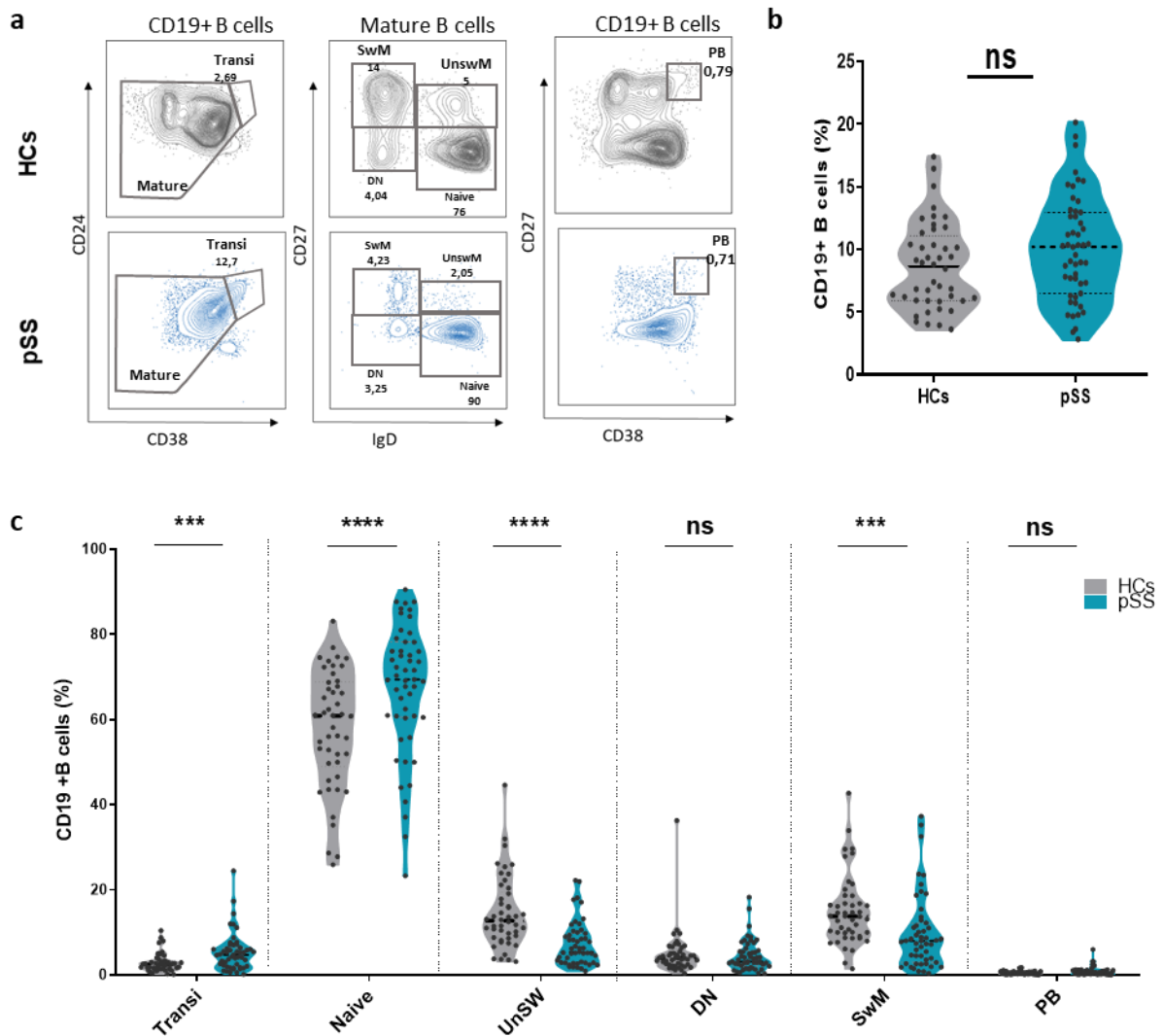


Figure 1. Circulating B cells in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and healthy controls (HCs). **a-** Gating strategy used to define circulating B cell subsets in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HCs (n=44) and pSS patients (n=51). First, based on CD24 and CD38 expression, CD19⁺ cells were divided into transitional (Transi, CD24^{hi}CD38^{hi}) and mature B cells (CD24⁺CD38⁺). Mature B cells were further classified into four populations: naive (CD27⁻IgD⁺), unswitched memory (UnswM, CD27⁺IgD⁺), switched memory (SwM, CD27⁺IgD⁻), and double negative (DN, CD27⁻IgD⁻). Plasmablasts (PB, CD27^{hi}CD38^{hi}) were defined based on the expression of CD38 and CD27. **b-** Plots depicting the frequency of CD19⁺ B cells in pSS patients (blue) and HCs (grey). **c-** Plots depicting the frequency CD19⁺ B-cell subsets in pSS patients (blue) and HCs (grey). Each data point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figure are indicated as *** p < 0.001, ****p<0,0001, ns: not significant.

Autoreactive anti-SSA-positive B cells are found in patients with pSS and HCs

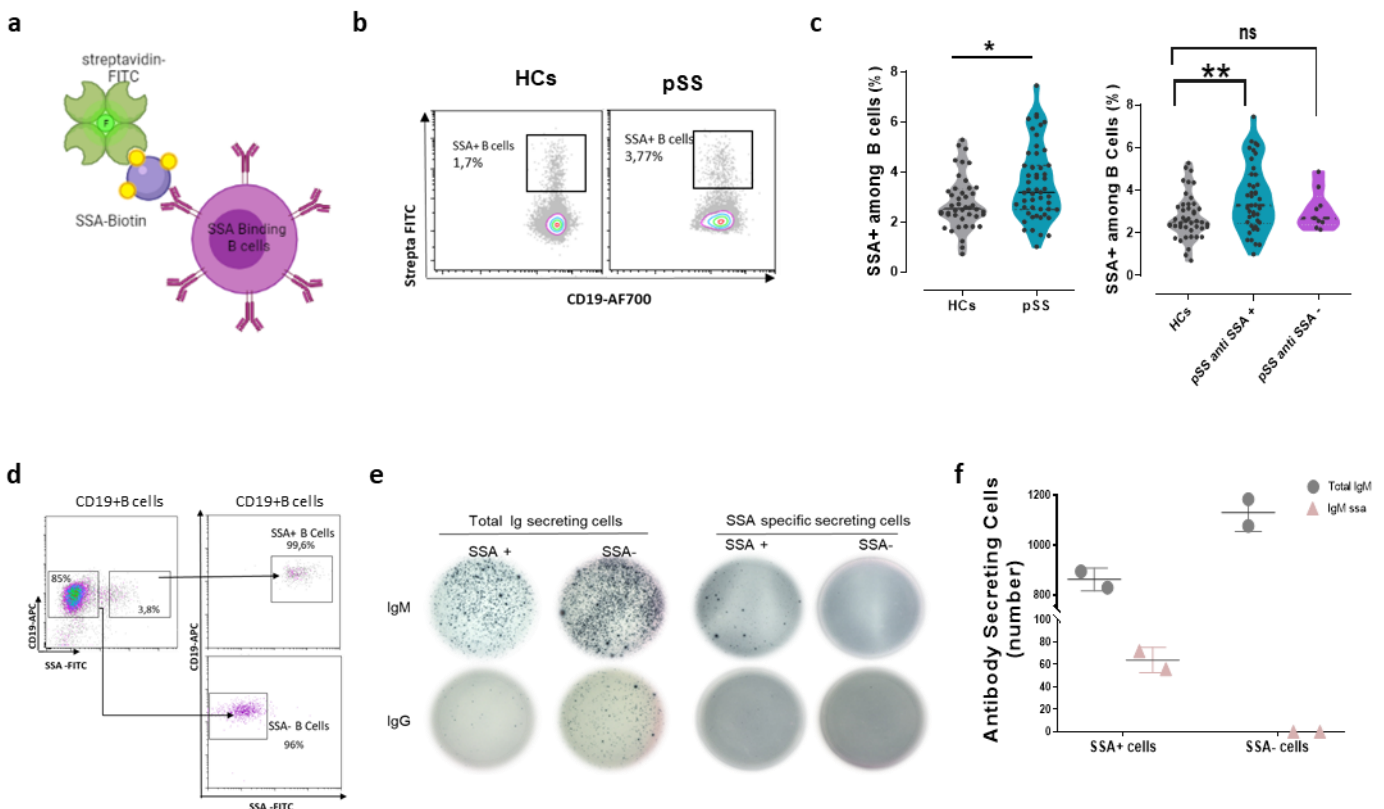
To characterize B cells specific to SSA, we used a flow cytometry assay based on the specificity of the BCR to the SSA autoantigen using a biotinylated SSA antigen (adapted from (24), **Figure 2a**). As expected, SSA⁺ B cells were detected in PBMCs from pSS patients and HCs (**Figure 2b**), but pSS patients showed a higher frequency of SSA⁺ B cells (3.2% [1%-7.45%]) compared to HCs (2.5% [0.7%-5.27%]), $p < 0.05$, (**Figure 2c**). Interestingly, SSA⁺ B cells were increased in the group of patients with high levels of anti-SSA antibodies in serum compared to the seronegative group. Taken together, these observations suggested an association between the frequency of SSA⁺ B cells and the production of anti-SSA antibodies in pSS patients. No significant association was found between the frequency of circulating SSA⁺ B cells and the clinical manifestations in the patients (data not shown).

SSA⁺ B cells produce anti-SSA antibodies

We then measured by ELISPOT the ability of SSA⁺ B cells to produce *in vitro* immunoglobulins of the different isotypes (IgM and IgG) against SSA after stimulation (**Figure 2d**). SSA⁻ B cells secreted both total IgM and IgG whereas SSA⁺ B cells secreted almost exclusively total IgM. Only SSA⁺ B cells were able to produce SSA specific IgM (**Figure 2e-f**). These results validate the flow cytometry assay for SSA⁺ B cells, and confirmed that our detection method accurately detects circulating SSA-reactive B cells that are restricted to IgM-producing B cells in HCs.

Figure 2: Validation of the flow cytometry assay optimized to detect SSA⁺ B cells.

a- Method for identification of SSA-reactive B cells (SSA⁺ B cells) among CD19⁺ B cells. **b-** Representative detection of SSA⁺ B cells in PBMCs from primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls (HCs). **c-** Frequency of SSA⁺ B cells in pSS patients (n=51) and HCs (n=44). **d-** Gating strategy and validation of SSA⁺ and SSA⁻ B cell sorting in HCs. **e-** Analysis of the capacity of stimulated SSA-reactive B cells to produce anti-SSA antibodies by ELISPOT. Total secreting cells have been elicited as a positive control. **f-** Plots presents the spot number of total IgM or anti-SSA-specific IgM in HCs (n=2).



SSA⁺ B cells are enriched within the memory B-cell compartment in patients with pSS

We next analyzed the frequency of SSA⁺ B cells within B-cell subsets by flow cytometry. Gating strategies to identify B-cell subsets are shown in **Figure 3a**. We observed that the proportions of SSA⁺ B cells among transitional B cells were similar between pSS patients and HCs as well as in the transitional compartment T1, T2 and T3 (**Supplementary Figure 1**), suggesting that the central checkpoint and the first peripheral checkpoint (i.e. the transitional checkpoint) were not deficient in patients with pSS. The percentages of SSA⁺ among naive B cells in pSS patients was also comparable to HCs. On the other hand, SSA⁺ B cells were enriched among memory B cells, i.e. UnSW, SwM and DN “atypical memory B cells” (**Figure 3b**) suggesting that autoreactive B cells were not excluded from the maturation process toward memory B cells in patients. However, SSA⁺ B cells did not show enrichment in the plasmablast circulating compartment in pSS compared to HCs.

The enrichment of SSA⁺ B cells among memory B cells in patients was illustrated by assessing the ratio of the frequency of SSA⁺ within SwM B cells over the frequency of SSA⁺ within naïve B cells. The median ratio was <1 in HCs but was >1 in patients with pSS, illustrating the impairment of peripheral tolerance checkpoint (**Supplementary Figure 1**). Together these results suggested that SSA⁺ B cells accumulated through the maturation process in pSS patients and escaped putative peripheral tolerance checkpoints.

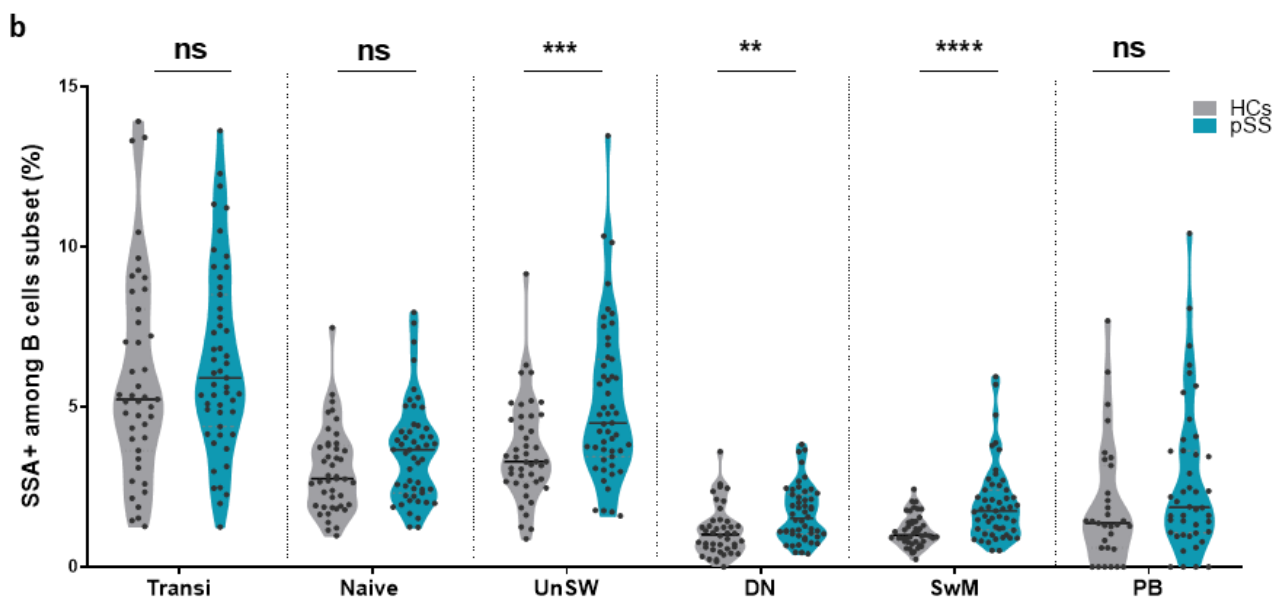
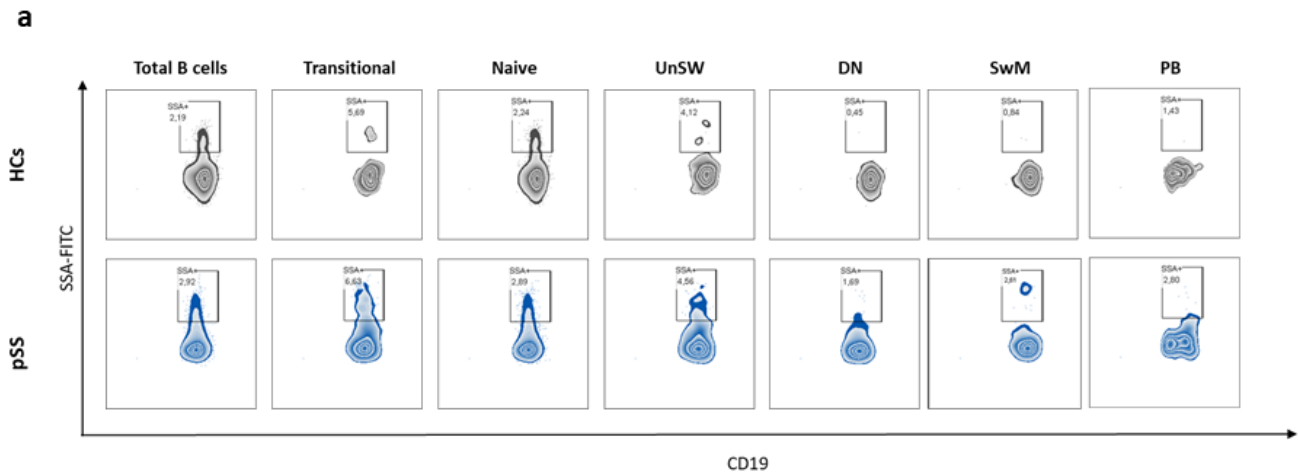


Figure 3: Distribution of SSA+ B cells among B-cell subsets. **a-** Gating strategy used for identification of SSA+ B cells among B-cell subsets. **b-** Percentage of SSA+ B cells in each B-cell subset in PBMCs from healthy controls (n= 44) and pSS patients (n=51). Each data point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figures are indicated as *** p < 0.001, ****p<0,0001, ns: not significant.

Expansion of SSA⁺ B cells in CD21^{low} Naïve B cells

We then undertook studies to characterize more deeply the naïve compartment, in order to explore which maturation pathways could be deficient in patients with pSS. Based on the expression of CD21 and CD11c, naïve B cells can additionally be separated into resting naïve (CD11c⁻CD21⁺, rNav), activated naïve (CD11c⁺CD21⁻, aNav) (28), and the CD21^{low/-} CD11c⁻ population (**Figure 4a**). CD21^{low/-} CD11c⁻ naïve B cells were expanded in patients with pSS, and autoreactive SSA⁺ B cells were increased within this subset in patients compared to HCs (**Figure 4b, c**). We investigated the expression of IgM and IgD within these CD21^{low/-}CD11c⁻ naïve B cells. Remarkably, CD21^{low/-}CD11c⁻ naïve B cells expressed low levels of IgD and IgM compared to other naïve B-cell subsets in pSS and HCs (**Figure 4d**), a phenotype previously associated with anergy or chronic antigen stimulation (29).

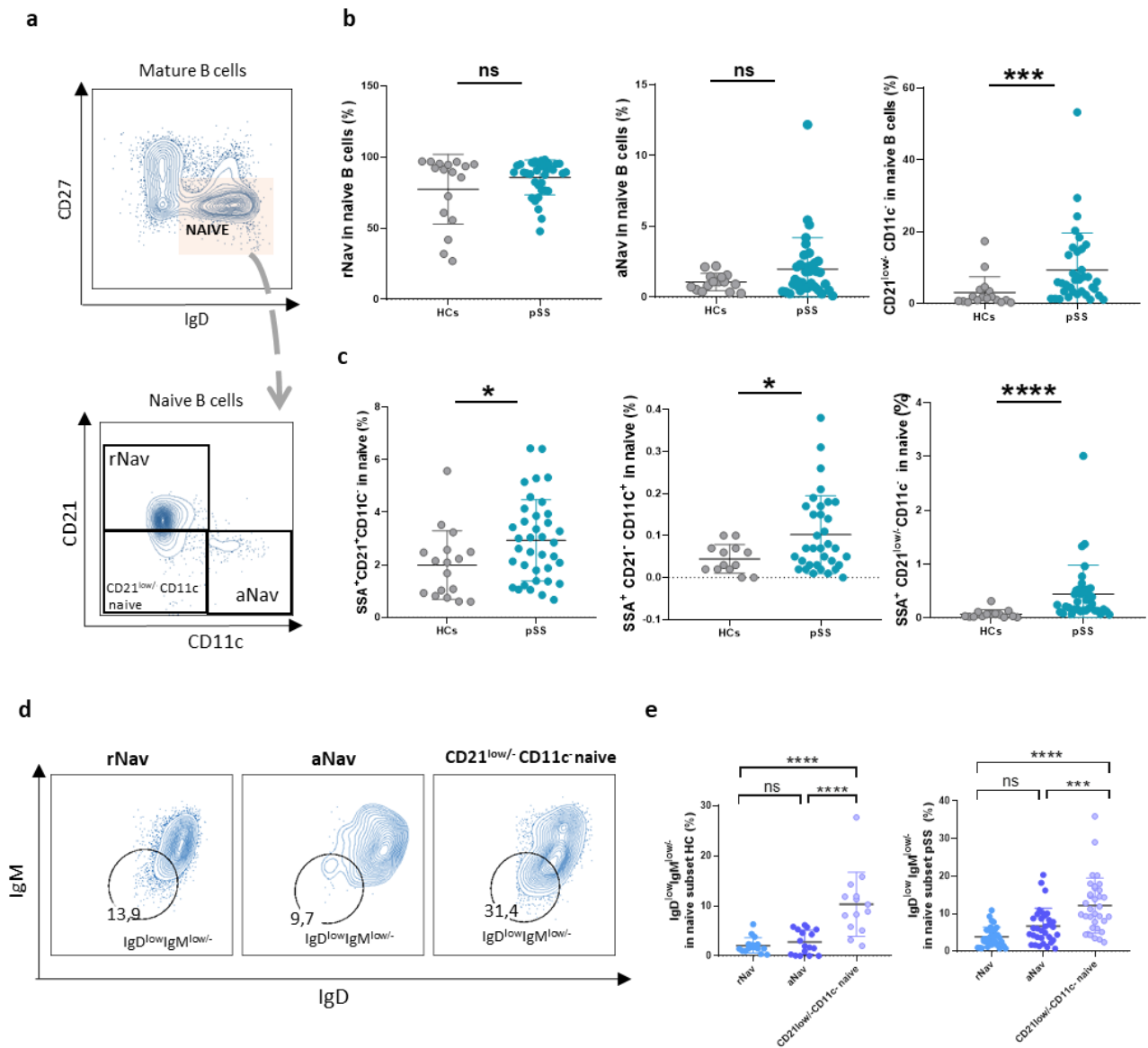


Figure 4: Frequency of SSA⁺ B cells among naive B-cell subsets in patients with pSS and healthy controls (HCs). **a-** Gating strategy to identify naive B-cell subsets. Based on the expression of CD21 and CD11c, we defined 3 distinct populations: rNav (CD21⁺CD11c⁺), aNav (CD21⁻CD11c⁺), and naive CD21^{low}-CD11c⁻. **b-** Comparative analysis of the 3 subsets of naive B cells from pSS patients and HCs. **c-** Comparative analysis of the frequency of SSA⁺ B cells among subsets of naive B cells in pSS patients and HCs. **d-** Based on the expression of IgM and IgD, we determined IgM^{low}IgD^{low} B cells and compared the proportion of these cells among naive compartments in pSS patients and HCs. **e-** Comparative analysis of IgM^{low}IgD^{low}

cells among rNav, aNav and naïve CD21^{low}-CD11c⁻ in pSS patients (n=37) and HCs (n=17). Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median value. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figures are indicated as *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ****<0,0001, ns = not significant.

Expansion of autoreactive SSA⁺ B cells in IgM^{low} unswitched memory B cells

We next investigated the proportion of SSA⁺ B cells in UnSW memory B cells (**Figure 5a**). Deeper characterization of this population showed a major increase of a fraction of UnSW memory B cells characterized by a downregulation of IgM in pSS patients (**Figure 5b**). Interestingly, the proportion of autoreactive SSA⁺ B cells was significantly increased in the CD27⁺IgD⁺IgM^{low} UnSW memory subset in patients with pSS compared to HCs, while their proportion in the CD27⁺IgD⁺IgM⁺ UnSW memory subset was similar in patients and controls (**Figure 5c**). A selective downregulation of the IgM BCR on autoreactive B cells has been previously reported (30), supporting our hypothesis that these SSA⁺ UnSW B cells are autoreactive in patients with pSS.

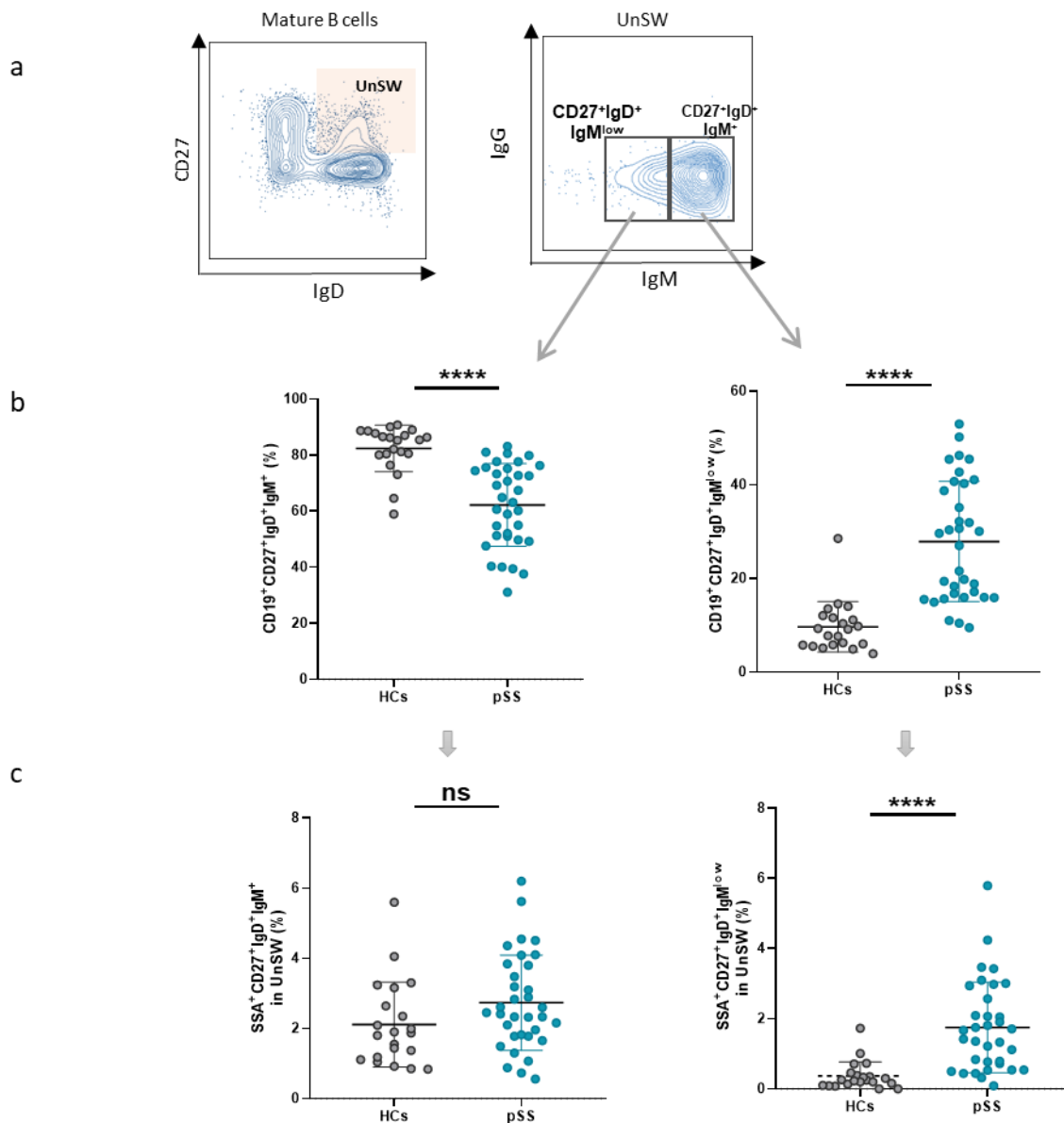


Figure 5: Frequency of SSA⁺ B cells among UnSW memory subset in pSS patients and healthy controls (HCs). **a-** Gating strategy to identify IgM expression in unswitched (UnSW) memory compartment. Based on the expression of IgM, we defined 2 distinct populations: a main population of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ and a minor population of IgM^{low} IgD⁺CD27⁺ UnSW memory B cells. **b-** Comparative analysis of 2 subpopulations of UnSW memory in pSS patients (n=38) and HCAs (n=17). **c-** Comparative analysis of the frequency of SSA⁺ B cells among the two subpopulations of UnSW memory B cells. Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the mean. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney

test. P values in the figures are indicated as *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** < 0.0001
ns = not significant.

SSA⁺ B cells are increased in the different subsets of DN B cells in patients with pSS

We next investigated the frequency of SSA⁺ B cells among DN B cells. DN B cells were previously fractionated into 3 subsets (DN1 to DN3) based on CD11c and CD21 expression (**Figure 6a**) (28). DN1 (IgD⁻CD27⁻CD21⁺CD11c⁻) represented the majority of DN B cells, and considered generated through the germinal center maturation pathway (19). The second population referred to as DN2 (IgD⁻CD27⁻CD21⁻CD11c⁺) has been described as precursors of short-lived plasmablasts generated through the extra-follicular (EF) pathway. Finally, DN3 (IgD⁻CD27⁻CD21^{low/-}CD11c⁻), a population recently described (31) and not yet fully characterized, was suggested close to the aNav and DN2 populations. When studying the frequency of each of the DN B-cell subsets, we found out that the DN3 cells were significantly increased in patients with pSS compared to HCs. The proportions of SSA⁺ B cells were increased in patients compared to HCs within the 3 DN subsets, but the most significant enrichment of SSA⁺ B cells was found among the DN2 subset (**Figure 6b**). DN B cells showed a decrease of IgG⁺ DN accompanied with an increase of IgM⁺ DN in patients with pSS compared to HCs, a finding that was observed similarly within the different DN subsets (DN1 to DN3) (**Supplementary Figure 3**).

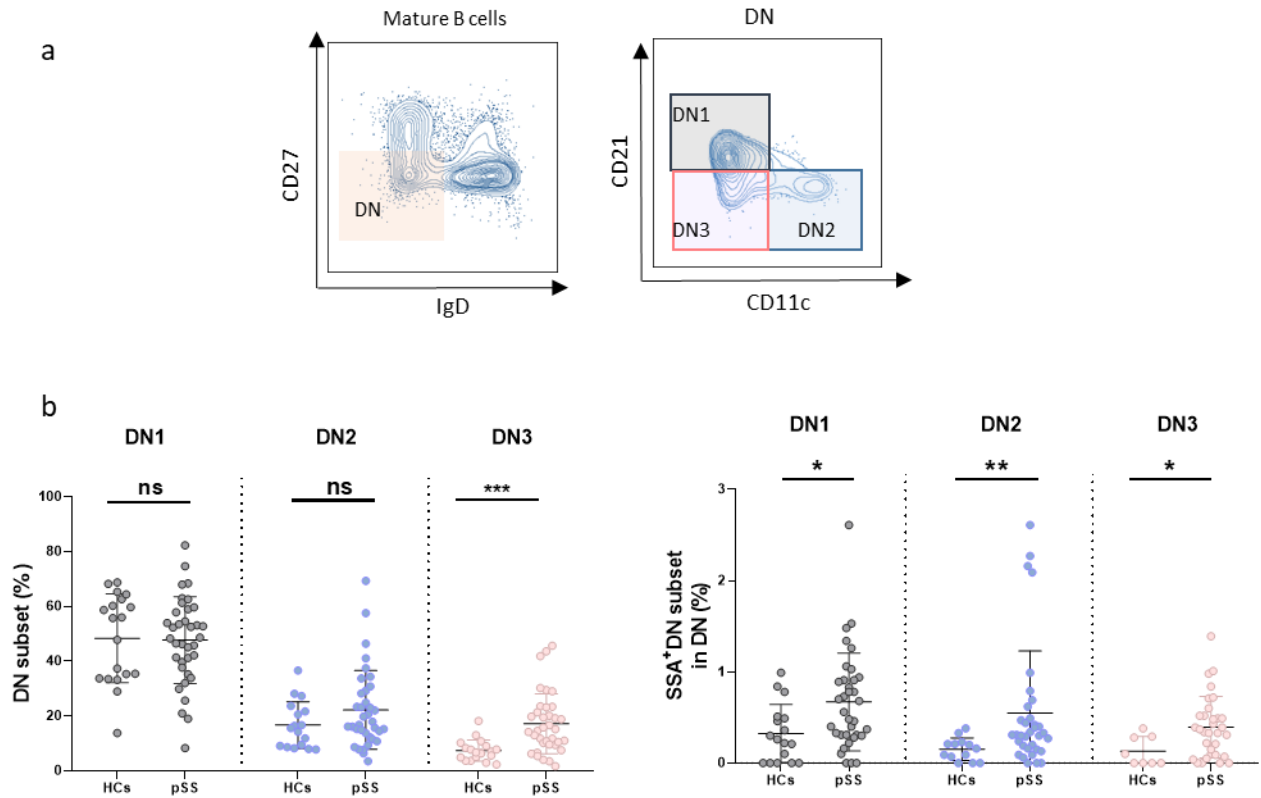


Figure 6: Frequency of SSA⁺ B cells among DN B cells in pSS patients and healthy controls (HCs). **a-** Gating strategy to identify DN subsets. Based on the expression of CD21 and CD11c, we defined 3 distinct populations: DN1 (CD21⁺CD11c⁺), DN2 (CD21⁻CD11c⁺) and DN3 (CD21^{low/-}CD11c⁻). **b-** Comparative analysis of the proportion of the DN subsets among total DN B cells, and SSA⁺ B DN among DN sub compartment in pSS patients (n=38) and HCs (n=17). Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the mean. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figures are indicated as *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ****<0,0001, ns = not significant.

Autoreactive SSA⁺ B cells are enriched in switched memory B cells in patients with pSS

We finally studied the proportion of SSA⁺ B cells among SwM according to their BCR isotype. We defined IgG⁺ SwM, IgM⁺ SwM and IgG⁻IgM⁻ SwM that are probably mostly IgA⁺ memory B cells (**Figure 7a**). Their proportions were similar in patients with pSS and HCs (**Figure 7b**). In line with our expectations, we found a high frequency of SSA⁺ B cells among the different isotypes of SwM B cells in pSS patients compared to HCs (**Figure 7c**).

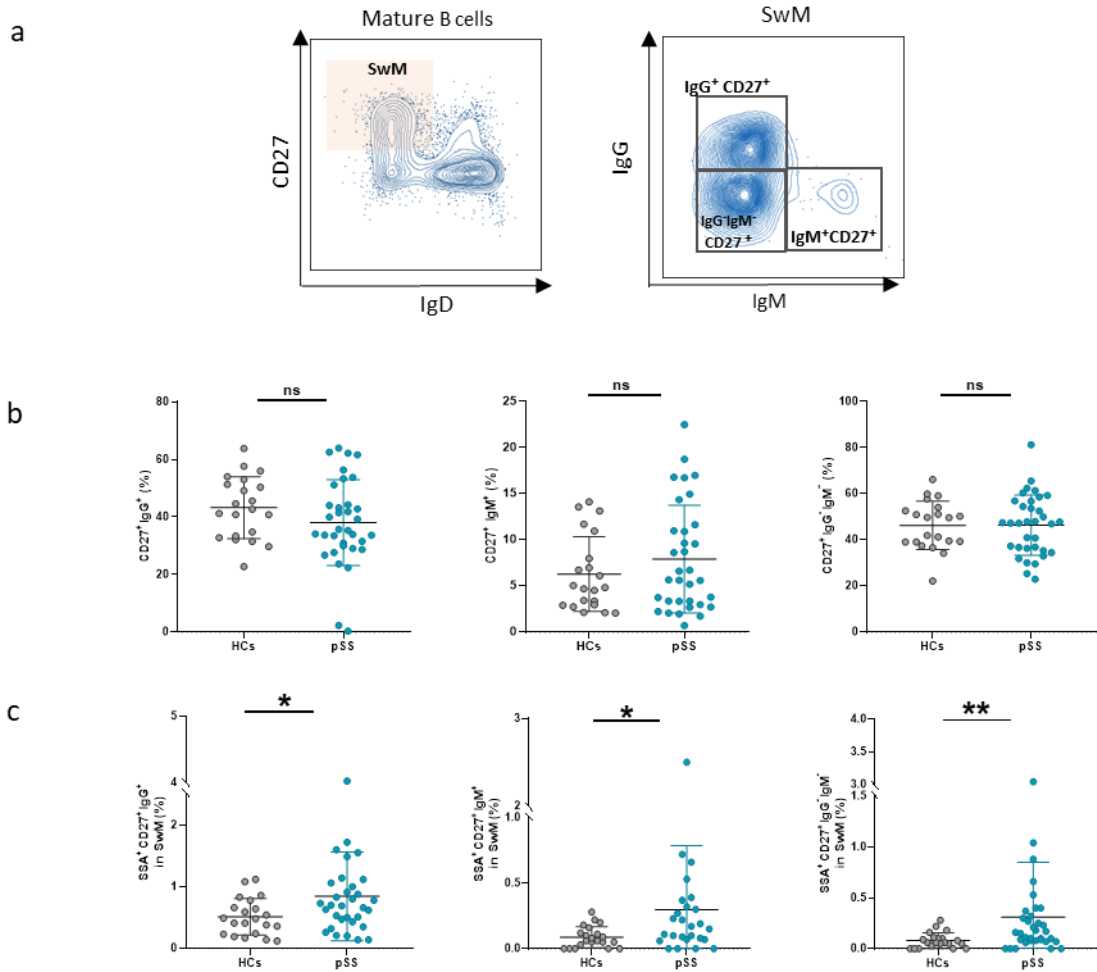


Figure 7: Frequency of SSA⁺ B cells among switched memory B cells in pSS patients and healthy controls (HCs). **a-** Gating strategy to identify the isotype of switched memory (SwM) B cells. Based on the expression of IgM and IgG, we determined 3 subsets for SwM: IgM⁺ SwM (pre-switched), IgG⁺ SwM, and IgG⁻IgM⁻ SwM. **b-** Comparative analysis of frequency of each isotype among SwM in pSS and HCs. **c-** Comparative analysis of the frequency of SSA⁺ B cells among SwM isotypes. Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the mean. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figures are indicated as *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ****<0,0001, ns = not significant.

Discussion

This study is the first example of *ex-vivo* identification, isolation and characterization of SSA⁺ B cells in patients with pSS, and sheds new lights on the involvement of B cells in the disease processes.

Using flow cytometry and a multicolor/streptavidin staining approach, we set up a new method to identify SSA⁺ B cells based on the reactivity of their BCR to antigen (32), adapted from a strategy we previously developed (24). Specificity of the staining was confirmed with the production of anti-SSA antibodies exclusively by the fraction of sorted SSA⁺ B cells, confirming the full recovery of circulating SSA-reactive B cells as detected by FACS in HCs. Whether all SSA⁺ B cells are actually able to secrete anti-SSA antibodies is still unknown, and further studies are needed to better understand the fine specificity of these clones.

Our analyses show a remarkable higher circulating levels of SSA⁺ B cells in pSS compared to HCs. These results confirmed an impairment of general tolerance checkpoint in pSS as proposed in other autoimmune diseases. The increased levels of SSA⁺ B cells exclusively in the group of patients with detectable anti-SSA antibodies in serum compared to the seronegative group, suggest that these SSA⁺ B cell may represent a precursor of autoreactive antibody-secreting cells responsible *in vivo* for the production of anti-SSA antibodies in patients with pSS (33).

Next, we sought to determine the stage of B-cell development at which tolerance was broken in patients with pSS. In order to indirectly study these tolerance checkpoints, we compared the proportion of autoreactive SSA⁺ B cells at each B-cell developmental stage between HCs and patients with pSS. First, to determine whether early B-cell tolerance checkpoints are defective, we compared the frequencies of

autoreactive SSA⁺ B cells in new emigrant/transitional and mature naïve B cells. Contrarily to other antigen-specific B cells in SLE and RA (34) (33), we detected SSA⁺ B cells at the same level within these subsets in patients and HCs, suggesting no abnormal specific mechanisms governing central and transitional checkpoints in pSS compared to HCs.

Autoreactive B cells not eliminated at the transitional checkpoint and reaching the naïve B cell stage may be silenced by anergy and be subjected to follicular exclusion (35). Anergic B cells among naïve B cells are characterized by the downregulation of the co-receptor CD21 (29). Previous studies have reported an expansion of CD21^{low/-} B cells in autoimmune diseases including pSS characterized by the CD27⁺CD21^{low/-} phenotype (18). This phenotype may result from a chronic antigenic stimulation by B-cell receptor engagement leading to an eventual reduction in signaling capacity and CD21. Subsets of CD21^{low/-} B cells expressing high levels of CD11c include also activated populations such as aNav and DN2 that were also found expanded in SLE (19).. In the present study, the enrichment of SSA⁺ B cells among CD21^{low/-} B cells and/or in subsets characterized by a down-regulation of the BCR in both naïve and UnSW memory compartments suggests that anergy is the major force trying to control SSA⁺ B cells in the naïve compartment and pre-GC checkpoints in pSS. However, this mechanism seems to be eventually insufficient, since autoreactive B cells in the patients continue their maturation towards the memory compartments.

Enrichment of SSA⁺ cells among mature switched memory B cells and the DN compartment highlights an impairment of other peripheral checkpoints in pSS. Previous studies demonstrated that continuous antigenic stimulation supported the formation of human memory B cells and production of poly- and self-reactive antibodies by the action of T_{FH} (36). CD21^{low/-} B cells were demonstrated to have a

potent antigen presentation function (37). This supports our hypothesis that anergic SSA⁺ B cells would be eventually able to differentiate into autoantibody secreting cells in patients with pSS, due to chronic autoantigen stimulation. Further studies are required to investigate activation of anergic B cells and breakdown of tolerance. Evidence of activation of CD21^{low} B cells by TLRs for the autoantibody responses have been demonstrated in SLE (38). Also, increased level of BAFF described in pSS (39) (40) may also play a role in the activation of these autoreactive B cells showing features of anergy. Interestingly, the CD11c^{hi}CD21^{low} population was shown to express high level of BAFF receptor in SLE (41) . Furthermore, the accumulation of SSA⁺ B cells among DN2 and DN3 B cells, which may represent the progeny of activated naïve cells following the extra follicular pathway, also suggests that SSA⁺ B cells may adopt both cell fates (follicular and extra-follicular) in patients with pSS. Other studies demonstrated that a predominance of the extra follicular response was found in other autoantibody-secreting cells such as rheumatoid factor or anti-DNA antibody (42) (43). Absence of enrichment of SSA⁺ B cells in the circulating plasmablast compartment in pSS patients could be explained by the migration of these cells to the salivary glands as previously reported (44).

Taken together, these results suggest that, *in vivo* in patients with pSS, autoreactive SSA⁺ B cells can follow the process of differentiation to become antibody-secreting cells by an insufficient anergy mechanism following extra follicular and germinal center pathways.

Patients with pSS are characterized by an infiltration of B cells and memory B cells in salivary glands, where they can form ectopic germinal centers in (45) (46) (47) which the abnormal selection of autoreactive B cells may happen and that have been associated with the development of lymphoma. The major limitation of the present

study is that we studied only circulating B cells, which constitute an indirect representation of the autoimmune process. The study of autoreactive B cells within the target tissue of the disease may allow further understanding of the disease pathophysiology. Deeper investigation of the SSA⁺ B cells at the single-cell level may also provide new insights into autoreactive B-cell differentiation and refine the landscape of B cells in autoimmune diseases.

Altogether, we provide here the first, detailed characterization of autoreactive SSA-specific B cells in patients with pSS. Overall, our results demonstrate a remarkable expansion of SSA⁺ B cells among mature antigen experienced B cells in patients with pSS, which highlights the impairment of the peripheral tolerance checkpoints in patients with pSS.

reference

1. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *N Engl J Med* 2018;378:931–939.
2. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2015;168:317–327.
3. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 ACR-EULAR Classification Criteria for primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2017;69:35–45.
4. Negrini S, Emmi G, Greco M, Borro M, Sardanelli F, Murdaca G, et al. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clin Exp Med* 2021. Available at: <https://link.springer.com/10.1007/s10238-021-00728-6>. Accessed June 21, 2021.
5. Maciel G, Crowson CS, Matteson EL, Cornec D. Prevalence of Primary Sjögren's Syndrome in a US Population-Based Cohort. *Arthritis Care Res* 2017;69:1612–1616.
6. Mielle J, Tison A, Cornec D, Le Pottier L, Daien C, Pers J-O. B cells in Sjögren's syndrome: from pathophysiology to therapeutic target. *Rheumatology* 2019. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key332>. Accessed April 12, 2021.
7. Kroese FG, Abdulahad WH, Haacke E, Bos NA, Vissink A, Bootsma H. B-cell hyperactivity in primary Sjögren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:483–499.
8. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:59–68.
9. Brito-Zerón P, Acar-Denizli N, Ng W-F, Zeher M, Rasmussen A, Mandl T, et al. How immunological profile drives clinical phenotype of primary Sjögren's syndrome at diagnosis: analysis of 10,500 patients (Sjögren Big Data Project). *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 112:102–112.
10. Reijm S, Kissel T, Toes REM. Checkpoints controlling the induction of B cell mediated autoimmunity in human autoimmune diseases. *Eur J Immunol* 2020;50:1885–1894.
11. Glauzy S, Boccitto M, Bannock JM, Delmotte FR, Saadoun D, Cacoub P, et al. Accumulation of Antigen-Driven Lymphoproliferations in Complement Receptor 2/CD21–/low B Cells From Patients With Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:298–307.
12. 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;201:703–711.
13. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 2007;26:205–213.
14. Corsiero E, Sutcliffe N, Pitzalis C, Bombardieri M. Accumulation of self-reactive naïve and memory B cell reveals sequential defects in B cell tolerance checkpoints in Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2014;9:e114575.
15. Duty JA, Szodoray P, Zheng N-Y, Koelsch KA, Zhang Q, Swiatkowski M, et al. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 2009;206:139–151.

16. Nossal GJ, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1602–1606.
17. Quách TD, Manjarrez-Orduño N, Adlowitz DG, Silver L, Yang H, Wei C, et al. Anergic Responses Characterize a Large Fraction of Human Autoreactive Naive B Cells Expressing Low Levels of Surface IgM. *J Immunol* 2011;186:4640–4648.
18. Saadoun D, Terrier B, Bannock J, Vazquez T, Massad C, Kang I, et al. Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis Rheum* 2013;65:1085–1096.
19. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* 2018;49:725-739.e6.
20. Varga-Martínez R de la, Rodríguez-Bayona B, Campos-Caro A, Añez GA, Medina-Varo F, Rodríguez C. Autoreactive B-lymphocytes in SLE and RA patients: Isolation and characterisation using extractable nuclear and citrullinated antigens bound to immunobeads. *Eur J Immunol* 2019;49:1107–1116.
21. Suurmond J, Atisha-Fregoso Y, Marasco E, Barlev AN, Ahmed N, Calderon SA, et al. Loss of an IgG plasma cell checkpoint in patients with lupus. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:1586–1597.
22. Kerkman PF, Fabre E, Voort EIH van der, Zaldumbide A, Rombouts Y, Rispens T, et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1170–1176.
23. Lu DR, McDavid AN, Kongpachith S, Lingampalli N, Glanville J, Ju C-H, et al. T Cell-Dependent Affinity Maturation and Innate Immune Pathways Differentially Drive Autoreactive B Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2018;70:1732–1744.
24. Cornec D, Berti A, Hummel A, Peikert T, Pers J-O, Specks U. Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J Autoimmun* 2017;84:122–131.
25. Smith MJ, Packard TA, O'Neill SK, Henry Dunand CJ, Huang M, Fitzgerald-Miller L, et al. Loss of Anergic B Cells in Prediabetic and New-Onset Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 2015;64:1703–1712.
26. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol* 2001;167:3610–3618.
27. Binard A, Pottier LL, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Youinou P, Pers J-O. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Ann Rheum Dis* 2009;68:1447–1452.
28. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol* 2019;10. Available at:

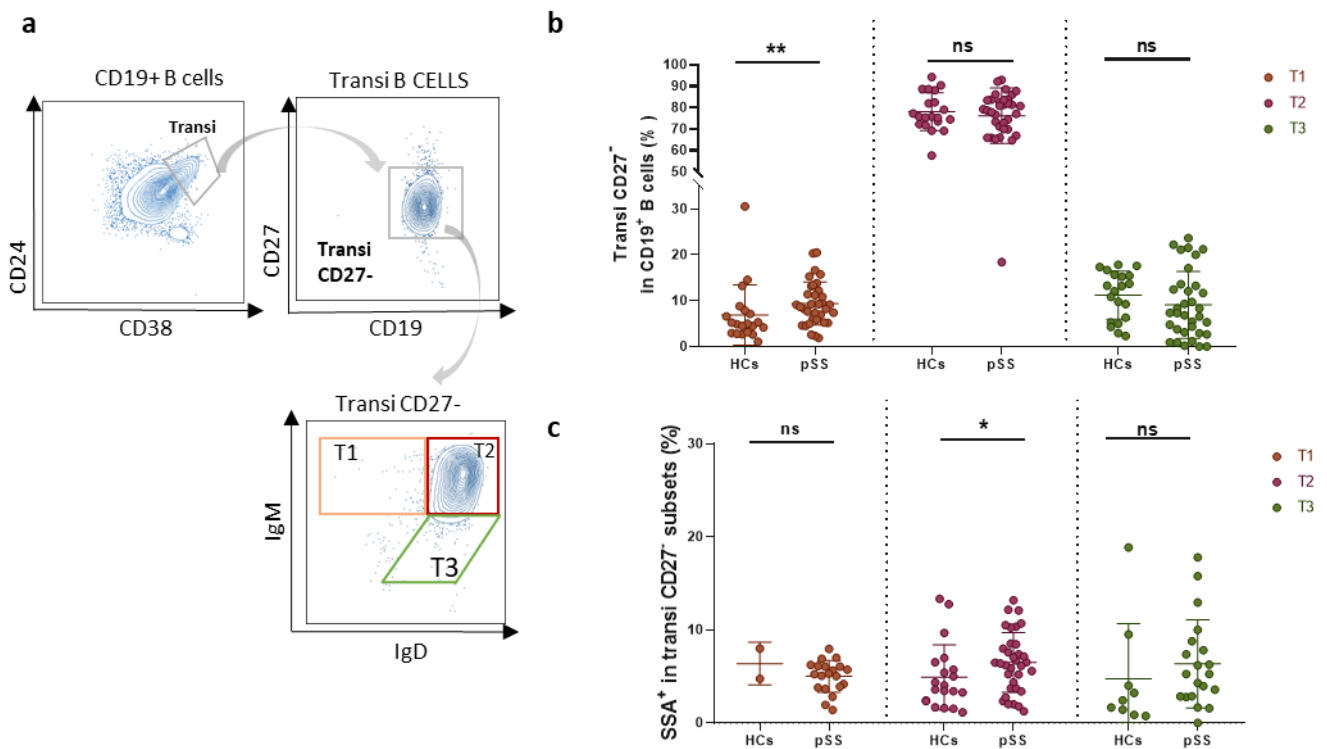
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02458/full>. Accessed July 2, 2021.

29. Isnardi I, Ng Y-S, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, et al. Complement receptor 2/CD21– human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 2010;115:5026–5036.
30. Noviski M, Zikherman J. “Control of autoreactive B cells by IgM and IgD B cell receptors: maintaining a fine balance.” *Curr Opin Immunol* 2018;55:67–74.
31. Stewart A, Ng JC-F, Wallis G, Tsioligka V, Fraternali F, Dunn-Walters DK. Single-Cell Transcriptomic Analyses Define Distinct Peripheral B Cell Subsets and Discrete Development Pathways. *Front Immunol* 2021;12:602539.
32. Leyendeckers H, Odendahl M, Löhndorf A, Irsch J, Spangfort M, Miltenyi S, et al. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* 1999;29:1406–1417.
33. Meffre E, O’Connor KC. Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunol Rev* 2019;292:90–101.
34. Jacobi AM, Zhang J, Mackay M, Aranow C, Diamond B. Phenotypic Characterization of Autoreactive B Cells—Checkpoints of B Cell Tolerance in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS ONE* 2009;4:e5776.
35. Ekland EH, Forster R, Lipp M, Cyster JG. Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:4700–4708.
36. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, et al. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* 2013;38:596–605.
37. Reincke ME, Payne KJ, Harder I, Strohmeier V, Voll RE, Warnatz K, et al. The Antigen Presenting Potential of CD21low B Cells. *Front Immunol* 2020;11:2664.
38. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;202:1171–1177.
39. Varin M-M, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers J-O. B-cell tolerance breakdown in Sjögren’s Syndrome: Focus on BAFF. *Autoimmun Rev* 2010;9:604–608.
40. Arbonneau F d’, Pers J-O, Devauchelle V, Penneç Y, Saraux A, Youinou P. BAFF-induced changes in B cell antigen receptor-containing lipid rafts in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:115–126.
41. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS, et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11chiT-bet+ B cells in SLE. *Nat Commun* 2018;9:1758.
42. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of Autoantibody Responses via Somatic Hypermutation Outside of Germinal Centers. *Science* 2002;297:2066–2070.
43. Herlands RA, William J, Hershberg U, Shlomchik MJ. Anti-chromatin antibodies drive in vivo antigen-specific activation and somatic hypermutation of rheumatoid factor B cells at extrafollicular sites. *Eur J Immunol* 2007;37:3339–3351.
44. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren’s

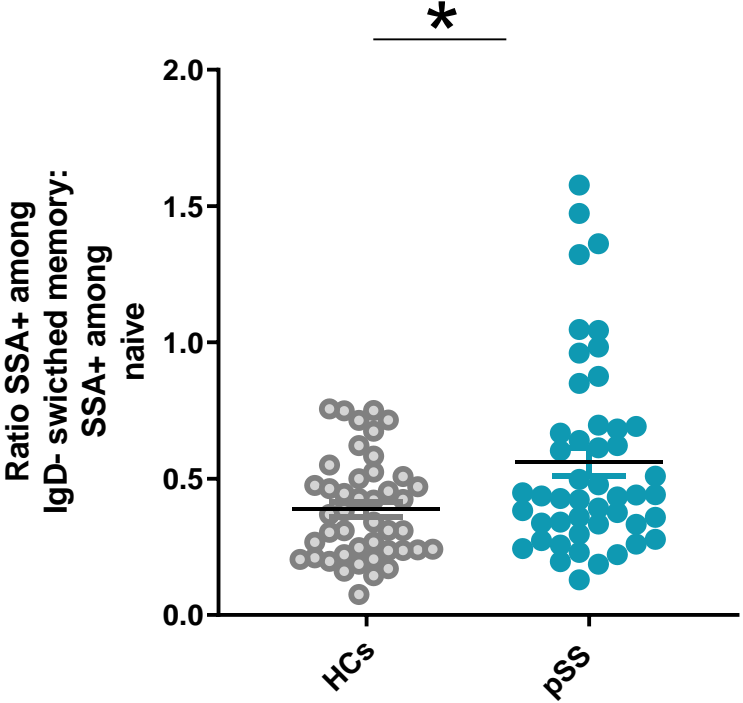
- signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1809-1821.e12.
45. Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JWJ, Roon JAG van. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2013;42:368–376.
46. Sène D, Ismael S, Forien M, Charlotte F, Kaci R, Cacoub P, et al. Ectopic Germinal Center–Like Structures in Minor Salivary Gland Biopsy Tissue Predict Lymphoma Occurrence in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:1481–1488.
47. Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009;182:3540–3547.

SUPPLEMENTARY FIGURES

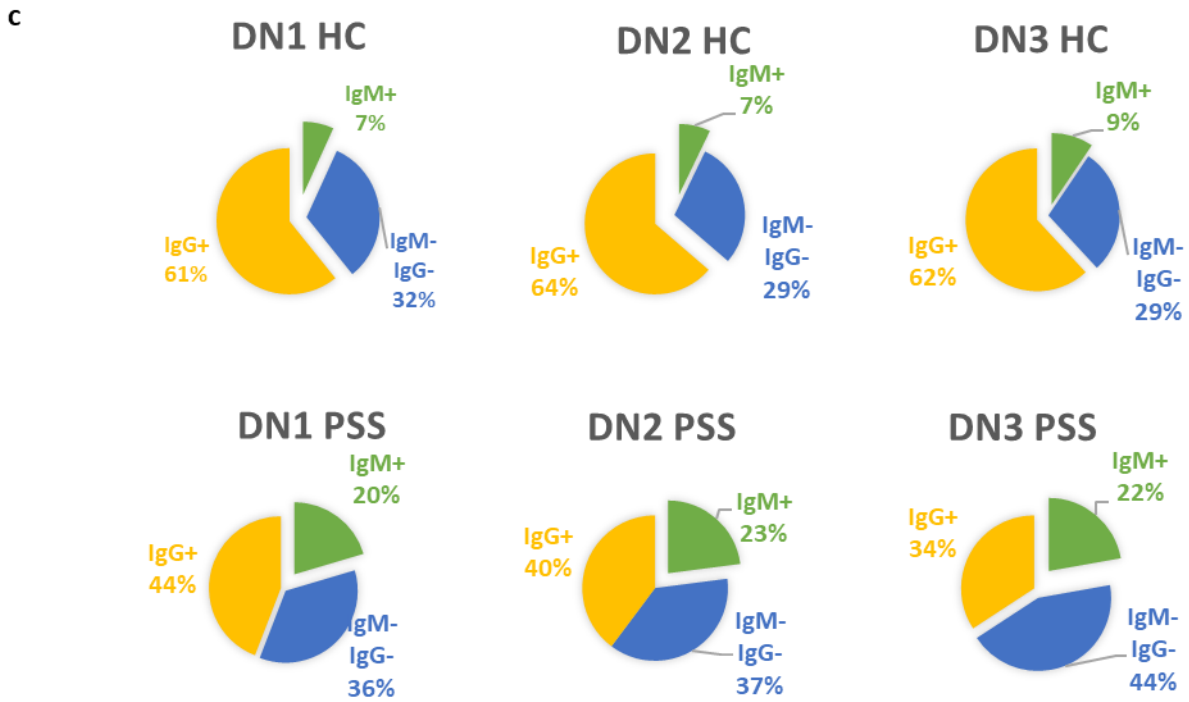
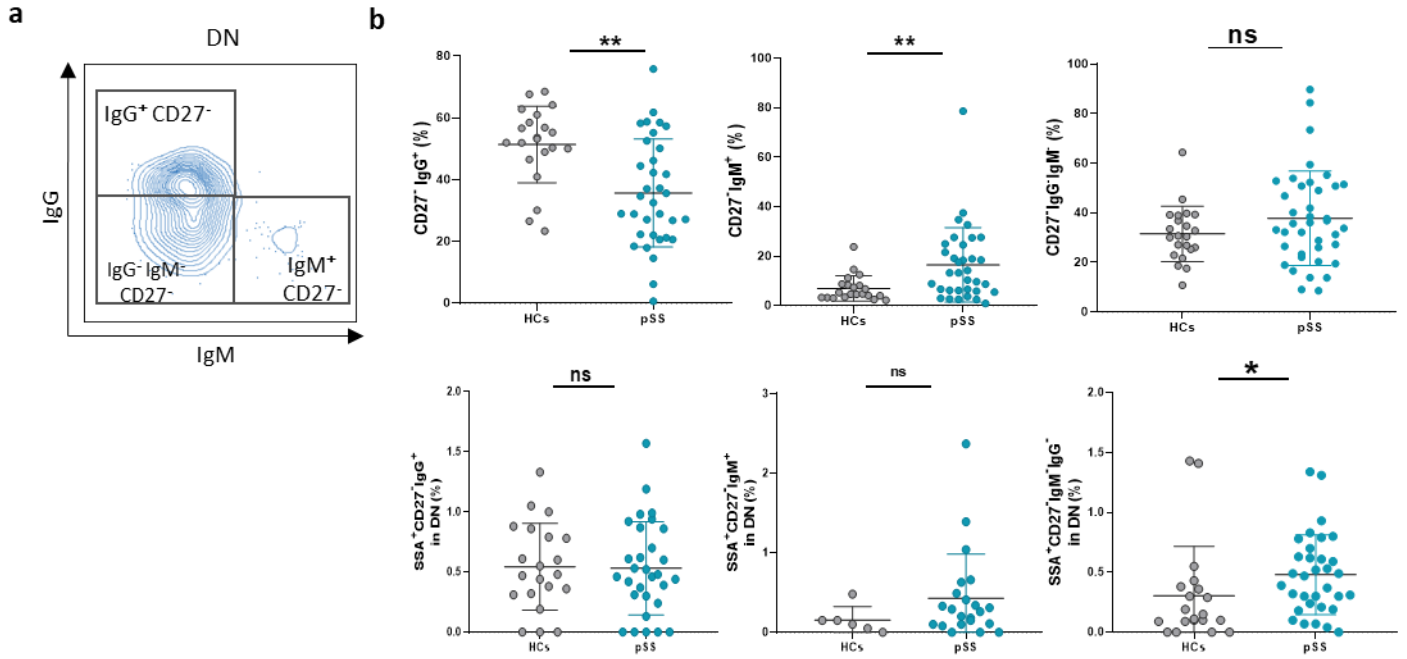
Supplementary Figure 1: Distribution of SSA⁺ B cells among transitional B cell subsets. **a-** Gating strategy used for identification of transitional CD27⁻ B cells and subsets T1/T2/T3 among B cell subsets, based on the expression of IgD and IgM, we defined T1 (IgM⁺ IgD⁻), T2 (IgM⁺ IgD⁺), T3 (IgM⁻ IgD⁺). **b-** Comparative analysis of frequency of each isotype among transitional CD27⁻ B cells in pSS patients and HCs. **c-** Comparative analysis of the frequency of SSA⁺ B cells among each subpopulation. P values in the figure are indicated as *p < 0.05 ** p < 0.01, ns=not significant.



Supplementary Figure 2: Enrichment of SSA⁺ among switched memory B cells (SwM). The Ratio SSA⁺ B cells among SwM / SSA⁺ among naïve B cells in primary Sjögren's syndrome (pSS) (n= 51) and healthy controls (HCs) (n=44) are shown. P value was determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P value in the figure is indicated as *p < 0.05.



Supplementary Figure 3: DN B cell isotype subsets in primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and healthy controls (HCs). **a-** Representative contour plots from a pSS patient to identify DN isotype sub-compartments. Based on the expression of IgM and IgG, we determine 3 isotypes for DN: CD27⁺IgG⁺ DN, CD27⁻IgM⁺ and CD27⁻IgG⁻IgM⁻. **b-** Comparative analysis of the three subsets and the frequency of SSA⁺ B cells in pSS and HC are shown. **c-** characterization of isotypes in each of DN subset (DN1 to DN3). Each data point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the mean. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test. P values in the figures are indicated as *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ****<0,0001 ns = not significant.



Partie 2 : Analyses fonctionnelles des LB réactifs à la SSA

1. OBJECTIFS

Afin d'étudier les LB SSA⁺ dans le SSp, nous avons donc développé une méthode de cytométrie en flux pour pouvoir les détecter dans la circulation et les isoler. La population LB SSA⁺ a été évaluée dans le volet précédemment de notre article sur le plan phénotypique. Une validation de la méthode a été effectuée par ELISPOT, en évaluant la sécrétion des anticorps anti-SSA à partir d'une population de LB SSA⁺ triés. La limite d'un ELISPOT est que nous évaluons une population de cellules, nous fournissant donc des données sur la population dans son ensemble.

Pendant 3 mois de mobilité à LEIDEN dans l'équipe du Professeur Rene Toes, j'ai eu l'opportunité d'effectuer une autre partie de mon projet complémentaire à la partie ELISPOT, dont le **but était de**

- **Valider la spécificité de la méthode de détection des LB SSA⁺ par cytométrie en flux en complémentarité avec la partie ELISPOT.**
- **Générer des clones de LB auto-réactifs spécifiques de la SSA en *ex vivo*, capables de produire des autoanticorps anti-SSA**
- **Générer des anticorps monoclonaux de SSA pour pouvoir étudier d'avantage ces anticorps.**

Cependant le projet n'a pu aboutir jusqu'à la construction des anticorps monoclonaux.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1- Sujets humains et isolation des PBMCs

Cette étude a été effectuée sur un totale de 7 échantillons de sang périphérique prélevés à partir de trois sujets sains, inclus au Centre médical universitaire de Leiden (LUMC). Quatre échantillons de PBMCs cryopreservés collectés à partir de 3 patients atteints du SSp et un sujet sain, qui ont été expédiés de Brest. Le diagnostic des patients SSp était basé sur les critères EULAR. Les patients ont été recrutés lors de consultations multidisciplinaires au sein du service de rhumatologie du CHU de Brest. Tous les sujets ont fourni un consentement éclairé écrit.

2.2- Isolation et culture des cellules

Les cellules sont obtenues à partir des PBMCs, frais ou cryopreservés. Un marquage des cellules avec des anticorps ciblant des protéines de surface par cytométrie en flux a permis de définir le stade de maturation des LB : LIVE/DEAD™ Fixable Aqua BV510, CD3 BV510, CD14 BV510, CD19 APC-Cy7, CD27 BV421, IgD AF700, IgG BV605, IgA PE-Vio770, IgM Percp cy5.5, CD38 PE, ainsi que la streptavidine couplée au FITC, permettant de détecter les LB réactifs à la SSA. Ces LB SSA⁺ ainsi que la fraction déplétée (LB SSA⁻) ont été sélectionnés à l'aide d'un BD FACS Aria II (BD Biosciences) et mis en culture à raison d'une cellule par puits dans des plaques à fond plat de 96 puits, qui contenaient 10⁵ cellules feeder CD40L irradiées (70 Gray) par puits dans le milieu Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM). Le milieu IMDM a été complété par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1 % de L-glutamine, 1 % de pénicilline-streptomycine, 1 ng/mL d'IL-1beta, IL-21 recombinant humain (Gibco/ Thermo Fisher), 0,3 ng/mL TNFα recombinant humain (R&D), 0,5 µg/mL de R848 (Invivogen), 20 µg/mL d'Apotransferrine IgG déplétée (Sigma (déplétion en interne)), et 50 µM de 2-Mercaptoéthanol (Merck). Les LB SSA⁺ et LB SSA⁻, ont été incubées pendant 12 jours à 37°C, 5% CO₂ pour leur permettre de proliférer en cellules productrices d'anticorps.

2.3- Dosage des anticorps par ELISA

La production d'anticorps spécifiques de l'autoantigène SSA a été évaluée par ELISA pour détecter les clones spécifiques de la SSA après le tri des LB. Un ELISA a été effectué en premier lieu pour évaluer la production d'immunoglobulines totale. A partir des puits capables de produire une immunoglobuline, un deuxième ELISA spécifique de la SSA est effectué afin d'évaluer les LB capables de produire des anticorps spécifiques de la SSA. Brièvement, les plaques d'ELISA (Costar) ont été recouvertes de 10 µg/mL de SSA dans du PBS pendant une nuit à 4°C, suivi d'une incubation avec une solution de blocage (PBS – 1% BSA – 50 mM Tris) pendant au moins 1h à température ambiante. Le surnageant des LB triées a été dilué deux fois dans le même tampon de blocage et incubé pendant 1h. Entre toutes les étapes, les plaques ont été lavées quatre fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween-20. Un anticorps secondaire a été ajouté anti-Ig-HRP humaine (H&L), suivi d'un développement avec ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), pour détecter la liaison des anticorps. La quantité d'anticorps fixée a été mesurée sur la base de la densité optique à 415 nm à l'aide d'un lecteur de plaque. Pour la détection des immunoglobulines totales (IgG, IgM et IgA) sécrétées par les LB ; le même protocole a été utilisé, en modifiant les anticorps de coating et de révélation.

2.4- Détermination des chaînes lourdes et légères

Les ARNm des LB dont le surnageant a montré une liaison spécifique à la SSA ont été isolés en utilisant le réactif TRIzol selon le protocole du fabricant (ThermoFisher). Brièvement, L'ADNc a été synthétisé selon la méthode suivante : l'ARNm a été incubé pendant 3 min à 72°C. Ensuite, on ajoute dans chaque échantillon : un tampon premier brin 5x (TaKaRa), de la bêtaïne BioUltra (10 µmol, Sigma-Aldrich), du DTT (10 nmol, TaKaRa), un inhibiteur de RNase (10 U), de la transcriptase inverse SMARTScribe (50 U, TaKaRa), un oligo-commutateur et de l'eau exempte de RNase. Par la suite une PCR pour amplifier les isotypes d'immunoglobulines est effectuée. Les produits de PCR provenant de LB triés ont été utilisés pour le séquençage Sanger sur le système Applied Biosystems 96-capillaires (ABI3730xl).

3 RESULTATS

3.1- Stratégie d'isolement des LB spécifiques de la SSA

Pour créer des clones de SSA⁺, les LB réactifs à la SSA ont été sélectionnés par cytométrie en flux et triés individuellement afin de créer des clones. La fraction déplétée de la SSA (LB SSA⁻) était également triée. Pour étudier les sous-populations des LB SSA⁺ et l'effet d'une culture sur la production des anticorps, nous avons également trié les LB **naïfs** définis par : DCK⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁻CD38^{low} IgD⁺, Les LB **transitionnels** : DCK⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁻CD38^{high}, les LB **mémoires** : DCK⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁺CD38^{low}, les **DN** : DCK⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁻CD38^{low} IgD⁻, les **PB** : DCK⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD27⁺CD38^{high} (Figure 6).

Pour cette étude, nous avons pu trier et mettre en culture 1614 clones de LB (SSA⁺ et SSA⁻). Dans certains puits, 50 ou 200 cellules ont été déposées pour servir de contrôles positifs et faire la mise au point.

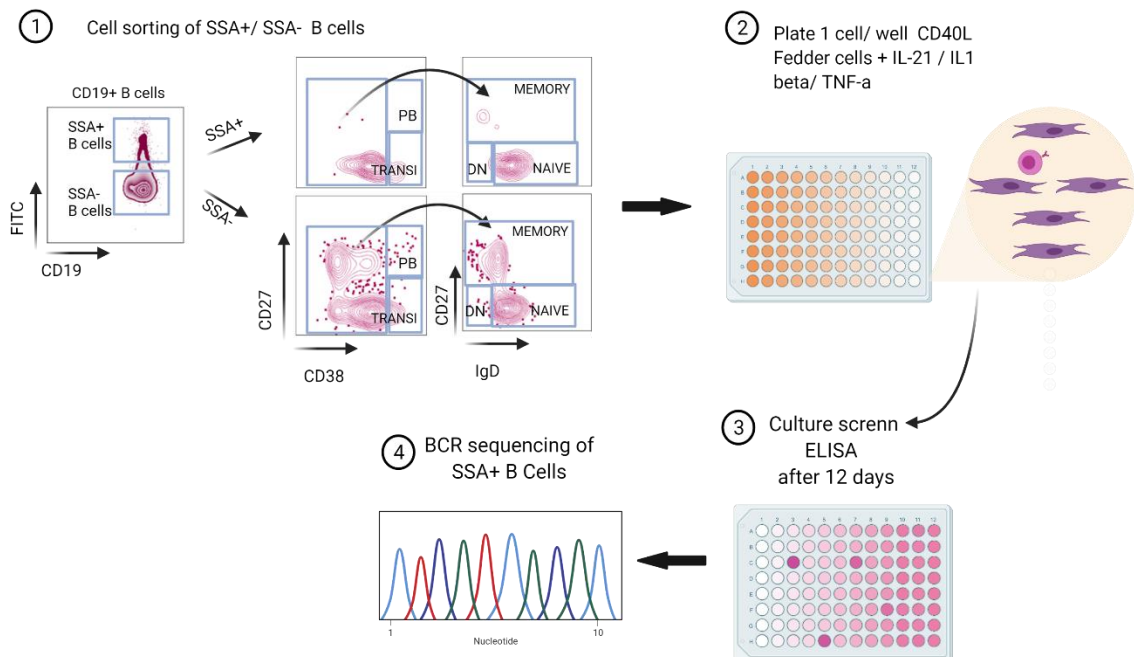


Figure 6 : Protocole expérimental pour caractériser les LB spécifiques à la SSA.

Les LB SSA⁺ et les LB SSA⁻ ainsi que leurs sous-populations ont été triés à partir de PBMCs collectées chez des sujets sains (n=4) et des patients SSp (n=3). Les LB sont par la suite stimulées 12 jours avec une stimulation T-dépendante (CD40L, IL-1beta, IL-21, TNFa, R848 (anti TLR7/8)), pour conduire à la différenciation des LB en cellules sécrétrices des anticorps. Des ELISA IgM/G/A totale et SSA-Ig sont effectués. Finalement un séquençage du BCR est effectué pour les clones SSA⁺.

3.2- Elisa pour détecter la sécrétion totale des immunoglobines

Pour évaluer la sécrétion totale des LB après 12 jours de culture, un ELISA pour détecter la sécrétion des immunoglobulines totales a été effectué. Au total, 35% des puits étaient capable de produire de l'immunoglobuline totale IgM, IgG et IgA. Pour les puits ne contenant pas d'anticorps, on peut penser que soit les cellules sont mortes pendant l'incubation, soit qu'elles n'ont pas pu sécréter d'anticorps, ce qui pourrait être expliqué par le processus délicat de stockage et de décongélation des échantillons. En effet les LB triés à partir des PBMCs fraîches, montre un rendement plus élevé (60 % des puits avec une sécrétion d'immunoglobuline). Avec une stimulation 12 jours T-dépendante (CD40L, IL-1beta, IL-21, TNFa, R848 (anti TLR7/8)), les sous-populations naïves, mémoires, DN étaient capables de produire plus d'IgM/G/A que les LB transitionnels suggérant une capacité à se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps. De façon plus surprenante, les PB n'étaient pas capables à se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps peut-être en raison de la stimulation utilisée (Figure 7).

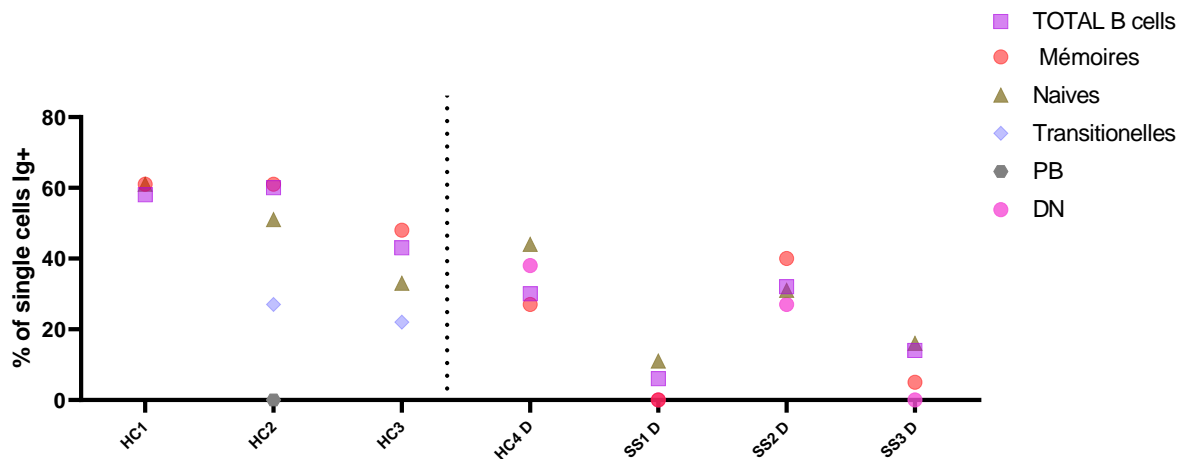


Figure 7 : Dosage de la sécrétion d'immunoglobulines par ELISA dans les cultures des LB.

ELISA IgM/G/A, est effectué pour détecter la sécrétion totale de l'immunoglobuline dans le surnagant des LB issues des 7 échantillons. Le pourcentage moyen de la sécrétion par puits est représenté pour chaque type cellulaire. D= Décongelé, HC= Sujet sain, SS= patient SSp.

Dans l'ensemble 1137 LB SSA⁺ ont été triées (560 à partir des patients et 577 à partir des sujets sains) et 477 LB SSA⁻ (180 des patients et 297 des témoins) (Figure 8). Le criblage ELISA a ensuite permis d'identifier les puits de cellules uniques contenant des LB spécifiques de la SSA qui sont capables de produire des autoanticorps après une stimulation T-dépendante.

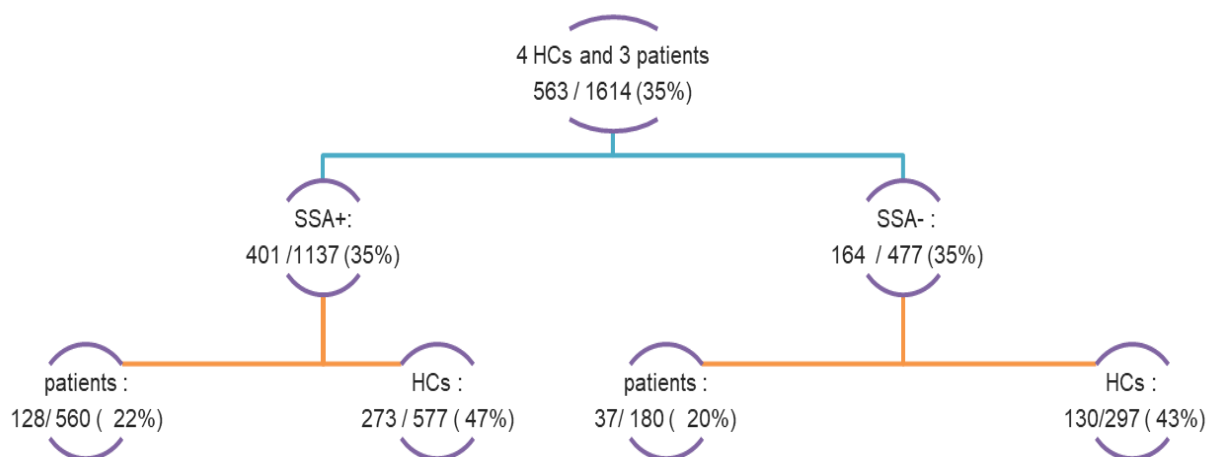


Figure 8 : Schéma explicatif des clones générés à partir des échantillons et selon le type cellulaire LB SSA⁺ ou LB SSA⁻

Les chiffres correspondent au pourcentage des cellules uniques pour lesquelles une sécrétion d'immunoglobulines a pu être détectée.

3.3- Mise au point d'ELISA spécifique de la SSA

Pour la détection des anticorps anti-SSA avec ELISA, nous avons dû mettre au point la méthode pour détecter des anticorps spécifiques de différents isotypes. Deux ELISA SSA d'isotype IgM et IgG, ont été effectués initialement pour évaluer la sécrétion des anticorps anti-SSA à partir du surnageant des LB issues du 1^{er} sujet sain (HC1) (cellules PBMCs fraîches). Nos résultats montrent une sécrétion totale IgM pour les puits avec 1 cellule et 50 cellules. Le contrôle 0 cellule correspond au surnageant issu des puits ne contenant pas de cellule mais avec le cocktail de cytokines, montrant bien que nous n'avons pas de détection non spécifique d'immunoglobulines. L'ELISA spécifique de la SSA ne montre pas par contre une sécrétion d'anticorps spécifiques anti SSA, que ce soit dans les puits 1 ou 50. En raison de l'absence de contrôle positif pour IgM anti-SSA, on ne peut pas réellement écarter un problème technique pour expliquer cette non détection des anticorps comme montré dans la figure ci-dessous. Pour remédier à ceci, nous avons mis au point un ELISA Ig totale SSA-spécifique qui nous permet de doser les anticorps anti-SSA de tout isotype (IgG et IgM) et d'utiliser un contrôle positif avec le sérum d'un patient atteint de SSp (RO1) avec une sérologie positive à la SSA- IgG.

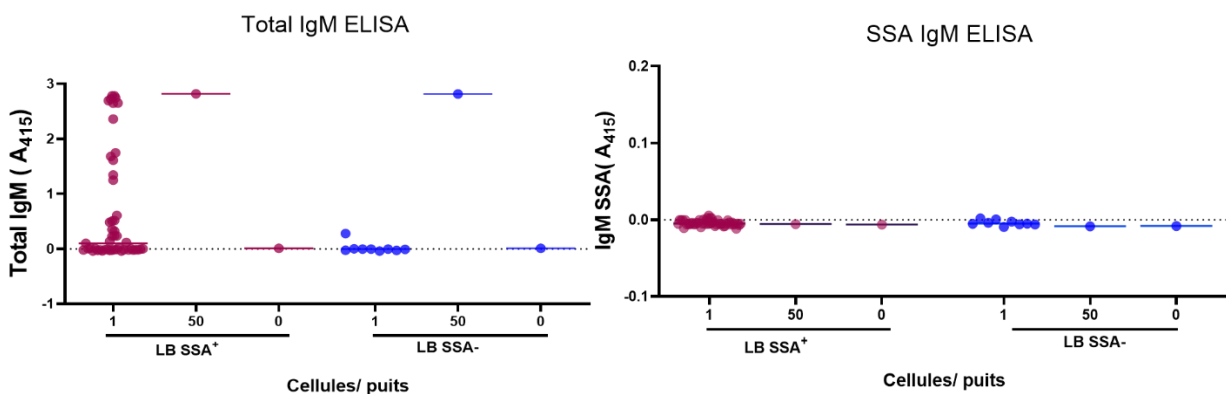


Figure 9 : Dosage de la sécrétion d'immunoglobulines IgM totale ou IgM anti-SSA.

Les LB SSA⁺ et les LB SSA⁻ ont été triés à partir de PBMCs collectés chez un sujet sain (n=1) et et stimulées de manière adaptée pour conduire la différenciation des LB en cellules sécrétant des anticorps. Un ELISA spécifique de SSA a été réalisé par la suite pour détecter les anticorps anti-SSA dans les surnageants. A- ELISA IgM Totale sur le surnageant des LB issues d'un sujet sain. B- ELISA spécifique de SSA sur le surnageant des LB issues d'un sujet sain. Chaque point correspond à un puits. La valeur moyenne est affichée.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué un ELISA SSA-Ig. Pour le contrôle positif nous utilisons le sérum du patient (RO1) et pour le contrôle négatif, le sérum collecté d'un sujet sain (Figure 10A). Les surnageants issus des puits 200, 50 et 1 LB SSA⁺ ou SSA⁻ à partir toujours du même sujet sain 1 ont été testés (Figure 10 B). Une sécrétion d'anticorps anti SSA a été trouvée avec les surnageants issus des puits avec 200 LB SSA⁺ seulement. L'absence de la sécrétion des anticorps anti-SSA dans les surnageants issus des puits avec 200 LB SSA⁻ montre bien que la technique d'isolement des cellules par cytométrie permet une récupération complète des LB capables de sécréter des anticorps anti-SSA. Néanmoins, aucun surnageant avec les puits 1 ou 50 LB SSA⁺ contenaient des autoanticorps anti-SSA détectables. Le deuxième obstacle a donc été la détection des anticorps anti-SSA dans le surnageant des puits avec une seule cellule. Nous avons alors émis l'hypothèse que la sensibilité avec notre protocole d'ELISA était faible, due à une quantité faible d'anticorps anti-SSA dans le surnageant de ces LB provenant d'un sujet sain, sachant que nous nous attendons à être capables de détecter maximum **200ng/ml** d'anticorps total par cette méthode.

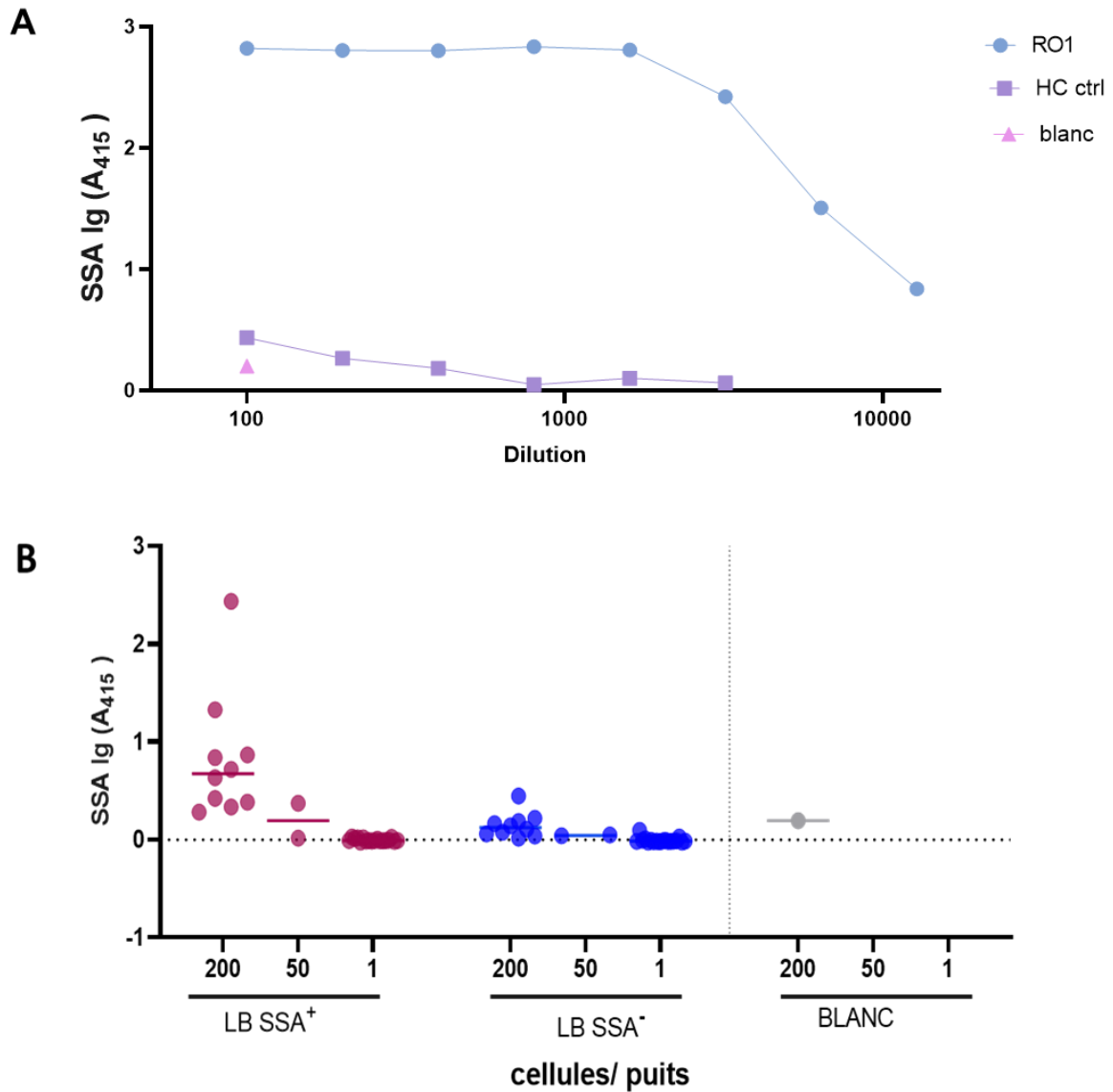


Figure 10 : Dosage de la sécrétion des anticorps anti-SSA.

A- ELISA SSA-Ig dans le serum d'un patient et d'un sujet sain comme contrôle. B- ELISA SSA-Ig avec le surnagant des LB issues d'un sujet sain. Chaque point correspond à un puits. La valeur moyenne est affichée.

Afin d'augmenter la sensibilité de l'ELISA, trois stratégies ont été employées : i) Faire une liaison croisée « cross-linking » de l'anticorps secondaire avec le surnageant pendant une nuit à 4°C ii) Augmenter la concentration de l'anticorps secondaire iii) Faire une dilution de surnageant à 1.2x au lieu de 2x. Aucun des trois protocoles ne nous ont permis d'avoir une sensibilité plus importante sans augmenter le bruit de fond.

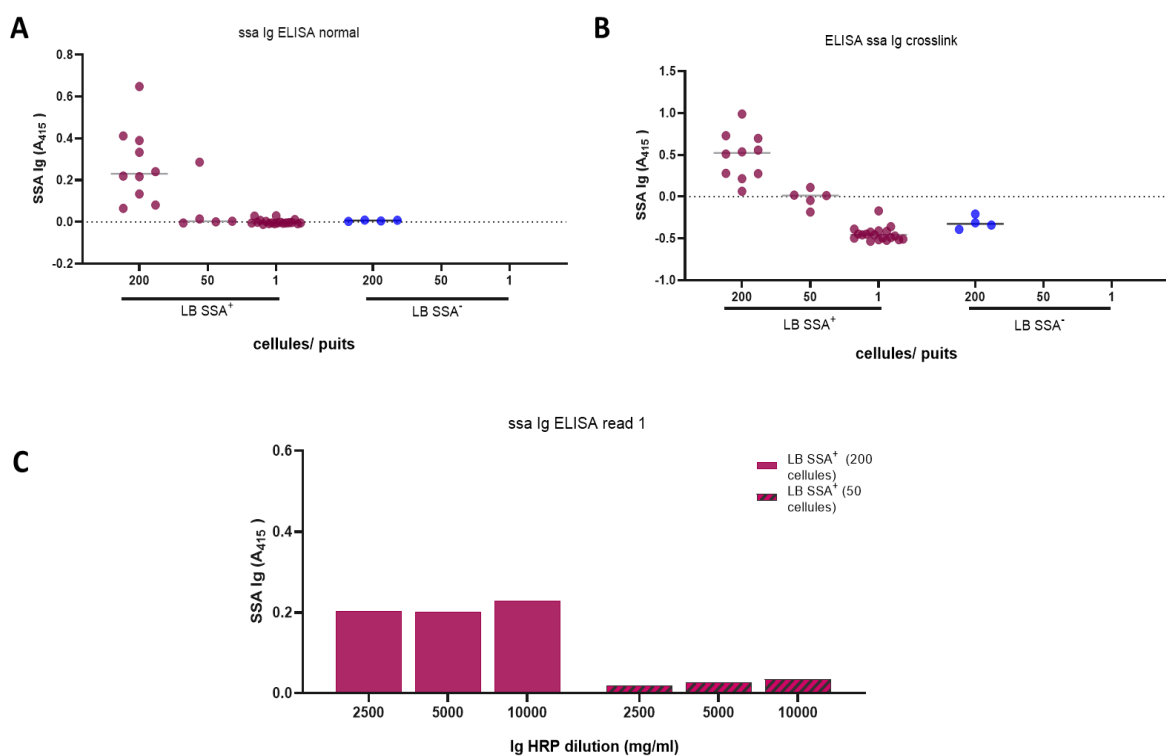


Figure 11 : Dosage de la sécrétion des anticorps anti-SSA par différents protocoles.

Les LB SSA⁺ et les LB SSA⁻ ont été triés à partir de PBMCs collectés chez un sujet sain (n=1) et stimulés de manière adaptée pour conduire la différenciation des LB en cellules sécrétant des anticorps. Un ELISA spécifique de SSA, a été réalisé par la suite pour détecter les anticorps anti-SSA dans les surnageants avec 3 protocoles : A- protocole normal, B- protocole avec une liaison croisée « cross-linking » de l'anticorps secondaire avec le surnageant pendant une nuit à 4°C, C- augmentation de la concentration de l'anticorps secondaire.

3.4- Détection des anticorps Anti-SSA

Partant de l'hypothèse que ces difficultés de mise au point étaient possiblement expliquées par les faibles quantités d'anti-SSA produites par les LB issus d'un sujet sain, nous avons finalement décidé de réaliser l'expérience sur les LB issues de 3 patients et d'un autre témoin, à partir de PBMC congelés. Nous avons obtenu en tout 167 LB SSA⁺ capables de produire des immunoglobulines totales (IgM/G/A) et 57 LB SSA⁻. Cinq clones ont produit des anticorps anti-SSA détectables dans le surnageant par ELISA, et ces 5 clones provenaient bien des LB SSA⁺. Des ELISA spécifiques des isotopes IgG et IgM ont été effectués par la suite pour évaluer l'isotype des anticorps sécrétés. Le seul clone provenant du sujet sain était d'isotype IgM. Parmi les 4 clones provenant des malades, 3 étaient d'isotype IgM et 1 d'isotype IgG. Ceci suggère bien que seuls les LB SSA⁺ des patients sont capables de commuter et de produire des autoanticorps IgG.

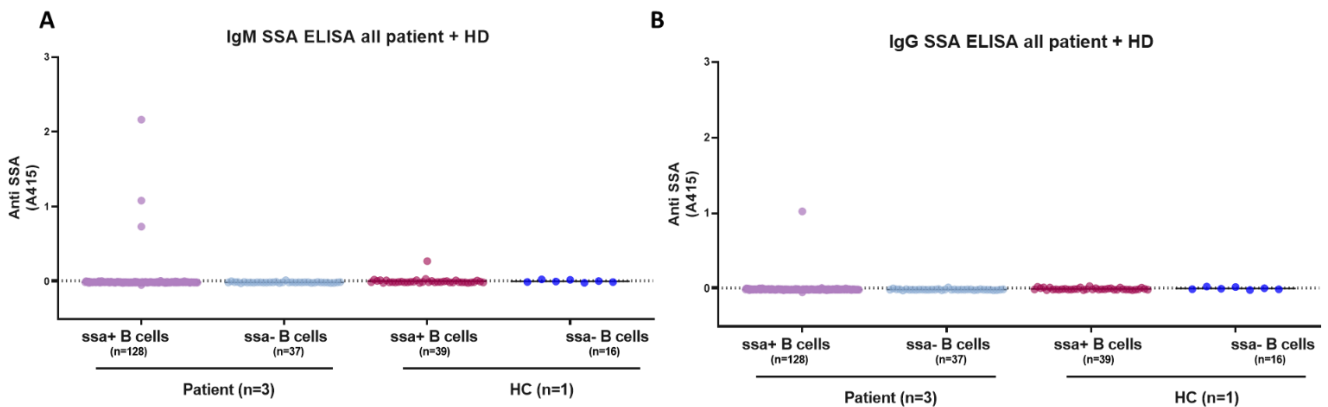


Figure 12 : Dosage de la sécrétion des anticorps anti-SSA chez les patients SSp et un sujet sain.

Les LB SSA⁺ et les LB SSA⁻ ont été triés à partir de PBMCs cryopréservées collectées chez un sujet sain (n=1) et des patients SSp (n=3). Un ELISA Ig spécifique de SSA a été réalisé par la suite pour détecter les anticorps anti-SSA dans les surnagenants avec protocole décrit dans la partie matériel et méthode. En se basant par la suite sur la sécrétion totale d'immunoglobulines, nous pouvons déterminer l'isotype de l'anticorps sécrétés. Chaque point représente un puit.

3.5- Séquençage de répertoire des LB spécifiques de SSA

Enfin, afin d'étudier le répertoire de ces LB spécifiques de la SSA, un séquençage des chaînes légères et lourdes a été effectué à partir des 5 LB uniques spécifiques de la SSA obtenues à partir des 3 patients SSp et du contrôle sain pour l'analyse du répertoire. Toutes les séquences d'ADN ont été analysées à l'aide de la base de données IMGT (<http://www.imgt.org>) pour identifier leur séquence germinale humaine correspondante. Des séquences de la chaîne lourde variable (IGHV) ont été identifiées dans les séquences d'anticorps de différents clones (Tableau 2). Toutes les séquences provenaient de lignées germinales différentes. Les mutations dans les régions déterminant la complémentarité (CDR), étaient limitées (inférieur à 5 mut par séquence) et avec jusqu'à 100% de similarité avec la séquence germinale. De façon remarquable, pour les fragments variables des chaînes légères, le clone du sujet sain avait une chaîne légère kappa, alors que les 4 clones provenant des patients avaient une chaîne légère du sous-type lambda impliquant un deuxième réarrangement. La majorité des clones ne présentaient pas de mutations somatiques ou peu (inférieur à 5 mut par séquence), et seulement un clone provenant d'un patient présentait plus que 10 mutations somatiques provenant du clone IgG.

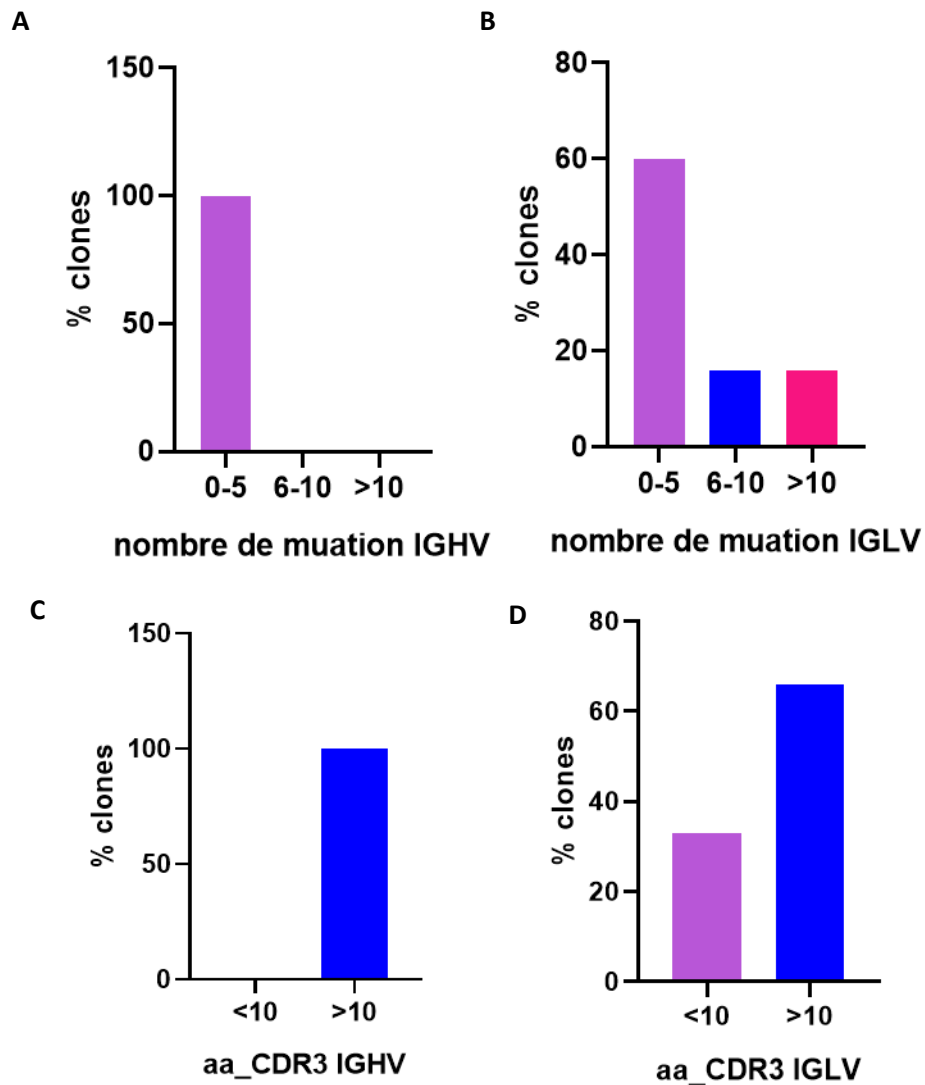


Figure 13 : Analyse des séquences IGHV et IGLV à partir des clones SSA+.

(A) Nombre des mutations dans les gènes de la chaîne lourde ou légère (B). (C) - Nombre d'acides aminés dans les régions déterminant la complémentarité CDR, les gènes de la chaîne lourde ou légère (D).

4 CONCLUSION

Pour résumer, cette étude avait pour but d'évaluer la proportion de LB spécifiques de la SSA parmi les LB SSA⁺ triés. Nous avons réalisé une analyse unicellulaire approfondie de ces LB issus de 3 patients atteints de SSp et d'un sujet sain. Les LB SSA⁺ et les LB SSA⁻ ont été triés individuellement et stimulés avec des cellules feeder CD40L, IL-1beta, IL-21, TNFa, et R848 pendant 12 jours. Ensuite, nous avons identifié par ELISA les puits des cellules uniques contenant les LB spécifiques de la SSA, qui ont produit des anticorps anti-SSA détectables dans le surnageant.

Nous montrons que seuls les LB SSA⁺ étaient capables de produire des anticorps anti-SSA, ce qui implique que la méthode de détection par cytométrie en flux permet une récupération totale des LB SSA⁺. Les LB SSA⁺ sécrétaient principalement des anticorps anti-SSA d'isotype IgM et seuls les LB SSA⁺ issus des patients SSp, étaient capables de produire des anticorps anti-SSA d'isotype IgG. L'analyse du répertoire des 5 clones générés spécifiques de la SSA, ne montrait pas d'anomalies majeures dans le répertoire des gènes Ig des LB SSA⁺ circulants chez les patients atteints de SSp. Ces résultats restent préliminaires, compte tenu du nombre limité des clones obtenus et de la qualité du séquençage.

Ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle les LB SSA⁺ chez les patients atteints de SSp sont capables de commuter et de sécréter des autoanticorps IgG.

Annexe

Tableau 3: Tableau récapitulatif des 6 séquences BCR obtenues à partir des LB spécifiques à la SSA.

Sample_org	Plate_Sample Name	Heavy chain										light chain						
		isotype	IGHV	IGHD	IGHJ	IGH-CDR3aa	#_aa_CDR3	#_mut	similarity_to_V germline	Light chain	IGLJ	IGL-CDR3aa	#_aa_CDR3	#_mut	similarity_to_V germline			
HD2	13E10	IgG	V3-23	D2-8	J6	CAKGSWSHYYMYMMD VW	17	0	100	K	J4	COQVGSPLTF	9	0	100			
HD2	13E10	IgM	V3-23	D2-8	J6	CAKGSWSHYYMYMMD VW	17	0	100	X	X	X	X	X	X			
pSS1	2E11	X	X	X	X	X	X	X	X	λ	J2 or J3	COAWEASTAVF	9	6	97,85			
pSS2	10E8	IgM	V1-8	D3-22	J3	CARGPAGYDSSGYYSL YAFDNW	22	0	100	λ	J1	CSSYSSSTWVF	10	0	100			
pSS3	17E5	X	X	X	X	X	X	X	X	λ	J1	CHSRDSSINHLRVF	12	11	96,06			
pSS3	17G6	IgM	V6-1	-	-	-	-	2	99,33	λ	J3	CATWDDSSGSWVF	11	5	98,25			

Partie 3 : Analyses transcriptomiques des LB réactifs à la SSA.

1 OBJECTIFS

La diversité du répertoire des LB réactifs à la SSA reste inconnue. Pour pouvoir mieux approfondir notre compréhension sur les caractéristiques de ces LB auto-réactifs, nous avons ensuite étudié l'aspect transcriptomique et le répertoire des immunoglobulines de ces LB en utilisant la technique de séquençage des ARN à l'échelle unicellulaire : « single cell RNA-seq » (Tang et al., 2009). La transcriptomique unicellulaire devient aujourd'hui une méthodologie clé en biologie.

L'objectif final de ce travail est de comparer les LB SSA⁺ chez les patients et les sujets sains afin de :

- Comprendre le profil transcriptomique propre aux LB auto-réactifs SSA chez les patients atteints du syndrome de Sjögren
- Etudier le répertoire des immunoglobulines au sein des LB auto-réactifs spécifiques de la SSA,

Pour la première expérience « pilote » de single-cell RNAseq qui sera détaillée ci-dessous, nous avons étudié les LB réactifs à la **SSA** à partir d'un échantillon de sujet sain. Cette première expérience a eu pour but de mettre au point la technique et d'avoir une 1^{ère} caractérisation des LB SSA⁺ en physiologie, comparées aux LB SSA⁻. Ces résultats doivent donc être considérés comme préliminaires et nous ont permis d'évaluer la faisabilité d'utiliser cette méthode pour nous permettre ultérieurement d'étudier les LB auto-réactifs chez les malades.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Isolation des LB réactifs à la SSA chez un sujet sain

Du fait de difficultés techniques, les LB SSA+ n'ont pas pu être purifiés par tri cellulaire sur le trieur MoFlo pour cette partie du projet. Dans un premier temps, une purification des LB a été effectuée à partir de PBMCs décongelés obtenus d'un sujet sain. Les LB ont été d'abord purifiés, avec une pureté ≥ 94 %, par sélection positive avec le kit « REAlease® CD19 MicroBead Kit » (Miltenyi Biotec). Les LB réactifs à la SSA ont été par la suite enrichis par un deuxième tri avec des billes magnétiques anti-biotine (Miltenyi Biotec®). Brièvement, les LB sont marqués avec l'antigène biotinylé. On ajoute ensuite un anticorps anti-biotine couplé à une bille. Au passage sur une colonne magnétique, les LB spécifiques des antigènes sont retenues (Fraction positive). La pureté est évaluée par la suite, par cytométrie en flux.

2.2 Single cell RNA-seq : Séquençage d'ARN monocellulaire par l'automate Chromium 10X

L'isolation des cellules en micro-fluidique s'est effectuée avec le système 10X Genomics Chromium, qui repose sur une encapsulation rapide à base de gouttelettes en huile de cellules individuelles à l'aide d'une approche de billes de gel en émulsion (GEM). Avec cette méthode, chaque cellule est isolée dans une gouttelette d'huile avec une bille contenant des oligonucléotides et qui se composent d'un code-barres unique (l'identifiant unique à la cellule), d'une UMI de 10 nt (séquence aléatoire unique à chaque fragment de gène), d'adaptateurs/amorces de séquençage et d'un oligo-dT de 13 nt (Zheng et al., 2017). L'idée est de créer une librairie par la suite à partir de chaque ARNm barcodé (UMI) permettant d'obtenir une matrice d'expression par cellule et par gène. Chaque échantillon est séparé pour créer une librairie pour l'expression transcriptomiques 5' mais aussi pour le séquençage VDJ. La qualité des librairies a été validée avec un contrôle qualité effectué par « high sensitivity DNA chip » (Agilent technologies). Les échantillons ont été séquencés par la suite par un

séquençage « paired-end » (2 x 150 pb), qui est effectué avec l'instrument HiSeq X (Illumina, Macrogen, Inc).

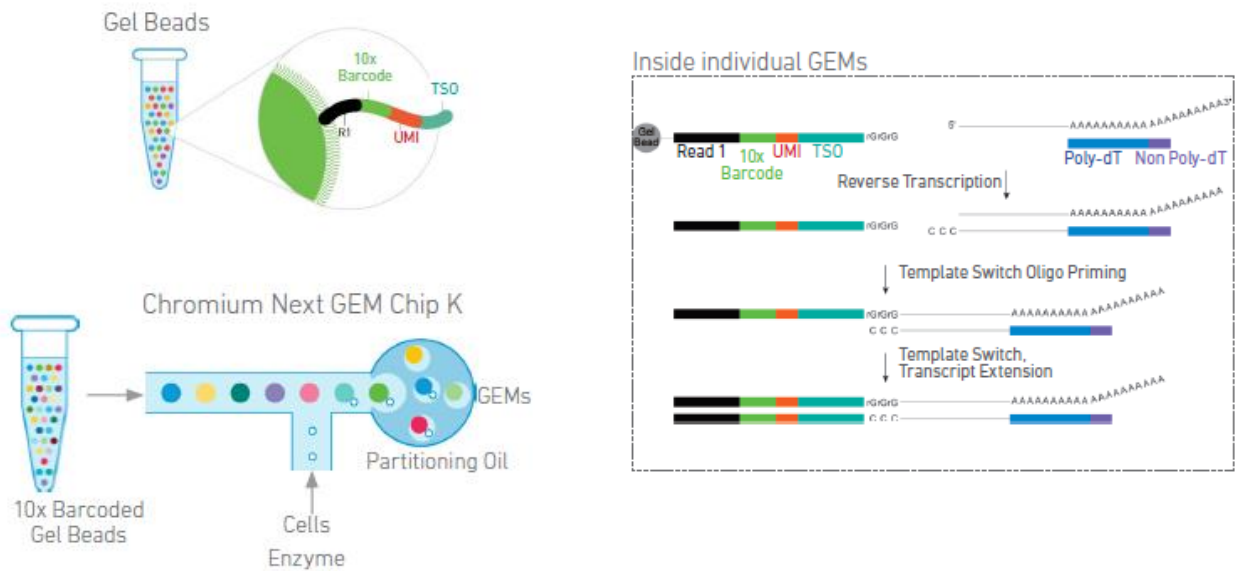


Figure 14 : Séquençage d'ARN monocellulaire par l'automate Chromium 10X

La qualité des "Raw.fastq" a été analysée en utilisant le logiciel « FastQC » (Illumina), et les données de séquençage obtenues ont un q-score supérieur à 30 (un Q30 à 89.74%). L'alignement a été effectué sur le génome de référence GRCh38-2020 GRCh37/hg19 avec le logiciel « Cell Ranger 3.1.0 » de 10x chromium qui utilise l'algorithme STAR.

2.3 Analyse des données du séquençage

L'analyse des données de séquençage a été effectuée avec le package **Seurat** sur R (V3). Seurat permet d'effectuer le contrôle qualité, l'analyse et l'exploration des données de scRNA-seq (Butler et al., 2018) (Stuart et al., 2019).

3.2.3.1 Workflow de pré-traitement standard

L'analyse consiste à effectuer un pré-traitement des données sur la base de ces critères :

- Le nombre de gènes uniques détectés dans chaque cellule. Nous avons éliminé les cellules de mauvaise qualité ou avec les gouttelettes vides, qui auront souvent un nombre très faible de gènes quantifiés (<200), ainsi que les doublets ou multiplets de cellules pouvant présenter un nombre de gènes élevé (>2500).
- Le pourcentage de génome mitochondrial. En effet les cellules de faible qualité ou mourantes présentent souvent une contamination mitochondriale importante. Pour cela nous éliminons les cellules avec pourcentage de gènes mitochondriale élevé (>7.5%)

3.2.3.2 Normalisation des données et analyse en réduction dimensionnelle linéaire

Ensuite, une normalisation des données a été effectuée en utilisant une méthode de normalisation à l'échelle globale, « LogNormalize », qui normalise les mesures d'expression génique pour chaque cellule par l'expression totale des cellules. Une fois la normalisation effectuée, nous avons identifié les variations transcriptionnelles intercellulaires dans le jeu de données (gènes fortement exprimés dans des cellules et peu exprimés dans d'autres) qui seront utilisées pour l'analyse en composante principale (ACP). 2 000 gènes variables ont été utilisés pour l'analyse en aval en suivant une approche similaire à celle de Macosko et al (Macosko et al., 2015). Enfin, chaque gène a été normalisé de telle sorte que le signal moyen pour chaque gène soit de 0 et que l'écart type soit de 1. Afin d'éviter un bruit de fond technique étendu et pour effectuer un clustering significatif, déterminer le nombre de Composante Principale (CP) à inclure en aval est une étape importante. En se basant sur la technique d'évaluation de la distribution de ces CP selon la technique proposée par Macosko et al « JackStraw » et la technique « ElbowPlot », qui consiste à voir les écarts types des principaux composants et à déterminer le seuil là où il y a un coude clair dans le graphique, les 20 premières CP ont été utilisées pour la suite de l'analyse. Le regroupement K-means a ensuite été effectué. Seurat inclut désormais une approche de regroupement cellulaire « clustering » basée sur des graphes par rapport

à Macosko et al. La résolution utilisée était de 1.2 qui a été déterminée selon la méthode de « Cluster tree », un outil utile pour prendre la décision de la résolution à utiliser (Zappia and Oshlack, 2018).

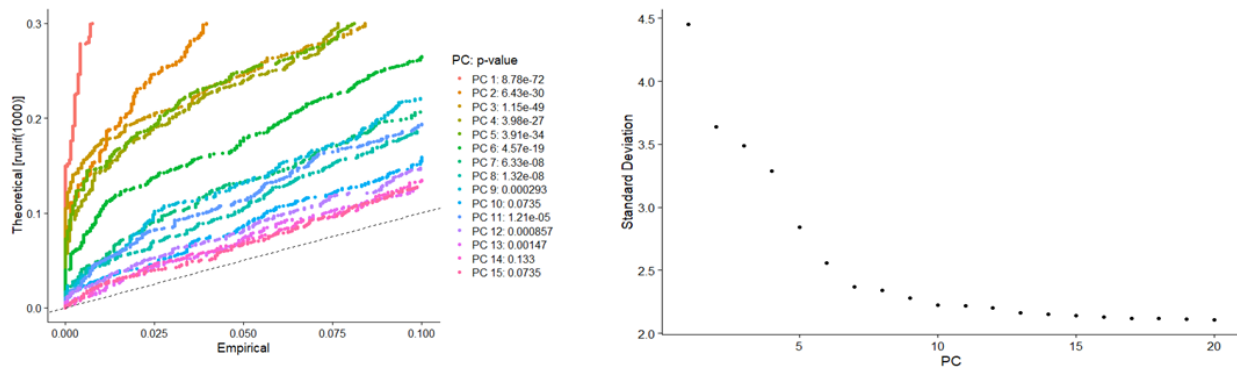


Figure 15 : Détermination de la "dimensionnalité" de l'ensemble de données avec la méthode JackStraw à gauche et ElbowPlot à droite.

3.2.3.3 Recherche des caractéristiques exprimées de manière différentielle entre les différents groupes (biomarqueurs des groupes)

La dernière étape de l'analyse consiste à trouver des marqueurs qui définissent des clusters via une expression différentielle (DEG) dans un groupe par rapport aux autres groupes, basée sur le test non paramétrique de Wilcoxon. En effet, les gènes les plus positivement et négativement exprimés, vont définir la signature de ce groupe de cellules. Dans un 1^{er} temps, nous avons regardé l'identité de chaque groupe par rapport aux autres puis par la suite des comparaisons entre deux groupes ont également été effectuées.

3.2.3.4 Annotation des processus biologiques GO

Des analyses d'enrichissement sur des ensembles de gènes ont été effectuées sur Enrichr (Chen et al., 2013). Ceci nous permet de valider un processus biologique ou une voie avec l'ensemble des gènes entrés en comparant ceux-ci à des bases de données. Plusieurs logiciels permettent de faire cette analyse. Pour notre étude, nous avons utilisé une bibliothèque développée par le laboratoire Ma'ayan (Chen et al., 2013).

3 RESULTATS

3.1 Pureté de l'isolation des cellules

L'isolation des LB réactifs à la SSA a été effectuée avec des billes anti-biotine. Cette technique nous a permis d'effectuer un enrichissement de ces LB réactives à la SSA avec un rendement et une viabilité des cellules élevés. Néanmoins la pureté était moins satisfaisante par rapport au trieur MoFlo (Figure 16A). La pureté des LB SSA⁺ était de **70%**. La fraction négative elle était de **96 %**. (Figure 16B). Au total 12.600 LB SSA⁺ ont pu être isolée et 641.000 LB SSA⁻, 5300 cellules ont été utilisés pour l'expérience pour avoir une couverture de 3000 cellules liées aux billes de 10x Chromium. Finalement après contrôle qualité, 721 LB SSA⁺ et 514 LB SSA⁻ ont été incluses dans l'analyse (Figure 16C).

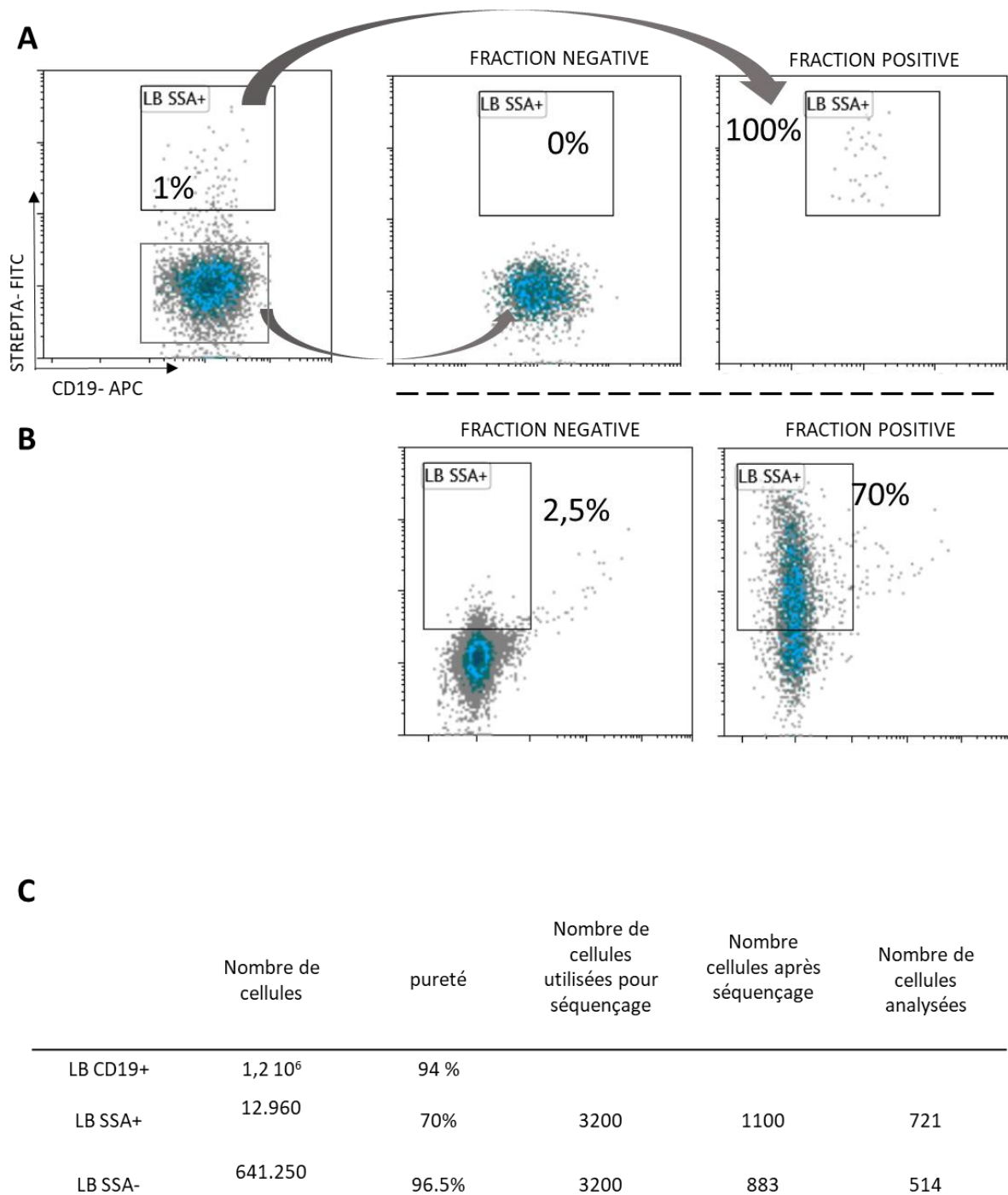
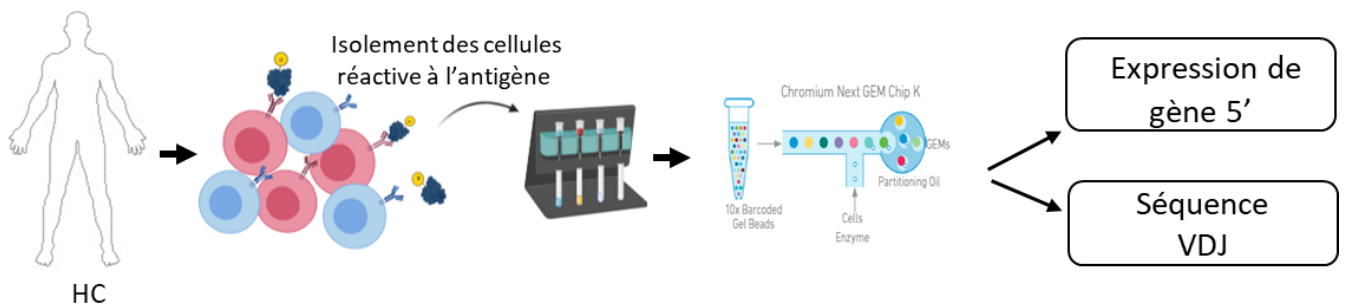


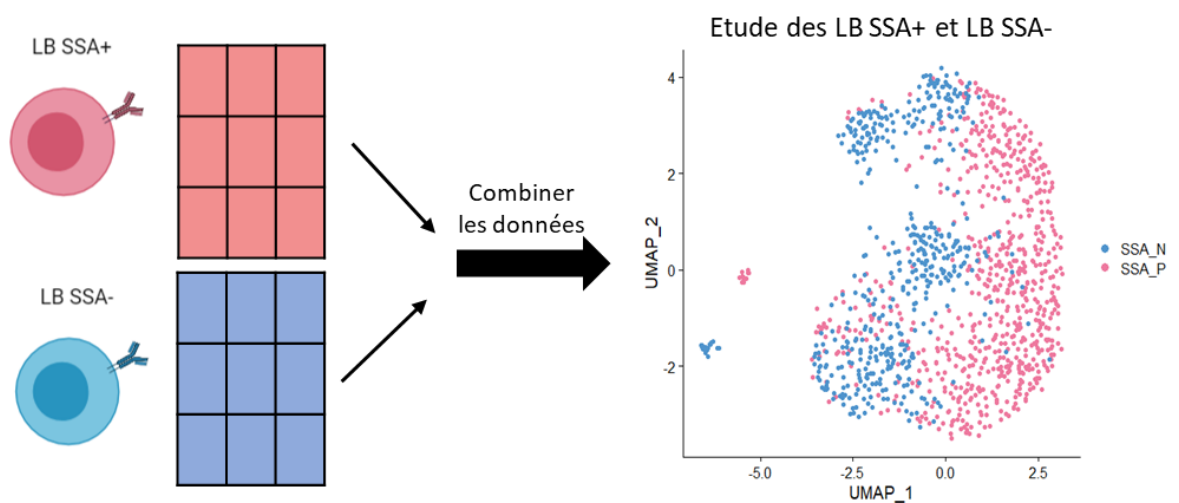
Figure 16 : Analyse de la pureté du tri des LB réactifs à la SSA par cytométrie en flux.

A- Pureté du tri des LB SSA+ et SSA- par le trieur MoFLO. B- Pureté du tri des LB SSA+ et LB SSA- par les billes anti-biotine. C- Tableau résumant le nombre des cellules triées et utilisées pour le scRNAseq.

A Isolement des cellules et scRNAseq



B



C Pipeline d'analyse

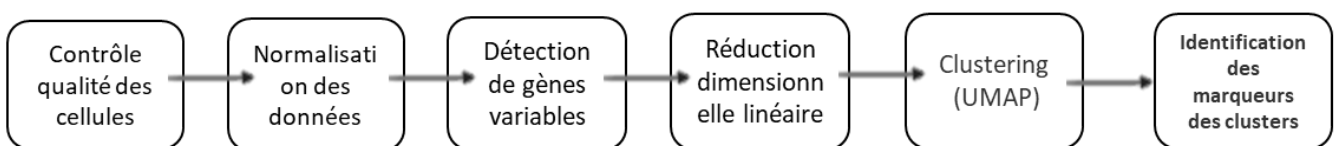


Figure 17 : Pipeline pour l'analyse des données scRNA seq.

A- Isolation des LB SSA⁺ et SSA⁻ et préparation des bibliothèques pour le séquençage du transcriptome 5' et séquence VDJ. **B-** Après l'alignement, un regroupement des deux sets de données SSA⁺ et SSA⁻, permettant une analyse comparative pour identifier les changements dans la proportion des populations lymphocytaires dans les deux échantillons. **C-** Pipeline de l'analyse effectuée.

3.2 Analyse des données et contrôle qualité

Dans une première étape, nous avons évalué la qualité des données après séquençage de 3000 cellules pour chaque échantillon LB SSA⁺ (SSA P) et LB SSA⁻ (SSA N). Les données issues des deux échantillons LB SSA⁺ et LB SSA⁻ ont été fusionnées (Figure 17). Les paramètres inclus pour filtrer les cellules non désirables de notre jeu de données étaient un nombre de gènes supérieur à 2500 et inférieur à 200. La majorité des cellules ont un pourcentage de gène mitochondriaux compris entre 2.5 et 10 (Figure 18A). Pour l'analyse qui s'en suit et afin d'avoir une meilleure qualité d'analyse, nous avons fixé le pourcentage de gène mitochondriaux à 7.5%. Suivant ces critères, un total de 1235 LB (721 pour les SSA⁺ et 514 pour le SSA⁻) a été inclus pour la suite de l'analyse. Le nombre de gènes détectés par cellule est plus important pour le groupe SSA-N (entre 500 et 1500 gènes) par rapport à SSA-P (500 en moyenne). L'analyse en composantes principales permet d'explorer des jeux de données multidimensionnelles et d'identifier les cellules et les caractéristiques qui définissent la CP. Cette analyse nous a permis d'identifier une population caractérisée par des gènes comme *CST3*, *ID2*, *LYZ*, *CD14*, *TYROBP* appartenant probablement à d'autres populations cellulaires que les LB (monocytes, etc..). Nous avons conclu que ces cellules pourraient provenir d'une contamination cellulaire par des cellules non B et nous avons ensuite retiré ces données lors de l'analyse plus approfondie (Figure 18B, C).

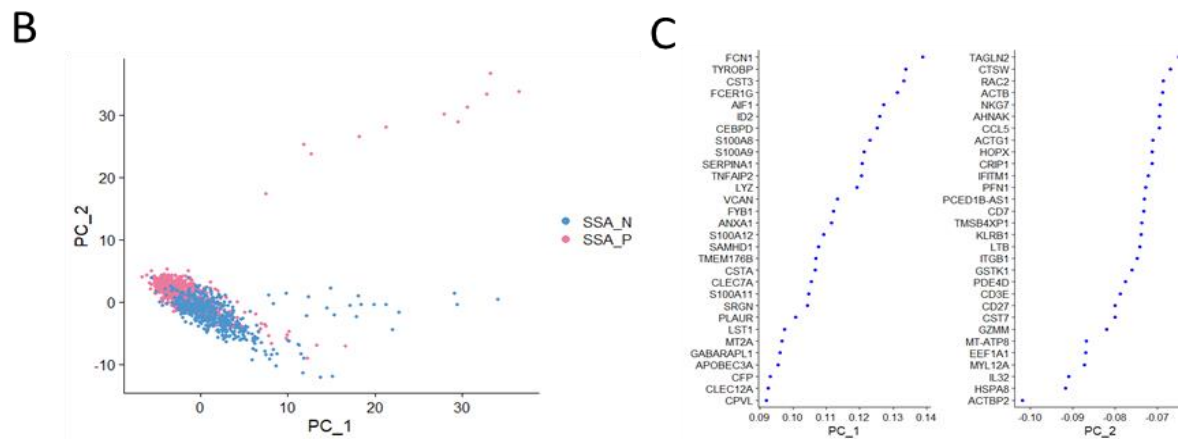
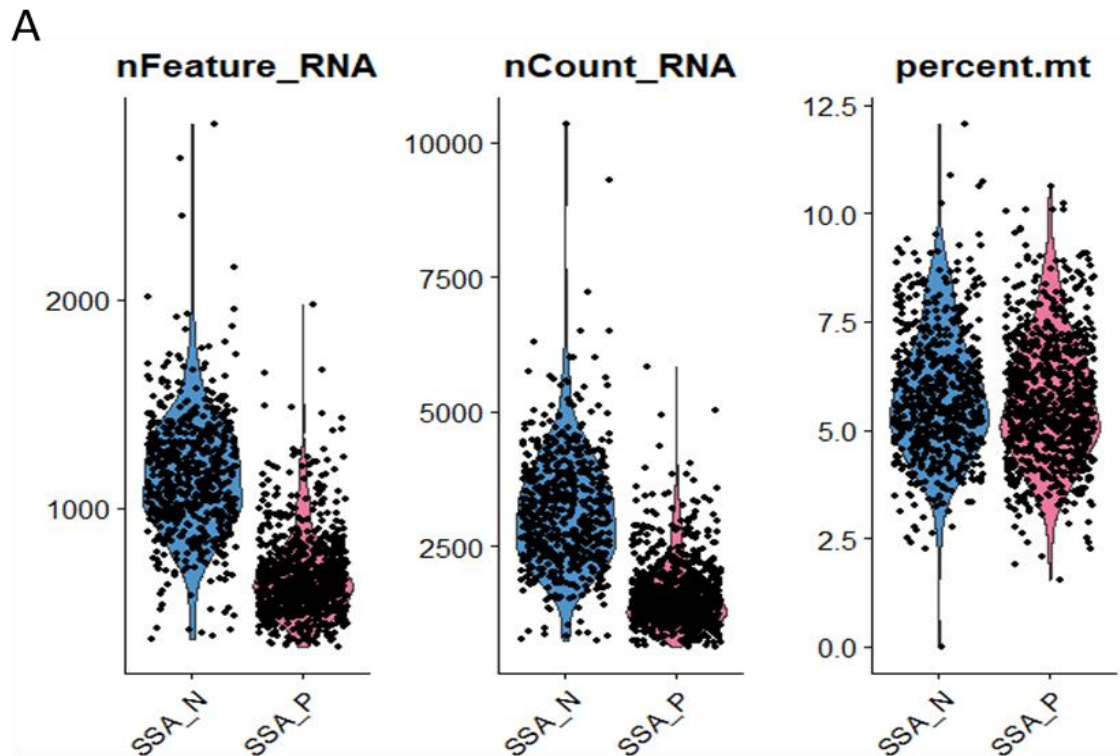


Figure 18 : Caractéristiques des jeux de données des groupes SSA+ et SSA-.

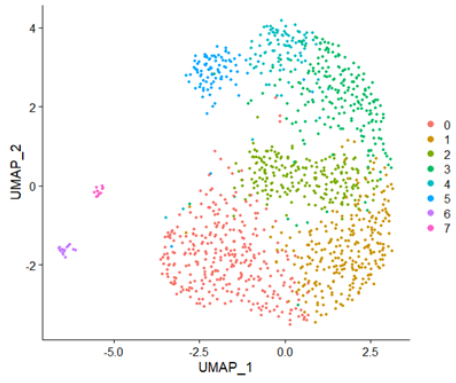
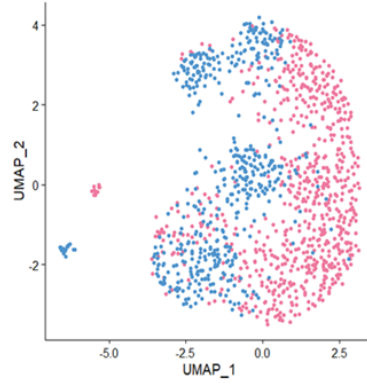
A- Caractéristiques des jeux de données des groupes SSA+ et SSA-. B- Réduction dimensionnelle linéaire des données avec analyse en composante principale. C- Visualisations des caractéristiques des PC1 et PC2.

3.3 Exploration de la signature transcriptionnelle des LB SSA⁺ et SSA⁻

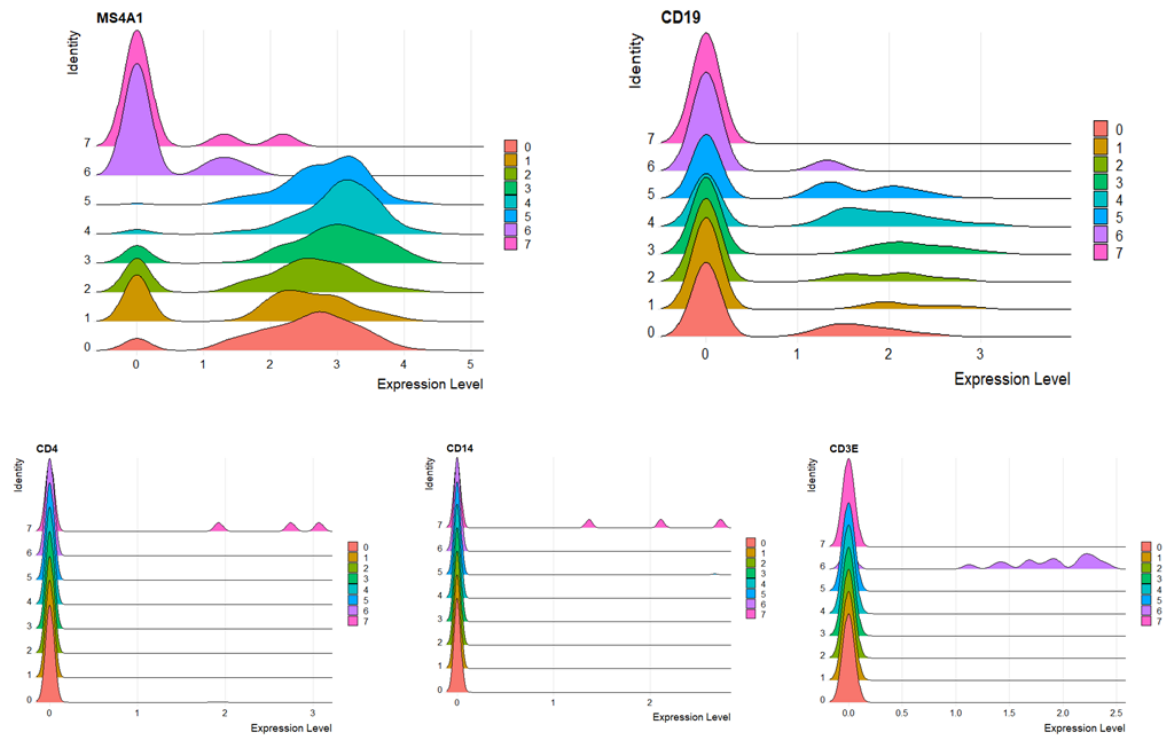
Dans le but d'identifier la signature moléculaire des LB SSA⁺, un regroupement « clustering » a été effectué sur les LB SSA⁺ et LB SSA⁻. Sept populations différentes ont été identifiées en prenant comme paramètre une résolution de 1.2 et avec les 20 premiers CP. Nous avons analysé l'expression des marqueurs spécifiques de la lignée B au sein des différents groupes (Figure 19). Nous observons une expression importante de CD19, CD20 et CD79a dans les 5 premiers groupes en revanche le cluster 6 et 7 semble toujours exprimer CD3, CD4 et CD14 (Figure 19D) laissant penser que ces deux clusters pourraient également être constitués d'autres cellules non B. Nous avons pu ainsi déterminer 2 clusters spécifiques aux LB SSA⁺ : les clusters 1 et 3 alors que le cluster 5 est restreint seulement aux LB SSA⁻. Les clusters 0, 2 et 4 sont des clusters contenant des proportions variables de LB SSA⁺ et SSA⁻ (Figure 19 A, B). L'étape suivante a consisté à identifier les marqueurs spécifiques de chaque groupe par analyse différentielle de l'expression des gènes entre groupes. Cette analyse a permis d'identifier près de 250 gènes différentiellement exprimés par les types cellulaires SSA⁺ et SSA⁻. Le seuil pour l'expression des gènes surexprimés et sous exprimés est fixé à 0.35 avec une p-value <0.05.

Figure 19 : L'analyse unicellulaire révèle la diversité des populations des LB circulants pour un individu sain.

(A) Projection UMAP bidimensionnelle des données scRNA-seq des sous-ensembles des deux groupes SSA⁺ et SSA⁻. Chaque point représente une cellule et est coloré par groupe. (B) Répartition de chaque groupe LB SSA⁺ et LB SSA⁻ en termes de nombre de cellules par groupe. (C) Expression des marqueurs enrichis pour chaque groupe. Ici, seuls les marqueurs avec une différence moyenne de $\text{avg_logFC} > 0,35$ ont été inclus. (D) Expression de CD19, MS4A1 (CD20), CD3e, CD4, CD14 dans chaque groupe.

A**B**

	SSA_N	SSA_P
0	197	124
1	8	262
2	119	100
3	15	195
4	74	20
5	82	9
6	19	0
7	0	11

C**D**

1- Groupe '0'

Ce groupe est commun aux deux échantillons SSA⁺ et SSA⁻. Composé à **40 % de LB SSA⁺ et 60% de LB SSA⁻**. On y trouve 100 gènes différentiellement exprimés comparativement aux autres clusters, contenant 32 gènes positivement régulés. Pour mieux comprendre la signature biologique de ce cluster, nous avons effectué une analyse d'enrichissement d'ontologie des processus biologiques (GO-BP). L'analyse nous montre que les gènes sont principalement associés à **l'activation des LB (GO : 0042113) et l'adhésion cellulaire et migration cellulaire (GO : 0030038)** par l'expression des gènes comme : l'ITGB1 (FC= 0,6) et SMARCB1 (FC= 0,38). ITGB1, intégrine bêta-1, est une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire et la régulation de la signalisation via les récepteurs de surface cellulaire (Lowell and Mayadas, 2012). Ces interactions augmenteront la capacité des LB à se différencier probablement par le soutien des interactions avec d'autres cellules, comme ça été montré par la délétion des intégrines α L β 2 et α 4 β 1 dans des souris (Wang et al., 2014). Quant à SMARCB1, il s'agit d'une enzyme de remodelage de chromatine (Zhao et al., 1998) , qui contrôle le cycle cellulaire via la régulation de p21, ainsi que les fonctions biologiques associées à la maintenance cellulaire. Il a été suggéré également que SMARCB1 est impliqué dans la régulation des gènes associés à l'inflammation tels que l'IL-6 (Choi et al., 2020).

Nous avons observé la surexpression du gène *PRKCB* (FC=0.36), codant pour la protéine kinase Cs. Des études initiales ont montré que ce gène était impliqué dans la cascade de signalisation cellulaire induite par le BCR et la voie NF-kappa-B. Récemment le rôle de cette protéine a été réévalué dans la différenciation des plasmocytes chez des souris *Prkcb*^{-/-}. Ils ont montré que la différenciation des plasmocytes était impactée suite à une absence de reprogrammation métabolique assurée par mTORC1, une protéine qui permet la différenciation des plasmocytes (Tsui et al., 2018).

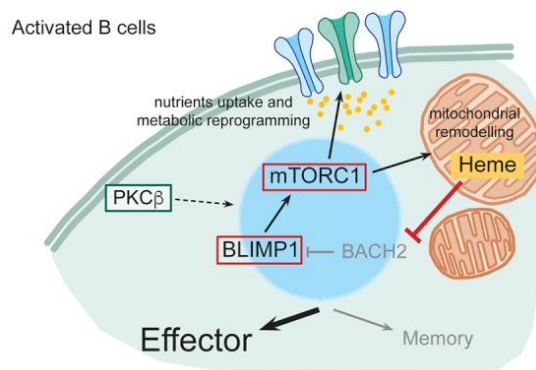


Figure 20 : Rôle de PKC β dans la différenciation des plasmocytes.

(Tsui et al., 2018).

Une expression du *TAGLN2*, *JCHAIN* et *POU2AF1* nous laisse par ailleurs penser à des LB mémoires activés en différenciation probablement vers des PB (Pré-plasmablaste). En effet une forte expression de *TAGLN2* été décrite sur les LB activés après stimulation du BCR dans les amygdales humaines (Kiso et al., 2017) ce qui suggère que l'expression de *TAGLN2*, indique un état d'activation. Le gène *JCHAIN* « *IGJ* », code pour la protéine de la chaîne J, une protéine spécifique des PC qui régule la polymérisation des IgA et IgM sécrétées suite à une différenciation des PC (Johansen et al., 2001); et finalement *POU2AF1* (FC= 0.26), connu sous le nom d'OBF1, qui est un facteur de transcription des LB en différenciation, induit par IRF4 et TCF4 (Laidlaw and Cyster, 2021). Avec le OCT1, il forme un complexe qui induit l'expression du facteur de transcription SPI-B, améliorant la signalisation en augmentant la transcription des gènes codant pour les récepteurs de surface des LB, tels que CD40, BAFFR, TLR. La signature mémoire est confirmée par l'expression de *TNFRSF13B*, codant pour TACI, un récepteur de BAFF, principalement exprimé par les LB mémoires (Zhang et al., 2015) (Smulski and Eibel, 2018). La signalisation de *TNFRSF13B* dans les LB génère l'expression de BLIMP-1, un facteur de transcription qui entraîne la différenciation des plasmocytes (Tsuji et al., 2011) .

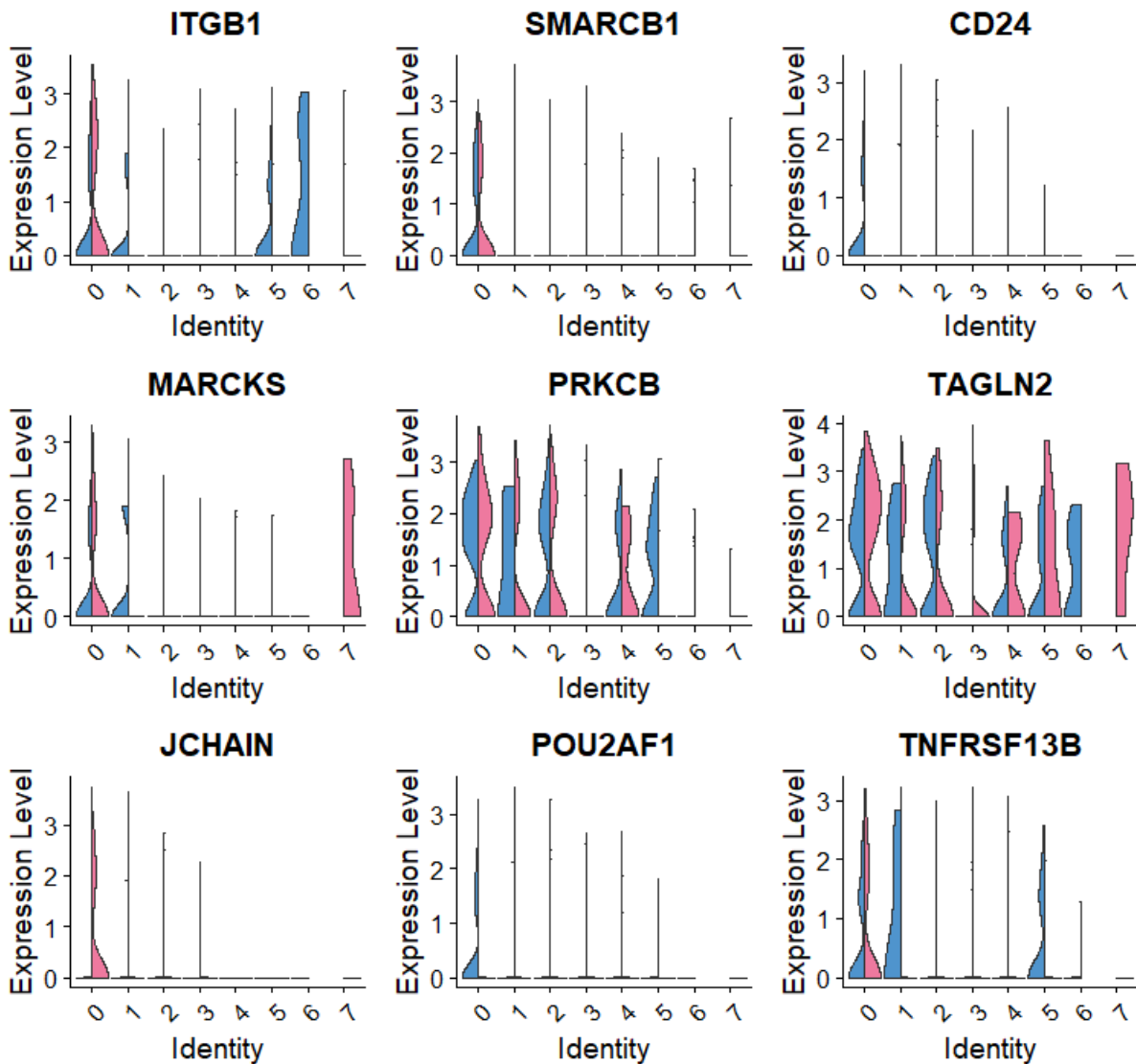


Figure 21 : Les gènes de la signature moléculaire du groupe 0.

Les niveaux d'expression des gènes différemment exprimés par le groupe 0 illustrés par des « Violon plot », $FC > 0.35$ et $FDR \leq 0,05$. Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)).

Nous avons par la suite comparé cette signature aux signatures des sous-populations de LB décrites dans une étude récente en scRNAseq qui avait comme objectif de consolider le phénotype avec le transcriptome (Stewart et al., 2021). Un tri de 6 populations des LB a été effectué dans ce travail à partir des PBMCs périphériques isolées du sang d'un sujet sain : transitionnelle, Naïve, Mémoire IgM, Memory classique, Double Négative. Avec une approche d'analyse similaire à la nôtre et en triant ces LB, les auteurs ont développé un outil qui peut être utilisé pour annoter les LB sous-populations dans des études de scRNAseq. Le « **groupe 0** » semble partager

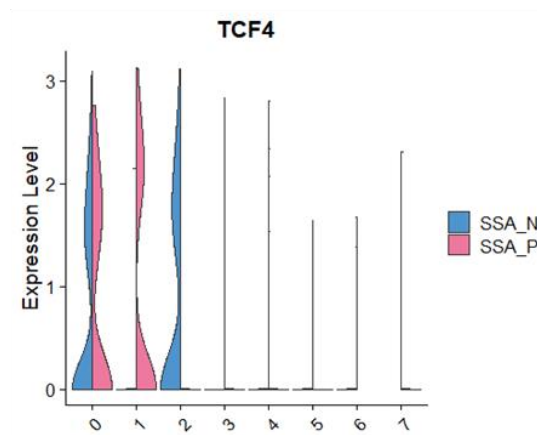
une signature avec deux populations. Tout d'abord les IgM mémoires par l'expression *MARCKS*, *COBLL1*, *SMARCB1* et *TCF4*. L'expression de *TCF4* est également trouvée exprimé dans ce « **groupe 0** » mais avec un faible FC=0.26. Ensuite, une similarité avec une population DN1 est trouvée par l'expression des *JCHAIN*, *TAGLN2*, *CD24*, *LTB*. L'analyse de pseudo-temps dans l'étude de Stewart montre bien que les LB DN1 et mémoires IgM avaient une trajectoire de développement similaire. Sanz et al confirment ceci sur la base que les LB mémoires IgM (LB mémoire pré-commutation) et les DN1 sont des précurseurs des LB mémoires (Sanz et al., 2019). Les LB mémoires et les DN1 semblent partager des similarités au niveau transcriptionnel (Jenks et al., 2018). Une caractérisation phénotypique et moléculaire du compartiment des LB mémoires suggère une origine des réponses CG primaires des deux sous-populations avec des preuves de l'expression élevée des molécules d'activation et de co-stimulation, des mutations somatiques des gènes variables lourds et légers d'Ig ainsi qu'un historique de réplication important par rapport aux LB naïfs (Berkowska et al., 2011).

2- Groupe '1' :

Le groupe 1 est enrichi en LB SSA⁺ (**97%**). L'analyse comparative avec les autres groupes montre 150 DEG contenant 16 gènes positivement régulés. Ce groupe montre une expression des DEG avec de nombreux gènes ribosomiques et reflète une faible expression génique globale par cette population. Néanmoins, nous observons une surexpression du facteur de transcription *TCF4* (FC= 0,5 / FDR= 0,002), exprimé par les LB en développement (Murre, 2005). Des études murines d'inactivation conditionnelle de *tcf4*, ont montré une réduction du nombre des LB de CG et de plasmocytes. Ils ont montré que TCF4 agit avec TCF3 en tant qu'activateurs transcriptionnel en régulent l'expression de gènes essentiels au développement et à la différenciation des LB CG, comme *icos1* (essentiel à l'interaction T_{FH}-LB (Nurieva et al., 2008)), *mef2b* (active bcl6 (Ying et al., 2013)) et *Pou2af1* (développement de LB CG) mais aussi les gènes essentiels à la différenciation des plasmocytes comme *Prdm1* (codant pour BLIMP-1) (Wöhner et al., 2016). La différenciation des plasmocytes assurée par TCF4 est étroitement contrôlée par ID3 qui permet d'orchestrer la différenciation et la ségrégation des LB CG et des plasmocytes après activation cellulaire (Gloury et al., 2016). Cependant l'expression de TCF4 par les LB SSA⁺ ne

nous permet pas de conclure sur une différenciation des LB puisqu'il est exprimé tout au long du développement et du maintien des LB matures. Afin de comprendre la fonction de ce groupe cellulaire, nous nous sommes intéressés aux gènes sous exprimés. Nous observons une diminution dans l'expression des gènes caractéristiques des LB naïfs comme *IGHD*, *BACH2* et *YBX3*, suggérant probablement que ces LB sont plus différenciés.

A



B

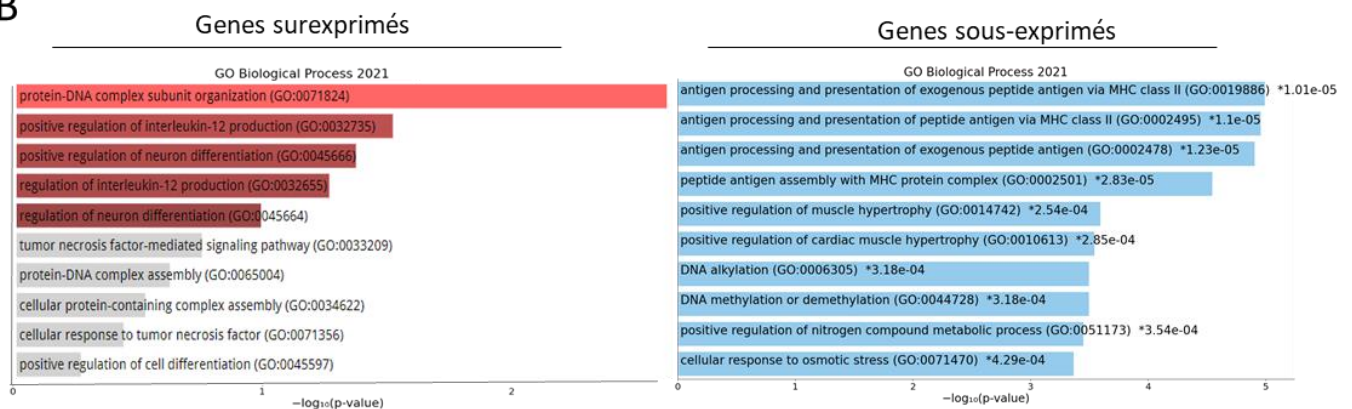


Figure 22 : Les gènes de la signature moléculaire du groupe 1.

A- Les niveaux d'expression des gènes différenciellement exprimés par le groupe 1 illustrés par des « Violin plot » FC>0.35 et FDR ≤ 0,05. Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)). B- Représentation des processus biologiques significativement enrichis (FDR ≤ 0,05) dans la signature moléculaire du groupe 1.

3- Groupe '2'

Le **groupe 2** représente la majorité des LB circulants. Il est composé d'autant de LB SSA⁺ que LB SSA⁻. Les principaux DEG comprennent des gènes associés à une signature de LB non différencié avec l'expression de **BACH2** (FC=0.82) (Igarashi et al., 2017), de la protéine antiproliférative **BTG1** (FC=0.57) (Rouault et al., 1992) et du facteur de transcription **PAX5** (FC=0.44). BACH2 et PAX5, sont deux facteurs de transcription essentiels pour de nombreux aspects de la lymphopoïèse B et ils sont fortement diminués lors de la différenciation terminale B (plasmocytes) (Itoh-Nakadai et al., 2014). (Cobaleda et al., 2007). Une signature **d'activation cellulaire** existe également dans ce groupe par la présence des marqueurs d'activation cellulaire comme le CD69 (Ziegler et al., 1994). Nous trouvons également l'expression de nombreux gènes codant pour des récepteurs de chimiokines comme *CXCR4*, qui contrôle l'entrée des LB aux ganglions lymphatiques (Okada et al., 2002) et *SELL* (CD62L) (Tedder et al., 1995) (Arbonés et al., 1994), surexprimé par les LB en migration folliculaire. Finalement l'expression de *FCER2* (CD23), le récepteur de faible affinité pour IgE, et l'expression d'*IGHD* nous suggère qu'il s'agit des LB naïfs activés IgD⁺CD23⁺ (Figure 23).

La comparaison de cette signature avec les sets de données scRNAseq précédemment publiés montre que cette population partage certains gènes exprimés par les LB naïfs (Ellebedy et al., 2016) (Stewart et al., 2021). Il est également intéressant de remarquer que l'expression de *SELL* ainsi que *CXCR4* est différente parmi les échantillons SSA⁺ et SSA⁻. Ainsi nous observons que les deux gènes responsables de migration folliculaire sont moins exprimés / absents dans l'échantillon issus des LB auto-réactifs SSA⁺, bien que ces différences ne soient pas significatives.

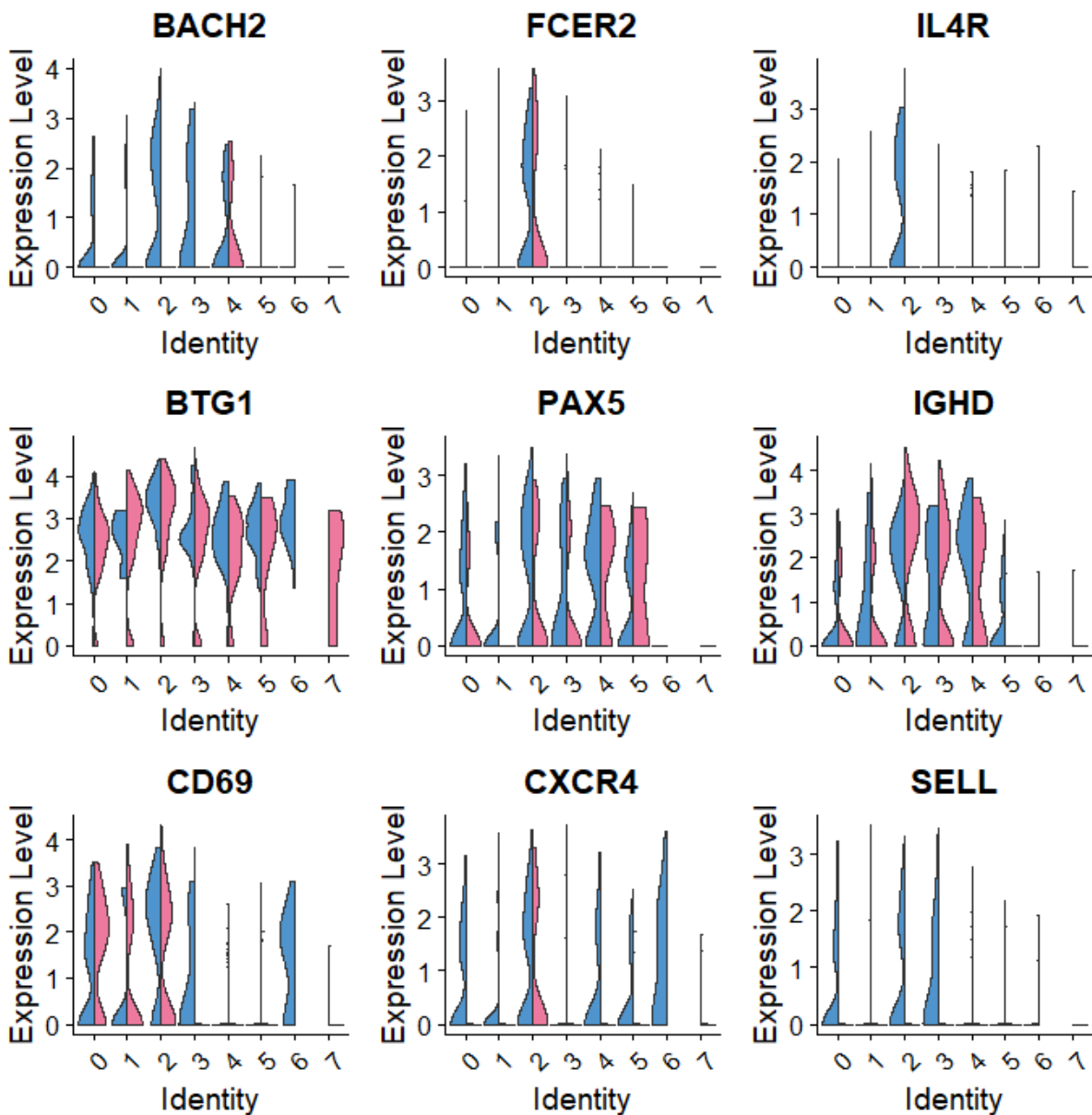


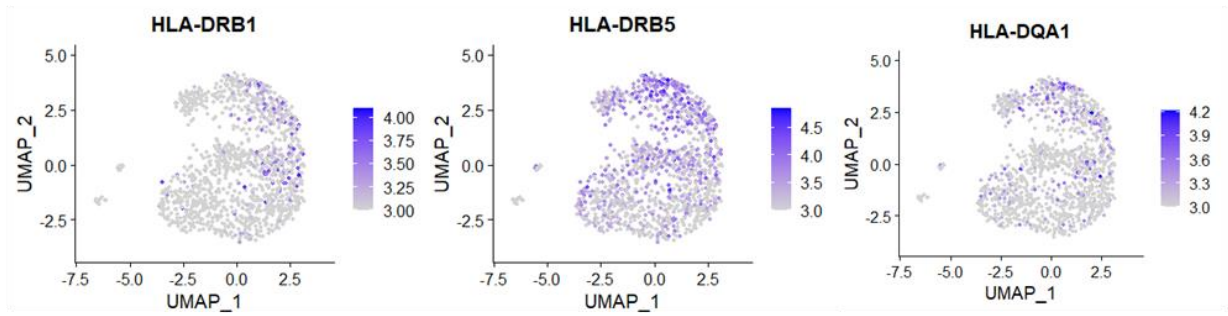
Figure 23 : Les gènes de la signature moléculaire du groupe 2.

Les niveaux d'expression des gènes différemment exprimés par le groupe 2 illustrés par des «Violin plot ». Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)).

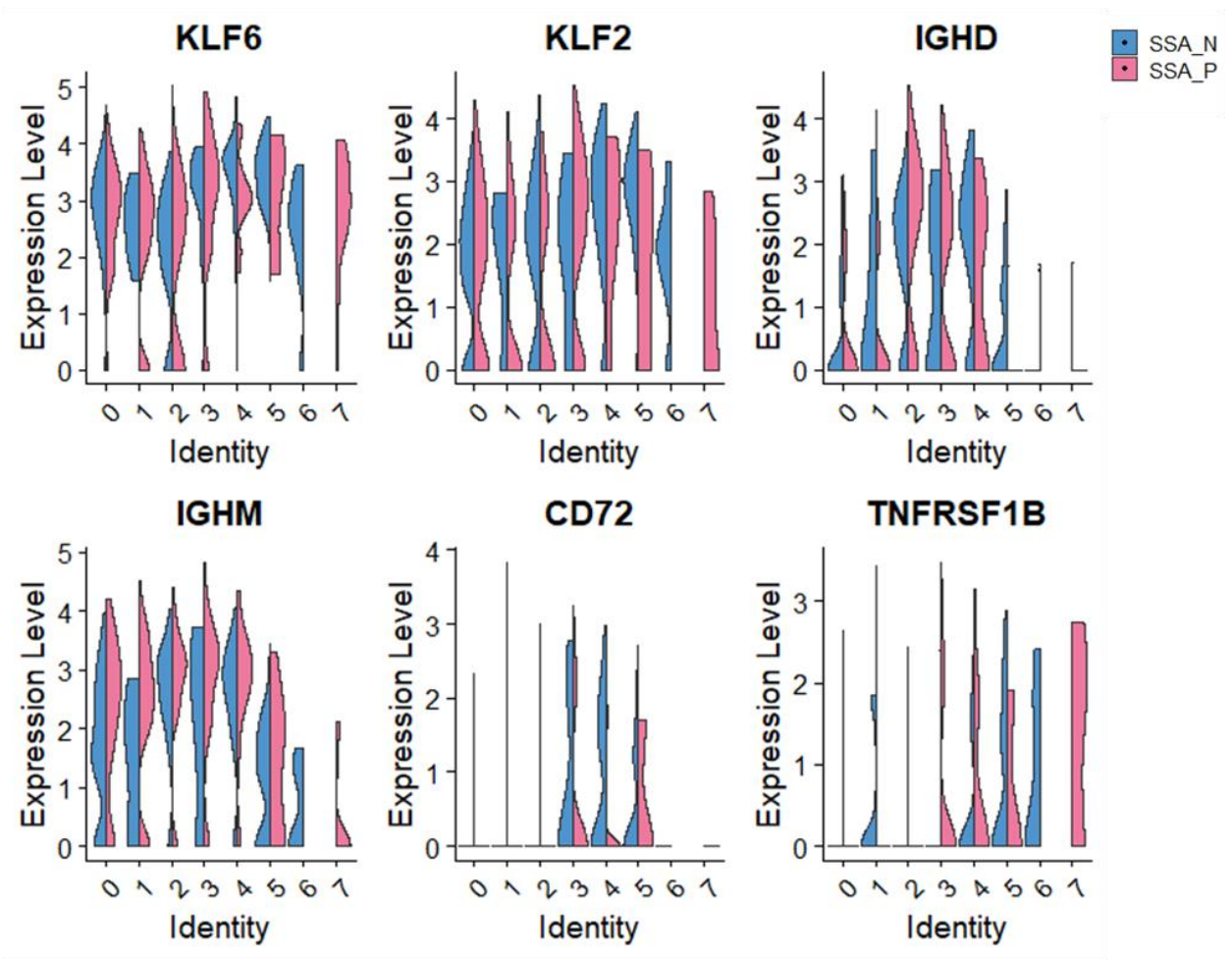
4- Groupe '3'

Le **groupe 3**, composé à 90 % des LB SSA⁺, est lui caractérisé par une surexpression de 18 gènes et une sous-expression de 29 gènes. L'analyse d'enrichissement de l'ensemble de ces gènes confirme que les gènes exprimés de manière différentielle dans les LB SSA⁺ sont principalement associés à la **présentation de l'antigène** notamment par l'expression des gènes *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DQA1* (Figure 24A). L'enrichissement de l'ensemble des gènes montre également une **régulation négative du récepteur de l'antigène**, notamment par la surexpression de *CD72* (FC= 0,7) un corécepteur inhibiteur du BCR (Li et al., 2006), exprimé sur tous les LB sauf les plasmocytes. CD72 régule la signalisation des LB avec un double effet, un effet négatif par son association avec SHP-1 par un motif de type ITIM (Wu et al., 1998) ou un effet positif avec son association avec Grb-2 (Wu and Bondada, 2009). CD72 joue également un rôle dans la discrimination de la signalisation tolérogène. Dans un modèle murin avec des LB anergiques aux lysozyme d'œuf de poule (souris Ig^{HEL}), les résultats montrent que les souris déficientes en CD72 produisent spontanément des autoanticorps et développent des caractéristiques d'une maladie auto-immune de type lupus (Li et al., 2008). Dans un LB anergique, l'activation du CD72 avec le BCR empêcherait la signalisation cellulaire contrairement à un LB stimulé par un antigène endogène. Ainsi, les LB de souris dTg CD72^{-/-} interprètent à tort la liaison à l'autoantigène comme un signal immunogène, ce qui entraîne une rupture de l'auto-tolérance des LB et conduit à leur activation. L'augmentation de l'expression de CD72 dans les LB anergiques soutient donc un rôle régulateur négatif dans l'activation des LB (Glynn et al., 2000). Finalement des **marqueurs d'activation** cellulaire comme *KLF6* (FC= 0,42) et *KLF2* (FC= 0,37) sont surexprimés dans ce groupe. Ces marqueurs, jouent un rôle dans la croissance et le développement des LB, et sont trouvés plus exprimés dans les MZB chez la souris (Turchinovich et al., 2011).

A



B



C

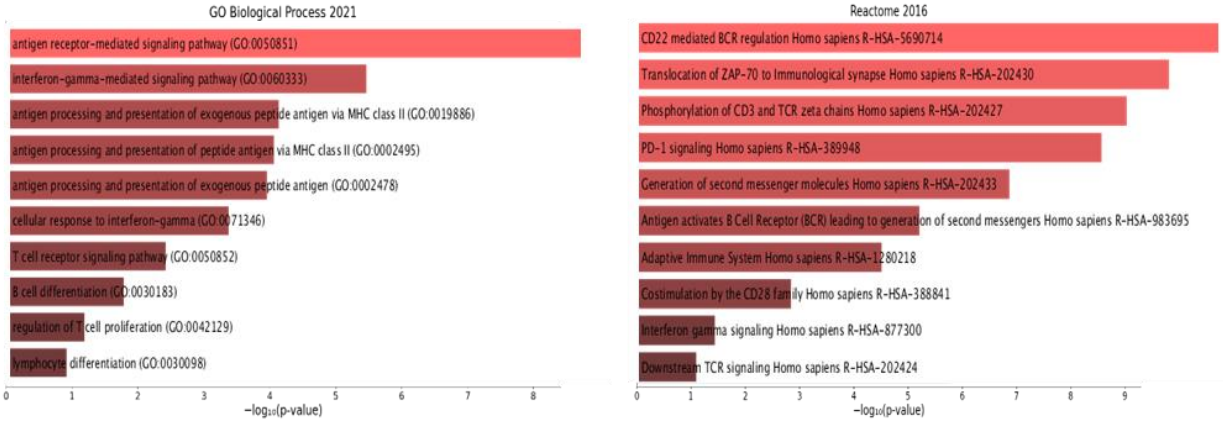


Figure 24 : Les gènes de la signature moléculaire du groupe 3.

A- UMAP montrant l'expression des gènes associés au groupe 3. **B-** Les niveaux d'expression des gènes différentiellement exprimés par le groupe 3 illustrés par des «Violin plot ». Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)). **C-** Représentation des processus biologiques significativement enrichis ($FDR \leq 0,05$) dans la signature moléculaire du groupe 3.

5- groupe '4'

Le groupe 4 est composé à 80% de LB SSA⁻. Il est caractérisé par une surexpression de 71 gènes. L'analyse d'enrichissement montre que ces gènes sont principalement impliqués dans la **signalisation cellulaire** (GO :0050851) et la **régulation de l'activation des LB** (GO :0050864), qui se manifeste par l'expression de *SYK* (signalisation de BCR), *MS4A1* (CD20) et *CD19*. Une forte expression des gènes tels que *ITGB2*, et les récepteurs inhibiteurs *FCRL3*, *FCRL5*, *CD72* et une sous expression de lymphotoxine-B (LTB), et *CD69* correspond à un profil cellulaire des LB décrit dans les études comme les « LB atypiques CD21^{low} » (Portugal et al., 2015). En comparant notre signature avec l'étude décrite plus haut (Stewart et al., 2021), la signature moléculaire du groupe 4 correspond parfaitement à la signature des DN2, par l'expression des gènes *CD72*, *FCRL3*, *FCRL5*, *FGR*... Les DN2, sont décrits comme des précurseurs des PB par voie extra folliculaire (Jenks et al., 2018). Néanmoins, nous notons que, dans cet ensemble de données, nous ne trouvons pas d'expression des deux gènes caractéristiques de cette population : *TBX21* (T-bet) et *ITGAX* (CD11c). Cependant, le régulateur transcriptionnel induit par T-bet : *ZEB2* est trouvé dans ce groupe (Dominguez et al., 2015).

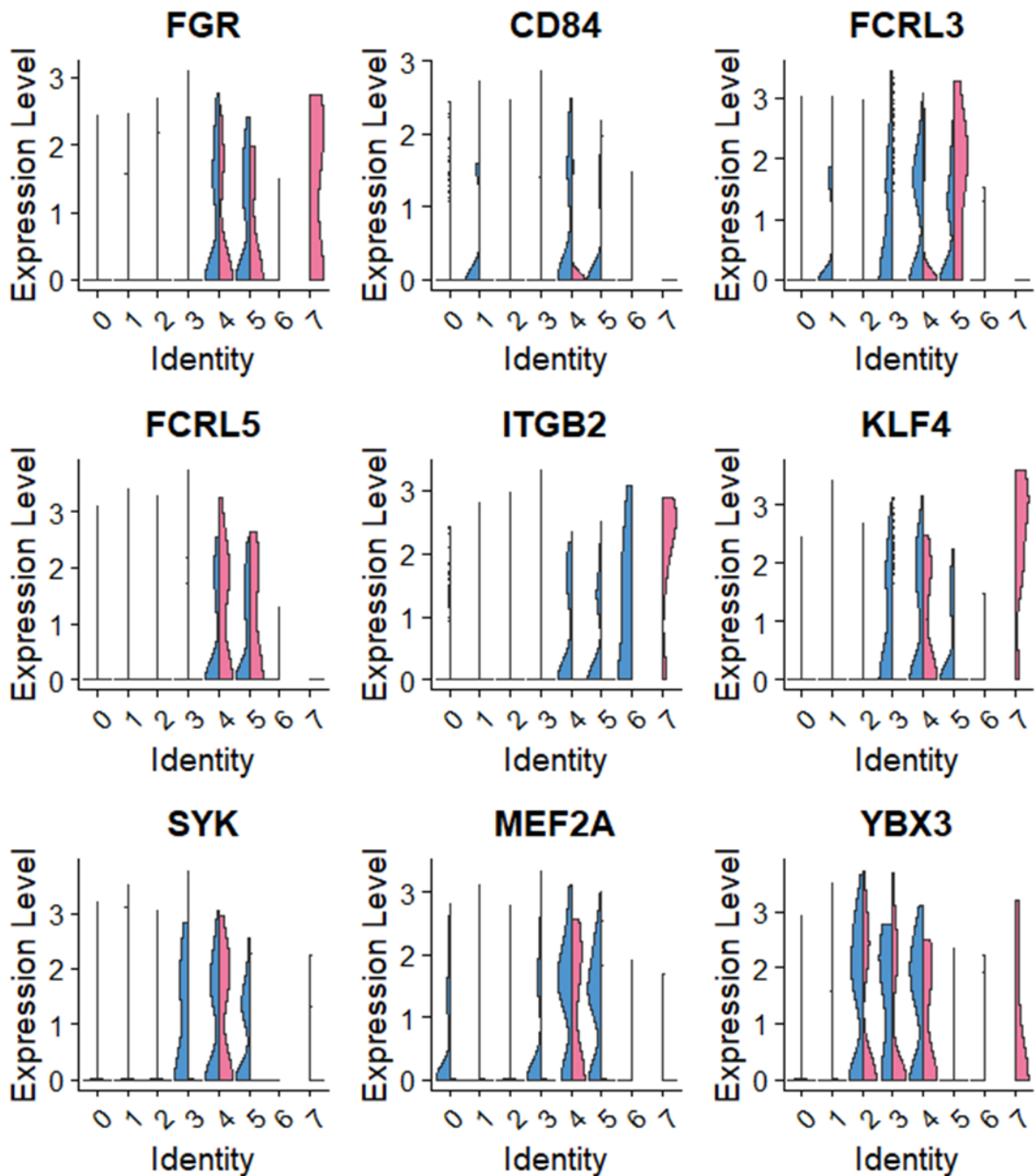


Figure 25 : Les gènes de la signature moléculaire du groupe 4

Les niveaux d'expression des gènes différemment exprimés par le groupe 4 illustrés par des «Violin plot », $FC > 0.35$ et $(FDR \leq 0,05)$. Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)).

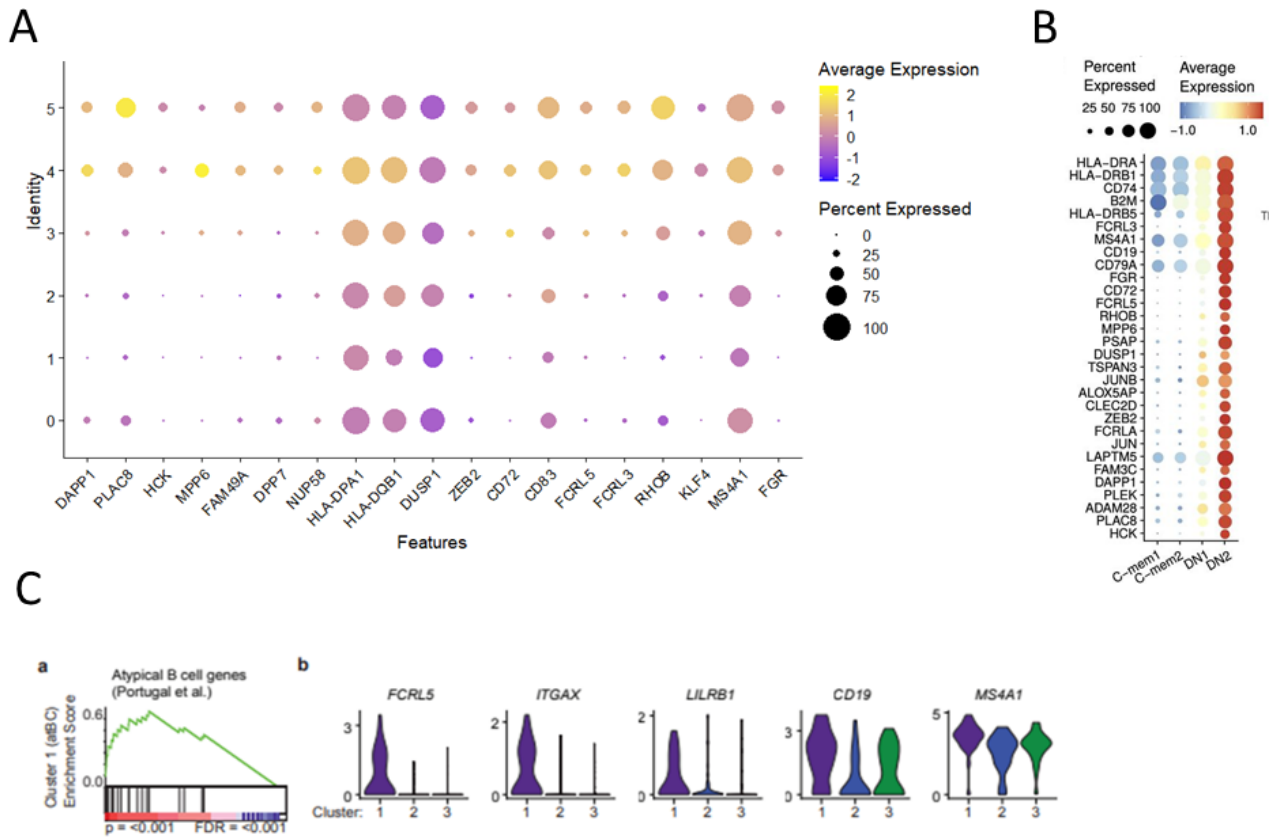


Figure 26 : Comparaison de la signature du groupe 4 avec la littérature.

A- Niveaux d'expression des marqueurs du groupe 4 illustrés par un dot plot. B- Niveaux d'expression des marqueurs du DN2 illustrés par un dot plot dans l'étude (Stewart et al., 2021). C- Niveaux d'expression des marqueurs des LB atypiques illustrés (Portugal et al., 2015) (Sutton et al., 2021)

Le gène *VH4-34* codant pour des autoanticorps (9G4⁺) (Tipton et al., 2015) est enrichi chez les patients atteints de lupus et contribue à la production des autoanticorps anti-ADN double brin. Ce gène est trouvé enrichi parmi les DN2 dans l'étude de Jenks (Jenks et al. 2018). Il était intéressant de trouver ce gène surexprimé dans ce groupe 4. En revanche, les LB SSA⁺ présentes dans ce cluster (représentant 20% des cellules) ne semblent pas l'exprimer. Ceci reste cohérent par le fait que ces LB SSA⁺ proviennent d'un sujet sain, incapable de produire des anticorps anti-SSA.

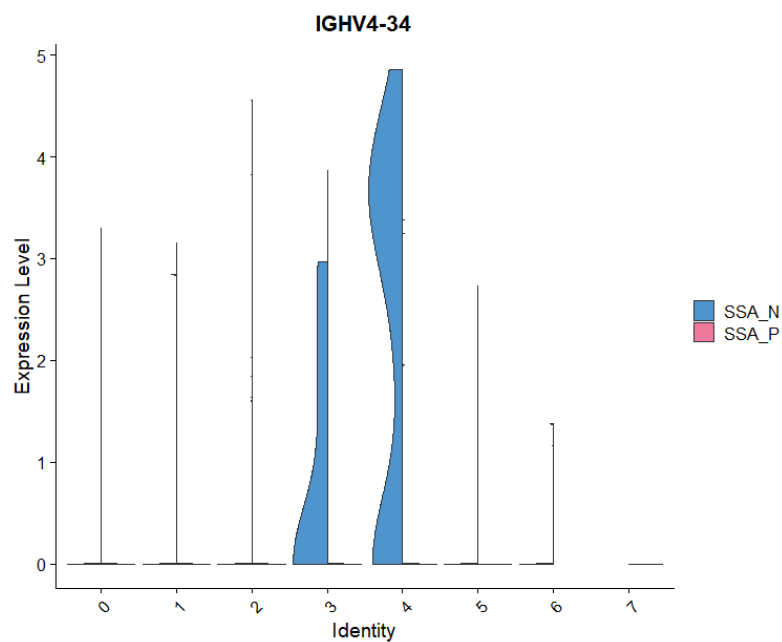


Figure 27: Vnplot pour l'expression du gène IGHV-34

6- Groupe '5'

Enfin, le groupe 5 est composé à 90% de LB SSA⁻. 63 gènes étaient significativement positivement régulés et 8 gènes étaient significativement régulés à la baisse dans ce cluster. L'analyse d'enrichissement des gènes montre bien des processus liés à **la signalisation cellulaire par la voie de RAS** par l'expression de RASGRP1, l'expression de EZR, qui permet la réorganisation dynamique du cytosquelette cortical, essentielle pour de nombreux processus cellulaires, notamment l'activation et la migration des LB (Pore and Gupta, 2015). Nous observons aussi, un enrichissement de la voie RHO GTPases, par l'expression de RHOB et RHOA, Ras Homolog Family Member B, qui sont impliqués dans le trafic **de protéines intracellulaires** (Zhang et al., 2012). L'expression de NOTCH2, un facteur de transcription exprimé par les LB matures notamment avec une augmentation dans les LB matures de la rate. Des souris knock-out Notch2 (Notch2 cKO), montraient une diminution nette des MZB « CD1d^{high}IgM^{high} IgD^{low}CD21^{high}CD23^{low/-} », ce qui a suggéré que NOTCH2, par son action sur Deltex1 exprimé sur les MZB, est indispensable au développement de la lignée B de la zone marginale. Ce rôle semble être restreint aux MZB, étant donné que la différenciation des LB folliculaires et des plasmocytes reste normale dans les souris Notch2 cKO (Saito et al., 2003). La surexpression du facteur d'activation KLF3, exprimé dans les MZB chez la souris (Turchinovich et al., 2011), suggère ainsi que ces cellules peuvent être des LB de la zone marginale en circulation.

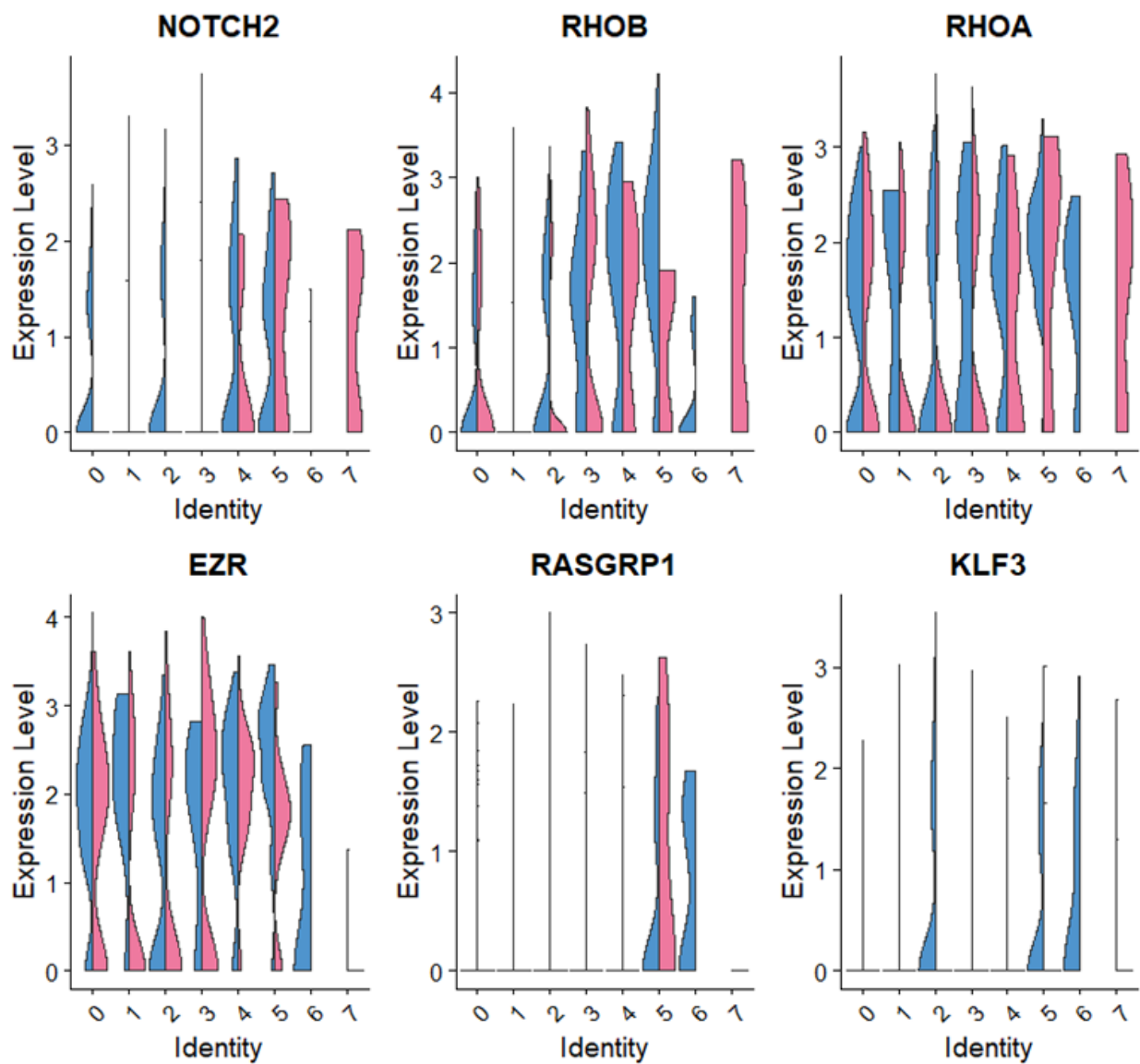


Figure 28: Les gènes de la signature moléculaire du groupe 5

Les niveaux d'expression des gènes différenciellement exprimés par le groupe 5 illustrés par des «Violin plot », $FC > 0.35$ et $(FDR \leq 0,05)$. Chaque Violon plot présente l'expression par cluster et par origine des données (SSA-P (rose) ou SSA-N(bleu)).

4 CONCLUSION

L'analyse transcriptomique à l'échelle unicellulaire des LB SSA⁺ à partir d'un sujet sain était une première étude « pilote » pour caractériser les LB SSA⁺ dits « naturels ». Cette étude, a pour objectifs de comprendre i) le profil transcriptomique propre aux LB auto-réactifs SSA chez un sujet sain mais aussi chez les patients atteints du syndrome de Sjögren par la suite. ii) Etudier le répertoire des immunoglobulines au sein des LB auto-réactifs spécifiques de la SSA.

Cette première expérience a eu pour but de mettre au point la technique et d'avoir une 1^{ère} caractérisation des LB SSA⁺ en physiologie, comparés aux LB SSA⁻. Les premiers résultats, montrent 5 différents groupes cellulaires. Nous avons, en se basant sur la littérature, essayé de caractériser ces groupes. Nous avons également montré un profil transcriptomique différent dans les LB SSA⁺ par rapport aux LB totaux, avec des gènes principalement associés à la présentation de l'antigène et à la régulation négative du récepteur d'antigène. Ces résultats doivent donc être considérés comme préliminaires et nous ont permis d'évaluer la faisabilité d'utiliser cette méthode pour nous permettre ultérieurement d'étudier les LB auto-réactifs chez les malades.

DISCUSSION

Les LB sont au cœur de la physiopathologie du SSp, mais peu d'études ont été réalisées sur les LB auto-réactifs spécifiques de la SSA, autoantigène principal de la maladie. Ainsi une analyse détaillée de ces LB spécifiques de la SSA, potentiellement pathogènes, pourrait permettre de mieux comprendre comment prévenir et traiter la maladie.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu comme objectif de caractériser ces LB auto-réactifs spécifique de la SSA chez les patients atteints de syndrome de Sjögren et de les comparer avec les LB auto-réactifs spécifiques de la SSA en physiologie chez un sujet sain.

La sécrétion des autoanticorps de type IgG étant présente seulement chez les patients, il est probable que les LB auto-réactifs peuvent se différencier *in vivo* en cellules sécrétrices d'anticorps et ont subi une commutation de classe. Nous émettons donc l'hypothèse que chez un patient atteint de SSp, les LB auto-réactifs spécifiques de SSA échappent aux points de contrôle de la tolérance centrale et périphérique contrairement à des conditions physiologiques normales où les LB restent sous le contrôle des mécanismes de la tolérance.

1- Marquage des LB spécifiques de la SSA

Les LB spécifiques d'un antigène donné sont rares dans le sang et en l'absence de marqueurs les définissant, leur détection et leur isolation est complexe. **Le 1^{er} objectif** de cette thèse était de détecter ces LB spécifiques de la SSA, en périphérie et de les isoler par la suite pour pouvoir les caractériser. Nous avons développé une méthode de cytométrie en flux en se basant sur la détection des LB sur la base de la spécificité de leur BCR (reconnaissance de SSA). Les LB qui vont reconnaître la SSA biotinylée seront révélées par l'ajout de la streptavidine fluorescente (FITC). La cytométrie en flux est la méthode la plus couramment utilisée pour identifier les LB spécifiques d'antigènes dans d'autres contextes. Cette méthode de couplage des protéines à la biotine et de révélation avec une streptavidine, a été utilisée également pour détecter les LB auto-réactifs qui reconnaissent les antigènes nucléaires (ANA⁺) dans le Lupus (Malkiel et al., 2016). Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), des

tétramères avec des peptides citrullinés (CCP) biotinylés et révélées par deux streptavidines couplées à deux fluorochromes différents, ont été développés pour détecter les LB spécifiques (Kerkman et al., 2016) (Lu et al., 2018a). L'utilisation des tétramères avec des streptavidines couplées à deux fluorochromes différents permet de détecter les LB spécifiques en diminuant les faux positifs. Cependant cette méthode n'est pas compatible avec la taille de notre protéine SSA (60 KDa) contrairement aux protéines citrullinées. Des études antérieures ont identifié des LB spécifiques d'un antigène d'une manière similaire mais en utilisant des antigènes directement conjugués à un fluorochrome (Cornec et al., 2017). Nos premiers résultats montrent que les LB SSA⁺ étaient bien présents chez les patients ainsi que les témoins avec des fréquences qui sont de 2% en moyenne parmi les LB CD19⁺. La proportion de LB auto-réactifs est très variable entre les études. Des études ont montré des pourcentages plus faibles comme pour les LB spécifiques à l'insuline, qui représentaient une moyenne de ~ 0,37% des LB circulants chez les patients (Smith et al., 2015), et les LB spécifiques aux CCP représentaient une médiane de 0,008 % des LB circulantes chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde. A l'inverse, les LB spécifiques aux extraits antinucléaires (ANA⁺) représentaient entre 6 % et 24 % des LB circulants dans la rate ou moelle osseuse de souris (Suurmond et al., 2019).

Les LB SSA⁺ ont été isolées par tri en FACS et un ELISPOT a été effectué pour vérifier la spécificité de la méthode utilisée pour isoler les LB spécifiques à la SSA et confirmer que ces cellules sont bien capables de sécréter des anticorps anti-SSA. Nos résultats ont montré que seulement les LB SSA⁺ étaient capable de produire des anticorps anti-SSA contrairement aux LB déplétés de la SSA (LB SSA⁻), indiquant une récupération totale des LB SSA⁺ dans l'ensemble des LB CD19⁺. Cependant toutes les cellules n'étaient pas capables de produire des anticorps anti-SSA puisque le nombre de spots Ig totales était plus élevé que le nombre de spots Ig anti-SSA. Cela correspond également aux données trouvées par d'autres équipes (Kerkman et al., 2016) (Roose et al., 2018).

Notre collaboration avec l'équipe de Dr Rene Toes au LUMC, nous a permis d'étudier les LB SSA⁺ à l'échelle unicellulaire afin de comprendre l'hétérogénéité au

sein de la population LB SSA⁺ et de déterminer les cellules spécifiques à la SSA. Nos résultats en 1^{er} lieu, nous ont permis de confirmer nos premières observations obtenues par ELISPOT : seules les LB SSA⁺ étaient capables de produire des anticorps anti SSA. En revanche, la sécrétion limitée d'anticorps détectée à partir de tous les LB SSA⁺ à la suite de cette stimulation *in vitro* avec TLR7/8, TNF α , IL21, IL1b, indique que 1) soit la méthode utilisée par cytométrie ne nous permet pas de récupérer uniquement des LB spécifiques de SSA, 2) soit le protocole de stimulation pourrait être modifié pour inclure des facteurs essentiels à la survie et à la différenciation des LB auto-réactifs, tels que BAFF (Nojima et al., 2011) (Joosse et al., 2021) ou une stimulation TLR9 connue pour activer l'activation des LB auto-réactifs dans le lupus érythémateux disséminé (Christensen et al., 2005), 3) La méthode de détection des anticorps spécifiques avec le coating des antigènes pourrait affecter la sensibilité des deux techniques ELISA et ELISPOT.

La technique utilisée nous a permis de détecter les LB réactives à la SSA. Néanmoins, il est suggéré d'avoir des liaisons non spécifiques comme montré avec ELISPOT et ELISA. Cette liaison en partie non spécifique des LB à la SSA-b pourrait être expliquée par les limitations liées à l'utilisation d'antigène biotinylé. Il est important de noter que la biotinylation de l'antigène peut affecter la disponibilité des épitopes antigéniques (Smith et al., 2017). Un titrage minutieux de l'antigène biotinylé est essentiel pour distinguer la liaison spécifique de l'antigène et non spécifique. De plus, Il a été suggéré également qu'il faut un rapport 1 :1 entre la biotine et antigène (Boonyaratanakornkit and Taylor, 2019). Rappelons également que la fréquence de polyréactivité dans le répertoire normal des LB humains adultes a été estimée à 4 % des LB naïfs, 23 % des LB mémoire IgG⁺ et 26 % des plasmablastes intestinaux. (Tiller et al., 2007a) (Benckert et al., 2011). Cette notion de polyréactivité pourrait expliquer l'hétérogénéité des résultats entre les différentes études qui ont rapporté la fréquence des LB auto-réactifs à différents autoantigènes au cours de différentes maladies auto-immunes. Pour confirmer cela, il pourrait être intéressant d'étudier la polyréactivité de ces cellules par le biais d'anticorps monoclonaux produits à partir des clones SSA⁺.

2- Phénotype des LB réactifs à la SSA

Après avoir établi/validé la méthode de détection des LB SSA⁺, nous avons souhaité utiliser cette technique pour pouvoir étudier phénotypiquement ces cellules sur un ensemble de 51 patients atteints de SSp et de 46 sujets sains. Les 1^{ères} questions qui se sont posées pendant ce projet sont :

-Quelle est le stade de différenciation de ces LBs réactif à la SSA chez les patients atteints de Sjögren ?

-Est-ce qu'ils ont un phénotype plus mature chez les patients par rapport aux sujets sains ?

Pour répondre à ces questions, un grand axe de ce projet était de caractériser phénotypiquement les LB SSA⁺ dans les patients atteints de SSp et chez les sujets sains. En 1^{er} lieu, l'analyse des sous populations des LB chez les patients avec SSp nous confirme bien l'anomalie de distribution des sous populations spécifique de cette maladie (Bohnhorst et al., 2001). Cependant, malgré les preuves attestant des troubles des LB périphériques et de l'auto-immunité humorale, le stade de développement des LB, auquel la rupture de la tolérance et le début de l'auto-réactivité des LB se développent, chez les patients atteints de SSp n'est toujours pas clair.

Une analyse phénotypique des LB SSA⁺ a été effectuée par la suite afin de comprendre les mécanismes responsables de développement de SSp. Nos premiers résultats montraient que les LB SSA⁺ étaient bien présents chez les patients ainsi que chez les témoins. La présence de LB auto-réactifs circulants chez les individus sains a été décrit et dénommé l'auto-immunité naturelle. Le rôle de ces cellules sécrétant des autoanticorps naturels principalement des IgM, consisterait à l'élimination des cellules apoptotiques, le masquage des néo-autoantigènes, et la liaison à des déterminants idiotypiques sur les IgG autoréactives (Lobo, 2016). De façon remarquable, la fréquence des LB SSA⁺ était plus importante chez les patients avec SSp par rapport aux sujets sains. L'augmentation de leur fréquence est encore plus importante chez les patients avec une sérologie positive à l'anti-SSA par rapport aux patients avec une sérologie négative. Ce qui suggère une éventuelle corrélation entre ces LB SSA⁺ détectés par cytométrie en flux et la production des autoanticorps chez les patients, impliquant aussi une rupture de la tolérance chez les patients atteints de

SSp conduisant à la sécrétion des anticorps anti-SSA de type IgG détectés dans le sérum.

D'où la question : à quel stade de maturation la rupture de tolérance se fait-elle ?

Phénotypiquement, la majorité des LB SSA⁺ sont des cellules naïves, en cohérence avec l'accumulation des LB auto-réactifs trouvés dans le compartiment des LB naïfs dans la polyarthrite rhumatoïde (Isnardi et al., 2010). Lorsque l'on compare la répartition des sous-populations de LB au sein de LB SSA⁺ entre patients SSp et sujets sains, nous trouvons une augmentation du compartiment des LB transitionnels et une diminution du compartiment des LB mémoires, similaire aux anomalies de répartition des LB totaux (Figure 29). Afin de prendre en compte ces anomalies de répartition des LB entre patients et témoins, il était donc plus juste d'évaluer la fréquence des LB SSA⁺ dans chaque compartiment.

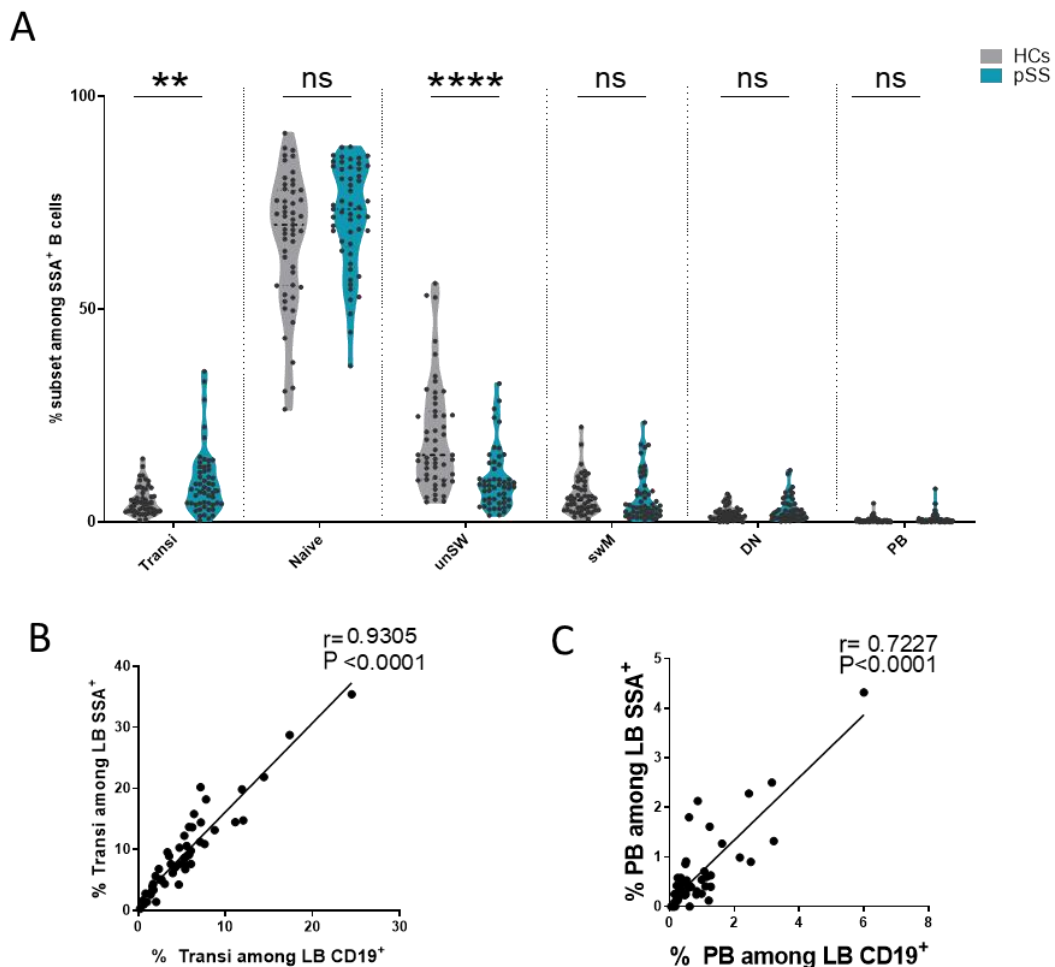


Figure 29: Phénotype des LB SSA⁺ chez les patients pSS et sujets sains.

(A) Répartition des sous-populations de LB au sein des LB SSA⁺ chez les patients atteints de pSS (n=51) et sujets sains (n=44). Chaque point correspond à un individu, P value est déterminée par un test Mann-Whitney. B- Test de corrélation entre la fréquence des LB SSA⁺ Transi et LB CD19⁺ Tansi, (C) et entre les LB SSA⁺ PB et les LB CD19⁺ PB. Régression Linéaire a été utilisée pour calculer la corrélation.

Dans un second temps, nous avons donc évalué la fréquence des LB SSA⁺ dans les principaux compartiments des LB : transitionnels, naïfs, mémoires, DN et PB. Nos analyses montrent une fréquence remarquable des LB SSA⁺ dans le compartiment des LB matures chez les patients SSp contrairement aux sujets sains. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats trouvés dans la polyarthrite rhumatoïde, où la majorité des LB auto-réactifs sont des LB mémoires (Kerkman et al., 2016). Chez les patients atteints de vascularite associée aux ANCA, la proportion des LB spécifiques de la PR3 est trouvée également enrichis avec la maturation des LB (Cornec et al., 2017).

La fréquence des LB SSA⁺ au sein des LB naïfs et transitionnels était similaire entre les patients et sujets sains suggérant une rupture des points de contrôles au niveau périphérique seulement chez les patients SSp. D'autres études, basées sur la génération d'anticorps monoclonaux à partir de LB isolés du sang périphérique de patients, ont précédemment rapporté une rupture de la tolérance centrale, entraînant l'accumulation de LB auto-réactifs naïfs et mémoires dans le SSp (Corsiero et al., 2014), dans le SLE ainsi que dans la polyarthrite rhumatoïde (Yurasov et al., 2005) (Samuels et al., 2005). Cependant, ces études ont pu tester la polyréactivité des anticorps monoclonaux isolées de ces LB contre les antigène nucléaires (ANA⁺), regroupant plusieurs protéines y compris la RO(SSA).

En utilisant une technique de tétramères pour détecter les LB auto-réactifs dans le SLE, l'équipe de Betty Diamond a montré lors d'une première étude, une rupture de la tolérance au niveau centrale et périphérique (point de contrôle Transi/naïve) (Jacobi et al., 2009). Dans une étude publiée 10 ans plus tard, la même équipe rapporte cependant que l'augmentation des LB réactif à des antigènes nucléaires (ANA⁺) est plutôt due à une détérioration dans la différenciation générale des LB générant une expansion des plasmocytes IgG responsables de la sécrétion des autoanticorps ainsi qu'à une rupture de la tolérance spécifique des LB spécifiques d'autoantigènes.

Cette rupture de tolérance centrale reste controversée entre différentes études qui mettent une évidence une rupture de la tolérance centrale et transitionnelles dans les

maladies auto-immunes et SSp, mettant la lumière sur la complexité des maladies auto-immunes. Que ce soit une expansion générale de tous les LB chez les patients ou un échappement à la tolérance centrale/périphérique, des études plus approfondies sur notre cohorte étaient primordiales.

La deuxième étape était alors d'étudier en profondeur la distribution des LB SSA⁺ au sein de chaque compartiment, afin de comprendre la rupture de la tolérance. Rappelons que pendant la maturation, les LB auto-réactifs passent par plusieurs points de contrôles qui permettent de les éliminer et prévenir leur maturation. Nous avons suivi la maturation des LB SSA⁺ pendant les points de contrôles.

2.1 Caractérisation des LB SSA⁺ au sein des points de contrôles de la tolérance périphérique et centrale

Les LB auto-réactifs qui échappent aux points de contrôle de la tolérance centrale, s'accumulent dans le compartiment des LB transitionnels. Dans la maladie de SSp, les cellules transitionnelles sont augmentées chez les patients, ce qui suggère un dérèglement du point de contrôle central. La fréquence de LB SSA⁺ parmi les LB transitionnels ainsi que les sous-populations T1, T2 et T3 était cependant similaire entre patients et sujets sains malgré l'expansion de ce compartiment cellulaire. Ceci peut être expliqué par une expansion générale des LB indépendamment de leur auto-réactivité à la SSA. Des taux élevés de BAFF, dans des modèles murins, montrent que les LB auto-réactifs ont pu échapper à l'élimination pendant le stade T2 de développement et s'accumuler dans les follicules spléniques (Thien et al., 2004). Des niveaux significativement élevés de BAFF sont trouvés dans le sérum de patients atteints de SSp (Groom et al., 2002), suggérant un rôle de rupture de tolérance par l'expression dérégulée de BAFF dans cette maladie en permettant l'expansion des LB et empêchant ainsi leur élimination (Thien et al., 2004).

Pour étudier, cette hypothèse, nous évaluons par la suite la fréquence des LB SSA⁺ dans le compartiment des LB naïfs. Nos résultats montrent que malgré une similarité de la fréquence de SSA⁺ parmi les LB naïfs entre patients et sujets sains, les LB SSA⁺ se trouvent augmentés parmi une population naïve CD21^{low} CD11c⁻. La caractérisation de cette population reflète une diminution de l'expression d'IgM et IgD dans cette population, partageant les caractéristiques d'une population anergique comme décrit

par Isnardi (Isnardi et al., 2010). Le principe d'une cellule anergique est son incapacité à répondre à une stimulation BCR. Des études fonctionnelles pour évaluer leur niveau de calcium après stimulation, seraient utiles afin de valider l'anergie de ces cellules. L'accumulation des LB auto-réactifs CD21^{low} suggère que ces cellules semblent rester sous le contrôle de l'anergie dans le compartiment des LB naïfs. Malgré la diminution de compartiment des LB mémoires à non commutation isotypique (UnswM) dans le SSp (Bohnhorst et al., 2002), nous avons observé une expansion d'une sous population caractérisée par une diminution d'expression d'IgM membranaire chez les patients atteints de SSp, qui est enrichie en LB auto-réactifs SSA⁺. Il a été montré que les LB avec des niveaux inférieurs de IgM (IgM^{low}), caractérisées également par une diminution du CD21, sont altérées dans leur capacité à faire circuler le calcium en réponse à une stimulation anti-IgM ou anti-IgD démontrant une anergie fonctionnelle. Plus important, ces LB IgM^{low} contiennent une fréquence significativement accrue de LB auto-réactifs par rapport aux LB naïfs avec des niveaux plus élevés de IgM (Quách et al., 2011). Ceci conclut bien une association de l'auto-réactivité avec une diminution d'IgM. En effet la diminution d'IgM a été montrée comme étant un mécanisme de tolérance afin de contrôler les LB auto-réactifs par probablement une incapacité des LB IgD seuls à générer des autoanticorps et de plasmocytes à courte durée de vie *in vivo* (Noviski et al., 2018) (Noviski and Zikherman, 2018).

L'accumulation de la population CD21^{low/-} est alignée avec d'autres études qui montre l'augmentation de cette population dans le SSp (Saadoun et al., 2013). Récemment, une étude a montré une expansion monoclonale dans le compartiment des LB CD21^{low/-} chez les patients atteints de SSp. Cette expansion est corrélée avec l'apparition des lymphomes chez ces mêmes patients (Glauzy et al., 2018). Ceci pose la question de **comment ces LB CD21^{low/-} contribuent au développement du SSp ?**

Avec l'enrichissement des LB SSA⁺ dans les compartiments des LB matures à commutations isotopiques (mémoire, DN), on pourrait imaginer que ces LB CD21^{low/-} servent de réserves de LB auto-réactifs SSA⁺. Suite à une rupture de tolérance, ces LB seraient capables de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps probablement responsable de la production d'anticorps anti-SSA (Figure 30). Il serait

intéressant de suivre cette population dans une étude longitudinale chez un patients SSp.

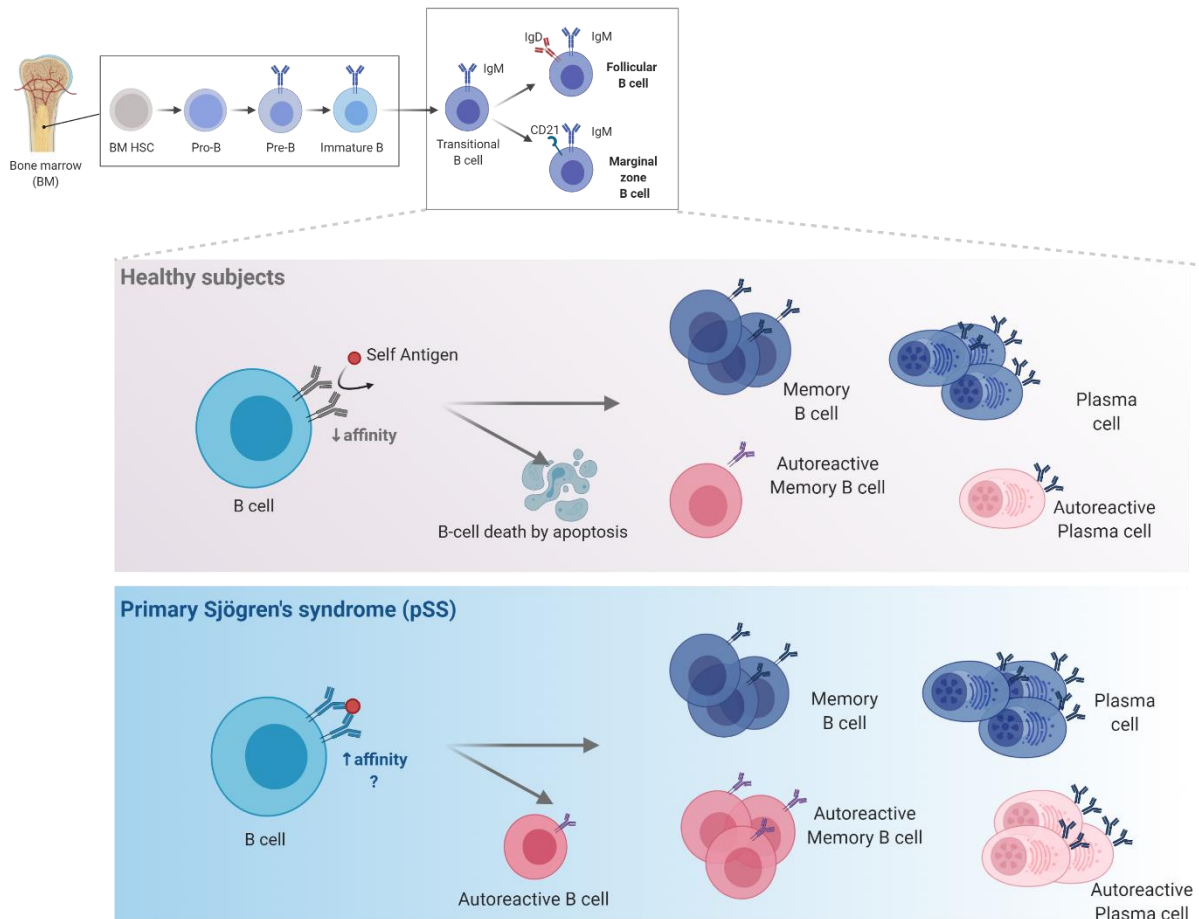


Figure 30 : Schéma proposé pour la rupture de la tolérance et accumulation des LB CD21^{low} dans le SSp.

Chez un sujet sain, les LB CD21^{low/-} anergiques sont éliminés et exclus des follicules. En conditions pathologiques, ces LB CD21^{low/-} enrichis en LB auto-réactifs servent de réserve et peuvent contribuer, suite à une rupture de la tolérance, à la production des anticorps anti-SSA ou présentation de l'autoantigènes aux LT (Figure créée sur BioRender.com).

Nous avons effectué ensuite une analyse détaillée des LB SSA⁺ au sein du compartiment des LB DN appelés auparavant LB mémoires atypiques, en raison de l'absence du marqueur des mémoires le CD27 à la surface de ces cellules. L'enrichissement des LB SSA⁺ parmi les DN2 (CD21^{low/-} CD11c⁺) et DN1 (CD21⁺ CD11c⁻), suggère que les LB SSA⁺ parviennent bien à se différencier en empruntant les deux voies (extra folliculaire ou centre germinatifs) chez les patients SSp (Jenks et al., 2018) (Sanz et al., 2019). Des études ont montré qu'une stimulation antigénique continue supporte la formation et la production des autoanticorps par l'action des T_{FH} (Baumjohann et al., 2013). Une étude sur les LB CD21^{low/-} isolés de patients atteints de maladies auto-immunes (PR, SLE ...) montre qu'ils régulent positivement les molécules de co-stimulation (CD80-CD86) et entraînent ainsi la régulation positive du CD69 sur les LT, suggérant que les LB CD21^{low/-} sont des cellules compétentes pour présenter l'antigène aux LT (Reincke et al., 2020). Il est donc possible aussi donc que les LB SSA⁺ enrichies parmi les LB CD21^{low/-} CD27⁻ soient compétentes pour présenter l'autoantigène aux LT auto-réactifs, mais cela devra être testé dans des travaux futurs.

Les LB CD21^{low/-} CD27⁻, semblent avoir un rôle dans la réponse immunitaire normale chez un sujet sain en cas d'infection (Sutton et al., 2021) (Portugal et al., 2015). Ces LB CD21^{low/-} CD27⁻ partagent ainsi le profil transcriptomique d'une population de LB activés spécifiques d'antigènes pendant une infection virale, notamment par l'expression des gènes *HLA*, des inhibiteurs de BCR *FCRL*, et le *CD19* comme décrit par Ellebedy (Ellebedy et al., 2016). Dans le lupus, ces LB CD21^{low/-} CD27⁻, regroupant les DN2 (CD27⁻CD21⁻CD11c⁺IgD⁻) et aNAV (CD27⁻CD21⁻CD11c⁺IgD⁺), sont capables de se différencier en PC par voie extra folliculaire et augmentées chez les patients atteints de Lupus (Wei et al., 2007) (Jenks et al., 2018). Ils semblent être induits dans les conditions d'une stimulation TLR7, et serait impliquée dans la physiopathologie de Lupus (Wang et al., 2018). Cette population partage également des caractéristiques avec la population ABC « age associated B cells », qui est décrite aussi comme étant des LB avec une fonction de cellules présentatrices d'antigène (Rubtsova et al., 2015). En accord avec ces résultats, nous montrons également que les LB SSA⁺ chez un sujet sain, partagent des caractéristiques sur le plan transcriptionnel avec la surexpression des gènes *HLA* et *FCLR5*. De plus, une perte d'anergie des LB dans le diabète de type 1 était également associée à des allèles de

susceptibilité trouvés dans les gènes *HLA* impliquant l'interaction des LT dans le processus (Smith et al., 2018).

Compte-tenu de toutes ces informations, l'expansion de cette population CD21^{low/-} CD27⁻ chez le SSp comme nous avons également fait l'observation ; suggère que donc ces LB CD21^{low/-} CD27⁻ dans des conditions pathologiques avec une stimulation TLR, échappent à la tolérance et deviennent des PC responsables de la sécrétion des autoanticorps (Figure 31). Dans ce sens, il a été rapporté une rupture de la tolérance par une double stimulation BCR et TLR (Leadbetter et al., 2002). En effet, il s'avère que les complexes immuns contenant de l'ARNss joue aussi un rôle aussi de ligand pour les TLR7 et TLR9, entraînant l'activation des LB auto-réactifs (Lau et al., 2005). L'accumulation des LB atypiques avec une stimulation TLR7, pose la question du **lien entre une infection virale et les maladies auto-immunes**. Dans le cas d'une infection par le virus d'Epstein bar, une stimulation du TLR7, induit la production du facteur de transcription T-box T-bet, et l'accumulation des LB CD11c⁺ CD21^{low/-}, responsable de production d'anticorps et la réponse antivirale (Rubtsova et al., 2013). Ainsi, une voie de différenciation de ces LB qui a évolué pour promouvoir l'immunité contre les virus peut également contribuer à l'auto-immunité. Une étude plus étendue serait nécessaire dans le SSp pour étudier le lien entre une infection virale et l'apparition de cette population.

Dans des modèles murins précliniques, des études suggèrent que la majorité des LB avec une spécificité autoréactive proviennent de LB CD11c⁺ T-bet⁺ (Lau et al., 2017). L'ensemble de nos résultats suggèrent que la majorité des LB avec une auto-réactivité contre le SSA proviennent de LB CD11c⁻CD21^{low/-} (naïfs et DN3) et CD11c⁺CD21^{low/-} (DN2) impliquant une différenciation extra folliculaire et post centre germinal. Ainsi, des événements environnementaux tels qu'une infection virale, peuvent en perturbant l'anergie des LB, entraîner les individus vers l'auto-immunité, principalement lorsque le terrain génétique est favorable comme des facteurs de risque génétiques, tels que les allèles HLA.

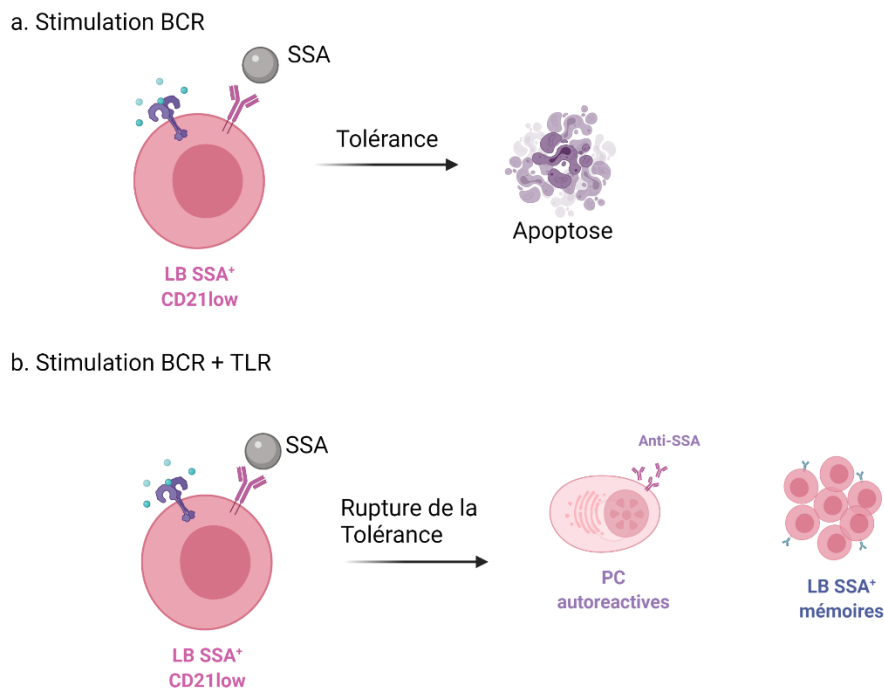


Figure 31 : rupture de la tolérance des LB CD21^{low} dans le SSp.

Nous émettons l'hypothèse que la reconnaissance combinée des autoantigènes par les BCR et les TLR, peut aider à l'échappement de la tolérance dans les LB autoréactifs CD21^{low/-} (Figure créée sur BioRender.com).

Une autre hypothèse est que le passage de ces LB SSA⁺ du compartiment anergique CD21^{low/-} à un compartiment des LB activé CD21^{low/-} n'est pas le fruit d'une perte d'anergie mais d'une acquisition d'auto-réactivité pendant la maturation cellulaire. Des études ont suggéré l'acquisition de l'auto-réactivité dans le SSp avec la mutation somatique au sein du centre germinatif. Une analyse des anticorps monoclonaux obtenus à partir des LB mémoires IgG⁺ isolées des patients avec SSp, montre une acquisition de l'auto-réactivité de ces anticorps après avoir subi une mutation somatique (Takeshita et al., 2020).

Ces résultats ouvrent la porte à plusieurs études nécessaires pour étudier ces hypothèses notamment avec des analyses fonctionnelles sur des patients atteints de SSp. Une étude de la signalisation intracellulaire par phospho-FACS ou par mesure de flux calcique, serait nécessaire pour étudier la réponse BCR des LB SSA⁺ suite à une stimulation par l'antigène. Il faudrait également étudier aussi la différenciation du sous population CD21^{low/-} et valider l'hypothèse que suite à une double stimulation TLR et BCR, ces LB seront capables de répondre et peut être se différencier chez les patients SSp.

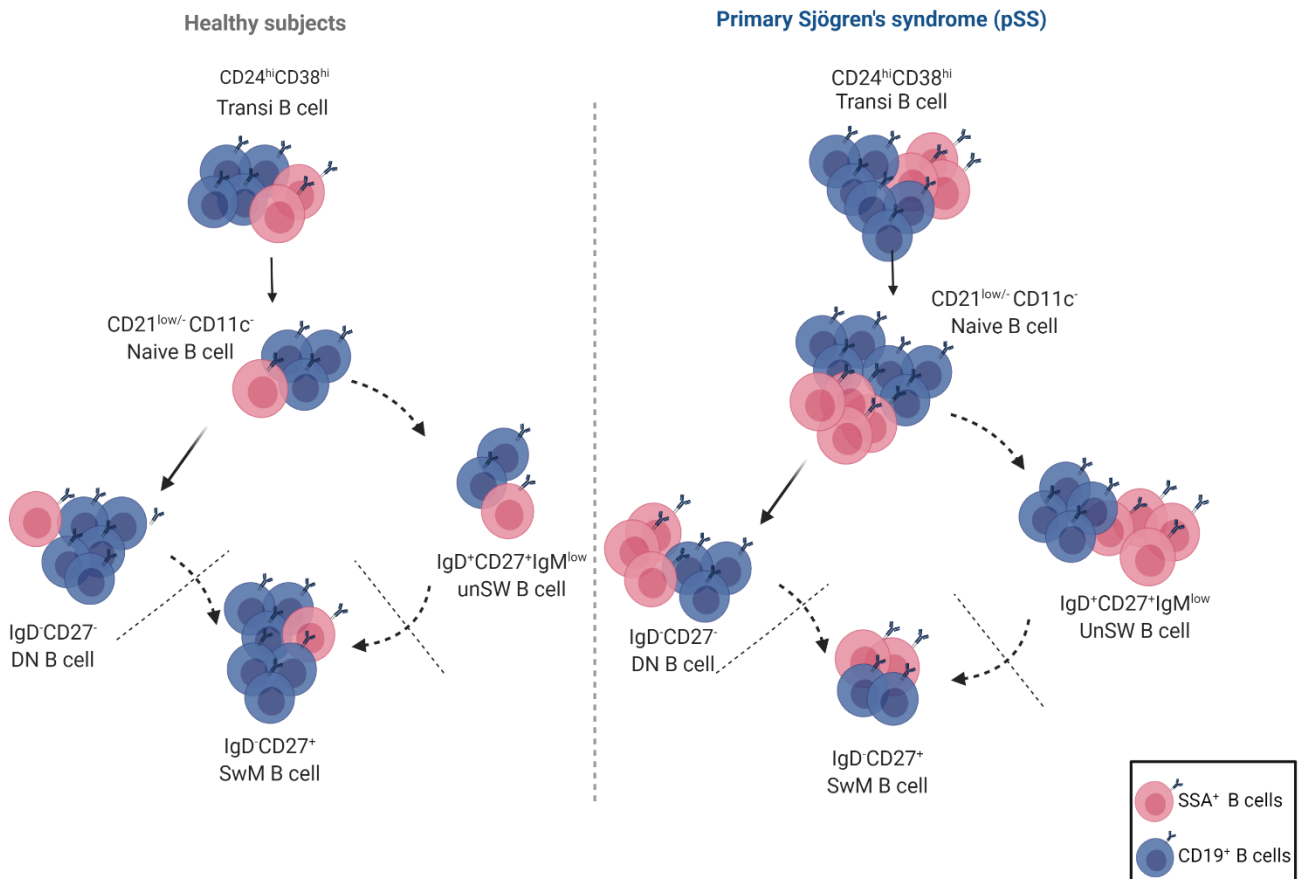


Figure 32 : Représentation schématique de l'étude phénotypique des LB SSA⁺ dans le SSp (Figure créée sur BioRender.com).

3- Répertoire des LB SSA⁺

Afin de comprendre les caractéristiques du répertoire des LB SSA⁺, des clones de LB spécifiques de la SSA ont été générés et le séquençage de leur BCR a été ensuite effectué lors de ma mobilité à Leiden. Le nombre de clones étant très limité avec une qualité de séquençage faible (informations manquantes pour la plupart des clones), il est difficile d'interpréter ces résultats. Une analyse VDJ sur un grand nombre de cellules était prévue dans la partie scRNAseq et les résultats aurait pu nous apporter plus d'informations. Les analyses sont cependant en cours.

Il est tout de même important de remarquer par rapport à ces résultats préliminaires, qu'il n'y a pas d'anomalies majeures dans le répertoire des gènes Ig des LB SSA⁺ circulants chez les patients atteints de SSp comme cela a été rapporté précédemment dans le SSp (Corsiero et al., 2014).

4- Analyse transcriptionnelle des LB réactifs à la SSA

L'identification de biomarqueurs du SSp à partir des LB spécifiques de la SSA serait informative pour faire progresser notre compréhension de la maladie. Dans cette étude préliminaire, nous avons utilisé le scRNAseq pour étudier la diversité des populations de LB SSA⁺ chez un sujet sain.

- **Les limites de scRNAseq avec le système 10X Genomics Chromium**

Le système 10X Genomics Chromium est aujourd'hui la méthode la plus rentable et la plus rapide disponible. L'émergence de la technologie du RNA-Seq unicellulaire (scRNA-Seq) vient surmonter les limites du RNA-Seq qui est basé sur l'expression moyenne d'une population, en étudiant le profil d'expression au niveau cellulaire et nous permettre finalement d'explorer l'hétérogénéité au sein d'une population unique. Cependant, des défis et limites analytiques restent présents avec cette technologie. La 1^{ere} limite du scRNAseq est que les populations de cellules rares peuvent ne pas être correctement représentées si un nombre insuffisant de cellules est analysé (See et al., 2018) comme c'était notre cas, avec seulement 800 cellules qui ont pu passer le contrôle qualité pour l'analyse. Une inclusion d'un nombre plus important de cellules aurait pu être plus bénéfique.

Pour bien analyser les données, il faut aussi prendre conscience des biais qui peuvent affecter l'analyse en aval (Buettner et al., 2015). Ainsi pour éviter les artefacts dans l'analyse des données scRNA-seq, les cellules de faible qualité d'ARNm/UMI doivent être retirées (Ilicic et al., 2016). Il est recommandé de supprimer les cellules avec un nombre de UMI <100, afin d'éviter les UMI erronées générées lors de l'amplification (Poirion et al., 2016) (Zeisel et al., 2015). Prenons l'exemple aussi de contamination par des ARNm provenant des cellules apoptotiques qui se caractérise par l'expression des gènes mitochondriaux. Ces gènes non éliminés peuvent dominer l'expression des gènes d'intérêts et masquer l'information dans notre analyse (J. S. Lee et al., 2020). Notons aussi que l'utilisation des cellules décongelées dans notre étude a pu avoir un impact sur l'augmentation des cellules apoptotiques. Une étape d'élimination des cellules mortes aurait pu être faite avec le kit « Dead Cell Removal Kit » de Milteny, pour augmenter la viabilité des cellules. Cependant, cela aurait pu avoir une conséquence sur la quantité cellulaire également. La cryoconservation semble augmenter aussi l'expression des gènes associés aux protéines de choc thermique

telles que les gènes de *HSPB1*, *HSPB12*, *HSPB11*, *HSPBAP1*, *HSPA1A*, *HSPA8*, comme ça été trouvé dans d'autres études (J. S. Lee et al., 2020). Dans la recherche translationnelle avec des cohortes des sujets humains, le processus de cryoconservation et de décongélation est parfois inévitable.

L'attribution des types cellulaires connus est primordiale dans une analyse scRNA seq, car connaître la composition des types cellulaires dans un échantillon aide à comprendre son hétérogénéité par la suite. De plus en plus fréquemment, d'algorithmes sont conçus pour permettre l'identification claire des sous populations avec des méthodes « semi-supervisées ». On nomme par exemple le package scSorter, en se basant sur des gènes de marqueurs connus, qui permet d'attribuer des cellules à des types cellulaires connus (Guo and Li, 2021). Simplement ces algorithmes sont conçus pour annoter des populations très différentes (PBMC) avec des marqueurs très distincts comme ça été montré avec des études sur des PBMCs (Martin et al., 2019) ou à partir d'une suspension cellulaire issue d'un tissu (Lantz et al., 2020) (Zywitzka et al., 2018). L'annotation reste plus compliquée au sein d'une population unique comme des LB, bien que des bases de données/algorithmes émergent ces derniers temps pour permettre de les identifier, comme BcellNet (Lu et al., 2018b) ou singleR (Ramesh et al., 2020) deux packages utilisés dans des études pour annoter les LB. Une utilisation d'un de ces algorithmes est à faire pour les prochaines études.

Nous pouvons également définir les ensembles de gènes qui discriminent le mieux les différents groupes, à l'aide de marqueurs de surface cellulaire. Cependant, une autre limite de scRNA seq est aussi l'absence de détection de certains gènes marqueurs de types cellulaires connus comme c'était le cas dans notre jeu de donnée avec l'absence d'expression du CD27, marqueur des LB mémoires (Klein et al., 1998), le facteur de transcription marqueur des PB 'BLIMP-1', codé par le gène *PRDM1* (Shaffer et al., 2002), ou encore XBP1, un facteur de transcription essentiel pour la différenciation terminale des LB (Reimold et al., 2001). Ceci a été discuté dans un article comparant le système de 10X chromium avec le système de Smart-seq2, où chaque cellule est séparée dans des plaques de microtitration (X. Wang et al., 2021). Les résultats montrent que le système Smart-seq2 avait de meilleures performances dans la détection de gènes à faibles niveaux d'expression. Cependant son coût reste très

élevé et le nombre de cellules étudiées reste très faible par rapport au 10X chromium qui permet de détecter des cellules rares par sa capacité à couvrir un grand nombre de cellules. Pour surmonter les faibles niveaux d'expression de l'ARNm, nous pourrions pour d'autres études utiliser le système de codage à barres appelé CITEseq.

Pour la première analyse, nous avons choisi d'utiliser le package SEURAT sur R qui permet d'explorer les données, effectuer les contrôles qualités et effectuer les DEG. Nos analyses ont révélé des groupes de LB qui ne répondent pas aux phénotypes principaux des sous-populations connues (transitionnels, mémoires, PB...), suggérant un degré encore élevé d'hétérogénéité à explorer. Une analyse « pseudo-time », aurait pu être plus bénéfique pour pouvoir identifier le stade de maturation des cellules. En effet, la construction d'un chemin pseudo-temporel des cellules permet de les ordonner en fonction de la transition progressive de leurs transcriptomes, nous permettant ainsi d'étudier la dynamique d'expression génique dans une population cellulaire hétérogène (Ji and Ji, 2016) (Campbell and Yau, 2018). Ceci devrait être inclus dans une deuxième analyse des données.

L'idée de cette partie de projet était de répondre à ces questions :

Est-ce que les LB SSA⁺ sont différents par rapport aux LB totaux ? À l'échelle unicellulaire, ces LB auto-réactifs SSA⁺ sont-ils tous homogènes ?

Nous avons rapporté les premiers résultats de comparaison entre les LB SSA⁺ et SSA⁻ chez un sujet sain. Ces résultats montrent en premier lieu que nous avons un profil transcriptomique différent dans les LB SSA⁺ par rapport aux LB totaux, avec des gènes principalement associés à la présentation de l'antigène et à la régulation négative du récepteur d'antigène. La question est : quel rôle jouent les LB auto-réactifs dans la physiologie au travers de la présentation d'antigène ?

Alors que les théories de sélection clonale affirmaient que « le système immunitaire était spécifique des antigènes environnementaux et incapable de reconnaître les antigènes du soi ; lorsqu'une telle tolérance aux antigènes du soi est rompue, un état pathologique se développe », la découverte des LB auto-réactifs et les anticorps auto-réactifs, dits naturels chez des sujets sains, vient rajouter un degré de complexité à cette théorie. On estime qu'environ 20% des LB du sang adulte sont polyréactifs et sont largement distribués dans les ganglions lymphatiques (Tiller et al., 2007b).

Les autoanticorps naturels sont principalement polyréactifs avec de faibles affinités à l'autoantigène mais de larges spécificités (Shoenfeld and Toubi, 2005). De nombreux rôles physiologiques ont été attribués à ces anticorps naturels, notamment la maintenance de l'homéostasie tissulaire, l'élimination des cellules apoptotiques, le masquage des néo-autoantigènes, et la liaison à des déterminants idiotypiques sur les IgG autoréactives (Avrameas and Selmi, 2013). Il a été montré qu'une carence en anticorps IgM naturels pourrait être le facteur prédisposant au SLE, suggérant leur rôle protecteur dans les maladies auto-immunes (Boes et al., 2000). Ces LB auto-réactifs naturels auraient également comme rôle, la présentation des antigènes aux LT pour maintenir la tolérance (Zhong et al., 1997) (Wang et al., 2001).

Des conditions homéostatiques ainsi qu'une régulation du BCR par les corécepteurs (CD19/CD21) ou les récepteurs inhibiteurs (CD72) sont nécessaires à la prévention des maladies auto-immunes (S. Lee et al., 2020). Ainsi une augmentation de l'expression du récepteur inhibiteur CD72 dans les LB SSA⁺ dans le groupe 3 suggère qu'en physiologie, ces LB auto-réactifs naturels sont sous le contrôle de la tolérance et qu'une expression de CD72 permet de jouer son rôle d'inhibiteur négatif.

On pourrait imaginer que les LB SSA⁺ chez les patients SSp, auraient une diminution de l'expression du CD72, ce qui par conséquence conduirait à une rupture de la tolérance. Néanmoins, une expression plus importante de CD72 a été retrouvée dans les LB de patients atteints de SSp (Shen et al., 2020). Rappelons que le CD72 joue également un rôle de régulateur positif, il a d'ailleurs montré que son interaction avec son ligand CD100 (exprimé sur les LT, les LB et les cellules présentatrices d'antigène) induit la déphosphorylation de la tyrosine du CD72 et conduit à la dissociation entre SHP-1 et CD72, exerçant ainsi un effet co-stimulateur (Ishida et al., 2003) (Hokazono et al., 2003). Ainsi les voies ERK1/2 (signalisation positive via le BCR) et JNK1/2 indépendante de BCR, sont libérées (Wu et al., 2001). On pourrait imaginer que dans les LB SSA⁺ anergiques dans le SSp, il y aurait une liaison entre l'autoantigène SSA et CD100, qui empêcherait la signalisation négative par le biais de CD72 et permettrait leur survie et activation (Figure 33). Cette théorie est soutenue par l'augmentation du niveau de CD100 soluble dans le plasma des patients atteints de SSp (Kang et al., 2020).

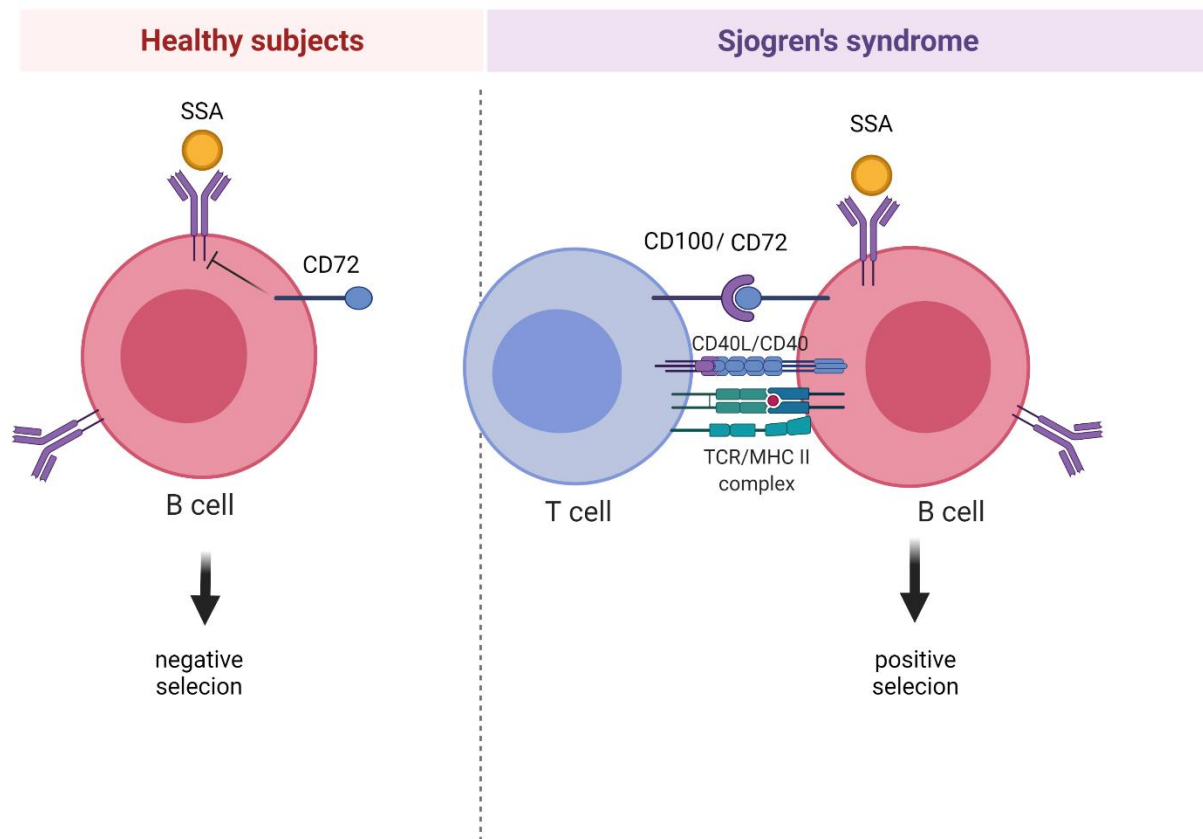


Figure 33 : Hypothèse d'activation des LB réactifs à la SSA dans le SSp avec une augmentation de l'expression de CD72 (Figure créée sur BioRender.com).

Il convient de noter qu'une comparaison de ces LB SSA⁺ avec des cellules allo réactives ou d'autre LB spécifiques d'un autre antigène aurait pu être plus juste qu'une comparaison avec des LB totaux. Des validations avec des tests protéiques seront nécessaires pour valider ces résultats par rapport aux gènes trouvés augmentés dans les LB SSA⁺.

Nous avons pu lancer tout récemment une analyse comparative des LB SSA⁺ entre patients et sujets sains. Nous avons trié les LB SSA⁺ sur un total de 5 patients et 3 sujets sains, et généré les bibliothèques pour une analyse du transcriptome unicellulaire et du répertoire VDJ. Les résultats de cette expérience nous permettront de mieux étudier la différence des LB SSA⁺ entre pathologie et physiologie.

CONCLUSION GENERALE

Ce projet de thèse avait pour particularité d'être un des premiers ayant pour but d'étudier les LB spécifiques de la SSA dans le SSp. Afin de parvenir à cet objectif, nous avons développé trois grands axes expérimentaux :

- Une étude phénotypique des LB SSA⁺ en physiologie et chez des patients SSp
- Une étude fonctionnelle des LB SSA⁺ explorant la sécrétion des anticorps anti-SSA sur cellules isolées.
- Une analyse transcriptomique préliminaire des LB SSA⁺ chez un sujet sain.

Ce travail a permis, tout d'abord, de valider la méthode de détection des LB SSA⁺ parmi les LB circulants. Les LB SSA⁺ sont retrouvés enrichis au cours de la maturation des LB chez les patients SSp. Ces LB SSA⁺ étaient capables de produire des anticorps d'isotype IgG seulement chez les patients SSp, confirmant que chez un sujet sain les LB SSA⁺ restent sous le contrôle de la tolérance. L'analyse transcriptomique effectuée, chez un sujet sain montrait une augmentation de l'expression des gènes HLA essentiels à la présentation de l'antigène aux LT dans les LB SSA⁺. De façon intéressante, nous observons un enrichissement des LB SSA⁺ parmi les LB CD21^{low/-}. Cette population augmentée dans le SSp et décrite comme des cellules présentatrices d'antigène.

Nous émettons l'hypothèse que ces LB CD21^{low/-} auto-réactifs seront capables de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps chez les patients SSp. Des preuves de l'implication de la voie TLR ont déjà été montrées dans le SSp. Une étude récente montre l'implication de la signalisation TLR7 dans le développement du syndrome de Sjogren dans un modèle murin (Y. Wang et al., 2021).

Le lien entre les LB CD21^{low/-}, la rupture de la tolérance ainsi que la présentation d'antigène permet d'envisager différentes pistes de recherche afin d'étudier ces LB auto-réactifs SSA⁺CD21^{low/-} dans le SSp. La détection d'une augmentation de cette population pourrait être envisagée comme critère diagnostique chez les patients SSp.

Dans l'ensemble, cette étude en se basant sur des analyses phénotypiques, du tri cellulaire ainsi que la puissance de l'approche transcriptomique, permet d'avoir un meilleur aperçu des caractéristiques des LB SSA+ en physiologie et chez les patients SSp. Des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer les marqueurs et la signature moléculaire de ces LB spécifiques de la SSA, permettant ainsi un diagnostic plus précis des patients et la découverte des nouvelles cibles thérapeutiques.

RÉFÉRENCES:

- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R., 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6834–6840. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6834>
- Allman, D., Pillai, S., 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol., Lymphocyte Development - Edited by Klaus Rajewsky and Harald von Boehmer / Tumour Immunology - Edited by Haruo Sugiyama* 20, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.014>
- Amft, N., Curnow, S.J., Scheel-Toellner, D., Devadas, A., Oates, J., Crocker, J., Hamburger, J., Ainsworth, J., Mathews, J., Salmon, M., Bowman, S.J., Buckley, C.D., 2001. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 44, 2633–2641. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200111\)44:11<2633::aid-art443>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200111)44:11<2633::aid-art443>3.0.co;2-9)
- Arbonés, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Rotech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., Teddert, T.F., 1994. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1, 247–260. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90076-0)
- Avrameas, S., Selmi, C., 2013. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *J. Autoimmun., Special Issue: Epigenetics: The Host and the immune response in autoimmunity* 41, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.01.006>
- Baer, A.N., McAdams DeMarco, M., Shiboski, S.C., Lam, M.Y., Challacombe, S., Daniels, T.E., Dong, Y., Greenspan, J.S., Kirkham, B.W., Lanfranchi, H.E., Schjødt, M., Srinivasan, M., Umehara, H., Vivino, F.B., Vollenweider, C.F., Zhao, Y., Criswell, L.A., Shiboski, C.H., Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA) Research Groups, 2015. The SSB-positive/SSA-negative antibody profile is not associated with key phenotypic features of Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1557–1561. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206683>
- Barone, F., Bombardieri, M., Rosado, M.M., Morgan, P.R., Challacombe, S.J., De Vita, S., Carsetti, R., Spencer, J., Valesini, G., Pitzalis, C., 2008. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 5130–5140. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.5130>
- Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W., 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00675-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00675-x)
- Batten, M., Fletcher, C., Ng, L.G., Groom, J., Wheway, J., Laâbi, Y., Xin, X., Schneider, P., Tschopp, J., Mackay, C.R., Mackay, F., 2004. TNF Deficiency Fails to Protect BAFF Transgenic Mice against Autoimmunity and Reveals a Predisposition to B Cell Lymphoma. *J. Immunol.* 172, 812–822. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.812>
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2013. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* 38, 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.020>
- Båve, U., Nordmark, G., Lövgren, T., Rönnelid, J., Cajander, S., Eloranta, M.-L., Alm, G.V., Rönnblom, L., 2005. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum.* 52, 1185–1195. <https://doi.org/10.1002/art.20998>
- Bemark, M., 2015. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J. Biomed. Res.* 29, 264–284. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20150035>

- Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., Wardemann, H., 2011. The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *J. Clin. Invest.* 121, 1946–1955. <https://doi.org/10.1172/JCI44447>
- Berkowska, M.A., Driessen, G.J.A., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., van der Burg, M., van Dongen, J.J.M., van Zelm, M.C., 2011. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118, 2150–2158. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-345579>
- Binard, A., Pottier, L.L., Devauchelle-Pensec, V., Saraux, A., Youinou, P., Pers, J.-O., 2009. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1447–1452. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.096172>
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 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, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., Chen, J., 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1184–1189. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1184>
- Bohnhorst, J.Ø., Bjørgan, M.B., Thoen, J.E., Jonsson, R., Natvig, J.B., Thompson, K.M., 2002. Abnormal B cell differentiation in primary Sjögren’s syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with Serum IgG concentration. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 103, 79–88. <https://doi.org/10.1006/clim.2002.5199>
- Bohnhorst, J.Ø., Bjørgan, M.B., Thoen, J.E., Natvig, J.B., Thompson, K.M., 2001. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome. *J. Immunol.* 167, 3610–3618. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3610>
- Boonyaratanakornkit, J., Taylor, J.J., 2019. Techniques to Study Antigen-Specific B Cell Responses. *Front. Immunol.* 10, 1694. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01694>
- Buettner, F., Natarajan, K.N., Casale, F.P., Proserpio, V., Scialdone, A., Theis, F.J., Teichmann, S.A., Marioni, J.C., Stegle, O., 2015. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 155–160. <https://doi.org/10.1038/nbt.3102>
- Burnet, F.M., 1976. A modification of Jerne’s theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA. Cancer J. Clin.* 26, 119–121. <https://doi.org/10.3322/canjclin.26.2.119>
- Burnet, S.F.M., 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt University Press Nashville.
- Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., Satija, R., 2018. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* 36, 411–420. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>
- Campbell, K.R., Yau, C., 2018. Uncovering pseudotemporal trajectories with covariates from single cell and bulk expression data. *Nat. Commun.* 9, 2442. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04696-6>
- Campos, J., Hillen, M.R., Barone, F., 2016. Salivary Gland Pathology in Sjögren’s Syndrome. *Rheum. Dis. Clin. N. Am., Sjogren’s Disease* 42, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2016.03.006>
- Candando, K.M., Lykken, J.M., Tedder, T.F., 2014. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.* 259, 259–272. <https://doi.org/10.1111/imr.12176>
- Cariappa, A., Tang, M., Parnig, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., Pillai, S., 2001. The Follicular versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision Is Regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603–615. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00135-2)

- Cashman, K.S., Jenks, S.A., Woodruff, M.C., Tomar, D., Tipton, C.M., Scharer, C.D., Eun-Hyung Lee, F., Boss, J.M., Sanz, I., 2019. Understanding and measuring human B-cell tolerance and its breakdown in autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 292, 76–89.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2001. Antigen receptor structure and signaling pathways. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed.
- Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., Ma'ayan, A., 2013. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>
- Chen, Y., Zheng, J., Huang, Q., Deng, F., Huang, R., Zhao, W., Yin, J., Song, L., Chen, J., Gao, X., Liu, Z., Petersen, F., Yu, X., 2016. Autoantibodies against the Second Extracellular Loop of M3R Do neither Induce nor Indicate Primary Sjögren's Syndrome. *PLoS One* 11, e0149485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149485>
- Choi, S.K., Kim, M.J., You, J.S., 2020. SMARCB1 Acts as a Quiescent Gatekeeper for Cell Cycle and Immune Response in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3969. <https://doi.org/10.3390/ijms21113969>
- Christensen, S.R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Akira, S., Shlomchik, M.J., 2005. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J. Exp. Med.* 202, 321–331. <https://doi.org/10.1084/jem.20050338>
- Chu, V.T., Berek, C., 2013. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol. Rev.* 251, 177–188. <https://doi.org/10.1111/imr.12011>
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M., 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- Cornec, D., Berti, A., Hummel, A., Peikert, T., Pers, J.-O., Specks, U., 2017. Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J. Autoimmun.* 84, 122–131.
- Cornec, D., Chiche, L., 2015. Is primary Sjögren's syndrome an orphan disease? A critical appraisal of prevalence studies in Europe. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e25–e25. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206860>
- Cornec, D., Saraux, A., Pers, J.-O., Jousse-Joulin, S., Marhadour, T., Roguedas-Contios, A.-M., Genestet, S., Renaudineau, Y., Devauchelle-Pensec, V., 2014. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 16, R15. <https://doi.org/10.1186/ar4442>
- Corsiero, E., Sutcliffe, N., Pitzalis, C., Bombardieri, M., 2014. Accumulation of Self-Reactive Naïve and Memory B Cell Reveals Sequential Defects in B Cell Tolerance Checkpoints in Sjögren's Syndrome. *PLOS ONE* 9, e114575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114575>
- Cruz-Tapias, P., Rojas-Villarraga, A., Maier-Moore, S., Anaya, J.-M., 2012. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun. Rev.* 11, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.10.002>
- Cyster, J.G., Hartley, S.B., Goodnow, C.C., 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371, 389–395. <https://doi.org/10.1038/371389a0>
- d'Arbonne, F., Pers, J.-O., Devauchelle, V., Pennec, Y., Saraux, A., Youinou, P., 2006. BAFF-induced changes in B cell antigen receptor-containing lipid rafts in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.* 54, 115–126.
- Daridon, C., Devauchelle, V., Hutin, P., Le Berre, R., Martins-Carvalho, C., Bendaoud, B., Dueymes, M., Saraux, A., Youinou, P., Pers, J.-O., 2007a. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 56, 1134–1144. <https://doi.org/10.1002/art.22458>
- Daridon, C., Guerrier, T., Devauchelle, V., Saraux, A., Pers, J.-O., Youinou, P., 2007b. Polarization of B effector cells in Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.* 6, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.01.010>

- Daridon, C., Pers, J.-O., Devauchelle, V., Martins-Carvalho, C., Hutin, P., Pennec, Y.-L., Saraux, A., Youinou, P., 2006. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 54, 2280–2288. <https://doi.org/10.1002/art.21936>
- Denman, A.M., Frenkel, E.P., 1968. Mode of action of anti-lymphocyte globulin. II. Changes in the lymphoid cell population in rats treated with anti-lymphocyte globulin. *Immunology* 14, 115–126.
- Dominguez, C.X., Amezquita, R.A., Guan, T., Marshall, H.D., Joshi, N.S., Kleinstein, S.H., Kaech, S.M., 2015. The transcription factors ZEB2 and T-bet cooperate to program cytotoxic T cell terminal differentiation in response to LCMV viral infection. *J. Exp. Med.* 212, 2041–2056. <https://doi.org/10.1084/jem.20150186>
- Dörner, T., Posch, M.G., Li, Y., Petricoul, O., Cabanski, M., Milojevic, J.M., Kamphausen, E., Valentin, M.-A., Simonett, C., Mooney, L., Hüser, A., Gram, H., Wagner, F.D., Oliver, S.J., 2019. Treatment of primary Sjögren's syndrome with ivalumab (VAY736) targeting B cells by BAFF receptor blockade coupled with enhanced, antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 641–647. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214720>
- Duty, J.A., Szodoray, P., Zheng, N.-Y., Koelsch, K.A., Zhang, Q., Swiatkowski, M., Mathias, M., Garman, L., Helms, C., Nakken, B., Smith, K., Farris, A.D., Wilson, P.C., 2009. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 206, 139–151. <https://doi.org/10.1084/jem.20080611>
- Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., Cyster, J.G., 2004. Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 4700–4708. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4700>
- Ellebedy, A.H., Jackson, K.J.L., Kissick, H.T., Nakaya, H.I., Davis, C.W., Roskin, K.M., McElroy, A.K., Oshansky, C.M., Elbein, R., Thomas, S., Lyon, G.M., Spiropoulou, C.F., Mehta, A.K., Thomas, P.G., Boyd, S.D., Ahmed, R., 2016. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat. Immunol.* 17, 1226–1234. <https://doi.org/10.1038/ni.3533>
- Emamian, E.S., Leon, J.M., Lessard, C.J., Grandits, M., Baechler, E.C., Gaffney, P.M., Segal, B., Rhodus, N.L., Moser, K.L., 2009. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 10, 285–296. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.20>
- Eris, J.M., Basten, A., Brink, R., Doherty, K., Kehry, M.R., Hodgkin, P.D., 1994. Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4392–4396. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4392>
- Espéli, M., Bashford-Rogers, R., Sowerby, J.M., Alouche, N., Wong, L., Denton, A.E., Linterman, M.A., Smith, K.G.C., 2019. FcγRIIb differentially regulates pre-immune and germinal center B cell tolerance in mouse and human. *Nat. Commun.* 10, 1970. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09434-0>
- Fecteau, J.F., Côté, G., Néron, S., 2006. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3728–3736. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3728>
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–950. <https://doi.org/10.1038/ni833>
- Fischer, M.B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A.P., Goodnow, C.C., Kelsoe, G., Carroll, M.C., 1998. Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* 280, 582–585. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.582>
- Fisher, B.A., Szanto, A., Ng, W.-F., Bombardieri, M., Posch, M.G., Papas, A.S., Farag, A.M., Daikeler, T., Bannert, B., Kyburz, D., Kivitz, A.J., Carsons, S.E., Isenberg, D.A., Barone, F., Bowman, S.J., Espié, P., Floch, D., Dupuy, C., Ren, X., Faerber, P.M., Wright, A.M., Hockey, H.-U., Rotte, M.,

- Milojevic, J., Avrameas, A., Valentin, M.-A., Rush, J.S., Gergely, P., 2020. Assessment of the anti-CD40 antibody iscalimab in patients with primary Sjögren's syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Lancet Rheumatol.* 2, e142–e152. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(19\)30135-3](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(19)30135-3)
- Fleck, M., Kern, E.R., Zhou, T., Lang, B., Mountz, J.D., 1998. Murine cytomegalovirus induces a Sjögren's syndrome-like disease in C57Bl/6-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 41, 2175–2184. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199812\)41:12<2175::AID-ART12>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199812)41:12<2175::AID-ART12>3.0.CO;2-I)
- Fogel, O., Rivière, E., Seror, R., Nocturne, G., Boudaoud, S., Ly, B., Gottenberg, J.-E., Le Guern, V., Dubost, J.-J., Nititham, J., Taylor, K.E., Chanson, P., Dieudé, P., Criswell, L.A., Jagla, B., Thai, A., Mingueneau, M., Mariette, X., Miceli-Richard, C., 2018. Role of the IL-12/IL-35 balance in patients with Sjögren syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 258-268.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.041>
- Gao, Y., Chen, Y., Zhang, Z., Yu, X., Zheng, J., 2020. Recent Advances in Mouse Models of Sjögren's Syndrome. *Front. Immunol.* 11, 1158. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01158>
- Garimalla, S., Nguyen, D.C., Halliley, J.L., Tipton, C., Rosenberg, A.F., Fucile, C.F., Saney, C.L., Kyu, S., Kaminski, D., Qian, Y., Scheuermann, R.H., Gibson, G., Sanz, I., Lee, F.E.-H., 2019. Differential transcriptome and development of human peripheral plasma cell subsets. *JCI Insight* 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126732>
- Gestermann, N., Mekinian, A., Comets, E., Loiseau, P., Puechal, X., Hachulla, E., Gottenberg, J.-E., Mariette, X., Miceli-Richard, C., 2010. STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjögren's syndrome and could be involved in type 1 interferon pathway signaling. *Genes Immun.* 11, 432–438. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.29>
- Glauzy, S., Boccitto, M., Bannock, J.M., Delmotte, F.R., Saadoun, D., Cacoub, P., Ice, J.A., Sivils, K.L., James, J.A., Wolin, S.L., Meffre, E., 2018. Accumulation of Antigen-Driven Lymphoproliferations in Complement Receptor 2/CD21–/low B Cells From Patients With Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 70, 298–307. <https://doi.org/10.1002/art.40352>
- Gloury, R., Zotos, D., Zuidschewoude, M., Masson, F., Liao, Y., Hasbold, J., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Belz, G.T., Shi, W., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., Kallies, A., 2016. Dynamic changes in Id3 and E-protein activity orchestrate germinal center and plasma cell development. *J. Exp. Med.* 213, 1095–1111. <https://doi.org/10.1084/jem.20152003>
- Glynne, R., Akkaraju, S., Healy, J.I., Rayner, J., Goodnow, C.C., Mack, D.H., 2000. How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B-cell mitogenesis. *Nature* 403, 672–676. <https://doi.org/10.1038/35001102>
- Gong, S., Nussenzweig, M.C., 1996. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 272, 411–414. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.411>
- Gong, Y.-Z., Nititham, J., Taylor, K., Miceli-Richard, C., Sordet, C., Wachsmann, D., Bahram, S., Georgel, P., Criswell, L.A., Sibilia, J., Mariette, X., Alsaleh, G., Gottenberg, J.-E., 2014. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 51, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.11.003>
- Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., Labetoulle, M., Ardizzone, M., Sibilia, J., Fournier, C., Chiochia, G., Mariette, X., 2006. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2770–2775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510837103>
- Goules, A., Tzioufas, A.G., Manousakis, M.N., Kirou, K.A., Crow, M.K., Routsias, J.G., 2006. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 26, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.02.002>
- Groom, J., Kalled, S.L., Cutler, A.H., Olson, C., Woodcock, S.A., Schneider, P., Tschopp, J., Cachero, T.G., Batten, M., Wheway, J., Mauri, D., Cavill, D., Gordon, T.P., Mackay, C.R., Mackay, F., 2002. Association of BAFF/BLYS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 109, 59–68. <https://doi.org/10.1172/JCI14121>

- Gross, J.A., Dillon, S.R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K.P., Haugen, H., McMillen, S., Waggle, K., Schreckhise, R.W., Shoemaker, K., Vu, T., Moore, M., Grossman, A., Clegg, C.H., 2001. TACI-Ig Neutralizes Molecules Critical for B Cell Development and Autoimmune Disease: Impaired B Cell Maturation in Mice Lacking BlyS. *Immunity* 15, 289–302. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00183-2)
- Guo, H., Li, J., 2021. scSorter: assigning cells to known cell types according to marker genes. *Genome Biol.* 22, 69. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02281-7>
- Gururajan, M., Sindhava, V.J., Bondada, S., 2014. B cell tolerance in health and disease. *Antibodies* 3, 116–129.
- Halverson, R., Torres, R.M., Pelanda, R., 2004. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* 5, 645–650.
- Hansen, A., Gosemann, M., Pruss, A., Reiter, K., Ruzickova, S., Lipsky, P.E., Dörner, T., 2004. Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* 50, 1897–1908. <https://doi.org/10.1002/art.20276>
- Hansen, A., Odendahl, M., Reiter, K., Jacobi, A.M., Feist, E., Scholze, J., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Dörner, T., 2002. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* 46, 2160–2171. <https://doi.org/10.1002/art.10445>
- Healy, J.I., Goodnow, C.C., 1998. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 645–670. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.645>
- Hertz, M., Nemazee, D., 1997. BCR ligation induces receptor editing in IgM+ IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 6, 429–436.
- Hervé, M., Isnardi, I., Ng, Y., Bussell, J.B., Ochs, H.D., Cunningham-Rundles, C., Meffre, E., 2007. CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *J. Exp. Med.* 204, 1583–1593. <https://doi.org/10.1084/jem.20062287>
- Hippen, K.L., Schram, B.R., Tze, L.E., Pape, K.A., Jenkins, M.K., Behrens, T.W., 2005. In Vivo Assessment of the Relative Contributions of Deletion, Anergy, and Editing to B Cell Self-Tolerance. *J. Immunol.* 175, 909–916. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.909>
- Hokazono, Y., Adachi, T., Wabl, M., Tada, N., Amagasa, T., Tsubata, T., 2003. Inhibitory Coreceptors Activated by Antigens But Not by Anti-Ig Heavy Chain Antibodies Install Requirement of Costimulation Through CD40 for Survival and Proliferation of B Cells. *J. Immunol.* 171, 1835–1843. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1835>
- Ice, J.A., Li, H., Adrianto, I., Lin, P.C., Kelly, J.A., Montgomery, C.G., Lessard, C.J., Moser, K.L., 2012. Genetics of Sjögren’s syndrome in the genome-wide association era. *J. Autoimmun., Special Issue: Current pathogenetic, clinical and therapeutic aspects of Sjögren’s syndrome* 39, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.01.008>
- Igarashi, K., Kurosaki, T., Roychoudhuri, R., 2017. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 437–450. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.26>
- Ilicic, T., Kim, J.K., Kolodziejczyk, A.A., Bagger, F.O., McCarthy, D.J., Marioni, J.C., Teichmann, S.A., 2016. Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biol.* 17, 29. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0888-1>
- Ishida, I., Kumanogoh, A., Suzuki, K., Akahani, S., Noda, K., Kikutani, H., 2003. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. *Int. Immunol.* 15, 1027–1034. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg098>
- Isnardi, I., Ng, Y.-S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J.H., Cunningham-Rundles, C., Meffre, E., 2010. Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 115, 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243071>
- Itoh-Nakadai, A., Hikota, R., Muto, A., Kometani, K., Watanabe-Matsui, M., Sato, Y., Kobayashi, M., Nakamura, A., Miura, Y., Yano, Y., Tashiro, S., Sun, J., Ikawa, T., Ochiai, K., Kurosaki, T., Igarashi, K., 2014. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development

- by repressing the myeloid program. *Nat. Immunol.* 15, 1171–1180.
<https://doi.org/10.1038/ni.3024>
- Ittah, M., Miceli-Richard, C., Eric Gottenberg, J.-, Lavie, F., Lazure, T., Ba, N., Sellam, J., Lepajolec, C., Mariette, X., 2006. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 8, R51. <https://doi.org/10.1186/ar1912>
- Ittah, M., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J.-E., Sellam, J., Eid, P., Lebon, P., Pallier, C., Lepajolec, C., Mariette, X., 2008. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 38, 1058–1064. <https://doi.org/10.1002/eji.200738013>
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., Takada, K., 2009. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *J. Exp. Med.* 206, 2091–2099.
<https://doi.org/10.1084/jem.20081761>
- Jacobi, A.M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C., Diamond, B., 2009. Phenotypic Characterization of Autoreactive B Cells—Checkpoints of B Cell Tolerance in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS ONE* 4, e5776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005776>
- Jenks, S.A., Cashman, K.S., Zumaquero, E., Marigorta, U.M., Patel, A.V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M.C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E.L., Scharer, C.D., Tipton, C.M., Wei, C., Lim, S.S., Petri, M., Niewold, T.B., Anolik, J.H., Gibson, G., Lee, F.E.-H., Boss, J.M., Lund, F.E., Sanz, I., 2018. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* 49, 725-739.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>
- Ji, Z., Ji, H., 2016. TSCAN: Pseudo-time reconstruction and evaluation in single-cell RNA-seq analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, e117–e117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw430>
- Jin, W., Luo, Z., Yang, H., 2020. Peripheral B Cell Subsets in Autoimmune Diseases: Clinical Implications and Effects of B Cell-Targeted Therapies. *J. Immunol. Res.* 2020, e9518137.
<https://doi.org/10.1155/2020/9518137>
- Johansen, F.-E., Braathen, R., Brandtzaeg, P., 2001. The J Chain Is Essential for Polymeric Ig Receptor-Mediated Epithelial Transport of IgA. *J. Immunol.* 167, 5185–5192.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5185>
- Joose, B.A., Jackson, J.H., Cisneros, A., Santhin, A.B., Smith, S.A., Moore, D.J., Crofford, L.J., Wilfong, E.M., Bonami, R.H., 2021. High-Throughput Detection of Autoantigen-Specific B Cells Among Distinct Functional Subsets in Autoimmune Donors. *Front. Immunol.* 12, 685718.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.685718>
- Kang, K.Y., Kim, H.-O., Kwok, S.-K., Ju, J.H., Park, K.-S., Sun, D.-I., Jhun, J.Y., Oh, H.J., Park, S.-H., Kim, H.-Y., 2011. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res. Ther.* 13, R179. <https://doi.org/10.1186/ar3504>
- Kang, S.E., Kim, S.U., Kim, R.H., Yoo, H.J., Lee, Y.J., Choi, I.A., Park, J.K., Lee, E.Y., Song, Y.W., 2020. Ab0133 Increased Soluble Semaphorin 4d/Cd100 in the Plasma of Sjögren's Syndrome and Its Effects on Human Salivary Gland Cell and Cd4+ T Cell. *Ann. Rheum. Dis.* 79, 1367–1367.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-eular.5162>
- Kapsogeorgou, E.K., Moutsopoulos, H.M., Manoussakis, M.N., 2001. Functional Expression of a Costimulatory B7.2 (CD86) Protein on Human Salivary Gland Epithelial Cells that Interacts with the CD28 Receptor, but Has Reduced Binding to CTLA4. *J. Immunol.* 166, 3107–3113.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3107>
- Katsifis, G.E., Rekka, S., Moutsopoulos, N.M., Pillemer, S., Wahl, S.M., 2009. Systemic and Local Interleukin-17 and Linked Cytokines Associated with Sjögren's Syndrome Immunopathogenesis. *Am. J. Pathol.* 175, 1167–1177.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090319>

- Kerkman, P.F., Fabre, E., van der Voort, E.I.H., Zaldumbide, A., Rombouts, Y., Rispens, T., Wolbink, G., Hoeben, R.C., Spits, H., Baeten, D.L.P., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Scherer, H.U., 2016. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1170–1176. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-207182>
- Khare, S.D., Sarosi, I., Xia, X.Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I., Hawkins, N., Kelley, M., Chang, D., Van, G., Ross, L., Delaney, J., Wang, L., Lacey, D., Boyle, W.J., Hsu, H., 2000. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3370–3375. <https://doi.org/10.1073/pnas.050580697>
- Kiso, K., Yoshifuji, H., Oku, T., Hikida, M., Kitagori, K., Hirayama, Y., Nakajima, T., Haga, H., Tsuruyama, T., Miyagawa-Hayashino, A., 2017. Transgelin-2 is upregulated on activated B-cells and expressed in hyperplastic follicles in lupus erythematosus patients. *PLoS One* 12, e0184738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184738>
- Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R., 1998. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679–1689. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1679>
- Koelsch, K., Zheng, N.-Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M.D., Jared, M., Smith, K., Capra, J.D., Wilson, P.C., 2007. Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 117, 1558–1565. <https://doi.org/10.1172/JCI27628>
- Kolkowski, E.C., Reth, P., Pelusa, F., Bosch, J., Pujol-Borrell, R., Coll, J., Jaraquemada, D., 1999. Th1 Predominance and Perforin Expression in Minor Salivary Glands from Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *J. Autoimmun.* 13, 155–162. <https://doi.org/10.1006/jaut.1999.0289>
- Komano, H., Ikegami, Y., Yokoyama, M., Suzuki, R., Yonehara, S., Yamasaki, Y., Shinohara, N., 1999. Severe impairment of B cell function in *lpr/lpr* mice expressing transgenic Fas selectively on B cells. *Int. Immunol.* 11, 1035–1042. <https://doi.org/10.1093/intimm/11.7.1035>
- Koncz, G., Hueber, A.-O., 2012. The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-Specific B Cells. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00207>
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., Rajewsky, K., 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117, 787–800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.014>
- Kroese, F.G., Abdulahad, W.H., Haacke, E., Bos, N.A., Vissink, A., Bootsma, H., 2014. B-cell hyperactivity in primary Sjögren's syndrome. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 483–499.
- Laidlaw, B.J., Cyster, J.G., 2021. Transcriptional regulation of memory B cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 209–220. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00446-2>
- Lantz, C., Radmanesh, B., Liu, E., Thorp, E.B., Lin, J., 2020. Single-cell RNA sequencing uncovers heterogenous transcriptional signatures in macrophages during efferocytosis. *Sci. Rep.* 10, 14333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70353-y>
- Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., Marshak-Rothstein, A., 2005. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* 202, 1171–1177. <https://doi.org/10.1084/jem.20050630>
- Lau, D., Lan, L.Y.-L., Andrews, S.F., Henry, C., Rojas, K.T., Neu, K.E., Huang, M., Huang, Y., DeKosky, B., Palm, A.-K.E., Ippolito, G.C., Georgiou, G., Wilson, P.C., 2017. Low CD21 expression defines a population of recent germinal center graduates primed for plasma cell differentiation. *Sci. Immunol.* 2, eaai8153. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8153>
- Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J.-E., Mariette, X., 2008. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Immunol.* 67, 185–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02049.x>

- Le Goff, M., Cornec, D., Jousse-Joulin, S., Guellec, D., Costa, S., Marhadour, T., Le Berre, R., Genestet, S., Cochener, B., Boisrame-Gastrin, S., Renaudineau, Y., Pers, J.-O., Saraux, A., Devauchelle-Pensec, V., 2017. Comparison of 2002 AECG and 2016 ACR/EULAR classification criteria and added value of salivary gland ultrasonography in a patient cohort with suspected primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 19, 269. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1475-x>
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A., 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416, 603–607. <https://doi.org/10.1038/416603a>
- Lee, J.S., Yi, K., Ju, Y.S., Shin, E.-C., 2020. Effects of Cryopreservation and Thawing on Single-Cell Transcriptomes of Human T Cells. *Immune Netw.* 20, e34. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e34>
- Lee, S., Ko, Y., Kim, T.J., 2020. Homeostasis and regulation of autoreactive B cells. *Cell. Mol. Immunol.* 17, 561–569. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0445-4>
- Lessard, C.J., Li, H., Adrianto, I., Ice, J.A., Rasmussen, A., Grundahl, K.M., Kelly, J.A., Dozmorov, M.G., Miceli-Richard, C., Bowman, S., Lester, S., Eriksson, P., Eloranta, M.-L., Brun, J.G., Gøransson, L.G., Harboe, E., Guthridge, J.M., Kaufman, K.M., Kvarnström, M., Jazebi, H., Graham, D.S.C., Grandits, M.E., Nazmul-Hossain, A.N.M., Patel, K., Adler, A.J., Maier-Moore, J.S., Farris, A.D., Brennan, M.T., Lessard, J.A., Chodosh, J., Gopalakrishnan, R., Hefner, K.S., Houston, G.D., Huang, A.J.W., Hughes, P.J., Lewis, D.M., Radfar, L., Rohrer, M.D., Stone, D.U., Wren, J.D., Vyse, T.J., Gaffney, P.M., James, J.A., Omdal, R., Wahren-Herlenius, M., Illei, G.G., Witte, T., Jonsson, R., Rischmueller, M., Rönnblom, L., Nordmark, G., Ng, W.-F., Mariette, X., Anaya, J.-M., Rhodus, N.L., Segal, B.M., Scofield, R.H., Montgomery, C.G., Harley, J.B., Sivils, K.L., 2013. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat. Genet.* 45, 1284–1292. <https://doi.org/10.1038/ng.2792>
- Li, D.H., Tung, J.W., Tarner, I.H., Snow, A.L., Yukinari, T., Ngermaneepong, R., Martinez, O.M., Parnes, J.R., 2006. CD72 Down-Modulates BCR-Induced Signal Transduction and Diminishes Survival in Primary Mature B Lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 5321–5328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5321>
- Li, D.H.-H., Winslow, M.M., Cao, T.M., Chen, A.H., Davis, C.R., Mellins, E.D., Utz, P.J., Crabtree, G.R., Parnes, J.R., 2008. Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model. *Arthritis Rheum.* 58, 3192–3204. <https://doi.org/10.1002/art.23812>
- Li, H., Reksten, T.R., Ice, J.A., Kelly, J.A., Adrianto, I., Rasmussen, A., Wang, S., He, B., Grundahl, K.M., Glenn, S.B., Miceli-Richard, C., Bowman, S., Lester, S., Eriksson, P., Eloranta, M.-L., Brun, J.G., Gøransson, L.G., Harboe, E., Guthridge, J.M., Kaufman, K.M., Kvarnström, M., Cunnigham Graham, D.S., Patel, K., Adler, A.J., Farris, A.D., Brennan, M.T., Chodosh, J., Gopalakrishnan, R., Weisman, M.H., Venuturupalli, S., Wallace, D.J., Hefner, K.S., Houston, G.D., Huang, A.J.W., Hughes, P.J., Lewis, D.M., Radfar, L., Vista, E.S., Edgar, C.E., Rohrer, M.D., Stone, D.U., Vyse, T.J., Harley, J.B., Gaffney, P.M., James, J.A., Turner, S., Alevizos, I., Anaya, J.-M., Rhodus, N.L., Segal, B.M., Montgomery, C.G., Scofield, R.H., Kovats, S., Mariette, X., Rönnblom, L., Witte, T., Rischmueller, M., Wahren-Herlenius, M., Omdal, R., Jonsson, R., Ng, W.-F., Nordmark, G., Lessard, C.J., Sivils, K.L., 2017. Identification of a Sjögren's syndrome susceptibility locus at OAS1 that influences isoform switching, protein expression, and responsiveness to type I interferons. *PLoS Genet.* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006820>
- Lin, X., Rui, K., Deng, J., Tian, J., Wang, X., Wang, S., Ko, K.-H., Jiao, Z., Chan, V.S.-F., Lau, C.S., Cao, X., Lu, L., 2015. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1302–1310. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204584>
- Linterman, M.A., Vinuesa, C.G., 2010. T follicular helper cells during immunity and tolerance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 92, 207–248. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)92009-7](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(10)92009-7)

- Liu, Y.-J., Bouteiller, O. de, Arpin, C., Brière, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., Lebecque, S., 1996. Normal Human IgD+IgM- Germinal Center B Cells Can Express Up to 80 Mutations in the Variable Region of Their IgD Transcripts. *Immunity* 4, 603–613. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80486-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80486-0)
- Lobo, P.I., 2016. Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease. *Front. Immunol.* 7, 198.
- Lowell, C.A., Mayadas, T.N., 2012. Overview: Studying Integrins In Vivo, in: Shimaoka, M. (Ed.), *Integrin and Cell Adhesion Molecules: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 369–397. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_22
- Lu, D.R., McDavid, A.N., Kongpachith, S., Lingampalli, N., Glanville, J., Ju, C.-H., Gottardo, R., Robinson, W.H., 2018a. T Cell-Dependent Affinity Maturation and Innate Immune Pathways Differentially Drive Autoreactive B Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 70, 1732–1744. <https://doi.org/10.1002/art.40578>
- Lu, D.R., McDavid, A.N., Kongpachith, S., Lingampalli, N., Glanville, J., Ju, C.-H., Gottardo, R., Robinson, W.H., 2018b. T Cell-Dependent Affinity Maturation and Innate Immune Pathways Differentially Drive Autoreactive B Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 70, 1732–1744. <https://doi.org/10.1002/art.40578>
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., Tangye, S.G., 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 209, 1241–1253. <https://doi.org/10.1084/jem.20120994>
- Maciel, G., Crowson, C.S., Matteson, E.L., Cornec, D., 2017. Prevalence of Primary Sjögren’s Syndrome in a US Population-Based Cohort. *Arthritis Care Res.* 69, 1612–1616. <https://doi.org/10.1002/acr.23173>
- Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J. Exp. Med.* 190, 1697–1710. <https://doi.org/10.1084/jem.190.11.1697>
- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., Vinuesa, C.G., 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00058.x>
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., Trombetta, J.J., Weitz, D.A., Sanes, J.R., Shalek, A.K., Regev, A., McCarroll, S.A., 2015. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 161, 1202–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>
- Malkiel, S., Jeganathan, V., Wolfson, S., Orduño, N.M., Marasco, E., Aranow, C., Mackay, M., Gregersen, P.K., Diamond, B., 2016. Checkpoints for Autoreactive B Cells in the Peripheral Blood of Lupus Patients Assessed by Flow Cytometry. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 68, 2210–2220. <https://doi.org/10.1002/art.39710>
- Manoussakis, M.N., Fragoulis, G.E., Vakrakou, A.G., Moutsopoulos, H.M., 2014. Impaired clearance of early apoptotic cells mediated by inhibitory IgG antibodies in patients with primary Sjögren’s syndrome. *PloS One* 9, e112100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112100>
- Mariette, X., Criswell, L.A., 2018. Primary Sjögren’s Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 378, 931–939. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1702514>
- Mariette, X., Roux, S., Zhang, J., Bengoufa, D., Lavie, F., Zhou, T., Kimberly, R., 2003. The level of BLYS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren’s syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 168–171. <https://doi.org/10.1136/ard.62.2.168>
- Martin, J.C., Chang, C., Boschetti, G., Ungaro, R., Giri, M., Grout, J.A., Gettler, K., Chuang, L.-S., Nayar, S., Greenstein, A.J., Dubinsky, M., Walker, L., Leader, A., Fine, J.S., Whitehurst, C.E., Mbow, M.L., Kugathasan, S., Denson, L.A., Hyams, J.S., Friedman, J.R., Desai, P.T., Ko, H.M., Laface, I., Akturk, G., Schadt, E.E., Salmon, H., Gnjjatic, S., Rahman, A.H., Merad, M., Cho, J.H., Kenigsberg, E., 2019. Single-Cell Analysis of Crohn’s Disease Lesions Identifies a Pathogenic

- Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* 178, 1493-1508.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.008>
- McGrath-Morrow, S., Laube, B., Tzou, S.-C., Cho, C., Cleary, J., Kimura, H., Rose, N.R., Caturegli, P., 2006. IL-12 overexpression in mice as a model for Sjögren lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L837-846. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00134.2006>
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Meffre, E., Wardemann, H., 2008. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol., Autoimmunity / Allergy and Hypersensitivity* 20, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.09.001>
- Meng, W., Li, Y., Xue, E., Satoh, M., Peck, A.B., Cohen, P.L., Eisenberg, R.A., Luning Prak, E.T., 2012. B-cell tolerance defects in the B6.Aec1/2 mouse model of Sjögren's syndrome. *J. Clin. Immunol.* 32, 551–564. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9663-6>
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., Cambier, J.C., 2006. Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity* 25, 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.017>
- Mielle, J., Tison, A., Cornec, D., Le Pottier, L., Daien, C., Pers, J.-O., 2019. B cells in Sjögren's syndrome: from pathophysiology to therapeutic target. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key332>
- Mingueneau, M., Boudaoud, S., Haskett, S., Reynolds, T.L., Nocturne, G., Norton, E., Zhang, X., Constant, M., Park, D., Wang, W., Lazure, T., Le Pajolec, C., Ergun, A., Mariette, X., 2016. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1809-1821.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.024>
- Monroe, J.G., Bannish, G., Fuentes-Panana, E.M., King, L.B., Sandel, P.C., Chung, J., Sater, R., 2003. Positive and negative selection during B lymphocyte development. *Immunol. Res.* 27, 427–442. <https://doi.org/10.1385/IR:27:2-3:427>
- Murre, C., 2005. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat. Immunol.* 6, 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/ni1260>
- Negrini, S., Emmi, G., Greco, M., Borro, M., Sardanelli, F., Murdaca, G., Indiveri, F., Puppo, F., 2021. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clin. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00728-6>
- Nemazee, D., Kouskoff, V., Hertz, M., Lang, J., Melamed, D., Pape, K., Retter, M., 2000. B-cell-receptor-dependent positive and negative selection in immature B cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 57–71.
- Noack, M., Miossec, P., 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004>
- Nocturne, G., 2019. Actualités dans le syndrome de Sjögren primitif : aspects cliniques et thérapeutiques. *Rev. Médecine Interne* 40, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.03.329>
- Nocturne, G., Mariette, X., 2015. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br. J. Haematol.* 168, 317–327. <https://doi.org/10.1111/bjh.13192>
- Nocturne, G., Mariette, X., 2013. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 544.
- Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., Kitamura, D., 2011. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2, 465. <https://doi.org/10.1038/ncomms1475>
- Nossal, G.J., Pike, B.L., 1980. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1602–1606. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1602>

- Noviski, M., Mueller, J.L., Satterthwaite, A., Garrett-Sinha, L.A., Brombacher, F., Zikherman, J., 2018. IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *eLife* 7, e35074. <https://doi.org/10.7554/eLife.35074>
- Noviski, M., Zikherman, J., 2018. Control of autoreactive B cells by IgM and IgD B cell receptors: maintaining a fine balance. *Curr. Opin. Immunol.* 55, 67–74.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C., 2008. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* 29, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.009>
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Nutt, S.L., Thévenin, C., Busslinger, M., 1997. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80043-5](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80043-5)
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., Sciammas, R., 2013. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D.R., Cyster, J.G., 2002. Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer’s Patches. *J. Exp. Med.* 196, 65–75. <https://doi.org/10.1084/jem.20020201>
- Packard, T.A., Cambier, J.C., 2013. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep.* 5, 40. <https://doi.org/10.12703/P5-40>
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R.J., Sanz, I., Anolik, J.H., 2009. Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. *J. Immunol.* 182, 5982–5993. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>
- Palm, A.-K.E., Friedrich, H.C., Mezger, A., Salomonsson, M., Myers, L.K., Kleinau, S., 2015. Function and regulation of self-reactive marginal zone B cells in autoimmune arthritis. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 493–504. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.37>
- Palm, A.-K.E., Kleinau, S., 2021. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *J. Autoimmun.* 119, 102627. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102627>
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A.L., Zago, C.A., Carneiro-Sampaio, M., 2012. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646>
- Pelanda, R., Torres, R.M., 2012. Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007146.
- Peng, B., Ling, J., Lee, A.J., Wang, Z., Chang, Z., Jin, W., Kang, Y., Zhang, R., Shim, D., Wang, H., Fleming, J.B., Zheng, H., Sun, S.-C., Chiao, P.J., 2010. Defective feedback regulation of NF- κ B underlies Sjögren’s syndrome in mice with mutated κ B enhancers of the I κ B α promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15193–15198.
- Poirion, O.B., Zhu, X., Ching, T., Garmire, L., 2016. Single-Cell Transcriptomics Bioinformatics and Computational Challenges. *Front. Genet.* 7, 163. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00163>
- Pore, D., Gupta, N., 2015. Ezrin-Radixin-Moesin family proteins in the regulation of B cell immune response. *Crit. Rev. Immunol.* 35, 15–31.
- Portugal, S., Tipton, C.M., Sohn, H., Kone, Y., Wang, J., Li, S., Skinner, J., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Doumbo, O.K., Doumbo, S., Kayentao, K., Ongoiba, A., Traore, B., Sanz, I., Pierce, S.K., Crompton, P.D., 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>
- Qin, B., Wang, J., Yang, Z., Yang, M., Ma, N., Huang, F., Zhong, R., 2015. Epidemiology of primary Sjögren’s syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1983–1989. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205375>

- Quách, T.D., Manjarrez-Orduño, N., Adlowitz, D.G., Silver, L., Yang, H., Wei, C., Milner, E.C.B., Sanz, I., 2011. Anergic Responses Characterize a Large Fraction of Human Autoreactive Naive B Cells Expressing Low Levels of Surface IgM. *J. Immunol.* 186, 4640–4648. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001946>
- Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S., Weigert, M., 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* 177, 1165–1173. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1165>
- Raff, M.C., Sternberg, M., Taylor, R.B., 1970. Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* 225, 553–554. <https://doi.org/10.1038/225553a0>
- Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758. <https://doi.org/10.1038/381751a0>
- Ramesh, A., Schubert, R.D., Greenfield, A.L., Dandekar, R., Loudermilk, R., Sabatino, J.J., Koelzer, M.T., Tran, E.B., Koshal, K., Kim, K., Pröbstel, A.-K., Banerji, D., University of California, San Francisco MS-EPIC Team, Guo, C.-Y., Green, A.J., Bove, R.M., DeRisi, J.L., Gelfand, J.M., Cree, B.A.C., Zamvil, S.S., Baranzini, S.E., Hauser, S.L., Wilson, M.R., 2020. A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 22932–22943. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008523117>
- Ramos-Casals, M., García-Carrasco, M., Cervera, R., Rosas, J., Trejo, O., De La Red, G., Sánchez-Tapias, J.M., Font, J., Ingelmo, M., 2001. Hepatitis C Virus Infection Mimicking Primary Sjögren Syndrome: A Clinical and Immunologic Description of 35 Cases. *Medicine (Baltimore)* 80, 1–8.
- Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., Goodnow, C.C., 1995. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4 + T cells. *Nature* 376, 181–184. <https://doi.org/10.1038/376181a0>
- Reed, J.H., Jackson, J., Christ, D., Goodnow, C.C., 2016. Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *J. Exp. Med.* 213, 1255–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20151978>
- Reijm, S., Kissel, T., Toes, R.E.M., 2020. Checkpoints controlling the induction of B cell mediated autoimmunity in human autoimmune diseases. *Eur. J. Immunol.* 50, 1885–1894. <https://doi.org/10.1002/eji.202048820>
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., Glimcher, L.H., 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307. <https://doi.org/10.1038/35085509>
- Reincke, M.E., Payne, K.J., Harder, I., Strohmeier, V., Voll, R.E., Warnatz, K., Keller, B., 2020. The Antigen Presenting Potential of CD21^{low} B Cells. *Front. Immunol.* 11, 2664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.535784>
- Risselada, A.P., Looije, M.F., Kruize, A.A., Bijlsma, J.W.J., van Roon, J.A.G., 2013. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren’s syndrome: a systematic review. *Semin. Arthritis Rheum.* 42, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.07.003>
- Roose, E., Vidarsson, G., Kangro, K., Verhagen, O.J.H.M., Mancini, I., Desender, L., Pareyn, I., Vandeputte, N., Vandenbulcke, A., Vendramin, C., Schelpe, A.-S., Voorberg, J., Azerad, M.-A., Gilardin, L., Scully, M., Dierickx, D., Deckmyn, H., De Meyer, S.F., Peyvandi, F., Vanhoorelbeke, K., 2018. Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb. Haemost.* 118, 1729–1742. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1669459>
- Rouault, J.P., Rimokh, R., Tessa, C., Paranhos, G., Ffrench, M., Duret, L., Garoccio, M., Germain, D., Samarut, J., Magaud, J.P., 1992. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* 11, 1663–1670.
- Rubtsova, K., Rubtsov, A.V., Cancro, M.P., Marrack, P., 2015. Age-associated B cells: A T-bet dependent effector with roles in protective and pathogenic immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 195, 1933–1937. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501209>

- Rubtsova, K., Rubtsov, A.V., Dyk, L.F. van, Kappler, J.W., Marrack, P., 2013. T-box transcription factor T-bet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E3216–E3224. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312348110>
- Saadoun, D., Terrier, B., Bannock, J., Vazquez, T., Massad, C., Kang, I., Joly, F., Rosenzweig, M., Sene, D., Benech, P., Musset, L., Klatzmann, D., Meffre, E., Cacoub, P., 2013. Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis Rheum.* 65, 1085–1096. <https://doi.org/10.1002/art.37828>
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., Hirai, H., 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675–685. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00111-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00111-0)
- Samuels, J., Ng, Y.-S., Coupillaud, C., Paget, D., Meffre, E., 2005. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 201, 1659–1667. <https://doi.org/10.1084/jem.20042321>
- Sandel, P.C., Monroe, J.G., 1999. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289–299.
- Sanz, I., Wei, C., Jenks, S.A., Cashman, K.S., Tipton, C., Woodruff, M.C., Hom, J., Lee, F.E.-H., 2019. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>
- Scharer, C.D., Blalock, E.L., Mi, T., Barwick, B.G., Jenks, S.A., Deguchi, T., Cashman, K.S., Neary, B.E., Patterson, D.G., Hicks, S.L., Khosroshahi, A., Eun-Hyung Lee, F., Wei, C., Sanz, I., Boss, J.M., 2019. Epigenetic programming underpins B cell dysfunction in human SLE. *Nat. Immunol.* 20, 1071–1082. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0419-9>
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., Scott, M.L., 2001. An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells Through a BCMA-Independent Pathway. *Science* 293, 2111–2114. <https://doi.org/10.1126/science.1061964>
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.-L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R.H., Browning, J.L., Tschopp, J., 1999. BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. *J. Exp. Med.* 189, 1747–1756. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1747>
- See, P., Lum, J., Chen, J., Ginhoux, F., 2018. A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front. Immunol.* 9, 2425. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02425>
- Seifert, M., Küppers, R., 2016. Human memory B cells. *Leukemia* 30, 2283–2292. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.226>
- Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., Küppers, R., 2015. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E546–E555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416276112>
- Seror, R., Ravaud, P., Bowman, S., Baron, G., Tzioufas, A., Theander, E., Gottenberg, J.-E., Bootsma, H., Mariette, X., Vitali, C., 2010. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1103–1109. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.110619>
- Seror, R., Ravaud, P., Mariette, X., Bootsma, H., Theander, E., Hansen, A., Ramos-Casals, M., Dörner, T., Bombardieri, S., Hachulla, E., Brun, J.G., Kruize, A.A., Praprotnik, S., Tomsic, M., Gottenberg, J.-E., Devauchelle, V., Devita, S., Vollenweider, C., Mandl, T., Tzioufas, A., Carsons, S., Saraux, A., Sutcliffe, N., Vitali, C., Bowman, S.J., 2011. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 968–972. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.143743>
- Shaffer, A.L., Lin, K.-I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltman, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L.M., 2002. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by

- Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity* 17, 51–62.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00335-7)
- Shen, L., Gao, C., Suresh, L., Xian, Z., Song, N., Chaves, L.D., Yu, M., Ambrus, J.L., 2016. Central role for marginal zone B cells in an animal model of Sjogren’s syndrome. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 168, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.04.008>
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O’Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M.D., McPherson, R.C., Wirtz, S., Neurath, M., Hoehlig, K., Meinl, E., Grützkau, A., Grün, J.R., Horn, K., Kühl, A.A., Dörner, T., Bar-Or, A., Kaufmann, S.H.E., Anderton, S.M., Fillatreau, S., 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370.
<https://doi.org/10.1038/nature12979>
- Shen, Y., Ma, Y., Xie, J., Lin, L., Shi, Y., Li, X., Shen, P., Pan, X., Ren, H., 2020. A regulatory role for CD72 expression on B cells and increased soluble CD72 in primary Sjogren’s syndrome. *BMC Immunol.* 21, 21. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00351-2>
- Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H.D., Sugane, K., 2003. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin. Immunol.* 108, 128–137. [https://doi.org/10.1016/S1521-6616\(03\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1521-6616(03)00092-5)
- Shiboski, C.H., Shiboski, S.C., Seror, R., Criswell, L.A., Labetoulle, M., Lietman, T.M., Rasmussen, A., Scofield, H., Vitali, C., Bowman, S.J., Mariette, X., 2017. 2016 ACR-EULAR Classification Criteria for primary Sjögren’s Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 69, 35–45.
<https://doi.org/10.1002/art.39859>
- Shoenfeld, Y., Toubi, E., 2005. Protective autoantibodies: Role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum.* 52, 2599–2606.
<https://doi.org/10.1002/art.21252>
- Simon, Q., Pers, J.-O., Cornec, D., Le Pottier, L., Mageed, R.A., Hillion, S., 2016. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1577-1584.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.014>
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shiota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., Lipsky, P.E., 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390–4398.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>
- Sisto, M., Lisi, S., Lofrumento, D.D., Ingravallo, G., Maiorano, E., D’Amore, M., 2011. A failure of TNFAIP3 negative regulation maintains sustained NF-κB activation in Sjögren’s syndrome. *Histochem. Cell Biol.* 135, 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0821-3>
- Smith, A.J.F., Gordon, T.P., Macardle, P.J., 2004. Increased expression of the B-cell-regulatory molecule CD72 in primary Sjögren’s syndrome. *Tissue Antigens* 63, 255–259.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00187.x>
- Smith, D.A., Germolec, D.R., 1999. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environ. Health Perspect.* 107, 661–665.
- Smith, M.J., Packard, T.A., O’Neill, S.K., Henry Dunand, C.J., Huang, M., Fitzgerald-Miller, L., Stowell, D., Hinman, R.M., Wilson, P.C., Gottlieb, P.A., Cambier, J.C., 2015. Loss of Anergic B Cells in Prediabetic and New-Onset Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 64, 1703–1712.
<https://doi.org/10.2337/db13-1798>
- Smith, M.J., Packard, T.A., O’Neill, S.K., Hinman, R.M., Rihaneck, M., Gottlieb, P.A., Cambier, J.C., 2017. Detection and Enrichment of Rare Antigen-specific B Cells for Analysis of Phenotype and Function. *J. Vis. Exp. JoVE* 55382. <https://doi.org/10.3791/55382>
- Smith, M.J., Rihaneck, M., Wasserfall, C., Mathews, C.E., Atkinson, M.A., Gottlieb, P.A., Cambier, J.C., 2018. Loss of B-Cell Anergy in Type 1 Diabetes Is Associated With High-Risk HLA and Non-HLA Disease Susceptibility Alleles. *Diabetes* 67, 697–703. <https://doi.org/10.2337/db17-0937>

- Smulski, C.R., Eibel, H., 2018. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front. Immunol.* 9, 2285. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02285>
- Stewart, A., Ng, J.C.-F., Wallis, G., Tsioligka, V., Fraternali, F., Dunn-Walters, D.K., 2021. Single-Cell Transcriptomic Analyses Define Distinct Peripheral B Cell Subsets and Discrete Development Pathways. *Front. Immunol.* 12, 602539. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602539>
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., Satija, R., 2019. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888–1902.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>
- Su, T.T., Rawlings, D.J., 2002. Transitional B Lymphocyte Subsets Operate as Distinct Checkpoints in Murine Splenic B Cell Development. *J. Immunol.* 168, 2101–2110. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2101>
- Sutton, H.J., Aye, R., Idris, A.H., Vistein, R., Nduati, E., Kai, O., Mwacharo, J., Li, X., Gao, X., Andrews, T.D., Koutsakos, M., Nguyen, T.H.O., Nekrasov, M., Milburn, P., Eltahla, A., Berry, A.A., Kc, N., Chakravarty, S., Sim, B.K.L., Wheatley, A.K., Kent, S.J., Hoffman, S.L., Lyke, K.E., Bejon, P., Luciani, F., Kedzierska, K., Seder, R.A., Ndungu, F.M., Cockburn, I.A., 2021. Atypical B cells are part of an alternative lineage of B cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. *Cell Rep.* 34, 108684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684>
- Suurmond, J., Atisha-Fregoso, Y., Marasco, E., Barlev, A.N., Ahmed, N., Calderon, S.A., Wong, M.Y., Mackay, M.C., Aranow, C., Diamond, B., 2019. Loss of an IgG plasma cell checkpoint in patients with lupus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 143, 1586–1597. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.041>
- Szabo, K., Papp, G., Barath, S., Gyimesi, E., Szanto, A., Zeher, M., 2013. Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren’s syndrome. *Clin. Immunol.* 147, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.02.024>
- Szyszkowski, E.A., Brokstad, K.A., Oijordsbakken, G., Jonsson, M.V., Jonsson, R., Skarstein, K., 2011. Salivary glands of primary Sjögren’s syndrome patients express factors vital for plasma cell survival. *Arthritis Res. Ther.* 13, R2. <https://doi.org/10.1186/ar3220>
- Takeshita, M., Suzuki, K., Kaneda, Y., Yamane, H., Ikeura, K., Sato, H., Kato, S., Tsunoda, K., Arase, H., Takeuchi, T., 2020. Antigen-driven selection of antibodies against SSA, SSB and the centromere ‘complex’, including a novel antigen, MIS12 complex, in human salivary glands. *Ann. Rheum. Dis.* 79, 150–158. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215862>
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., Lao, K., Surani, M.A., 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods* 6, 377–382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Pizcueta, P., 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.* 181, 2259–2264. <https://doi.org/10.1084/jem.181.6.2259>
- Theander, E., Jonsson, R., Sjöström, B., Brokstad, K., Olsson, P., Henriksson, G., 2015. Prediction of Sjögren’s Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling. *Arthritis Rheumatol.* 67, 2427–2436. <https://doi.org/10.1002/art.39214>
- Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., Brink, R., 2004. Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. *Immunity* 20, 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.010>
- Thompson, J.S., Bixler, S.A., Qian, F., Vora, K., Scott, M.L., Cachero, T.G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I.D., Mullen, C., Strauch, K., Zafari, M., Benjamin, C.D., Tschopp, J., Browning, J.L., Ambrose, C., 2001. BAFF-R, a Newly Identified TNF Receptor That Specifically Interacts with BAFF. *Science* 293, 2108–2111. <https://doi.org/10.1126/science.1061965>
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177, 1009–1020.

- Tiller, T., Kofer, J., Kreschel, C., Busse, C.E., Riebel, S., Wickert, S., Oden, F., Mertes, M.M.M., Ehlers, M., Wardemann, H., 2010. Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J. Exp. Med.* 207, 2767–2778. <https://doi.org/10.1084/jem.20100171>
- Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2007a. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.009>
- Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2007b. Autoreactivity in Human IgG+ Memory B Cells. *Immunity* 26, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.009>
- Tipton, C.M., Fucile, C.F., Darce, J., Chida, A., Ichikawa, T., Gregoret, I., Schieferl, S., Hom, J., Jenks, S., Feldman, R.J., 2015. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 16, 755.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tsui, C., Martinez-Martin, N., Gaya, M., Maldonado, P., Llorian, M., Legrave, N.M., Rossi, M., MacRae, J.I., Cameron, A.J., Parker, P.J., Leitges, M., Bruckbauer, A., Batista, F.D., 2018. Protein Kinase C-β Dictates B Cell Fate by Regulating Mitochondrial Remodeling, Metabolic Reprogramming, and Heme Biosynthesis. *Immunity* 48, 1144–1159.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.031>
- Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *J. Exp. Med.* 203, 393–400. <https://doi.org/10.1084/jem.20052033>
- Tsuji, S., Cortesão, C., Bram, R.J., Platt, J.L., Cascalho, M., 2011. TACI deficiency impairs sustained Blimp-1 expression in B cells decreasing long-lived plasma cells in the bone marrow. *Blood* 118, 5832–5839. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-353961>
- Turchinovich, G., Vu, T.T., Frommer, F., Kranich, J., Schmid, S., Alles, M., Loubert, J.-B., Goulet, J.-P., Zimber-Strobl, U., Schneider, P., Bachl, J., Pearson, R., Crossley, M., Agenès, F., Kirberg, J., 2011. Programming of marginal zone B-cell fate by basic Krüppel-like factor (BKLF/KLF3). *Blood* 117, 3780–3792. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-308742>
- van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J., 1995. Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 819–824. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80054-9)
- Verstappen, G.M., Corneth, O.B.J., Bootsma, H., Kroese, F.G.M., 2018. Th17 cells in primary Sjögren's syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J. Autoimmun., Plasticity of Th17 cells in autoimmune disease* 87, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.11.003>
- Verstappen, G.M., Meiners, P.M., Corneth, O.B.J., Visser, A., Arends, S., Abdulahad, W.H., Hendriks, R.W., Vissink, A., Kroese, F.G.M., Bootsma, H., 2017. Attenuation of Follicular Helper T Cell–Dependent B Cell Hyperactivity by Abatacept Treatment in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 69, 1850–1861. <https://doi.org/10.1002/art.40165>
- Vitali, C., 2011. Immunopathologic differences of Sjögren's syndrome versus sicca syndrome in HCV and HIV infection. *Arthritis Res. Ther.* 13, 233. <https://doi.org/10.1186/ar3361>
- Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H.M., Alexander, E.L., Carsons, S.E., Daniels, T.E., Fox, P.C., Fox, R.I., Kassinis, S.S., Pillemer, S.R., Talal, N., Weisman, M.H., European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome, 2002. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 554–558. <https://doi.org/10.1136/ard.61.6.554>
- Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J.L., Naiman, B., Gross, P.S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holowick, N., Liu, H., Manna, Z., Goldbach-Mansky, R., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Streicher, K., Cancro, M.P., Kolbeck, R., Ettinger, R., 2018. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c^{hi}T-bet⁺ B cells in SLE. *Nat. Commun.* 9, 1758. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>

- Wang, X., He, Y., Zhang, Q., Ren, X., Zhang, Z., 2021. Direct Comparative Analyses of 10X Genomics Chromium and Smart-seq2. *Genomics Proteomics Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.02.005>
- Wang, X., Rodda, L., Bannard, O., Cyster, J.G., 2014. Integrin-mediated interactions between B cells and follicular dendritic cells influence germinal center B cell fitness. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 4601–4609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400090>
- Wang, Y., Roussel-Queval, A., Chasson, L., Hanna Kazazian, N., Marcadet, L., Nezos, A., Sieweke, M.H., Mavragani, C., Alexopoulou, L., 2021. TLR7 Signaling Drives the Development of Sjögren’s Syndrome. *Front. Immunol.* 12, 1747. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676010>
- Wang, Z., Jian Chen, Z., Wheeler, J., Shen, S., Notkins, A.L., 2001. Characterization of murine polyreactive antigen-binding B cells: presentation of antigens to T cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 1106–1114. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1106::AID-IMMU1106>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1106::AID-IMMU1106>3.0.CO;2-5)
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., Sanz, I., 2007. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 178, 6624–6633. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6624>
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., Tchernia, G., Steiniger, B., Staudt, L.M., Casanova, J.-L., Reynaud, C.-A., Weill, J.-C., 2004. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0346>
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Deist, F.L., Basile, G. de S., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.-A., Weill, J.-C., 2001. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1166–1170. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1166>
- Wen, S., Shimizu, N., Yoshiyama, H., Mizugaki, Y., Shinozaki, F., Takada, K., 1996. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Sjögren’s syndrome: differential EBV expression between epithelial cells and lymphocytes in salivary glands. *Am. J. Pathol.* 149, 1511–1517.
- Wöhner, M., Tagoh, H., Bilic, I., Jaritz, M., Poliakova, D.K., Fischer, M., Busslinger, M., 2016. Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *J. Exp. Med.* 213, 1201–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20152002>
- Woodruff, M.C., Ramonell, R.P., Nguyen, D.C., Cashman, K.S., Saini, A.S., Haddad, N.S., Ley, A.M., Kyu, S., Howell, J.C., Ozturk, T., Lee, S., Suryadevara, N., Case, J.B., Bugrovsky, R., Chen, W., Estrada, J., Morrison-Porter, A., Derrico, A., Anam, F.A., Sharma, M., Wu, H.M., Le, S.N., Jenks, S.A., Tipton, C.M., Staitieh, B., Daiss, J.L., Ghosn, E., Diamond, M.S., Carnahan, R.H., Crowe, J.E., Hu, W.T., Lee, F.E.-H., Sanz, I., 2020. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* 21, 1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>
- Wu, H.-J., Bondada, S., 2009. CD72, a Coreceptor with Both Positive and Negative Effects on B Lymphocyte Development and Function. *J. Clin. Immunol.* 29, 12–21. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9264-6>
- Wu, H.J., Venkataraman, C., Estus, S., Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A., Bondada, S., 2001. Positive signaling through CD72 induces mitogen-activated protein kinase activation and synergizes with B cell receptor signals to induce X-linked immunodeficiency B cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 1263–1273. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1263>
- Wu, Y., Nadler, M.J.S., Brennan, L.A., Gish, G.D., Timms, J.F., Fusaki, N., Jongstra-Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J., Neel, B.G., Hozumi, N., 1998. The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Curr. Biol.* 8, 1009–1017. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00421-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00421-6)

- Wu, Y.-C., Kipling, D., Leong, H.S., Martin, V., Ademokun, A.A., Dunn-Walters, D.K., 2010. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 116, 1070–1078. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275859>
- Yau, I.W., Cato, M.H., Jellusova, J., Mendoza, T.H. de, Brink, R., Rickert, R.C., 2013. Censoring of Self-Reactive B Cells by Follicular Dendritic Cell–Displayed Self-Antigen. *J. Immunol.* 191, 1082–1090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201569>
- Ying, C.Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I.C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., Dalla-Favera, R., 2013. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* 14, 1084–1092. <https://doi.org/10.1038/ni.2688>
- Youinou, P., Pers, J.-O., 2011. Disturbance of cytokine networks in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Res. Ther.* 13, 227. <https://doi.org/10.1186/ar3348>
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., Nussenzweig, M.C., 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201, 703–711. <https://doi.org/10.1084/jem.20042251>
- Zappia, L., Oshlack, A., 2018. Clustering trees: a visualization for evaluating clusterings at multiple resolutions. *GigaScience* 7. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy083>
- Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., Linnarsson, S., 2015. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>
- Zenzo, G.D., Lullo, G.D., Corti, D., Calabresi, V., Sinistro, A., Vanzetta, F., Didona, B., Cianchini, G., Hertl, M., Eming, R., Amagai, M., Ohshima, B., Hashimoto, T., Sloostra, J., Sallusto, F., Zambruno, G., Lanzavecchia, A., 2012. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J. Clin. Invest.* 122, 3781–3790. <https://doi.org/10.1172/JCI64413>
- Zhang, S., Zhou, X., Lang, R.A., Guo, F., 2012. RhoA of the Rho Family Small GTPases Is Essential for B Lymphocyte Development. *PLOS ONE* 7, e33773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033773>
- Zhang, Y., Li, J., Zhang, Y.-M., Zhang, X.-M., Tao, J., 2015. Effect of TACI Signaling on Humoral Immunity and Autoimmune Diseases. *J. Immunol. Res.* 2015, e247426. <https://doi.org/10.1155/2015/247426>
- Zhao, K., Wang, W., Rando, O.J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., Crabtree, G.R., 1998. Rapid and phosphoinositid-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95, 625–636. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81633-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81633-5)
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., Gregory, M.T., Shuga, J., Montesclaros, L., Underwood, J.G., Masquelier, D.A., Nishimura, S.Y., Schnall-Levin, M., Wyatt, P.W., Hindson, C.M., Bharadwaj, R., Wong, A., Ness, K.D., Beppu, L.W., Deeg, H.J., McFarland, C., Loeb, K.R., Valente, W.J., Ericson, N.G., Stevens, E.A., Radich, J.P., Mikkelsen, T.S., Hindson, B.J., Bielas, J.H., 2017. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>
- Zhong, G., Reis e Sousa, C., Germain, R.N., 1997. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J. Exp. Med.* 186, 673–682. <https://doi.org/10.1084/jem.186.5.673>
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Alderson, M.R., 1994. The activation antigen CD69. *STEM CELLS* 12, 456–465. <https://doi.org/10.1002/stem.5530120502>
- Zywitza, V., Misios, A., Bunatyan, L., Willnow, T.E., Rajewsky, N., 2018. Single-Cell Transcriptomics Characterizes Cell Types in the Subventricular Zone and Uncovers Molecular Defects

Impairing Adult Neurogenesis. Cell Rep. 25, 2457-2469.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.003>

ANNEXES

Pendant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler en parallèle sur la caractérisation des LB circulants spécifiques de la protéinase 3 (PR3), un des autoantigènes principaux des vascularites associées aux ANCA. L'isolement de ces cellules ainsi qu'un ELISPOT, nous a permis de valider la sécrétion des anticorps anti PR3 par les LB PR3+ chez un sujet sain.

Ce travail a été valorisé par la publication de l'article :

Circulating Autoreactive Proteinase 3+ B Cells and Tolerance Checkpoints in ANCA-Associated Vasculitis

AUTHORS: Alvisé Berti, M.D.1,2, Sophie Hillion, Ph.D.3, Amber M. Hummel¹, Young Min Son, Ph.D.1,4, **Nedra Chriti**,³ Tobias Peikert, M.D.1, Eva M. Carmona, M.D.,Ph.D.1,4, Wayel Abdulahad, Ph.D.5, Peter Heeringa, Ph.D.5, Kristina M. Harris, Ph.D.6, E. William St. Clair, M.D.7, Paul Brunetta, M.D.8, Fernando C. Fervenza, M.D., Ph.D.9, Carol A. Langford, M.D., M.H.S.10, Cees G.M. Kallenberg, M.D., Ph.D.5, Peter A. Merkel, M.D., M.P.H.11, Paul A. Monach, M.D., Ph.D.12, Philip Seo, M.D.13, Robert F. Spiera, M.D.14, John H. Stone, M.D., M.P.H.15, Guido Grandi, Ph.D.2, Jie Sun, Ph.D.1,4, Jacques-Olivier Pers, Ph.D.3 Ulrich Specks, M.D.1 and Divi Cornec, M.D., PhD.1,3 for the RAVE-ITN Research Group¹⁶

Circulating Autoreactive Proteinase 3⁺ B Cells and Tolerance Checkpoints in ANCA-Associated Vasculitis

AUTHORS: Alvis Bert, M.D.^{1,2}, Sophie Hillion, Ph.D.³, Amber M. Hummel¹, Young Min Son, Ph.D.^{1,4}, Nedra Chriti,³ Tobias Peikert, M.D.¹, Eva M. Carmona, M.D.,Ph.D.^{1,4}, Wayel Abdulahad, Ph.D.⁵, Peter Heeringa, Ph.D.⁵, Kristina M. Harris, Ph.D.⁶, E. William St. Clair, M.D.⁷, Paul Brunetta, M.D.⁸, Fernando C. Fervenza, M.D., Ph.D.⁹, Carol A. Langford, M.D., M.H.S.¹⁰, Cees G.M. Kallenberg, M.D., Ph.D.⁵, Peter A. Merkel, M.D., M.P.H.¹¹, Paul A. Monach, M.D., Ph.D.¹², Philip Seo, M.D.¹³, Robert F. Spiera, M.D.¹⁴, John H. Stone, M.D., M.P.H.¹⁵, Guido Grandi, Ph.D.², Jie Sun, Ph.D.^{1,4}, Jacques-Olivier Pers, Ph.D.³ Ulrich Specks, M.D.¹ and Divi Cornec, M.D., PhD.^{1,3} *for the RAVE-ITN Research Group*¹⁶

AFFILIATIONS:

¹Thoracic Disease Research Unit, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

² Rheumatology Unit, S. Chiara Regional Hospital and Department of CIBIO, University Of Trento, Trento, Italy

³INSERM UMR1227, Lymphocytes B et Autoimmunité, University of Brest, CHRU Brest, Brest, France

⁴Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

⁵Department of Rheumatology and Clinical Immunology and Department of Pathology and Medical Biology, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

⁶Immune Tolerance Network, Bethesda, Maryland, USA

⁷Division of Rheumatology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA

⁸Genentech, Inc., South San Francisco, SF, USA

⁹Division of Nephrology and Hypertension, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

¹⁰Center for Vasculitis Care and Research, Department of Rheumatic and Immunologic Diseases, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA

¹¹ Division of Rheumatology, Department of Medicine, Division of Clinical Epidemiology, Department of Biostatistics, Epidemiology, and Informatics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

¹²Brigham and Women's Hospital and VA Boston Healthcare System, Boston MA, USA

¹³Division of Rheumatology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

¹⁴ Vasculitis & Scleroderma Program, Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA

¹⁵Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

¹⁶ *Supplemental Acknowledgments for consortium details*

NAME and ADDRESS of the CORRESPONDING AUTHOR for reprint request – please address correspondence to:

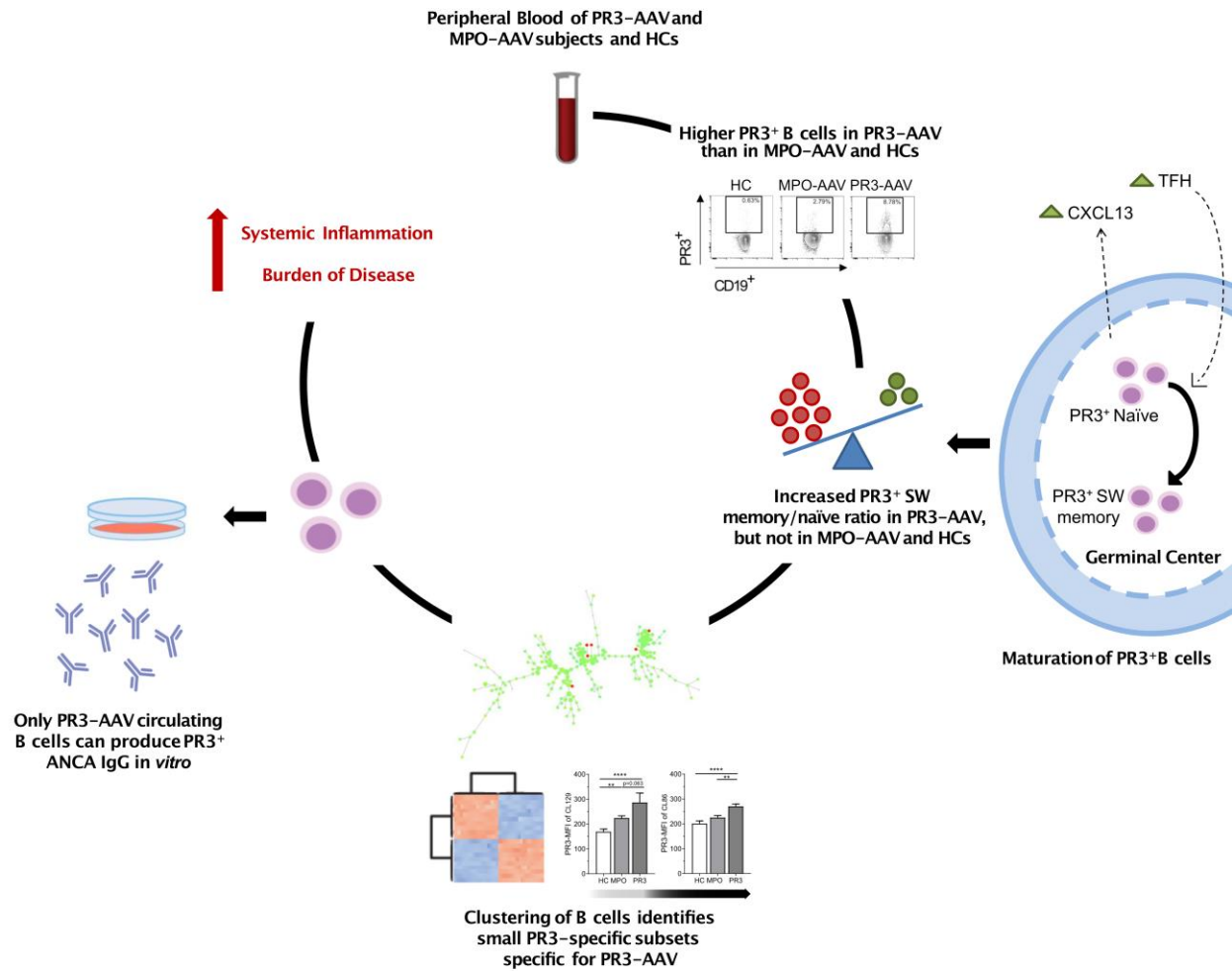
Ulrich Specks, MD, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Mayo Clinic, College of Medicine and Science, 200 First St SW, Rochester, MN 55905 (specks.ulrich@mayo.edu), Phone: (507) 284-4348, Fax: (507) 266-4372

Divi Cornec, INSERM U1227 “B cell and Autoimmunity”, University of Brest, CHRU Brest, Bd Tanguy Prigent, 29609 Brest cedex, Brest, France (divi.cornec@chu-brest.fr), Tel: +33298347264

Keywords

ANCA-associated vasculitis; PR3-reactive B cells; PR3; B cells; RAVE; IgG; myeloperoxidase; proteinase-3

GRAPHICAL ABSTRACT



Legend:

AAV: ANCA-associated vasculitis, i.e. the disease model

PR3: proteinase 3, i.e. the studied antigen of the B cell receptor

MPO: myeloperoxidase, i.e. the antigen of the disease control

HC: healthy controls

PR3⁺ B cells: proteinase 3+ B cells, i.e. autoreactive B cells

ABSTRACT

Background: Little is known about the autoreactive B cells in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV). We aimed to investigate tolerance checkpoints of circulating antigen-specific proteinase 3 (PR3⁺) B cells.

Methods: Multicolor flow cytometry in combination with bioinformatics and functional in vitro studies were performed on baseline samples of peripheral blood mononuclear cells from 154 well-characterized participants of the RAVE trial (NCT00104299) with severely active PR3-AAV and myeloperoxidase (MPO)-AAV, and 27 healthy controls (HCs). Clinical data and outcomes from the trial were correlated with PR3⁺ B cells (total and subsets).

Results: The frequency of PR3⁺ B cells among circulating B cells was higher in PR3-AAV (4.77% [3.98%-6.01%]), than in MPO-AAV (3.16% [2.51%-5.22%]), and in AAV compared to HCs (1.67% [1.27%-2.16%], $p < 0.001$ for all comparisons), implying a defective central tolerance checkpoint in patients. Only PBMC from PR3-AAV contained PR3⁺ B cells capable of secreting PR3-ANCA IgG in vitro, proving to be functionally distinct from those of MPO-AAV and HCs. Unsupervised clustering identified subtle subsets of atypical autoreactive PR3⁺ memory B cells accumulating through the maturation process in PR3-AAV patients. PR3⁺ B cells were enriched in the memory B cell compartment of PR3-AAV, and were associated with higher serum CXCL13 levels, suggesting an increased germinal center activity. PR3⁺ B cells correlated with systemic inflammation (C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate, $p < 0.05$) and complete remission ($p < 0.001$).

Conclusions: This study suggests the presence of defective central antigen-independent and peripheral antigen-dependent checkpoints in patients in PR3-AAV, elucidating the selection process of autoreactive B cells.

INTRODUCTION

The systemic autoimmune diseases granulomatosis with polyangiitis (GPA) and microscopic polyangiitis (MPA) are small vessel vasculitis syndromes associated with circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which target either proteinase 3 (PR3) or myeloperoxidase (MPO)(1). Distinguishing the different types of AAV by autoantigen specificity rather than clinicopathologic items has been proposed for classification purposes because the presence of PR3-ANCA versus MPO-ANCA conveys unique biological and clinically useful information(2, 3).

In healthy individuals, a large fraction of immature B cells are autoreactive, but autoreactive cells are progressively eliminated by central and peripheral tolerance checkpoints during the B cell maturation and selection process(4–7). Central checkpoint mechanisms control the survival of the cells during their maturation from bone-marrow-residing immature B cells towards circulating transitional B cells; they may be studied by analyzing the proportion of autoreactive B cells among blood transitional B cells. Peripheral tolerance checkpoints control the maturation of B cells from the transitional to the naïve mature stages, and then during their functional orientation towards memory B cells and antibody-secreting cells; they may be studied by comparing the proportions of autoreactive B cells among the different circulating B cell subsets(4–7). Normal tolerance mechanisms are thought to be defective in patients with AAV(8). Yet, little is known about how autoreactive B cells escape tolerance checkpoints leading to ANCA production. The presence of circulating IgG-secreting cells and their B-cell precursors bearing a B cell receptor (BCR) specific for PR3 or MPO has been postulated in AAV, but investigation of these cells has been limited by their low frequency in peripheral

blood^{4,5}. Furthermore, in comparison to other autoimmune diseases(6, 9–11), very few studies have characterized ANCAs reconstituted from human B cells(12, 13), and valid animal models of AAV are only available for MPO-AAV (14–17).

We previously developed an original method to enumerate PR3-reactive B cells (PR3⁺ B cells) by flow cytometry and observed a higher frequency of circulating PR3⁺ B cells that were enriched within memory B cells in a small cohort of patients with PR3-AAV as compared to healthy controls (HCs)(18).

The present study was designed to (i) confirm and expand our preliminary observations in a large, well-characterized cohort of patients with PR3-AAV as compared to patients with MPO-AAV as disease controls and HCs, (ii) elucidate the mechanisms of the differentiation process leading to mature PR3⁺ B cell selection in PR3-AAV during the active phase of the disease, as compared to MPO-AAV and HCs, and (iii) investigate the relationship between the frequency of PR3⁺ B cell subsets and the clinical and biological features of PR3-AAV.

RESULTS

Perturbations of circulating B cell subsets are similar in patients with PR3-AAV and MPO-AAV

The characteristics of the participants are shown in **Supplemental Table 1**. We observed that B-cell homeostasis was abnormal in AAV compared to HCs (gating strategy **Figure 1A**; percentages of total B cells and B cell subsets in **Figure 1B-C**), confirming previous studies(19–23). The absolute counts of both PR3-AAV and MPO-AAV participants showed higher numbers of circulating B cells and higher numbers of naïve and double negative (DN) B cells than HCs (**Supplemental Figure 1A-C**).

We further dissected the B-cell pool using the SPADE algorithm (**Supplemental Figure 1D**). Overall, the B-cell clusters segregated PR3-AAV participants from HCs when directly compared (principal component analysis in **Figure 1D**, unsupervised hierarchical clustering heat map in **Supplemental Figure 1E**), but not from MPO-AAV participants, meaning that the two groups of patients display similar disturbances in B cell homeostasis compared to HCs (**Figure 1E, Supplemental Figure 1F**).

Circulating PR3⁺ B cells are higher in patients with PR3-AAV than in controls

PR3⁺ B cells were detected in PBMCs from patients with PR3-AAV and MPO-AAV, as well as HC subjects (representative plots shown **Figure 2A**). Patients with PR3-AAV had higher frequencies and absolute numbers of PR3⁺ B cells compared to MPO-AAV and HCs (median [25-75% IQR], PR3-AAV 4.77% [3.98%-6.01%] *versus*

MPO-AAV 3.19% [2.51%-5.22%] *versus* HCs 1.67% [1.27%-2.16%], $p < 0.001$ for all comparisons; PR3-AAV 5.55 [3.09-9.64] cells/ μ l *versus* MPO-AAV 3.09 [2.02-8.81], $p < 0.05$, and MPO-AAV *versus* HCs 0.95 [0.58-1.31] cells/ μ l, $p < 0.001$), confirming and expanding the findings from our previous report(18) (**Figure 2B-C**). Notably, no significant effect of glucocorticoids on the levels and percentages of lymphocytes, B cells, PR3⁺ B cells and other T cell specific subsets was observed (**Supplemental Table 2**).

PBMCs from patients with PR3-AAV contain PR3⁺ B cells capable of secreting PR3-ANCA IgG in vitro

Supernatants from PBMC cultures from patients with PR3-AAV contained significantly higher levels of anti-PR3 IgG than those from MPO-AAV and HC subjects ($p < 0.001$, **Figure 2D**), showing that PR3⁺ B cells from patients with PR3-AAV are functionally distinct from their counterparts from MPO-AAV patients and HCs.

Then, we sought to assess whether PR3⁺ B cells that can be detected among PBMCs by FACS are responsible for the in-vitro secretion of anti-PR3 immunoglobulin. We measured the frequency of PR3⁺ secreting cells (IgM and IgG) by ELISPOT after stimulation. After sorting PR3⁺ and PR3-negative B cells from B cell-enriched PBMC of HCs (**Supplemental Figure 2A-B**), we found that circulating PR3⁺ B cells from HCs are able to produce PR3-ANCA IgM, but not PR3-ANCA IgG. Furthermore, we could not detect any PR3-specific antibody secretion in PR3-negative cells, demonstrating that our detection method ensures a full recovery of circulating PR3-specific B cells within the PR3⁺ B cell pool as detected by FACS.

The significant correlation between anti-PR3 IgG levels from in vitro cultures and in vivo serum levels in PR3-AAV participants (**Figure 2E, Supplemental Figure 2C**) suggests that circulating PR3⁺ B cells from patients with PR3-ANCA can serve as *bona fide* precursors of PR3-ANCA IgG secreting cells in vivo.

Autoreactive PR3⁺ memory B cells accumulate through the maturation process only in patients with PR3-AAV.

The frequency of PR3⁺ B cells within each of the different B-cell subsets was higher in PR3-AAV than in MPO-AAV, and in AAV overall compared to HCs, implying a defective central tolerance checkpoint in patients compared to HCs (**Figure 3A**; representative plots are shown in **Supplemental Figure 3**). B-cell subsets within the PR3⁺ B-cell pool were similarly distributed in PR3-AAV, MPO-AAV, and HCs, except higher levels of mature B cells in PR3-AAV and MPO-AAV compared to HCs ($p < 0.001$) (**Figure 3B**).

In order to better understand whether rare subsets of PR3⁺ B cells were specifically enriched in patients with PR3-AAV compared to controls, we identified PR3-reactive B cell clusters defined by the SPADE algorithm significantly more represented or activated in PR3-AAV. Among the 200 B-cell nodes, 6 clusters of cells displayed a stable increased reactivity for PR3 across all the samples in HCs, MPO-AAV and PR3-AAV participants (**Figure 4A-B**, phenotypic characterization in **Supplemental Table 3**). Among these 6 stable PR3⁺ clusters, we observed a significant enrichment of PR3⁺ cells in CL57, CL93, CL160 and CL185 (Bm2/naïve and transitional clusters) in PR3-

AAV subjects compared to MPO-AAV and HCs (**Figure 4C**), confirming a deficient central checkpoint (controlling the maturation of immature B cells towards transitional and naïve mature B cells).

The investigation of the MFI of the PR3 BCR in these transitional/naïve clusters (**Figure 4D, Supplemental Figure 4A**) revealed a marked reduction in CL160, CL187, CL93, and CL140 in patients with AAV, a hallmark of chronically activated or anergic cells. In contrast, the PR3 BCR MFI was significantly higher in five other clusters (CL86, CL129, CL104, CL132, CL155), belonging to the memory compartments, suggesting the presence of defective peripheral checkpoints in AAV. Clusters CL104 and CL132 (corresponding to switched activated memory cells) and CL155 (corresponding to plasmablasts, PB) were increased in AAV subjects with no significant differences between PR3-AAV and MPO-AAV (**Figure 4E**), and a PR3-specific defect was identified in the clusters CL86 and CL129 (corresponding to the DN IgD⁻CD27⁻CD38⁻ subset) only in PR3-AAV patients (**Figure 4F**).

We therefore repeated the manual gating analysis using a more conservative strategy to identify PR3⁺ B cells with the highest reactivity (PR3^{high}) (gating strategy **Figure 4G, left**), and observed that similar to the frequency of total PR3⁺ B cells (**Figure 1B**), the frequency of PR3^{high} B cells was significantly increased in PR3-AAV compared to MPO-AAV and HCs (**Figure 4G, central**). Consistent with the unsupervised cluster analyses, enrichment of PR3^{high} B cells among the peripheral pool of DN B cells distinguished PR3-AAV from both MPO-AAV and HCs (**Figure 4G, right; Supplemental Figure 4B**).

Selection of mature PR3⁺ B cells and determinants of the maturation of autoreactive B cells

When comparing the frequencies of PR3⁺ B cells in each B-cell subset within each disease group, we observed a significant decrease in the frequencies of PR3⁺ B cells from transitional to naïve, from unswitched (UnSW) to switched (SW), and from SW to PB in all the groups, illustrating the different layers of control of the peripheral checkpoints (**Figure 5A**).

PR3-AAV participants showed a higher frequency of PR3⁺ B cells in the SW compartment compared to the naïve one, while MPO-AAV subjects and HCs did not (**Figure 5B**).

To illustrate the differential enrichment of PR3⁺ B cells during the maturation process, we computed a ratio of the frequency of PR3⁺ within SW B cells over the frequency of PR3⁺ within naïve B cells. The median ratio was < 1 in HCs and MPO-AAV subjects but was > 1 in PR3-AAV participants (**Figure 5C**), with approximately one third of HCs, half of the MPO-AAVs and almost three quarters of the PR3-AAV participants with a ratio >1 (**Supplemental Figure 5A**).

In addition to having higher proportions of PR3⁺ SW B cells relative to the proportions of PR3⁺ naïve B cells (accounting for a higher ratio), PR3-AAV participants with a ratio >1 compared to those ≤1 had higher levels of circulating PR3⁺ PB and DN B cells and lower levels of transitional B cells, suggesting that the ratio reflects an overall higher degree of PR3⁺ B cells maturation (**Table 1**).

We measured the relationship between PR3⁺ B cell maturation and serum cytokine levels potentially implicated, which were similar between MPO-AAV and PR3-AAV subjects (**Supplemental Figure 5B**). While B-cell activating factor (BAFF) and interleukin (IL)-6 did not show any association with PR3⁺ B-cell maturation in PR3-AAV subjects, C-X-C motif ligand 13 (CXCL13) levels were higher in those with a SW memory/naïve ratio >1 compared to those with a ratio ≤1 (**Figure 5D**), suggesting a higher germinal center reaction(24) for PR3-AAV participants with a SW memory/naïve ratio >1.

The absolute numbers of chemokine receptor 5 (CXCR5), programmed cell death-1 (PD-1), T follicular helper (CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh) were significantly elevated in PR3-AAV and MPO-AAV compared to HCs (**Supplemental Figure 5C-D**), in line with observations made by others(25), and we observed that circulating Tfh count and frequency were lower in participants with PR3-AAV with a SW memory/naïve ratio >1 compared to those with a ratio ≤1 (**Supplemental Figure 5E**). Together, these results support the activation of the germinal center machinery to promote PR3-reactive B cell maturation in participants with PR3-AAV.

Maturation of PR3⁺ B cells and clinical manifestations in PR3-AAV subjects

The PR3⁺ SW memory/naïve B cell ratio did not show significant correlations with clinical and demographic features (**Figure 6A-C** and **Supplemental Figure 6A-E**). Subjects with ratio >1 had higher ESR and CRP serum levels compared to those with a ratio ≤1 (**Figure 6D**), but disease activity assessed by BVAS/WG did not show any association with this ratio (**Figure 5E**).

Whereas participants with ratio ≤ 1 tended to achieve more frequently complete remission at 6 months than those > 1 (80.8% vs. 60.6%, respectively, $p=0.0649$; primary endpoint of the trial, defined as BVAS/WG=0 and Prednisone=0), 100% of participants with ratio ≤ 1 achieved complete remission at any time during the observation period compared to less than 80% in those with ratio > 1 ($p\leq 0.001$) (**Figure 6F**). Time-to-complete remission (**Figure 6H**) and time-to-first remission (BVAS/WG=0) (**Supplemental Figure 6F**) were significantly shorter in subjects with ratio ≤ 1 compared to ratio > 1 . Future relapse and severe relapse were not associated to this ratio (**Figure 6G**).

No striking correlations between the frequency of PR3⁺ B cells and the demographic, disease activity, and major clinical features was observed (**Supplemental Figure 7**).

Taken together, a PR3⁺ SW memory/naïve B cell ratio > 1 seems to be associated with higher degrees of systemic inflammation and slower response to treatment.

DISCUSSION

Herein, we confirm our previous findings(18) in a large well-characterized cohort of patients with AAV with active disease, and show that patients with PR3-AAV have higher circulating levels of PR3⁺ B cells compared to healthy and disease controls, suggesting a general defect in B-cell tolerance in AAV compared to HCs. Notably, only circulating B cells from PR3-AAV secrete PR3-ANCA IgG under appropriate stimulation, reflecting their in vivo activity. While the frequency of PR3⁺ B cells decrease as B cells progress through the maturation checkpoints in AAV and HCs, there appears to be a

preferential enrichment of PR3⁺ B cells in the memory B-cell subsets of patients with PR3-AAV subjects. This phenomenon is accompanied by signs of germinal center activation, suggesting an antigen-specific breach in this layer of control of peripheral B-cell maturation. The selection of these autoreactive B cells through the different B cell compartments results in an accumulation of autoreactive PR3⁺ memory B cells, particularly in PR3⁺ DN subsets. The association between the maturation of PR3⁺ B cells, as reflected by the IgD⁻ memory/naïve ratio, with CRP, ESR and complete remission suggest a link between autoimmunity and systemic inflammation in AAV.

Interestingly, when focusing on the frequency of PR3⁺ B cells within each cell subset, the frequency of PR3⁺ B cells was also elevated in patients with MPO-AAV compared to HC, suggesting a defect in an early central tolerance checkpoint due to impaired selection of B cells before the transitional stage in both PR3- and MPO-AAV patients. Self-reactive human pre- or pro-B cells are usually eliminated before reaching the naïve B cell stage by receptor editing or clonal deletion, while antigen-experienced B cell populations are further excluded by induction of anergy and follicular exclusion(11, 26–29). A possible mechanism contributing to the increase of PR3⁺ B cells in MPO-AAV might be a non-specific defect in clonal anergy predisposing to autoimmunity(30), since levels of the circulating PR3 antigen are increased in both PR3-AAV and MPO-AAV compared to HCs as a consequence of neutrophil activation. A possible explanation of the subsequent tolerance failure in PR3-AAV, but not in MPO-AAV patients, might be the interplay between different genetic factors and autoreactive PR3⁺ B cells. It is well documented that MPO-AAV and PR3-AAV have different HLA and non HLA-gene associations, i.e. for PR3-AAV the HLA-DP and the genes encoding

for α 1-antitrypsin (SERPINA1) and PR3 (PRTN3) (31), Even though both MPO-AAV and PR3-AAV patients have increased levels of autoreactive PR3⁺ B cells, it is possible that only those from PR3-AAV patients are able to mature and produce PR3-ANCA IgG because of the genetic predisposition conferred by these genes. Indeed, mutations of the genes coding for the PR3 antigen, the PR3-specific B cell receptor (i.e. an ANCA immunoglobulin) and possibly the α 1-antitrypsin inhibiting PR3, might increase the affinity of this tripartite interaction leading to a breach in immune tolerance.

However, despite this mild increase of PR3⁺ B cells in MPO-AAV, only circulating B cells of patients with PR3-AAV can produce PR3-ANCA IgGs, suggesting that only patients with PR3-AAV can provide adequate T-cell help that may be instrumental to bypass anergy mechanisms.

The hierarchical B-cell clustering provided evidence of qualitative differences among the different patient groups. Patients with AAV seem to display a more permissive microenvironment, leading to the emergence of autoreactive B-cell clones while PR3⁺ B cells progress through the maturation stages. Importantly, we identified rare subsets of atypical autoreactive PR3⁺ memory B cells accumulating through the maturation process in PR3-AAV as compared to MPO-AAV and HC subjects. A similar Ag-specific defect has recently been identified for anti-nuclear antibody secreting B cells as a source of pathogenic antibodies in SLE(32). DN B cells have characteristics of memory B cells and are thought to represent a source of autoreactive antibody-secreting plasmablasts in SLE(32).

Patients with PR3-AAV showed a higher degree of maturation of PR3⁺ B cells compared to both disease and healthy controls, as represented by a significantly higher

PR3⁺ IgD⁻ memory/naïve ratio and a higher frequency of subjects with ratio >1 compared to MPO-AAV subjects and HCs. Serum CXCL13 levels were significantly increased, and the proportion of Tfh cells was decreased in patients with PR3-AAV with a PR3⁺ ratio >1 compared to those with ratio ≤1, suggesting an increased germinal center activity in patients with PR3-AAV with a higher PR3⁺ IgD⁻ memory/naïve ratio. B-cell maturation takes place in germinal centers of secondary lymphoid tissue or in tertiary lymphoid organ structures in inflamed target tissues in patients with autoimmune diseases, where the interaction of the recruited antigen-specific B cells with cytokines and cells (i.e. activated Tfh cells) leads to expansion, differentiation, and ultimately positive selection of antibody-secreting B cells and memory B cells(33–36). The major limitation of the study is that lymphoid tissue from patients with AAV was not available, impairing a direct assessment of the germinal center microenvironment. Therefore, we measured selected circulating cytokines, such as CXCL13, previously shown to reflect germinal center activation in lymph nodes in clinical and preclinical models of autoimmune and infectious diseases, as well as circulating Tfh(24, 37). Altogether, these data support the maturation process of PR3⁺ B cells ultimately leading to a preferential enrichment of PR3⁺ B cells in the memory compartment of patients with PR3-AAV as compared to those with MPO-AAV and HC subjects.

From a clinical perspective, the PR3⁺ SW memory/naïve B cell ratio seems to correlate with the degree of systemic inflammation as measured by the serological markers of inflammation used in clinical practice CRP and ESR , and by the time to achieving complete remission, but not with disease activity scored by the BVAS/WG, an instrument that iterates all disease manifestations affecting a patient within a 28 day

period leading up to the date of the biological sampling. BVAS/WG has sensitivity to measure disease activity to guide the need of immunosuppressive treatment, but it is probably a suboptimal gauge of systemic inflammation at a specific point in time when serum, plasma and PBMC 's are collected. Overall, our findings suggest a possible link between the maturation of PR3⁺ B cells and the burden of systemic inflammation of the disease, an observation that requires confirmation in future clinical studies.

With this work we elucidate for the first time the positive selection of autoreactive PR3⁺ B cells in PR3-AAV responsible for generating a distinct subset of mature autoreactive B cells in the peripheral circulation which are likely the source of PR3-ANCA IgG in vivo, beginning to unravel the layers of control that are deficient in patients with AAV and that promote the development of PR3-ANCA.

METHODS

Study Population and definitions

All available baseline cryopreserved PBMC samples from the Rituximab in ANCA-Associated Vasculitis (RAVE) (*NCT00104299*(38)) were collected and used for our analysis. We analyzed 181 subjects, 105 with PR3-AAV, 49 with MPO-AAV, and 27 HCs. All clinical data were obtained from the trial database. Disease activity was measured using the Birmingham Vasculitis Activity Score for Wegener's Granulomatosis (BVAS/WG).(39)

The RAVE study (*NCT00104299*, (38)) was a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial that randomized 197 participants (all ANCA positive) in a 1:1 ratio to receive either RTX (375 mg/m² intravenously each week for 4 weeks) or cyclophosphamide (CYC) (2 mg/kg for 3–6 months) followed by azathioprine (AZA) (2 mg/kg, up to 150 mg/day).

Initially, 110 PR3-AAV trial participants and 53 MPO-AAV participants were included in the current study, while 27 age-matched volunteers were used as HCs. A total of 9 participants were excluded from the final analysis because B cell depleted, i.e. <10 cells/ μ L (n=6; 4 PR3-AAV and 2 MPO-AAV) or because of artifacts/technical problems with the staining (n=3; 1 from PR3-AAV, 2 from MPO-AAV). In total, we analyzed 181 subjects, 105 with PR3-AAV, 49 with MPO-AAV, and 27 HCs. Disease activity was measured using the Birmingham Vasculitis Activity Score for Wegener's Granulomatosis (BVAS/WG)(39). The primary outcome of the trial was defined as complete remission (BVAS/WG=0 and prednisone=0) within 6 months from randomization; other outcomes were complete remission, defined as BVAS/WG=0 and

prednisone=0 at any time of the follow-up; complete response, defined as BVAS/WG=0 and prednisone \leq 10mg/day; first remission, defined as a BVAS/WG=0, regardless the dose of glucocorticoids. Disease relapse was defined as any new disease activity, with an increase in BVAS/WG \geq 1 point after achievement of CR. Severe relapse was defined as a BVAS/WG \geq 3 or the occurrence of at least one major BVAS/WG item following disease remission requiring re-treatment with either RTX or CYC.

Recombinant proteinase 3 production and labelling

A recombinant PR3 (rPR3) was expressed in an epithelial cell line as previously described (40). This variant consisted of the mature form of the protein (deletion of the N-terminal pro-dipeptide, allowing a mature conformational state), enzymatically inactive (S195A point mutated to avoid the protease activity which could digest different proteins including immunoglobulins), and produced by stable transfection of HEK-293 cells (41). This rPR3 is well recognized by PR3-ANCA from patients with AAV (42). Culture supernatants were harvested after a 48h starvation, and rPR3 was purified using a column loaded with the anti-human PR3 monoclonal antibody (Ab) MCPR3-2 (43) following recommendations from the supplier (CNBr-Activated Sepharose 4 Fast Flow, GE HealthCare), concentrated, and quantified by Coomassie Plus (Pierce, Rockford, IL). We biotinylated rPR3 using a commercial biotinylation kit (Lightning-Link Rapid Biotin Conjugation Kit, Innova Biosciences, Cambridge, UK), as previously published (18).

PR3-reactive B cell detection and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from trial participants with AAV and HCs were 10%-DMSO cryopreserved PBMCs. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stained and PR3⁺ B cells and T follicular helper cell (Tfh) detected by flow cytometry analysis.

For PR3⁺ B cell detection, cells were counted, and 1×10^6 cells were incubated on ice for 20 min with rPR3-biotin and a cocktail of different antibodies (anti-CD19-APC-Alexa Fluor 700 cat# A78837 clone J3-119, Anti-Human IgD-APC cat# B30651 clone IA6-2, anti-CD27-PC7 cat# A54823 clone 1A4CD27, CD38-PC5.5 cat# A70205 clone LS198.4.3, and anti-CD24-APC-Alexa Fluor 750 cat# B10738 clone ALB9, all from Beckman Coulter, Inc.), washed 3 times, incubated for 15 min with streptavidin-FITC (cat# 554060), washed, and fixed. For each experiment, unstained cells as well as single color controls were included. This customized flow cytometry assay, based on recombinant (r)PR3-FITC staining to identify the PR3-reactive B cells, was developed and validated by using anti-PR3 and anti-human neutrophil elastase antibody-producing hybridoma cell lines as positive and negative controls, as previously described in detail by our group (18).

For T follicular helper cell (Tfh) detection, cells were counted, and 1×10^6 cells were stained with antibodies against human CD4 (Clone: RM4-5, Biolegend, San Diego, CA, USA), CD45RO (Biolegend, San Diego, CA, USA), PD-1 (Clone: 29F.1A12, Biolegend, San Diego, CA, USA), and CXCR5 (Clone: 2G8, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cell analysis was performed on a FACS Canto (BD Bioscience) or Attune NxT system (Life Technologies). FACS data were analyzed and graphed using KALUZA (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) and FlowJo (Ashland, Oregon) softwares.

The unsupervised clustering of flow cytometry data was performed using the SPADE (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events) algorithm(44) based on the level of expression of 6 markers on each B cell (PR3, CD19, CD27, IgD, CD38 and CD24) on each cell. The analysis was performed on 27 HCs, 105 PR3-AAV and 49 MPO-AAV participants. Briefly, after an initial downsampling, the SPADE was performed using 200 nodes for the clustering. SPADE trees were initially visually investigated to identify and regroup nodes that exhibit similar phenotype. Then, data accompanying each SPADE tree (cluster abundance and MFI of each cluster for each sample) was downloaded from Cytobank, followed by hierarchical representation or testing for statistical significance.

In vitro PR3-ANCA production by PBMCs and detection of PR3-specific B cells with ELISPOT

PBMCs were cultured for 10 days to promote differentiation into antibody secreting cells, after which PR3-ANCA secretion was measured in the supernatant by the EliA PR3S test (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a Phadia ImmunocaCAP 250 analyzer(45).

Experiments were performed in duplicates in all trial participants with AAV and HC subjects. For each sample, one million PBMCs per well were cultured in 1 ml of RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 50 mg/ml gentamycin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in the presence of 3.2 µg/ml CpG-ODN 2006 (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands), 100 ng/ml BAFF (PreproTech, Rocky Hill, NJ,

USA) and 100 ng/ml of IL-21 (PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA). PBMCs were cultured for 10 days to promote differentiation into antibody secreting cells, after which PR3-ANCA secretion was measured in the supernatant by the EliA PR3S test (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a Phadia ImmunocaCAP 250 analyzer (45)

PR3-ANCA IgG and IgM were measured by ELISPOT in peripheral blood of HCs. To determine the ability of circulating PR3⁺ B cells to secrete in vitro immunoglobulins of different isotypes against PR3, we measured PR3-ANCA IgG and IgM by ELISPOT in peripheral blood of HCs. Briefly, enriched B cells from PBMCs of a healthy subject were FACS-sorted based on streptavidin expression to isolate PR3⁺ B cells and PR3⁻ B cells. The PR3⁺ B cells, PR3⁻ B cells and total B cells were cultured for 24h with 1 µg/ml R848 (Mabtech) and 10 ng/ml recombinant human (rh) IL-2 (Mabtech). After 24 hours, pre-stimulated cells were added to the plate with 100µl cell suspension/well (10,000 cells/well, 30,000 cells/well and 15,000 cells/well for PR3⁺ B cells, PR3⁻ B cells and total B cells, respectively). The ELISPOT was conducted according to the manufacturer's instructions (Mabtech, Nacka Strand, Sweden).

This could not be performed in the AAV trial participants, since the PBMCs required to obtain PR3⁺ B cells were in the order of 500x10⁶, much more than the frozen PBMCs available for every AAV participant.

Data availability

Clinical data from the RAVE clinical trial are publicly available on the Immune Tolerance Network website (<https://www.immunetolerance.org/researchers/trialshare>).

Experimental data are available upon reasonable request.

Statistics

Ordinal data are presented as N (%), continuous data as median (interquartile range) or mean (SEM). Groups were compared using parametric or non-parametric tests when appropriate, Student T test or Mann-Whitney test (2 tailed) for continuous data. Chi² or Fisher's test were used where appropriate for categorical data.

Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, where appropriate. The multiple comparisons on B cell maturation were analyzed by using mixed-effects modelling. Findings in all the analyses were considered significant at $p < 0.05$ after adjustment for multiple comparisons by calculating the false discovery rate (FDR) as described by Benjamini and Hochberg(46). Spearman's test was used to test correlations. The estimated distributions of time to remission were performed with the Kaplan–Meier method and the log-rank test. The adjusted P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. . All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (San Diego, California).

Study approval

All participants of the parent trial (RAVE trial *NCT00104299*), from which the PBMC and serum samples used in the present study were derived, provided written informed consent for participation in the clinical trial as well as for the use of the biospecimens collected during the trial in future ancillary mechanistic studies. The trial protocol

including all provisions for the future use of biospecimens collected during the trial had been approved by the institutional review board of each participating trial site.

Conflict of interest:

Dr. P. Brunetta was an employee of Genentech during the conduct of the RAVE trial and previously received salary and Genentech stock. Dr. J. Sun's laboratory received funding from Evive Biotech. Dr. John Stone and Dr. Robert Spiera participated in the Giacta trial blocking IL-6 receptor with tocilizumab in giant-cell arteritis and (sponsored by Roche) and reported grant support and personal fees from Roche outside the submitted work. Dr. U. Specks, Dr. P. Merkel, Dr. F.C. Fervenza, Dr. J.H. Stone and Dr. Spiera have received research grants from Roche/Genentech. Drs. P. Merkel and R. Spiera also report consulting fees from Roche/Genentech. Genentech and Biogen Idec provided partial funding for the study and donated the study medication but had no determinative role in the study design, the analyses, or the preparation of the manuscript. ANCA enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) kits were donated by EUROIMMUN, which had no role in any aspect of the study.

Author Contributions

AB, SH, US and DC designed the study. AB, AH, YMS, NC, WA, PH and DC acquired the data. AB, SH, NC, US and DC analyzed the data and drafted the manuscript. All coauthors interpreted the results and analyzed critically the manuscript for important intellectual content, and approved the final version.

Acknowledgements

Dr Cornec received funds from the "Société Française de Rhumatologie" for this work. Dr. Berti was supported by funds from the Vasculitis Foundation/Vasculitis Clinical Research Consortium fellowship, and by the National Reference Center for Rare Autoimmune Diseases in Brest, France (CERAINO). Dr. Paul A. Monach was supported by an Arthritis Investigator Award from the Arthritis Foundation.

RAVE-ITN Research Group:

Co-Protocol Chairs: Ulrich Specks, M.D. (Mayo Clinic) John H. Stone, M.D., M.P.H. (Massachusetts General Hospital)

Mayo Clinic: Ulrich Specks, M.D. Steven R. Ytterberg, M.D. Fernando C. Fervenza, M.D. Karina A. Keogh, M.B., B.Ch. Tobias Peikert, M.D. Jason M. Golbin, D.O. Lorenzo Klein, M.D. Kathleen Mieras, C.C.R.P. Cynthia Beinhorn Susan Fisher, R.N. Mary Lou Clawson, R.N. Sharon Bendel, R.N. Amber M. Hummel, Mayo Clinic Eisenberg Research Pharmacy.

Boston University: Peter A. Merkel, M.D., M.P.H. Eugene Y. Kissin, M.D. Paul A. Monach, M.D., Ph.D. Manuella R. Clark-Cotton, M.A. Carol A. McAlear, M.S. Jessica L. Pettit Maureen B. Sutton, M.P.H. Russell L. Widom, Ph.D. Giuseppina A. Farina, M.D., Ph.D. Michael J. DiMarzio Sharlene P. Johnson, M.A.T.

Johns Hopkins University: Philip Seo, M.D., M.H.S. John H. Stone, M.D., M.P.H. David Hellmann, M.D. Duvuru Geetha, M.D. Assil Saleh, M.D., M.P.H. Peter Wung, M.D. Lourdes P. Sejismundo, R.N., B.S.N. Charlotte Humphrey, R.N., B.S.N. Matthew

Marriott, P.A.-C. Yavette Goldsborough, Alexander Pinachos Karen Gauss, R.N., M.L.A. Linda King, R.N.

Cleveland Clinic: Foundation Carol A. Langford, M.D., M.H.S. Gary S. Hoffman, M.D. Rula A. Hajj-Ali, M.D. John J. Carey, M.D., M.S. Eamonn S. Molloy, M.D., M.S. Curry L. Koenig, M.D., M.S. Debora Bork, M.F.A. Tiffany M. Clark, M.S.N., C.N.P. Katherine A. Tuthill, M.S.N., C.N.P. Teresa Markle John Petrich, R.Ph., M.S.

Hospital for Special Surgery: Robert Spiera, M.D. Deborah R. Alpert, M.D., Ph.D. Stephen J. DiMartino, M.D., Ph.D. Jessica K. Gordon, M.D. Neal K. Moskowitz, M.D., Ph.D. Kyriakos A. Kirou, M.D. Jonathan Samuels, M.D. Stacey A. Kloiber, R.N. Elvedin Julevic Margaret O'Donohue, R.N. Avni Patel, Pharm.D.

University of Groningen: Cees Kallenberg, M.D., Ph.D. Coen Stegeman, M.D., Ph.D. Peter Rasker, R.N. Katinka Mulder Pieter Limburg, Ph.D. Jos Kosterink, Pharm.D.

Duke University: E. William St. Clair, M.D. Nancy B. Allen, M.D. Edna Scarlett, R.N. Martin Tochacek, Ph.D.

University of Alabama at Birmingham: Anthony Turkiewicz, M.D. Barri J. Fessler, M.D. Winn Chatham, M.D., Anita Turner, R.N.

Coordinating Centers:

Rho: David Ikle, Ph.D. Alice Lail, M.S.. Brett Jepson, M.S.

PPD: Wei Wu, Ph.D. Tammy D'Lugin Cathy Jacob

National Institute of Allergy and Infectious Diseases: Lisa Viviano, R.N.* Linna Ding, M.D., Ph.D. Steven Adah, Ph.D. James McNamara, M.D.

Immune Tolerance Network: Nadia Tchao, M.D. Mark Mueller, B.S., C.C.R.P.** Kasia Bourcier, Ph.D.** Deborah J. Phippard, Ph.D. Adam L. Asare, Ph.D. Noha Lim, Ph.D. Peter Sayre, M.D. Vicki-Seyfert Margolis, Ph.D.*** Patti Tosta, R.N. Nancy B. Skeeter Claire L. Anderson Adelaide N. Archampong

*Current employer: National Institutes of Heart, Lung and Blood Diseases.

**Current employer: National Institutes of Allergy and Infectious Diseases.

***Current employer: The U.S. Food and Drug Administration. The views presented in this article do not necessarily reflect those of the Food and Drug Administration.

Funding, grant/award info

This study was supported by a research grant from the Vasculitis foundation to Dr. D. Cornec and U. Specks (<http://www.vasculitisfoundation.org/research/research-program/>). The work was also supported in part by RO1 AI12844, RO1 AI15 4598 and RO1 AI147394 to Dr. J. Sun and by RC1AR058303 to Dr. PA Merkel and by funds from the Mayo Foundation for Education and Research and the Connor Group Foundation to Dr. U. Specks. Dr. A. Berti was supported by funds from the Vasculitis Foundation/Vasculitis Clinical Research Consortium fellowship. The ITN021AI RAVE

Trial was conducted by the Immune Tolerance Network and sponsored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health under Contract N01 AI15416 and Award Number UM1AI109565), (see online appendix for the list of all members of the RAVE-ITN Research Group). Genentech and Biogen/IDEC provided the study medications and partial funding.

Patient and Public Involvement

Not applicable

REFERENCES

1. Kitching AR et al. ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2020;6(71).
2. Lionaki S et al. Classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitides: the role of antineutrophil cytoplasmic autoantibody specificity for myeloperoxidase or proteinase 3 in disease recognition and prognosis. *Arthritis Rheum* 2012;64(10):3452–3462.
3. Cornec D, Cornec-Le Gall E, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis - clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(10):570–579.
4. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E NM. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Materials and Methods: Single cell sorting. Science (80-.).* 2003;
5. Yurasov S, Hammersen J, Tiller T, Tsuiji M, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in healthy humans and patients with systemic lupus erythematosus.. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; doi:10.1196/annals.1358.019
6. Yurasov S et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* [published online ahead of print: 2005]; doi:10.1084/jem.20042251
7. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; doi:10.1038/nri.2017.19
8. Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P. Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005:
9. de la Varga-Martínez R et al. Autoreactive B-lymphocytes in SLE and RA patients:

Isolation and characterisation using extractable nuclear and citrullinated antigens bound to immunobeads. *Eur. J. Immunol.* [published online ahead of print: 2019]; doi:10.1002/eji.201848065

10. Sweet RA et al. A new site-directed transgenic rheumatoid factor mouse model demonstrates extrafollicular class switch and plasmablast formation. *Autoimmunity* [published online ahead of print: 2010]; doi:10.3109/08916930903567500

11. Erikson J et al. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* [published online ahead of print: 1991]; doi:10.1038/349331a0

12. Sibilia J et al. Structural analysis of human antibodies to proteinase 3 from patients with Wegener granulomatosis.. *J. Immunol.* 1997;

13. Weppner G et al. In situ detection of PR3-ANCA+ B cells and alterations in the variable region of immunoglobulin genes support a role of inflamed tissue in the emergence of auto-reactivity in granulomatosis with polyangiitis. *J. Autoimmun.* [published online ahead of print: 2018]; doi:10.1016/j.jaut.2018.07.004

14. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am. J. Pathol.* [published online ahead of print: 2007]; doi:10.2353/ajpath.2007.060573

15. Schreiber A et al. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* [published online ahead of print: 2009]; doi:10.1681/ASN.2008050497

16. Xiao H et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase

cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest.* [published online ahead of print: 2002]; doi:10.1172/JCI0215918

17. Shochet L, Holdsworth S, Kitching AR. Animal Models of ANCA Associated Vasculitis. *Front. Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00525

18. Cornec D et al. Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J Autoimmun* 2017;84:122–131.

19. Lapse N et al. Altered B cell balance, but unaffected B cell capacity to limit monocyte activation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in remission. *Rheumatol. (United Kingdom)* [published online ahead of print: 2014]; doi:10.1093/rheumatology/keu149

20. Md Yusof MY et al. Repeat cycles of rituximab on clinical relapse in ANCA-associated vasculitis: Identifying B cell biomarkers for relapse to guide retreatment decisions. *Ann. Rheum. Dis.* [published online ahead of print: 2015]; doi:10.1136/annrheumdis-2014-206496

21. Aybar LT et al. Reduced CD5(+) CD24(hi) CD38(hi) and interleukin-10(+) regulatory B cells in active anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis permit increased circulating autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* [published online ahead of print: 2015]; doi:10.1111/cei.12483

22. Unizony S et al. Peripheral CD5+ B cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* [published online ahead of print: 2015]; doi:10.1002/art.38916

23. Todd SK et al. Regulatory B cells are numerically but not functionally deficient in

- anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatol. (United Kingdom)* [published online ahead of print: 2014]; doi:10.1093/rheumatology/keu136
24. Havenar-Daughton C et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [published online ahead of print: 2016]; doi:10.1073/pnas.1520112113
25. Zhao Y et al. Circulating T follicular helper cell and regulatory T cell frequencies are influenced by B cell depletion in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol. (United Kingdom)* [published online ahead of print: 2014]; doi:10.1093/rheumatology/ket406
26. Bynoe MS, Spatz L, Diamond B. Characterization of anti-DNA B cells that escape negative selection. *Eur. J. Immunol.* [published online ahead of print: 1999]; doi:10.1002/(sici)1521-4141(199904)29:04<1304::aid-immu1304>3.3.co;2-y
27. Mandik-Nayak L, Bui A, Noorchashm H, Eaton A, Erikson J. Regulation of anti-double-stranded DNA B cells in nonautoimmune mice: Localization to the T-B interface of the splenic follicle. *J. Exp. Med.* [published online ahead of print: 1997]; doi:10.1084/jem.186.8.1257
28. Li H, Jiang Y, Prak EL, Radic M, Weigert M. Editors and editing of anti-DNA receptors. *Immunity* [published online ahead of print: 2001]; doi:10.1016/S1074-7613(01)00251-5
29. Pewzner-Jung Y et al. B cell deletion, anergy, and receptor editing in “knock in” mice targeted with a germline-encoded or somatically mutated anti-DNA heavy chain.. *J. Immunol.* 1998;
30. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3

in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin. Exp. Immunol.* [published online ahead of print: 2003]; doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02083.x

31. Lyons PA et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2012;367(3):214–223.

32. Jenks SA et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* [published online ahead of print: 2018]; doi:10.1016/j.immuni.2018.08.015

33. MacLennan ICM. Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* [published online ahead of print: 1994]; doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001

34. Chan TD et al. Elimination of Germinal-Center-Derived Self-Reactive B Cells Is Governed by the Location and Concentration of Self-Antigen. *Immunity* [published online ahead of print: 2012]; doi:10.1016/j.immuni.2012.07.017

35. Reed JH, Jackson J, Christ D, Goodnow CC. Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *J. Exp. Med.* [published online ahead of print: 2016]; doi:10.1084/jem.20151978

36. MacLennan I, Toellner KM. Extrafollicular antibody responses - MacLennan - 2003 - Immunological Reviews - Wiley Online Library. *Immunol.* {...} 2003;

37. Monach PA et al. Serum proteins reflecting inflammation, injury and repair as biomarkers of disease activity in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2013;72(8):1342–1350.

38. Stone JH et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis.. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(3):221–32.

39. Stone JH et al. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). *Arthritis Rheum* 2001;44(4):912–920.
40. Sun J et al. A proportion of proteinase 3 (PR3)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) only react with PR3 after cleavage of its N-terminal activation dipeptide. *Clin. Exp. Immunol.* [published online ahead of print: 1998]; doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00730.x
41. Capizzi SA, Viss MA, Hummel AM, Fass DN, Specks U. Effects of carboxy-terminal modifications of proteinase 3 (PR3) on the recognition by PR3-ANCA. *Kidney Int.* [published online ahead of print: 2003]; doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00765.x
42. Rasmussen SM et al. Stable phenotype of B-cell subsets following cryopreservation and thawing of normal human lymphocytes stored in a tissue biobank. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* [published online ahead of print: 2015]; doi:10.1002/cyto.b.21192
43. Sun J et al. Capture-ELISA based on recombinant PR3 is sensitive for PR3-ANCA testing and allows detection of PR3 and PR3-ANCA/PR3 immunocomplexes. *J. Immunol. Methods* [published online ahead of print: 1998]; doi:10.1016/S0022-1759(97)00203-2
44. Kimball AK et al. A Beginner's Guide to Analyzing and Visualizing Mass Cytometry Data. *J. Immunol.* [published online ahead of print: 2018]; doi:10.4049/jimmunol.1701494
45. Lapse N et al. Toll-like receptor 9 activation enhances B cell activating factor and interleukin-21 induced anti-proteinase 3 autoantibody production in vitro. *Rheumatol.* 2016;55(1):162–172.

46. Li A, Barber RF. Multiple testing with the structure-adaptive Benjamini–Hochberg algorithm. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 2019;81(1). doi:10.1111/rssb.12298

TABLES

Table 1. Baseline PR3⁺ B cell subsets by switched memory/naïve B cell ratio in PR3-AAV.

PR3 ⁺ B cell subsets	Ratio ≤1	Ratio >1	p value
Transitional , median % (25-75% IQR)	8.95 (6.79; 13.54)	7.28 (5.26; 10.02)	0.031
Naïve , median % (25-75% IQR)	4.55 (3.70; 7.49)	3.82 (3.11; 4.68)	0.005
Unswitched memory , median % (25-75% IQR)	9.77 (7.00; 13.46)	10.63 (8.03; 12.86)	0.538
Switched memory , median % (25-75% IQR)	3.39 (2.39; 4.42)	6.41 (4.38; 8.29)	<0.001
Plasmablasts , median % (25-75% IQR)	0.96 (0; 1.89)	1.88 (0.91; 3.64)	0.029
Double Negative , median % (25-75% IQR)	3.18 (2.42; 3.49)	4.23 (3.29; 6.16)	<0.001

PR3: proteinase 3; AAV : ANCA-associated vasculitis; IQR: interquartile range.

Data represent median (25-75% IQR). P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test.

FIGURES

Figure 1. Circulating B cells in patients with PR3-AAV, MPO-AAV and HC subjects. Gating strategy used to define B cell subsets (A). CD19⁺ cells were first categorized based on CD24 and CD38 expression, in transitional (transi, CD24^{high}CD38^{high}), plasmablasts (PB, CD24^{low}CD38^{high}), and mature B cells (CD24^{low}CD38^{low}). Mature B cells were further classified into four populations: naïve (CD27⁺IgD⁺), unswitched memory (UnSW, CD27⁺IgD⁺), switched memory (SW, CD27⁺IgD⁻), and double negative (DN, CD27⁻IgD⁻). B cells frequency and subset distribution were overall similar in PR3-AAV (n=105) and MPO-AAV (n=49), but different compared to HCs (n=27) (B-C). Principal component analysis of the 200 B cell clusters obtained with SPADE (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events) representing HC subjects and PR3-AAV trial participants (D) and MPO-AAV and PR3-AAV participants (E). Data represent median (25-75% IQR). Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with Kruskal-Wallis test and P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test.

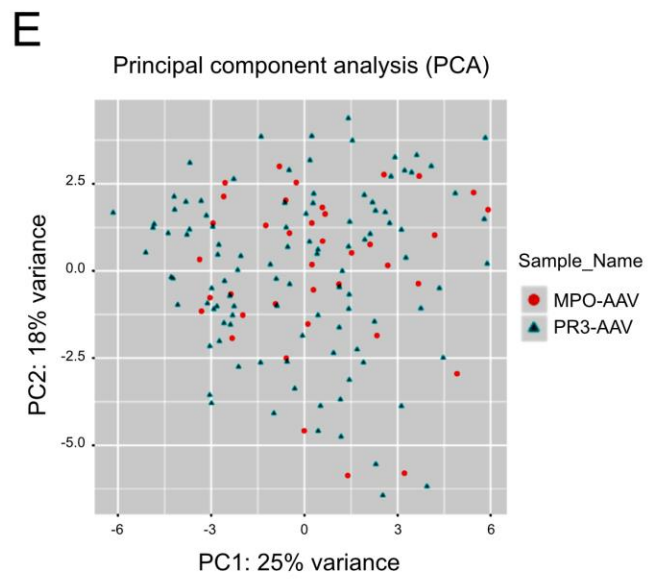
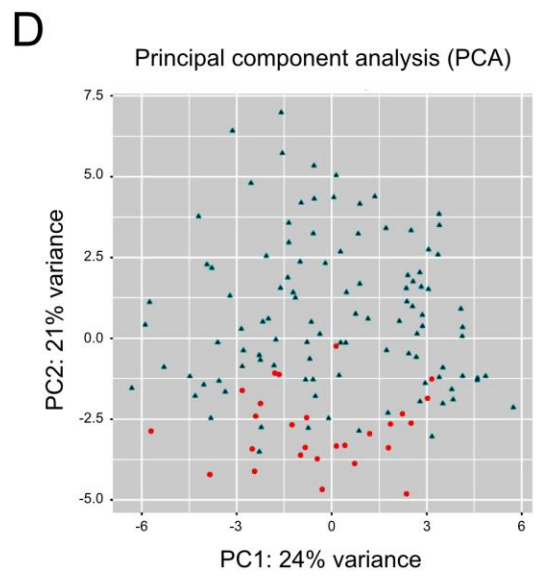
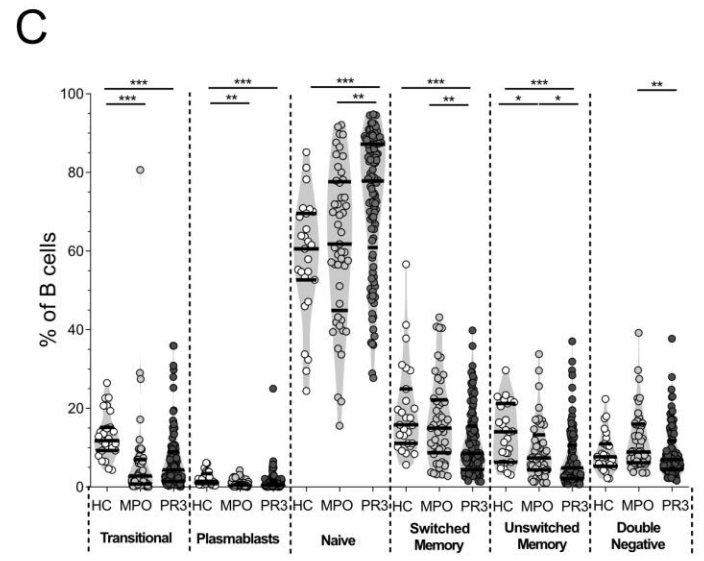
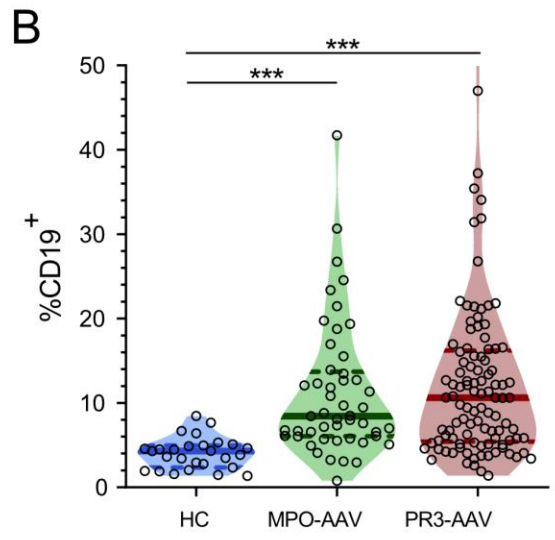
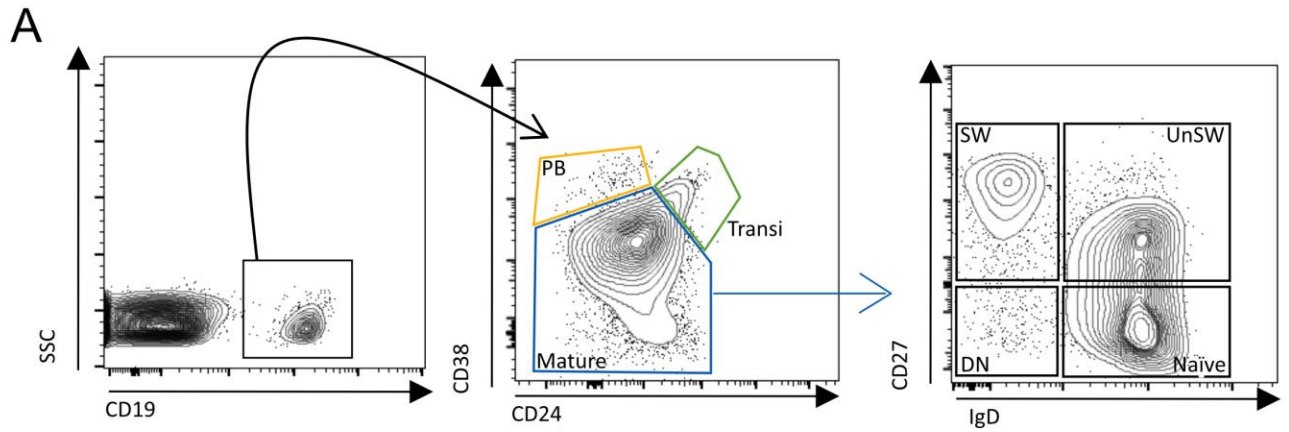


Figure 2. Circulating PR3⁺ B cells and PR3-ANCA production in patients with PR3-AAV, MPO-AAV and HC subjects. Representative examples of the gating of PR3⁺ positive B cells among total CD19⁺ cells in a PR3-AAV patient, a MPO-AAV patient and a HC subject (A). PR3⁺ B cells frequency and count were increased in PR3-AAV (n=105) compared to MPO-AAV (n=49) and HCs (n=27) (B-C). PBMCs were cultured to promote differentiation into antibody-secreting cells, after which PR3-ANCA secretion was analyzed by means of Phadia ImmunoCAP 250 analyzer (D). Only PR3-AAV subjects can produce PR3-ANCA IgG in vitro. Correlation of circulating (in vivo) PR3-ANCA IgG with secreted (in vitro) PR3-ANCA IgG in PR3-AAV subjects (E). Data represent median (25-75% IQR) in violin plot and mean \pm SEM in histograms. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test or Student's t-test, where appropriate. Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, as appropriate. P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test.

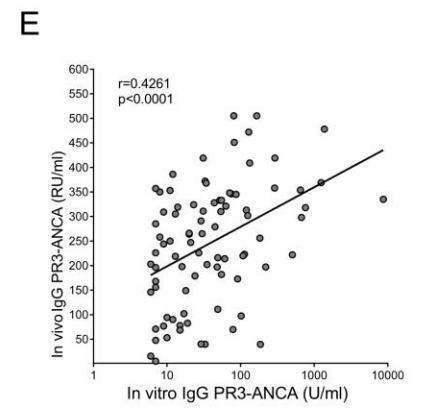
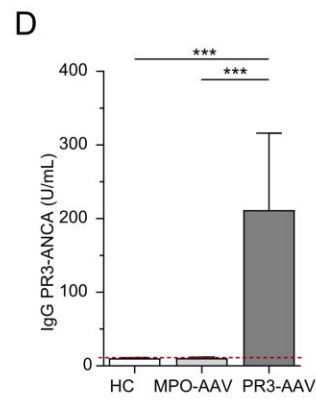
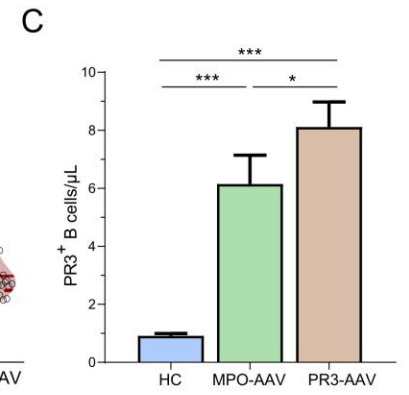
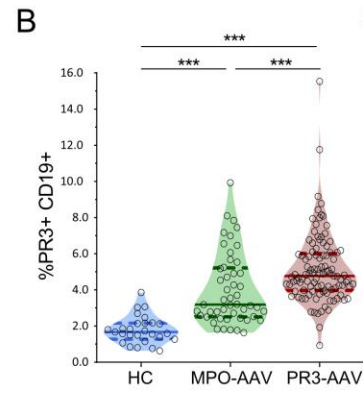
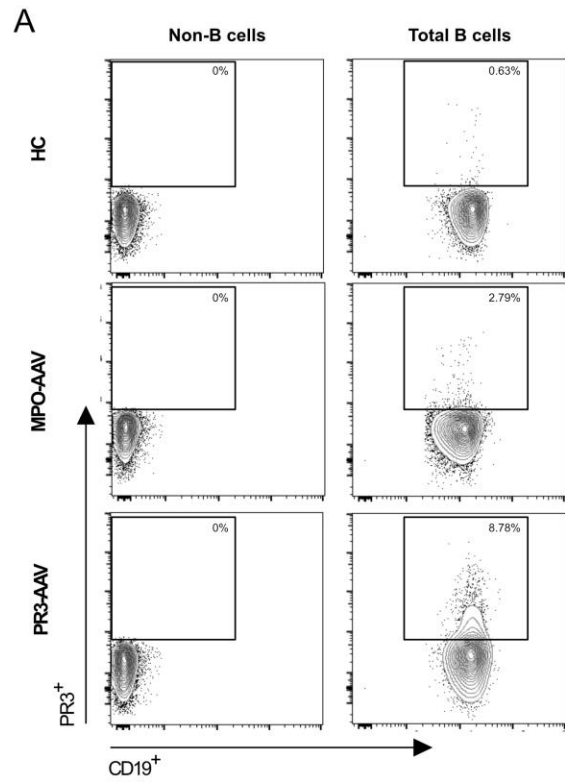
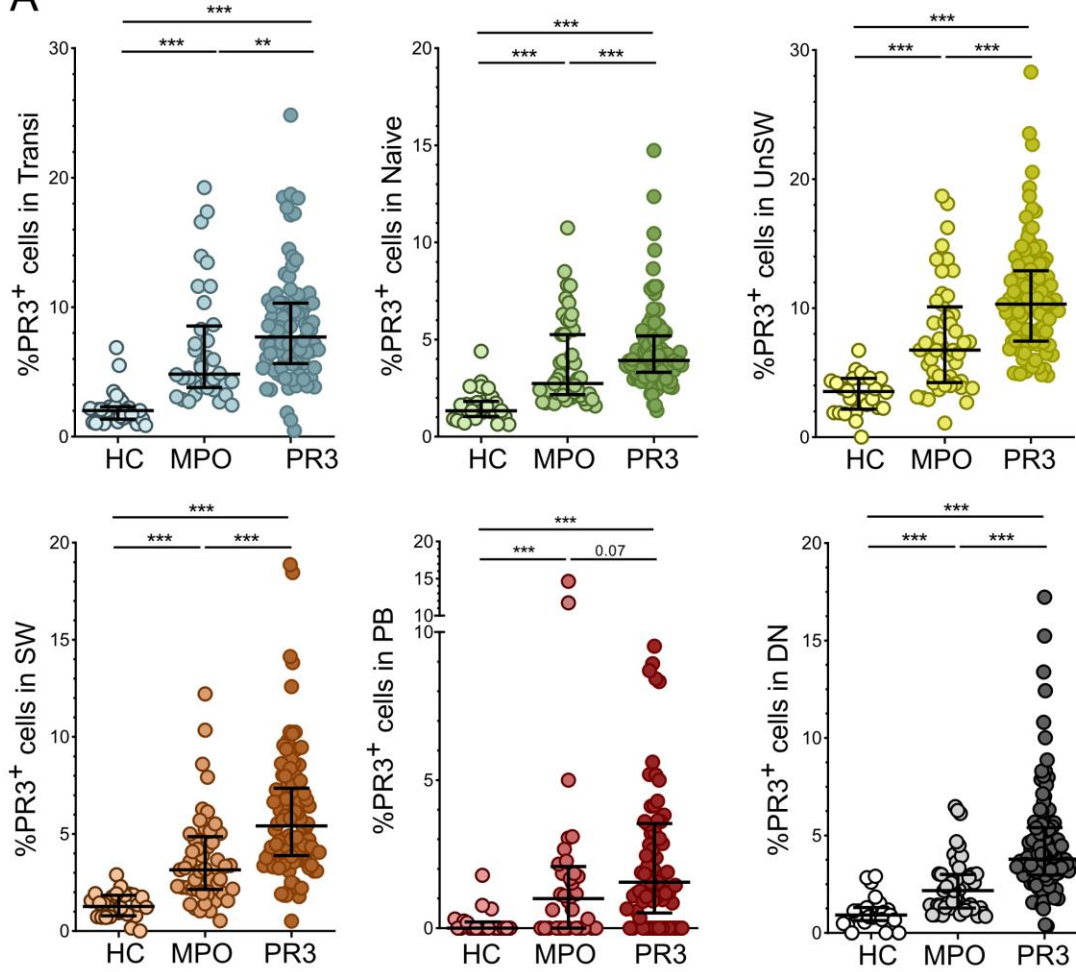


Figure 3. Frequency of PR3⁺ B cells within each B cell subset. Scatterplots depicting the frequency of PR3⁺ B cells within each B cell subset in HCs (n=27), MPO-AAV subjects (n=49), and PR3-AAV subjects (n=105) (A). B cell subset distribution within PR3⁺ pool in PR3-AAV and MPO-AAV patients and HC subjects (B). Data represent median (25-75% IQR). Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with Kruskal-Wallis test. P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test.

A



B

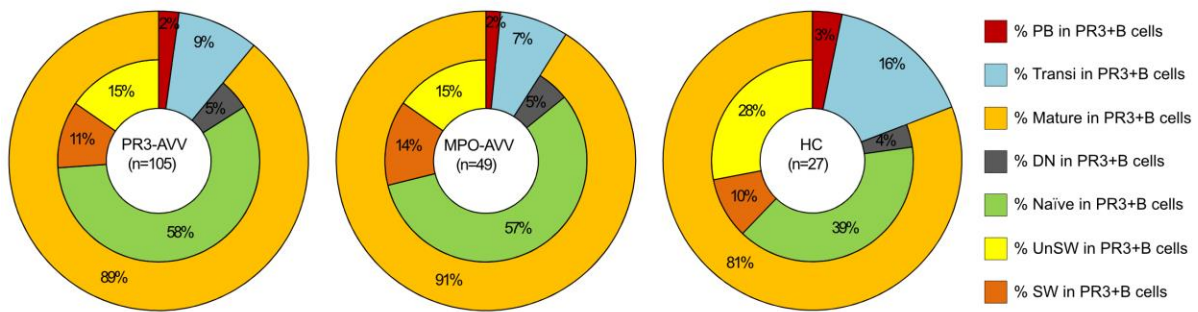


Figure 4. Selected PR3-reactive B cell clusters significantly more represented or activated in PR3-AAV patients. Six out of 200 clusters showed a stable expression of PR3 on the membrane of the B cells (A). A processed SPADE explanatory image of one PR3-AAV subject showing the most relevant clusters grouped by conventional subsets (B). In red, the six clusters of B cells with a stable increased reactivity for PR3 across all the samples, and their frequencies (C). The MFI of 4 out of these 6 clusters is reduced in AAV compared to HCs (D). Additional 5 clusters that significantly varied MFI between HCs and AAV: the MFI of clusters within the SW memory and PB are increased in AAV compared to HCs (E), and 2 clusters within the DN showed a relative MFI increase in PR3-AAV compared to MPO-AAV and HCs (F). A more conservative gating approach (PR3^{high}) (G, left), showing the increase of PR3^{high} B cells in PR3-AAV compared to MPO-AAV participants and HCs (G, central). Among B cell subsets, PR3^{high} B cells were significantly increased only in the DN subset in PR3-AAV participants compared to MPO-AAV participants and HCs (G, right). Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median with 25-75% IQR, each histogram represents mean (\pm SEM). P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test or Student's t-test, where appropriate. Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, where appropriate. P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test. MFI stands for mean fluorescence intensity.

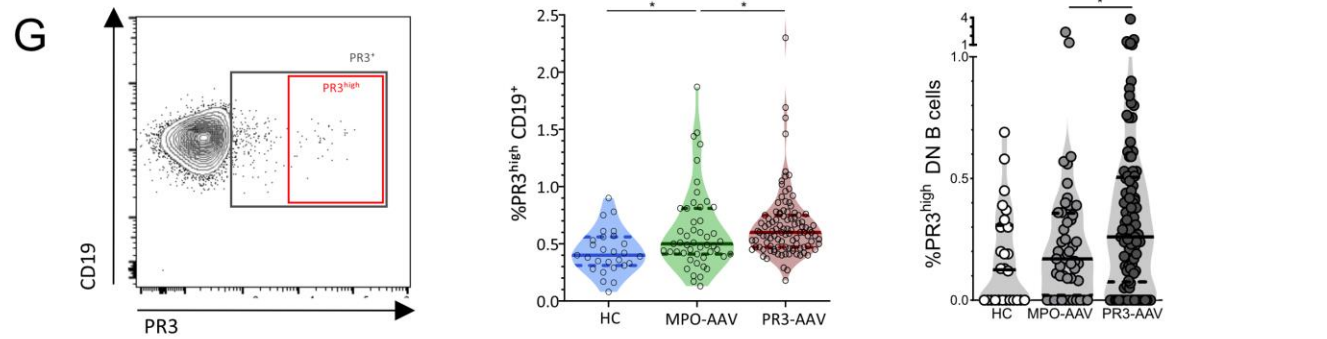
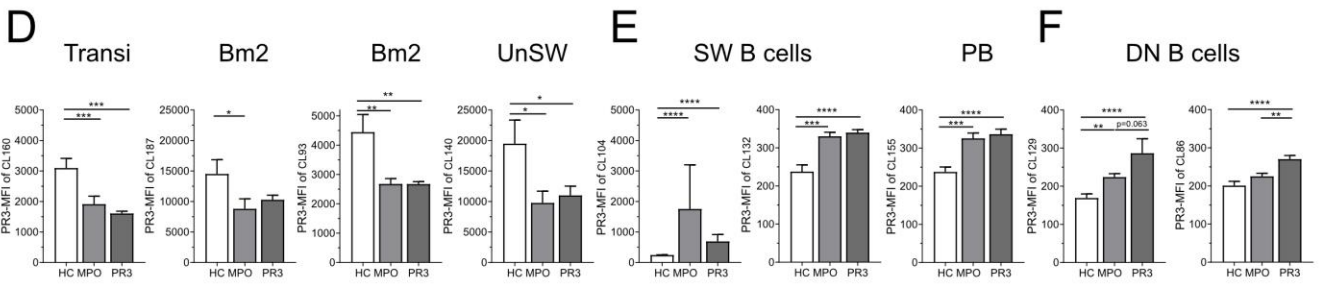
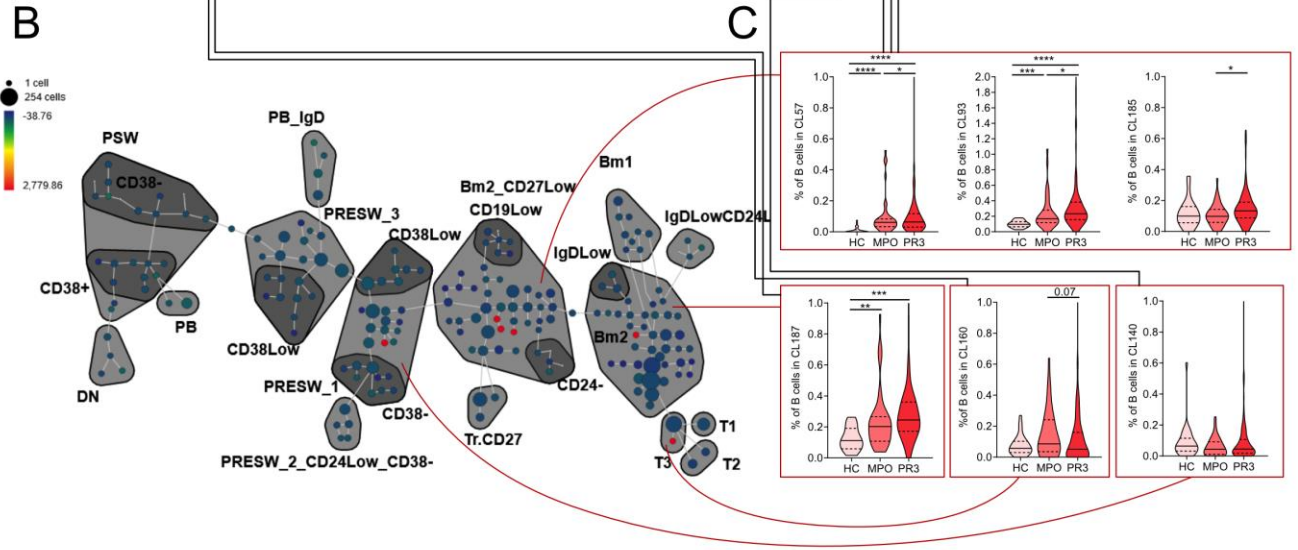
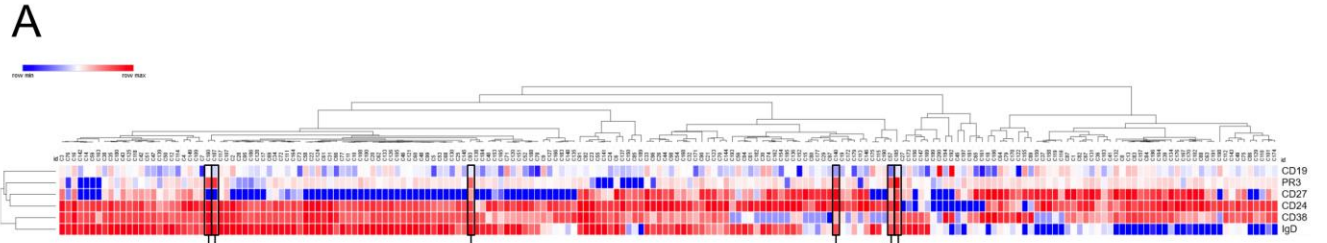
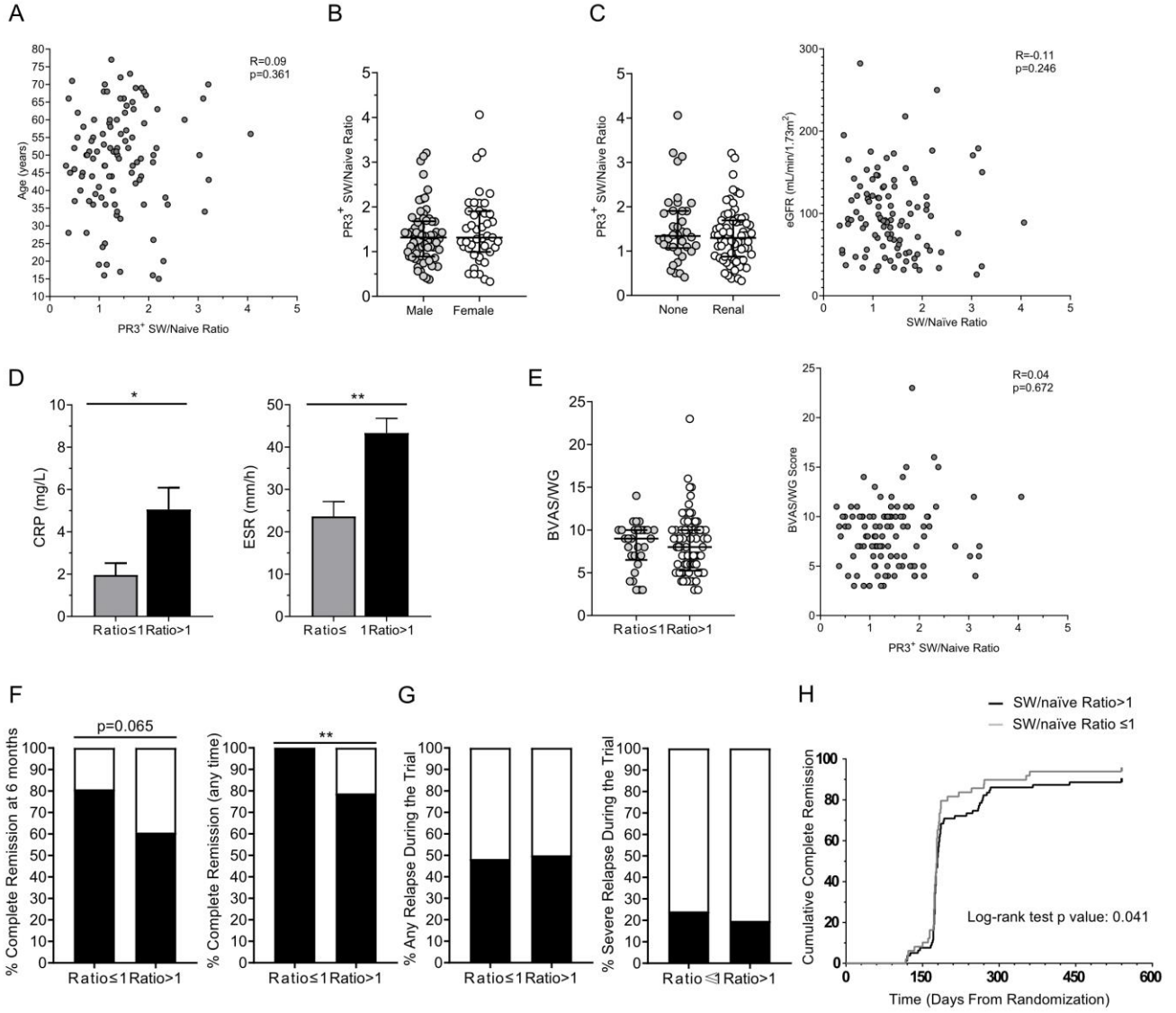


Figure 5. Maturation of PR3⁺ B cells among different participant groups.

Scatterplots depicting the different frequency of PR3⁺ B cells within each B cell subsets through the maturation process in HC subjects (n=27), in MPO-AAV (n=49) and in PR3-AAV participants (n=105). The multiple comparisons on B cell maturation were analyzed by using mixed-effects modelling. (A). Paired comparisons (Wilcoxon signed rank test) between PR3⁺ naïve and SW mature PR3⁺ B cells showing the enrichment of memory B cells in PR3-AAV, but not in MPO-AAV and HCs (B). Ratio between the frequency of PR3⁺ B cells among IgD⁻ switched memory and the frequency of PR3⁺ B cells among naïve B cells (C). Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median with 25-75% IQR. Selected cytokine (BAFF, CXCL13, IL-6) levels by SW memory/naïve PR3⁺ B cell ratio in PR3-AAV patients (D). Each histogram represents mean (\pm SEM). P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test or Student's t-test, where appropriate. P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test.

Figure 6. SW memory/naïve PR3⁺ B cell ratio and clinical manifestations in PR3-AAV patients. In PR3-AAV participants (n=105), SW memory/naïve PR3⁺ B cell ratio did not correlate with age (A), sex (B), or renal manifestations (C), but higher levels of CRP and ESR were associated with a ratio >1 (D). The ratio did not correlate with disease activity as assessed by BVAS/WG (E). Associations with complete remission definitions (F), future relapse and severe relapse (G), and time to complete remission (H) are represented. When evaluating associations with remission, the patients that underwent cross over (n=7) or experienced early treatment failure (n=6) during the trial time were excluded from the analysis.

Data represent median (25-75% IQR) in violin plot and mean \pm SEM in histograms. P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test or Student's t-test, where appropriate. Spearman's test the Kaplan–Meier method with the log-rank test was used to test correlations and time to event, respectively. P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.



SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1. Baseline features of patients with ANCA-associated vasculitis (AAV) and healthy controls (HCs) included in the study.

Characteristics	PR3-AAV (N=105)	MPO-AAV (N=49)	HCs (N=27)	p value
Age at study entry, media (SD)	48.7 (14.5)	59.0 (13.5)	53.9 (17.9)	0.0004*
Sex				0.0202*
Male, % (number)	59% (62)	37% (18)	41% (11)	
Female, % (number)	41% (43)	63% (31)	59% (16)	
Ethnicity				0.3023
White, % (number)	91% (96)	94% (46)	NA	
Black, % (number)	3% (3)	6% (3)	NA	
Hispanic or Latino, % (number)	5% (5)	-	NA	
Asian, % (number)	1% (1)	-	NA	
Clinical Diagnosis,% (number)				<0.001
GPA	97% (102)	33% (16)	-	-
MPA	3% (3)	65% (32)	-	-
New Disease at enrollment (vs relapsing disease), % (number)	42% (44)	78% (38)	-	<0.001
Any granulomatous manifestation, % (number)	76% (80)	35% (17)	-	<0.001
Any capillaritis' manifestation, % (number)	84% (88)	96% (47)	-	0.0363
Any renal involvement, % (number)	64% (67)	82% (40)	-	0.0259
Alveolar hemorrhage, % (number)	30% (32)	18% (9)		0.1133
Glucocorticoid treatment at screening, % (number)	54% (57)	59% (29)	-	0.6047
Baseline BVAS/WG score, mean (SD)	8.2 (3.3)	8.0 (3.1)	-	0.7351

ESR (SD), mm/1 hr, median [IQR]	33 [14.5; 56.5]	44 [15;77.5]	-	0.1414
CRP (SD), mg/L, median [IQR]	1.2 [0.35; 4.45]	1.2 [0.3; 3.025]	-	0.8521
Baseline eGFR (SD), mL/min/1.73 m ² , median [IQR]	92.0 [57.0; 127.6]	45.9 [30.1; 71.2]	-	<0.001
ANCA levels (normal <20 IU)				
MPO-ANCA	0.6 [0.3;1.1]	121 [56.9; 177]	-	<0.001
PR3-ANCA	258 [165.5; 346]	2.7 [1.4; 4.65]	-	<0.001
Randomized Treatment group				0.8629
Rituximab, % (number)	49% (52)	47% (23)	-	-
Cyclophosphamide/Azathioprine, % (number)	50% (53)	53% (26)	-	-

*One-way ANOVA: cut-off for p value interpretation after Bonferroni correction: **0,0167**

Abbreviations: ANCA=anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; BVAS/WG=Birmingham Vasculitis Activity Score for Wegener's Granulomatosis; CRP= C-reactive protein; ESR=erythrocyte sedimentation rate; eGFR=estimated glomerular filtration rate, by means the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equation; GPA=granulomatosis with polyangiitis; MPA-microscopic polyangiitis; MPO=myeloperoxidase; PR3=proteinase-3; SD=standard deviation; IQR=Interquartile range. P values are for the comparison of MPO-AAV and PR3-AAV groups.

Footnotes: *Capillaritis was defined as the presence of one or more of the following BVAS/WG items: cutaneous purpura, scleritis, retinal hemorrhage or exudate, sensorineural deafness, hematuria, red blood cell casts on urinalysis or glomerulonephritis, increase in creatinine level, alveolar hemorrhage, mesenteric ischemia, sensory peripheral neuropathy, or motor mononeuritis multiplex. In contrast, BVAS/WG items reflecting underlying necrotizing granulomatous inflammation included mouth ulcers, retro-orbital mass/proptosis, bloody nasal discharge, sinus involvement, salivary gland enlargement, subglottic inflammation, conductive deafness, other major or minor ear/nose/throat involvement, pulmonary nodule/cavity, endobronchial involvement, meningitis, and cord lesion. Patients were considered to have renal disease if any renal item on the BVAS/WG (hematuria, red blood cell casts or glomerulonephritis, increase in creatinine level, or "other") was scored. A patient was categorized as having alveolar hemorrhage only if that item was scored on the BVAS/WG. All other BVAS/WG items cannot be clearly attributed to either necrotizing granulomatous inflammation or capillaritis and were, therefore, not considered to categorize the patient one way or another.*

Supplemental Table 2. Glucocorticoid treatment at screening (before sample collection). Results are represented as median (25-75% IQR).

Subset of disease	GC	No GC	P values
PR3-AAV patients			
Lymphocytes # (10 ⁹ cells/L)	1.12 (0.72,1.69)	1.16 (0.89,1.65)	0.591
Lymphocytes (% of PBMCs)	25.31 (15.66, 34.61)	28.93 (19.66, 40.19)	0.129
B cells (cells/μL)	123.69 (66.63, 182.64)	102.94 (68.98,217.63)	0.940
B cells (% of Lymphocytes)	10.61 (5.43, 16.22)	10.2 (5.32, 15.60)	0.589
PR3 ⁺ B cells (cells/μL)	5.85 (3.33, 8.97)	4.69 (2.72, 10.12)	0.445
PR3 ⁺ B cells (% of B cells)	4.82 (3.92, 6.30)	4.55 (3.99, 5.59)	0.246
Tfh (cells/mm ³)	20.95 (10.14, 48.62)	20.75 (8.44, 46.62)	0.599
Tfh (% of CD4 ⁺ T cells)	3.58 (2.21, 4.88)	3.06 (1.83, 4.63)	0.144
MPO-AAV patients			
Lymphocytes # (10 ⁹ cells/L)	1.23 (0.93, 2.12)	1.25 (0.72, 2.33)	0.622
Lymphocytes (% of PBMCs)	25.57 (18.33, 34.64)	26.99 (19.89, 34.68)	0.504
B cells (cells/μL)	112.58 (56.22, 205.39)	118.92 (55.53, 236.65)	0.991
B cells (% of Lymphocytes)	8.43 (5.94, 17.87)	8.90 (6.07, 12.35)	1.000
PR3 ⁺ B cells (cells/μL)	2.74 (2.02, 8.34)	3.68 (1.61, 9.66)	0.801
PR3 ⁺ B cells (% of B cells)	3.13 (2.39, 5.04)	3.18 (2.72, 5.66)	0.569
Tfh (cells/mm ³)	27.52 (15.18, 48.50)	24.96 (10.21, 33.43)	0.411
Tfh (% of CD4 ⁺ T cells)	4.05 (2.23, 5.59)	3.63 (2.69, 5.36)	0.954

ANCA=anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; MPO=myeloperoxidase; PR3=proteinase-3; GC=glucocorticoids; IQR=Interquartile range.

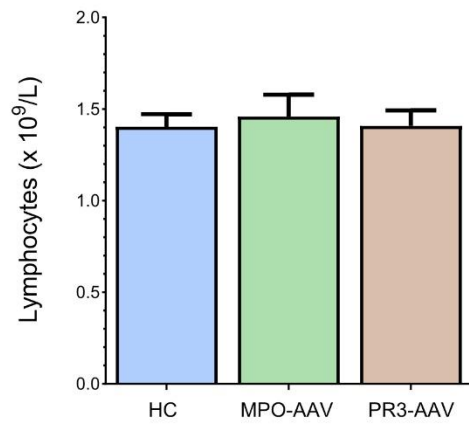
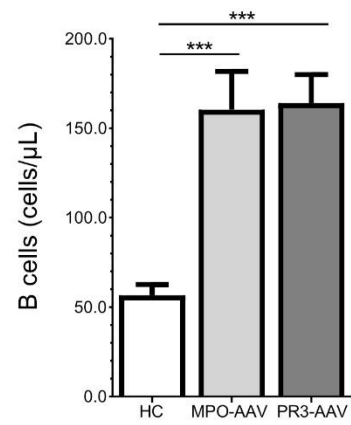
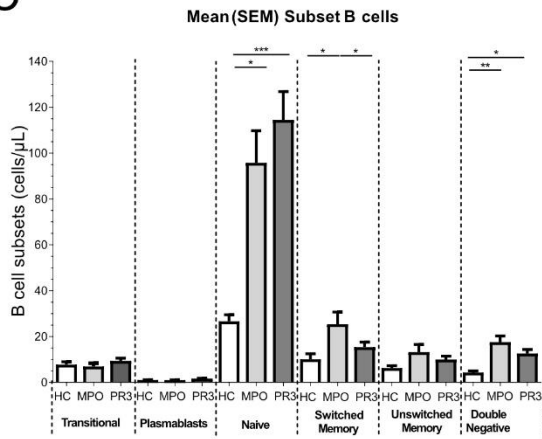
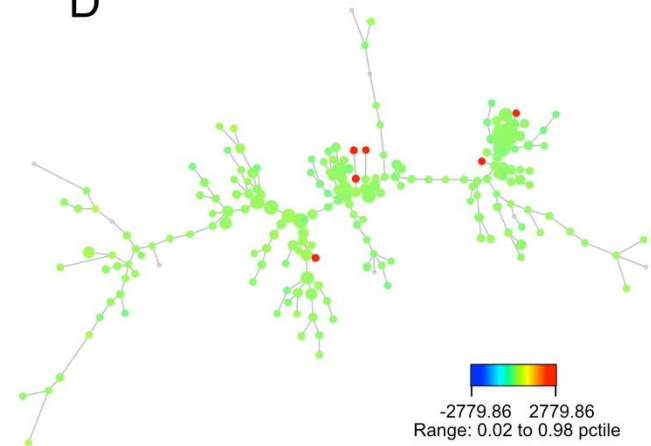
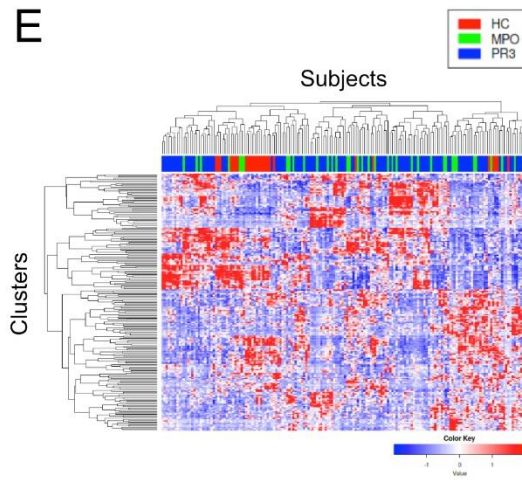
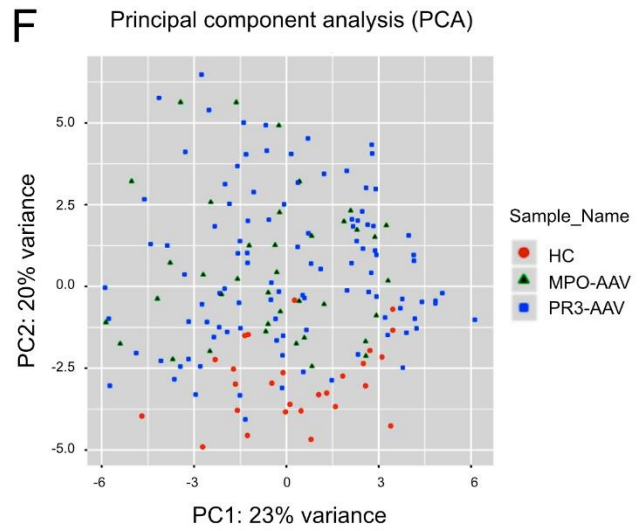
P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test.

Supplemental Table 3 Phenotypic characterization of selected PR3⁺ B cell clusters.

Cluster ID	Phenotype	Main Population
Stable Clusters		
CL 160	IgD ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high} CD27 ⁻	Transitional
CL 187	IgD ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁻	Bm2
CL 185	IgD ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{low} CD27 ^{low}	Bm2 CD27 ^{low}
CL 93	IgD ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ^{low}	Bm2 CD27 ^{low}
CL 57	IgD ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{low} CD27 ^{low}	Bm2 CD27 ^{low}
CL 140	IgD ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{low} CD27 ⁺	UnSW 1
Variable Clusters		
CL 104	IgD ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁺	PSW CD38 ⁺
CL 132	IgD ⁻ CD24 ^{low} CD38 ⁺ CD27 ⁺	PSW CD38 ⁺
CL 155	IgD ⁻ CD24 ⁻ CD38 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺	PB
CL 129	IgD ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁻ CD27 ⁻	DN CD38 ⁻
CL 186	IgD ⁻ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁻	DN CD38 ⁺

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplemental Figure 1. B cells and distribution of B cells among different subsets in HCs, MPO-AAV and PR3-AAV. Lymphocyte count (A), B cell count (B), and distribution of B cell count among the different B cell subsets (C). An explanatory example of the 200 B cell clusters obtained with SPADE (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events) in a PR3-AAV patient (D). Heat Map of the 181 patients (*x axis*, HCs in red, MPO-AAV in green and PR3-AAV in blue) showing the different expression of each one of the 200 B cell clusters (*y axis*) (E). Principal component analysis of the B cell clusters representing HC subjects, MPO-AAV and PR3-AAV participants (F). Data are represented as mean \pm SEM. Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA and P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ after correction for FDR with Benjamini and Hochberg test.

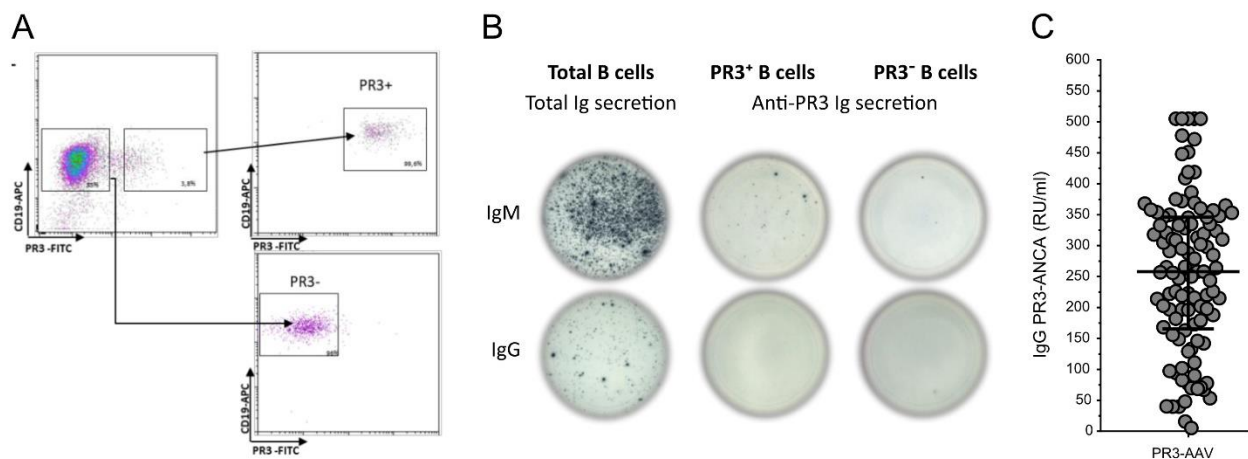
A**B****C****D****E****F**

Supplemental Figure 2. Circulating PR3⁺ B cells and PR3-ANCA production.

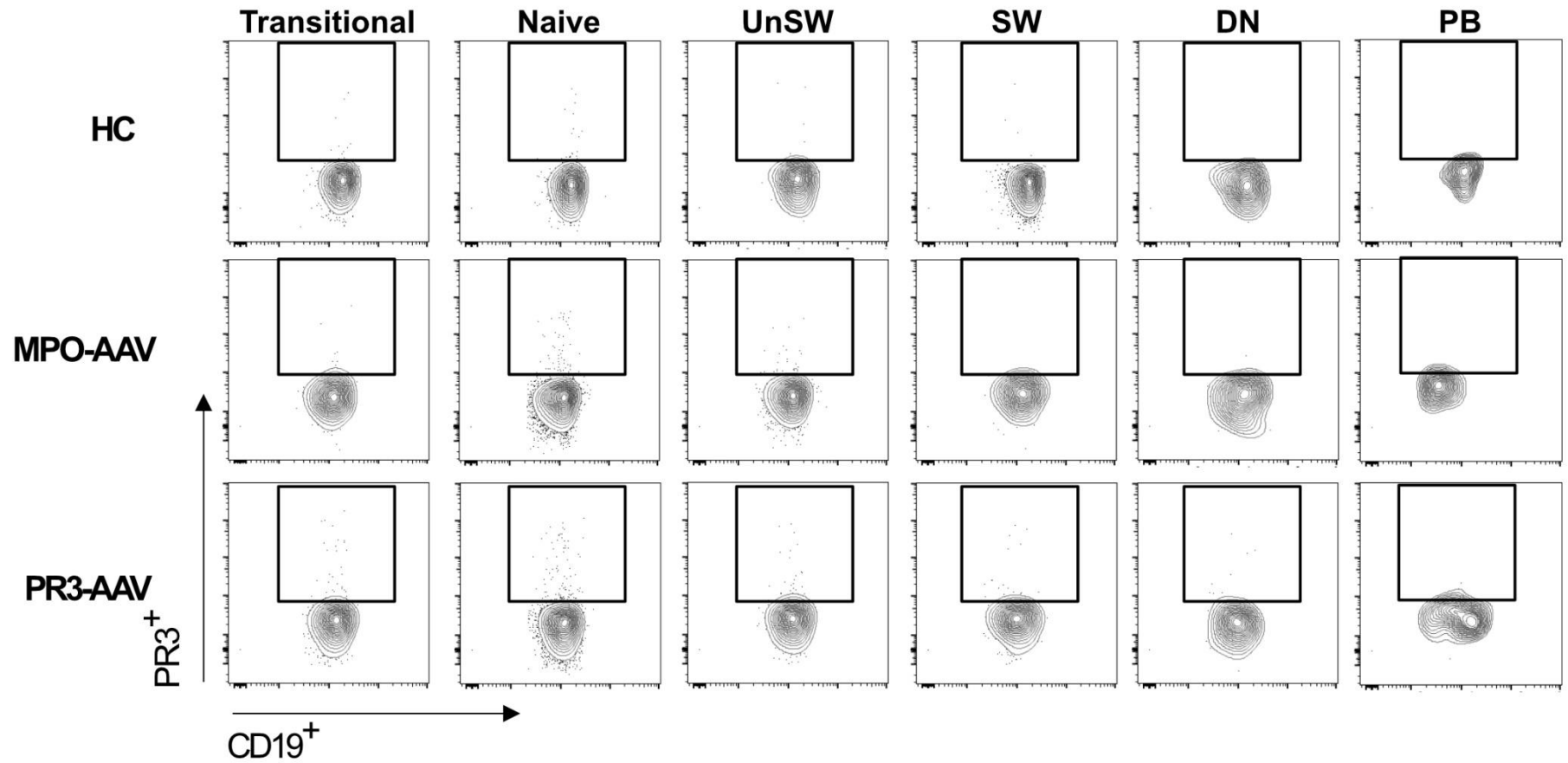
Purification of PR3⁺ B cells and PR3⁻ B cells for the ELISpot analysis in HCs (A). PBMCs isolated from a healthy subject were enriched for B cells by anti-CD19 antibody-linked magnetic bead selection. The B cell enriched fraction was FACS-sorted based on streptavidin expression to isolate PR3⁺ B cells and PR3⁻ B cells. Purity was 99% for PR3⁺ B cells and 96% PR3⁻ B cells, respectively.

Despite the production of total IgG and IgM by B cells (shown in B, left), PR3-ANCA IgM, but not PR3-ANCA IgG, can be secreted by PR3⁺ B cells (shown in B, central).

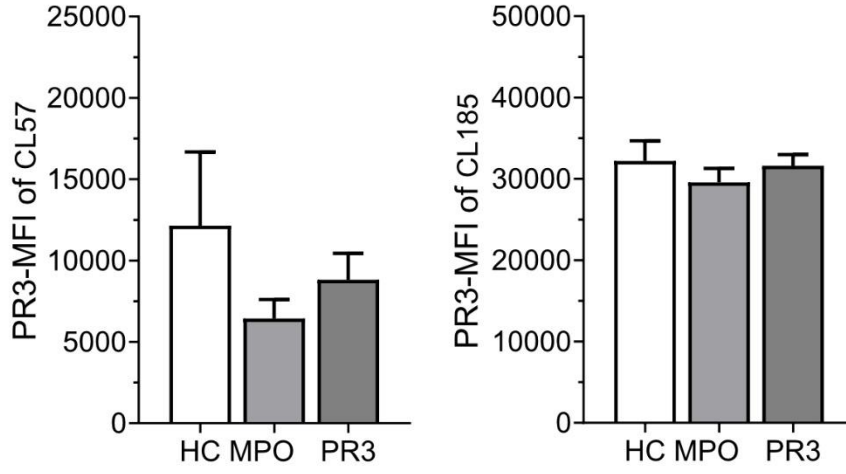
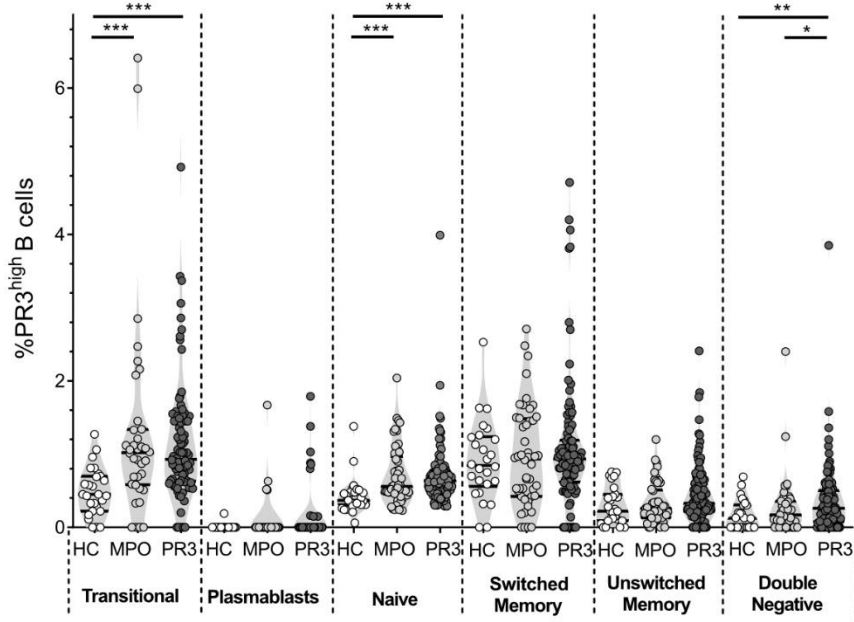
Circulating (*in vivo*) PR3-ANCA IgG in PR3-AAV participants by ELISA (C). P values were determined by 2-tailed Mann-Whitney test., P values in the figures are indicated as *** p < 0.001.



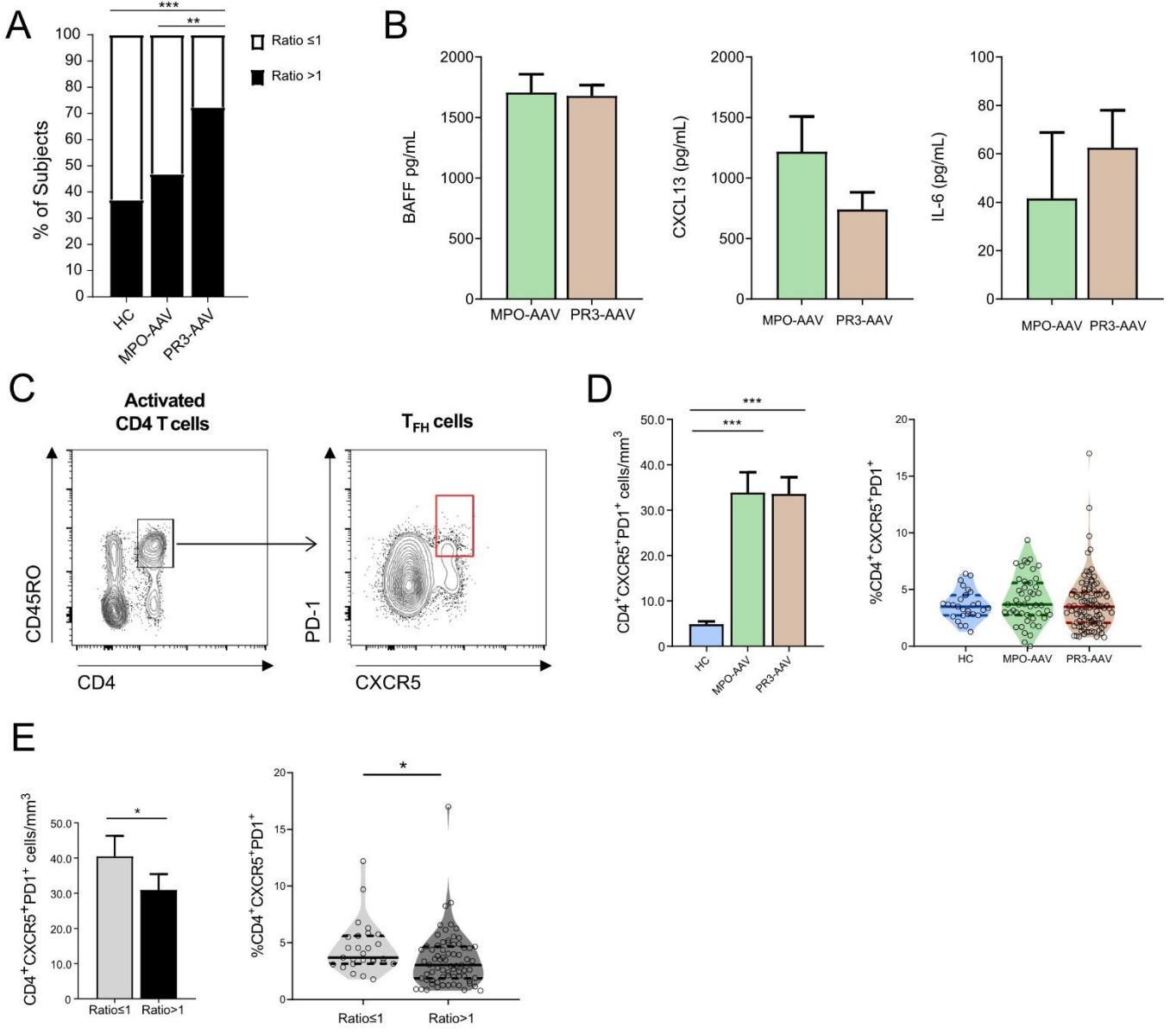
Supplemental Figure 3. Representative B cell subset plots of a HC subject, a MPO-AAV patient and a PR3-AAV patient. PR3⁺ B cells recognizing nuclear antigens were identified within each B cell subset in AAV and HC.



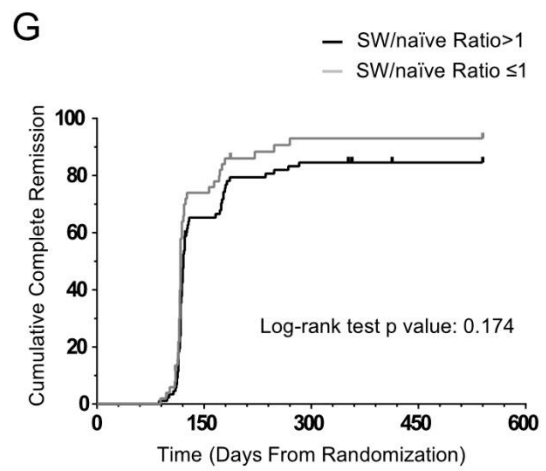
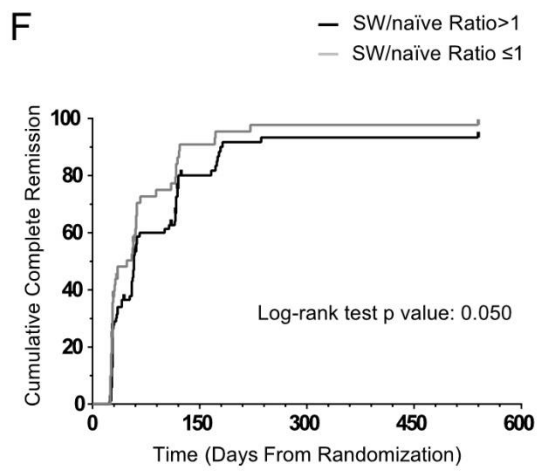
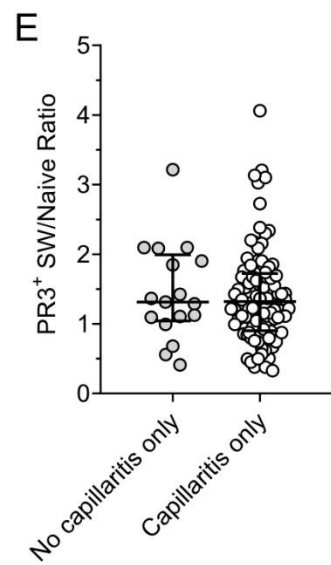
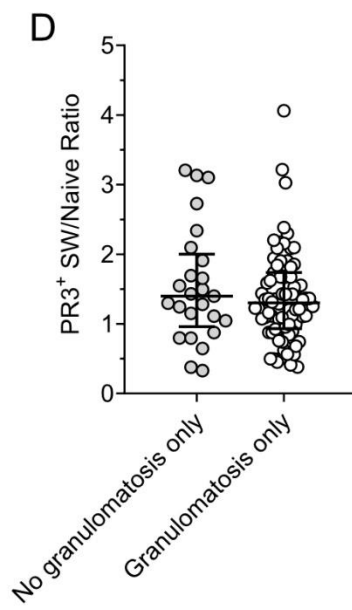
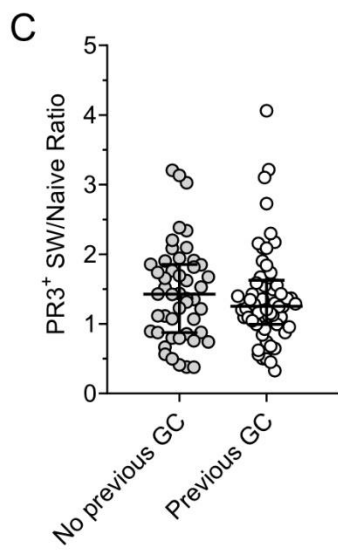
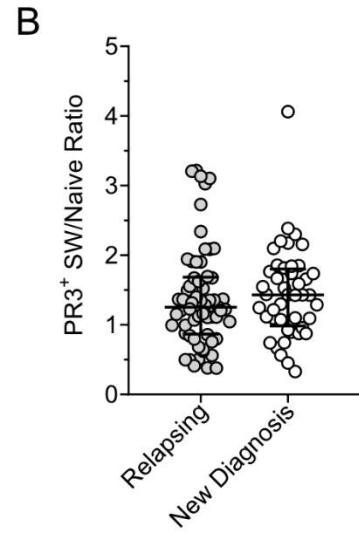
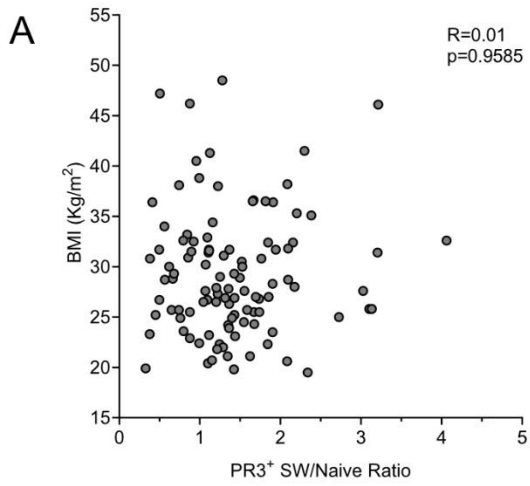
Supplemental Figure 4. Unsupervised clustering of circulating PR3+ B cells. Mean fluorescence intensity (MFI) of 2 out of 6 clusters with stable expression of PR3 across the samples (CL185 and CL57) (A), the others are represented in Figure 5. PR3^{high} B cell distribution in the B cell subsets (B); frequencies of PR3^{high} in transitional and naïve B cells are higher in AAV participants compared to HCs, but only the frequencies of PR3^{high} in DN B cells were higher in PR3-AAV participants compared to both MPO-AAV participants and HCs. Data represent median (25-75% IQR) in violin plots or mean \pm SEM in histograms. Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, where appropriate. P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ after adjustment for FDR as described by Benjamini and Hochberg.

A**B**

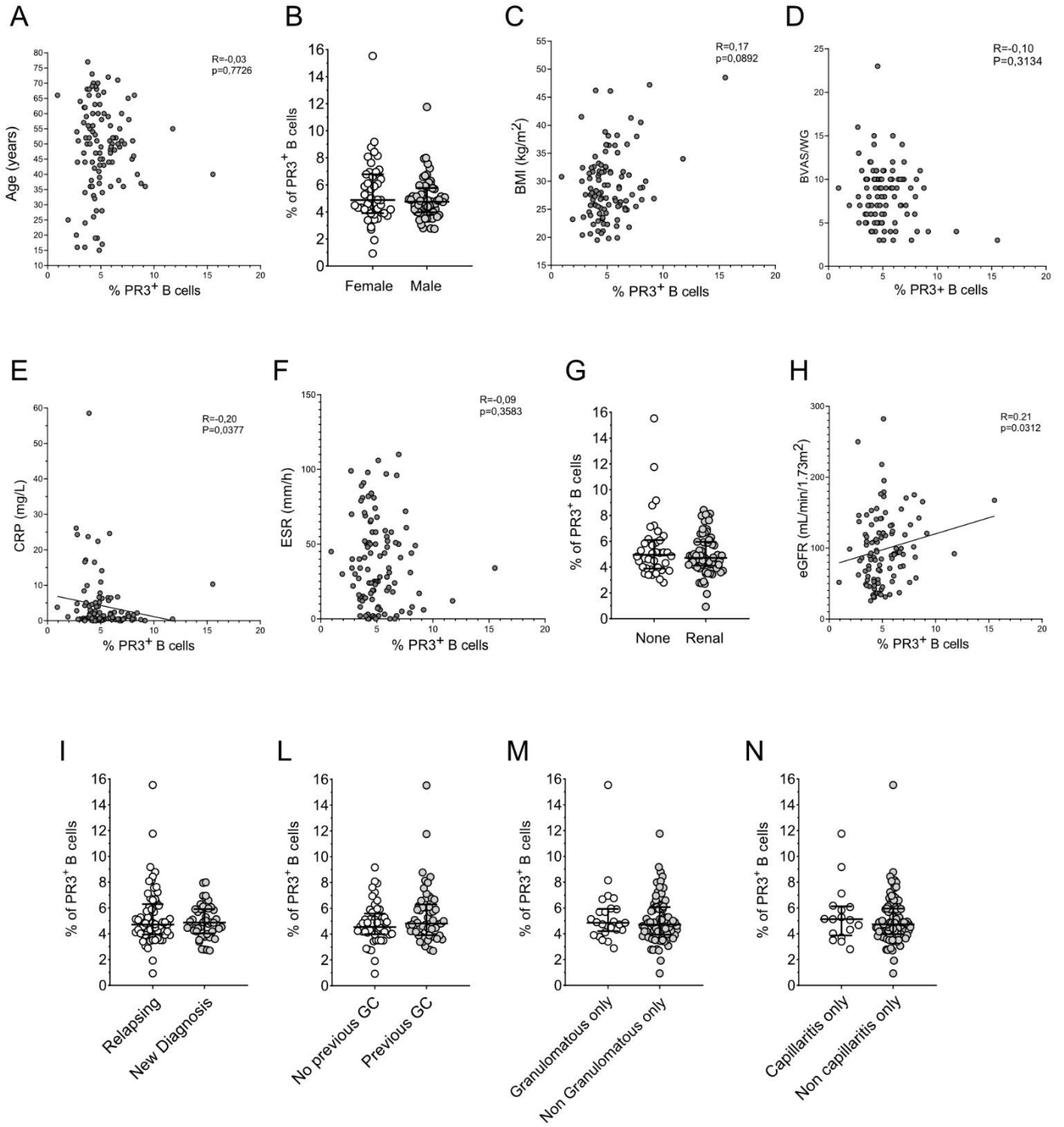
Supplemental Figure 5. Determinants of PR3+ B cell maturation. Frequency of AAV participants and HC subjects with a positive PR3+ B cell memory/naïve ratio (A). Levels of BAFF, CXCL13, IL-6 and in MPO-AAV and PR3-AAV participants (B). Gating strategy used for TFH identification (the reference population for the frequency is CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺PD-1⁺) (C), TFH cell count and frequency in HCs, MPO-AAV and PR3-subjects (D), and association of TFH higher levels with ratio < 1 in PR3-AAV participants (E). Each point represents the frequency in an individual subject; horizontal lines show the median with 25-75% IQR; each histogram represents mean (\pm SEM). Multiple comparisons between more than 2 groups were performed with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, where appropriate. P values in the figures are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ after adjustment for FDR as described by Benjamini and Hochberg.



Supplemental Figure 6. SW memory/naïve PR3⁺ B cell ratio and clinical manifestations in PR3-AAV patients. In PR3-AAV patients (n=105), SW memory/naïve PR3⁺ B cell ratio did not correlate with Body Mass Index (BMI) (A), relapsing versus new diagnosis (B), previous use of glucocorticoids (C), the presence of manifestations reflecting granulomatous disease only (D) or capillaritis only (E), as assessed by the BVAS/WG. The ratio did not correlate with disease activity as assessed by BVAS/WG (E). Time to first remission (BVAS/WG=0, any prednisone dose) (F) or time to complete response (BVAS/WG=0, prednisone dose≤10mg/day) (G) are represented. When evaluating associations with remission, the subjects that underwent cross over (n=7) or experienced early treatment failure (n=6) during the trial time were excluded from the analysis. P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001



Supplemental Figure 7. Frequency of PR3⁺ B cells and clinical manifestations in PR3-AAV participants. In PR3-AAV patients (n=105), frequency of PR3⁺ B cells did not show any meaningful correlation with age (A), sex (B), BMI (C), BVAS/WG (D), CRP (E), ESR (F), renal involvement (G) or creatinine clearance (H), relapsing versus new diagnosis (I), previous use of glucocorticoids (L), the presence manifestations reflecting granulomatous disease only (M) or capillaritis only (N), as assessed by the BVAS/WG. P values in the figures are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001





Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells

Alexis Grasseau¹ · Marina Boudigou¹ · Laëtitia Le Pottier¹ · Nedra Chriti¹ · Divi Cornec¹ · Jacques-Olivier Pers¹ · Yves Renaudineau^{1,2} · Sophie Hillion^{1,2}

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The innate B cell (IBC) population is heterogeneous and involved in the primary immune response. IBC functions include a high ability to produce natural antibodies with IgM isotype, the elimination of apoptotic cells, and a capacity to be cognate help to T cells. Among IBC subsets, B-1 cells and marginal zone B cells are the main producers of IgM, act as rapid immune responders that may relocate to follicular lymphoid and differentiate to cytokine and antibody-secreting cells shortly after infection. IBCs functions are highly dependent on their localization site and the nature of their B cell receptor repertoire, suggesting a high plasticity range of different immune responses. In this review, we will describe the nature and functions of the different innate-like B cell subsets, first in mice and then in humans. Besides this, we will emphasize the strong ability of these cells to undertake different protective functions from the first line of defense against pathogens to the regulatory role of the broader immune response.

Keywords Innate B cells · Effector functions · IgM · Autoreactivity · Regulatory B cells

Introduction

The immune system is classically divided into two separate branches. The more fundamental one, and referred to as innate immunity, is present in all eukaryote organisms. Its main function is to sense infections through germline molecular recognition in order to generate a protective response. The second branch is referred to as the acquired immunity or adaptive immunity and has appeared with jawed and jawless vertebrates during the evolution [1]. The main characteristic of the acquired immunity is to harbor a clonal antigen (Ag) receptor that is generated from a specific mechanism involving chromosomal DNA rearrangements to specifically recognize the pathogen [2]. Jawless fishes (lampreys) possess primary lymphoid organs including a thymus, but they lack secondary lymphoid organs (spleen and lymph nodes) explaining why T and B cell-like cells harbor clonally variable lymphoid

receptors (VLR) generated through DNA rearrangement during the lymphocyte ontogeny. The VLR B protein is expressed on the surface of the B cell-like cells from lampreys and can be secreted following stimulation [2], evoking the ancestor of the B cell receptor (BCR). The VLB protein is secreted as a pentamer, which suggests that IgM might be the primordial antibody class. Later on, during evolution, acquired immunity gained in specificity due to elaboration of its selection and memory programs within secondary lymphoid organs. B cells from the ectotherm family (e.g., lizards, snakes) have conserved their capacity to phagocytize different pathogens underlining the common origin of B cells and myeloid cells, whereas this capacity is lost in mammals [3, 4]. Innate functions are provided by specialized immune cells such as cells from the myeloid-derived lineage, which have not acquired the memory capacity. Myeloid functions include rapid and localized responses in tissues, the ability to clean up dead cells in a process known as efferocytosis, an elevated phagocytotic capacity, and the ability to provide cognate help to T cells.

Growing over the past decade, new insights regarding the functional heterogeneity of the two systems have allowed rethinking of how the multi-layered immune responses are articulated. The recent description of innate lymphoid cells (ILCs) has further contributed to provide substantial pieces of evidence showing that different lymphoid cells participate in the time-sequential shift from an innate to acquired immune response. As a consequence,

Alexis Grasseau and Marina Boudigou contributed equally to this work.

✉ Sophie Hillion
sophie.hillion@univ-brest.fr

¹ UMR1227, Lymphocytes B et Autoimmunité, Université de Brest, INSERM, CHU de Brest, BP824, F29609 Brest, France

² Laboratory of Immunology and Immunotherapy, CHU Brest, Brest, France

this modifies the dogma of functioning of the two systems. Together, new insights from comparative and developmental immunology bring us new perspectives for understanding the complexity of the immune response; through the observation of the compartmentalization of the immune system into components that change rapidly or disappear during evolution and those with a strong selective advantage that were conserved throughout the evolution.

Among lymphoid cells, arguments are accumulating to consider that B cells have conserved innate functions during their evolution. To this end, this review will describe the characteristics and functions of innate-like B cells (IBCs) first in mice and then in humans. In addition, we will highlight new insights into the biology of this subset shedding light on the strong plasticity of these cells to undertake different protective functions at the crossroad between innate and adaptive immunity.

Mice IBCs Family

B1 and MZB

Among the IBC family, two major B cell subsets have emerged and have been extensively described in mice. The first subset is referred to as B1 cells that reside in the serous cavities and can be dichotomized into B1a and B1b cells based on the expression of the plasma-membrane molecules CD5 and CD45RA [1]. The second subset, called marginal-zone B cells (MZB), was first described in the marginal zone of the spleen. Both subsets possess unique and shared properties and play a crucial role in the primary immune response.

One of the characteristics of B1 and MZB from mice is their expression of invariant or semi-invariant BCR [5]. Those receptors recognize mostly non-protein antigens, such as phospholipids, or carbohydrates shared by many pathogens as well as by the host [6, 7].

IBCs repertoire appears to be not only restricted to autoreactive germline-encoded elements but arise also from a selection process. Such an assertion came from the observation that BCR of IBCs producing antibodies directed against blood-group antigens are not germline-encoded immunoglobulins but result from a selection process in response to commensal bacteria [2]. More recently, a subset of IgM⁺ naïve B cells that recognizes the algal protein phycoerythrin (PE) was described in the spleen of Igh^b mice. Those PE-specific B cells were restricted to a single expression of the immunoglobulin variable heavy chain (V_H1-81) and these cells have conserved their capacity to differentiate into IgM⁺ producing plasma cells, which supports the possibility that exo-antigen could also participate to the selection process of the pre-immune repertoire of IBCs [8]. As a consequence, IBCs constitute a strong and protective local

defense against infection. However, the counterpart to the use of germline-encoded V segments is their potential self-reactivity as demonstrated for anti-type II collagen-specific IBCs in autoimmunity [9]. These autoreactive B cell clones are associated with a pathogenic response in patients with rheumatoid arthritis [10, 11] uncovering the ambiguous role of IBCs in the immune system.

Nevertheless, in most cases, IBCs possess a unique BCR recognition signature, which suggests that a positive selection step is critical during IBC development. In this regard and when forcing expression of different canonical BCR during the B cell ontogeny, IBCs are able to differentiate into new lineages from which the BCR has been generated [12–15]. These observations raise fascinating questions about the control of central and peripheral tolerance. In other words, the selection of IBCs for self-reactivity seems contrary to the dogma of the strict discrimination between self and non-self. One major challenge to the persistence of those autoreactive clones is their potential to increase their BCR affinity through somatic hypermutation (SHM) and class switching by recombination. However, murine B1 and MZB do not seem to undergo extensive SHM and the main reason is related to the fact that the antigen sequestration occurs away from the T cell area and germinal center [16]. Again, such an assertion is not absolute as recent studies have clearly demonstrated that a single clone of autoreactive B cells can generate autoreactive and peripheral germinal center producing clones of B cells targeting other self and non-self-antigens [17].

How are autoreactive IBCs restricted? Such a question is based on the broad observation that IBCs express a large panel of inhibitory receptors that may fine-tune the threshold of antigen-BCR signaling necessary for selection. B1 cells express the T cell marker CD5, while B1b and MZB express the myeloid marker CD11b and Fc receptor-like (FcRL)-5 known to restrict the BCR response through the recruitment of the Src homology protein tyrosine phosphatase (SHP-1) and may serve as a gatekeeper to an exacerbated response [18]. Although B1 cells are suspected to be anergic based on the expression of the CD5 molecule [19], B1 and MZB are not intrinsically anergic and one of the main arguments for that is the reported high level of cell surface IgM and the low level of cell surface IgD. Furthermore, it is hardly expected that natural autoreactive IBCs are anergic cells since different studies have demonstrated that those cells are able to respond rapidly and efficiently to foreign pathogens [20]. B1 cells and MZB are both activated following several types of infections through both Ag-specific and non Ag-specific processes suggesting that IBCs activation is not restricted to the engagement of BCR but may occur from BCR-independent signals such as Toll-like receptors (TLR) and cytokines receptors [21–23]. The strong inter-dependence between IBCs and their micro-environment supports an important role of the extracellular factors to control IBC survival and activation. In this regard,

B1 cells have the capacity to adapt to tissue-specific signals inducing a unique phenotypic and functional imprint [24, 25]. Nevertheless, the interconnection between IBC ontogeny and the natural B cell autoreactivity remains to be solved, probing which specific mechanisms of selection and activation are required to confer a broad natural response without triggering acute autoimmune responses.

The Protective Functions of IBCs

Natural IgM Production

The Nature of the IgM-Producing Cells One and if not the main contribution of IBCs in the immune system is to produce and secrete natural non-switched IgM antibodies. Expression and secretion of IgM is one of the most ancestral attributes of B cells. This capacity has been highly conserved during the evolution and this can be explained by the fact that natural IgM is particularly effective in removing auto-antigens from the circulation [26]. Both polyclonal and some monoclonal IgM Abs enhance the clearance of apoptotic components from dying cells [27] mainly through a complement-dependent mechanism. When bound, IgM is an early recruiter of C1q that activates the classical complement pathway and promotes opsonization by phagocytes. This was demonstrated in mice deficient in serum (s)IgM, as these mice showed reduced apoptotic cell clearance and C3 cellular deposition, similar to C1q deficient mice [28]. It has been recently proposed that B1a and MZB are the two main B cell actors involved in the clearance of apoptotic cells and participate in the elimination of a significant source of neoantigens [29].

B1 cells produce polyreactive and low avidity IgM antibody during infections including respiratory viral infections explaining why they are locally distributed within the respiratory tract epithelium but also present in the lymph nodes within regional and non T cell areas [20]. B1 cell development is auto-regulated by the production and secretion of natural IgM as mice unable to secrete IgM develop an impairment of B1 cell generation in the body cavities [30]. The accumulation of B1 clones in lymph nodes but outside T cell areas supports a role for these cells to the generation of high-specific response in germinal centers by providing antigen accessibility to T cells or to specific B cells, referred to as B2 cells.

Although B1 cells are the primary source of natural IgM, this fundamental function is not restricted to this particular subset of B cells [31]. Some authors have proposed that B1b (CD5 neg, CD45 low) rather than B1a (CD5 pos, CD45RA intermediate) are more critical for natural IgM production [32]. Furthermore, the contributions of other tissue-localized IBCs (MZB and B1 cells from the spleens) have also been incriminated. This increases the complexity of defining a unique natural IgM-producing B cell population. Such diversity is retrieved at the molecular level as

splenic B2 cells, B1 cells, and B1-derived plasma cells are all dependent on the transcription factor B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) expression for IgM and IgG3 production [33], while natural IgM production by B1 cells can occur independently of Blimp-1 in both bone marrow and in the peritoneal cavity.

During *Ehrlichia muris* infection, in the mantle zone of the spleen and in the bone marrow, MZB elicits the generation of IgM memory B cells harboring the myeloid integrin CD11c and expressing the T cell-associated transcription factor (T-bet) (Fig. 1, Table 1) [36, 37, 39]. In addition, the spleen CD11c⁺ T-bet⁺ IgM memory B cell subset expresses at its plasma-membrane the C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR-4) for CXCL12 (also known as SDF1), the transmembrane activator and CAML interactor (TACI, also known as tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B [TNFRSF13B]), and CD73 an ecto-5'-nucleotidase. For the IgG antibody response, the CD11c⁺ T-bet⁺ IgM memory B cell subset needs contact with T cells and IL-21 signaling as reported upon antigen challenge in lymph nodes [38]. In addition to the secretion of antibodies, CD11c⁺ T-bet⁺ B cells are potent antigen presenting cells to T cells and this is possible due to their localization at the T/B cell border in the spleen and the expression of the chemokine receptor CCR7 [40]. This observation is consistent with several reports suggesting that CD11c and T-bet expressing B cells may be a decisive subset in autoimmunity in mice [41] and also in humans [42].

Molecular Mechanism Controlling the IBC-Dependent Ig Production One major question arising is: What is related to the molecular mechanisms controlling T cell-independent activation and antibody production in IBCs? To this end, cytokines, as well as direct cellular interactions, could provide classical and alternative pathways leading to rapid production of antibodies associated or not with class-switching recombination. Using Blimp-1-GFP mice, in-depth sequencing analysis of the transcriptional program of antibody-secreting cells from distinct B cell subsets, including IBCs, based on their location and maturity stage has revealed a tissue-specific program necessary for the B cell differentiation [43]. Although a core transcriptional signaling is conserved between plasmablast and plasmocytes (PC) from the spleen and bone marrow-resident PC, a specific network has been underlined between the different compartments showing the key role played by chemokine receptors and cell adhesion molecules. However, the common and natural IgM antibody-secreting cell signature from IBCs remains to be defined, challenged by the complexity of the different origins of natural Ab-producing cells.

Collectively, the different steps involved in the generation of IgM⁺ memory B cells or IgM-producing cells from IBCs is still an open question and may be highly dependent on (1) the

Table 1 Extended phenotypes of innate B cells in mice to complete Fig. 1

	Reference	B220	CD19	CD5	IgM	IgD	CD21	CD23	CD43	CD1d	CD11b	CD11c	CD73	CD38	CD138	TAC1	CXCR4	CXCR3	PD-L2
CD5 ⁺ CD1d ^{hi} IL10 ⁺	[34]	lo	+	+	+	lo	lo	lo	+	hi	±								
CD5 ⁺ CD1d ^{lo} IL10 ⁺	[29]	lo	+	+	+	lo	lo	lo	+	lo	++								
LAG-3 ⁺ CD138 ^{hi}	[35]	lo	+	+	+	lo	+	lo	lo	hi	lo			hi			+		+
CD11c ^{lo}	[36]	lo	+	-	hi	lo	+	+	+	hi	+	lo		hi		+			
CD11c ⁺ T-Bet	[37]	+	hi	-	hi	lo	lo	lo	hi	+	+	+		++	+	hi			+
IgM memory CD11c ⁺ T-Bet	[38]	+	hi	hi	hi	±	lo	+			hi	+	hi	-	+	+			+

stimulatory antigen; (2) the tissue localization of the activation; (3) the interplay with other immune cells; and (4) canonical and non-canonical intrinsic molecular mechanisms.

Initiation of a Class Switch-Specific Immune Response

In addition to their capacity to promote an effective and protective response to infection by a steady-state production of polyreactive IgM antibodies, IBCs are also able to develop specific class-switched responses in secondary lymphoid organs. This is particularly true for MZB that could undergo class-switching through a strict metabolic program [44] [45]. MZB produce IgM but also class-switched IgG and IgA antibodies mainly in response to commensal antigens [21]. It is the chemical nature of the antigen that locally regulates the immunoglobulin production and drives the T-dependent or T-independent pathway for antibody production [46]. Some antigens could induce MZB activation and CXCR5 upregulation, necessary for MZB relocation into the follicular area rich in T cells [47]; [48]. One general explanation may, on one hand, be that T cell-independent antigens stimulate MZB to proliferate and produce IgM and class-switched antibodies without forming germinal centers whereas, and on the other, T cell-dependent antigens most likely induce MZB cell migration into the follicles [49]. However, the exact role of MZB in generating a GC reaction is still under investigation.

Additionally, MZB possess a strong propensity to interact with other immune cells and, in particular, to promote T cell-dependent responses within the spleen. It was demonstrated that dendritic cells expressing CLE4A4 selectively stimulate rapid IgG1 but not IgM production from MZB [50]. In humans, the newly described neutrophil and B cell helper subset (NBH) promotes MZB activation by presenting a higher expression of B cell stimulating molecules such as BAFF, APRIL, IL-21, and CD40L, than do classical neutrophils, leading to IgM production but also allowing class-switching recombination to IgG2 or IgA [51]. MZB have been demonstrated to closely interact with natural killer (NK)-T cells through the expression of CD1d [52]. CD1d-restricted glycolipid antigen ligands are present on the surface of *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, and *Sphingomonas species* [53, 54]. This interaction promotes an early wave of response to bacterial and viral pathogens [55]. The relationship between MZB and innate lymphoid cells (ILC) has been recently explored and it was demonstrated that mouse ILC3 express APRIL enhancing a T cell-independent IgG3 response from MZB [56].

Regulatory Functions of IBCs

The link between IBCs and B cell regulatory functions has been continuously suggested since the first appreciation of the B cell capacity to control the immune response (Fig. 1, Table 1) [57].

One of the primary functions of IBCs was related to the control of the immune response by different means. First, IBCs possess intrinsic regulatory functions mediated by their natural capacity to produce IgM at a steady state or following activation. Second, IBCs can exercise regulatory functions through the release of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 upon stimulation. Third, IBCs are also able to control the inflammatory response [58].

Regulatory Functions of IBCs: Activation Pathways One crucial question remains related to the necessity or not of a BCR engagement in the natural regulatory functions of IBCs is not well understood. Indeed, there are arguments to consider that part of the regulatory functions of IBCs is not strictly dependent on antigen stimulation via an engagement of the BCR. Accordingly, some studies have related a TLR pathway rather than an antigen-specific BCR activation pathway of IBCs leading to their redistribution in secondary lymphoid organs in order to regulate polyreactive IgM IBC production at the site of infection [22]. Support for such an assertion was observed during influenza infection in mice with IBCs that can rapidly migrate from local niches to secondary lymphoid organs following a type-I interferon stimulation and CD11b integrin cell surface expression in response to a TLR pathway activation [25]. This observation has also been reported during *tetanus toxoid (tet)* vaccination in humans. It was shown that specific staining of circulating antigen-specific B cells following *tet* vaccination revealed 6 days after vaccination the induction of two distinct plasmablast subsets. Indeed and along with the increase of the antigen-selected *tet*-positive CD38 high plasmablast, the authors have demonstrated the emergence of a second and non-specific (*tet*⁻ IgM⁺) plasmablast subset, which represents more than 60% of the entire plasmablast population. A complex phenotypic signature characterizes this bystander subset with moderate expression of CD138 (syndecan-I), HLA-DR, and CD126 (IL-6 α Receptor) but an increased expression of CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4). Although this study did not formally identify the nature of this non-specific plasmablast subset, the authors highlighted that those cells expressed a reduced expression of Blimp-1 suggests an innate origin [59].

On the other hand, different types of infections have demonstrated the induction of Breg cells arising mostly from IBCs that suppress harmful Th1 or Th2 responses in an antigenic non-specific manner [34, 60, 61]. Although the final phenotype of this Breg subset differs from one experimental model to another, and this is continually debated, such studies have, however, demonstrated that the greater part of the initial B cell origin is related to IBCs. As an example using IL-10-EGFP reporter mice, the dominant IL-10 producing B cell subset in the spleen of infected mice with *Schistosoma mansoni* is composed of MZB [61] whereas others have suggested that B1 cells were

involved [62]. It is highly likely that these two IBC subsets are crucial in the control of infection in mouse models [63]. This raises the possibility that innate Bregs could emerge from distinct IBC subsets (e.g., B1 and MZB) and perhaps from all of them during an immune response with specific attributes depending on (1) the nature of the antigen, (2) the localization of the response, and somehow (3) genetic and epigenetic factors that have not yet been elucidated. To summarize, we can consider that IBCs exert their regulatory functions at the crossroad of promoting a protective response in order to preserve the organism from exacerbating responses, and through recruitment activation and control of the antigen-specific response.

Innate Versus Regulatory Functions of IBCs Innate B cell functions and regulatory functions of IBCs are often examined separately but they represent the two sides of the same coin. Infectious models represent a robust and pertinent approach to evaluate the interplay between innate and regulatory functions in IBCs. Among them, the mouse model infected with the *Salmonella enterica serovar typhimurium* (STm) gram-negative bacterium infection has been well studied and provides interesting information regarding the innate properties of IBCs. STm has the capacity to introduce a specific bacterial effector protein into the host cytosol via a specific system, the Salmonella type III secretion system (TTSS) that can infect most immune cell types. In this model, IBCs were described as a significant partner in the generation of a protective response against Stm and this response depends on the nature of the bacteria (virulent or attenuated). Recently, a study demonstrated that a STm-attenuated infection induces rapid plasmablast production independent of the formation of germinal centers, supporting a T cell-independent activation of germline B cell clones. The authors demonstrated that the IgM-producing cells were present at 4 days post-infection, while IgG reaches a maximum 18 days post-infection. One interesting finding is that almost 95% of plasmablasts generated during the primary response possess a very poor ability to bind Salmonella antigens, suggesting no or a very low affinity for the antigen [64]. In this study, the authors propose an exciting concept where first an innate signal was generated leading to a burst of low-specific IBC expansion in response to Salmonella infection. This initial response is followed by a second and more-specific response dependent on germinal center-dependent somatic hypermutations taking place at extra-follicular sites in specific patches. This finding supports the view that engaging extremely low affinity or polyreactive IBC cells in early and primary response achieves a high potential of generating a rapid protective response that perfectly fits with the IBCs' fate. Another key conceptual observation involving regulatory IBC functions and performed in *Salmonella* infection mouse models comes from the ability of the pathogen to subvert the regulatory IBC response to its

advantage. This was demonstrated in mice lacking the capacity to produce IL-10 as these mice are significantly more resistant to death after infection as compared with wild type mice, supporting the notion that IL-10 production from lymphoid cells including regulatory IBCs may be a critical process for the survival of bacteria [65]. The IL-10 immunosuppressive role of B cells in infection was thus confirmed to be dependent on TLR signaling since mice lacking MyD88, the canonical adaptor for inflammatory signaling pathways downstream of TLR, in B cells became resistant to lethal infection [66] while B cells have conserved their capacity to produce a normal antibody response [67]. This paradoxical observation is due to the absence of the MyD88 signaling pathway in B cells leading to a defect in the IL-10-dependent B cell regulatory function of controlling neutrophil, NK cell, and inflammatory T cell accumulation at the site of bacterial replication. From additional studies, this group formally identified surface IgM⁺ CD138⁺ TACI⁺ CXCR4⁺ LAG3⁺ plasmablasts as the critical player inhibiting anti-*Salmonella* immunity during the early course of the infection through the release of two anti-inflammatory cytokines, IL-10 and IL-35 [35, 68]. In this latter study, the authors demonstrated that an intense burst of IL10⁺ IgM⁺ plasmablasts was generated several hours after infection, and decreased after 8 days reflecting the archetype of the primary humoral response. Epigenome-wide and repertoire analyses have further established the origin of these regulatory plasmablasts in this model to be B1a cells and B1b cells but not MZB [35].

The ability of pathogens to manipulate the suppressive functions of B cells to counteract the anti-bacterial response is not unique to the *Salmonella* infection as other intercellular bacteria such as *Chlamydia abortus* and also viruses such as CMV (cytomegalovirus), HIV (human immunodeficiency virus), and HBV (human hepatitis B virus) have the capacity to induce suppressive functions in B cells [69–73]. These models uncover the intrinsic dual function of IBCs, initiating protective immunity while promoting regulatory mechanisms against uncontrolled inflammation. Such feedback is a common feature in the homeostatic system but allows us to extend our point of view of IBCs and the general function of B cells such as immunoglobulin production or suppressive functions. Reconciling different observations, IBCs are a fair representative of the plasticity and the adaptability of immune cells to their microenvironment [74]. IBCs can differently respond to stimulation, change their identity, differentiate, and relocate throughout the body adapting their function to their new location (Fig. 1, Table 1).

Other Innate B Cell Populations

Atypical IBCs

Growing evidence during the past decade points toward the atypical capacity of IBCs to differentiate into other lymphoid

or myeloid lineages. This incredible cellular plasticity represents a reliable tool to offer the best range of responses against organism aggression. In this regard, B cells have continuously been described as a very plastic lineage. Interestingly, studies have demonstrated the conversion of B cells to other immune cell types by modification of lineage key transcription factors. Indeed, ectopic expression of C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) in primary progenitor B cells and mature B cells induces transdifferentiation of B cells toward a distinct myeloid cell fate including granulocytes macrophages and dendritic cells [75–77].). In vivo, this relevance seems restricted the ability of transdifferentiation from the pro-B cell population and can occur during the inflammation process [78]. A new study has highlighted the transcription factor Hoxb5 (Homeobox B5) as a master regulatory factor involved in the lineage conversion of B cell precursors into fully functional T cells [79]. A CD11c or CD11b B cell subset with myeloid or dendritic attributes and T cell regulatory functions has been described in mice [80]. These CD19⁺ CD11c⁺ B cells (discussed above) are present in mouse spleen, expressing Pax5 and the T cell regulatory enzyme IDO (indoleamine 2, 3-dioxygenase), and develop from stem cell progenitors in B cell-deficient mice (μ MT knockout) but not from CD19-knockout mice.

Are myeloid and non-B cell-restricted identity attributes such as CD5, CD11b, and CD11c a hallmark of IBCs? Do those characteristics represent different functional subsets? Does it represent alternatively, a conserved evolutionary function from a common progenitor? Although these questions remain to be solved, their investigation might bring us new insights into the function of these populations and how these populations could be conserved in humans.

Natural Killer B Cells

Three years ago, a study described a new innate B cell population with NK (natural killer) attributes emerging from bone marrow pro-B cells. These NK B cells (NKB) are present in the marginal zone of the spleen and mesenteric lymph nodes in both mice and humans. Murine NKB express the NK1-1 marker plus CD19 and a cell surface IgM with a limited repertoire. NKB cells exhibit a critical role in the control of microbial infection since NKB-depleted mice were more prone to *Listeria monocytogenes* and STm infections [81]. NKB show a great potential to produce IL-18 and IL-12 leading to activation of NK and ILC1 against bacterial infection. The description of this population was completed in an additional study showing that NK1-1⁺ CD19⁺ cells have the capacity to differentiate into CD138⁺ Blimp1⁺ plasmablasts upon LPS (lipopolysaccharide) stimulation. This has motivated the authors to propose that NK1-1⁺ or NKp46⁺ B cells represent a phenotypic attribute of MZB [82].

Although discrepancies exist in the characterization of IBCs, one significant aspect to keep in mind is the capacity of IBCs to express atypical B cell markers. Expression of CD11b, CD11c, NK1.1, PDCA, and other atypical phenotypic attributes in IBCs underline that the necessity that the dogma of the strict stable phenotypic identity of B cells has to be re-evaluated. This idea is already accepted in T cell biology where phenotypic attributes could be transitory and related to a functional program in many different T cell “subsets” establishing the foundation of inhibitory blockade molecules in some cancers [83, 84] and recently providing new therapeutic consideration in autoimmune diseases [85].

IBCs in Humans

Although an extensive amount of literature has provided evidence for the high diversity of IBCs in rodent models, the study of human IBC (hIBCs) is more challenging. One crucial feature of hIBCs is their tissue-dependent localization and functions that complicate experimental approaches in humans. From an evolutionary point of view, B cell subsets become diversified. Mouse IBCs represent a conserved B cell subset with functions close to the myeloid lineage supporting a substantial advantage against infections. Nevertheless, transposition to human is more speculative perhaps because most of the tissues housing IBCs are structurally very different (Table 2) [86].

Human B1 Cells

Characterization of the B1 cell population is the best illustration of the complexity of studying IBCs in humans. In 2011, the Rothstein’s group identified a homolog of the B1 subset (hB1) in cord blood and adult circulating peripheral blood based on their capacity to spontaneously produce IgM secretion, to stimulate T cells, and to possess a tonic intracellular signal [87]. This subset expresses CD27 and CD43 among the CD19⁺ CD20⁺ B cell population, and in addition, this population was the only one able to bind phosphoryl-choline (PC), another hallmark of the murine B1 cells [88, 89]. Interestingly, the hB1 subset was distinct from CD5⁺ B cells since the majority of CD5⁺ B cells were negative for CD27 and CD43. CD5 expression in humans is mainly an inducible marker that appears upon activation decoupling its expression from a specific subset [90, 91]. Beyond phenotypic considerations, one functional aspect of this intriguing CD27⁺ CD43⁺ CD5[±] B cell subset is its ability to spontaneously produce IgM within 3 h. This unique ability has evoked the question of the real nature of this specific subset and has raised the question of a possible contamination with plasmablasts that also express CD43⁺ and CD27⁺ [92, 93]. However, one recent study has further confirmed the presence of hB1 cells (CD20⁺CD43⁺CD27⁺CD70⁻) in the human chorionic decidua stroma of women with

spontaneous pre-term (PTL) and term (TL) labor [94]. According to these authors, chorionic decidua B cells display a unique phenotype that is distinct PTL from TL stroma since B cells from PTL stroma exhibit an hB1 phenotype with altered function promoting spontaneous polyreactive IgM and with a suspected impact on pregnancy outcomes [95].

Human MZ B Cells

Among innate B cell actors, human MZ B cells contribute mainly to a specific antigenic response leading to a rapid production of IgM and IgG3 isotype antibodies. In addition, human MZ B cells have been described as the main humoral actors of systemic anti-bacterial immunity [96]. Since the first description of circulating human MZB [97, 98], some advances have established the existence of two main hMZB subsets according to their localization.

Human Circulating MZ-Like B Cells

The circulating IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cell population harboring some shared properties with murine MZB was first observed in healthy children younger than 2 years old with mutations of their immunoglobulin receptor during ontogeny, prior differentiation into T-independent antigen responsive cells and from the formation of a competent germinal center [99, 100]. In adults, the presence of immunoglobulin-mutated V genes in this subset has suggested different interpretations regarding MZ-like B cell origin and in particular with the possibility to have somatic hypermutation events outside of the germinal centers [101] or the possibility that IgM memory B cells are generated during the immune response in germinal centers but without immunoglobulin class switching [102, 103]. Recent assessment of IgM⁺CD27⁺ subsets in humans reveals the heterogeneity of the MZ-like B cell subset including both “true” innate B cells harboring a unique repertoire and IgM-mutated memory cells (with no or low IgD expression) displaying a clonal relationship with switched memory B cells [104]. Additional evidence has demonstrated that the IgM⁺ memory B cell repertoire presents a bias in IgVH family usage and may be affected by age [105]. Furthermore, this study has further underlined that the IgM⁺ memory B cell subset is heterogeneous based on the density of IgM⁺ expression that could be used to dichotomize between T-dependent and T-independent types of IgM memory cells. There is no doubt that the emergence of single-cell transcriptomic analyses will bring new insights into the biology of human MZB-like and IgM⁺ memory cells together with additional traits about their function in the immune system. The ongoing characterization of MZ-like cells in humans rises fascinating questions about how those cells are generated during B cell development and by which mechanisms these cells are regulated coupling tissue localization with specific functional characteristics.

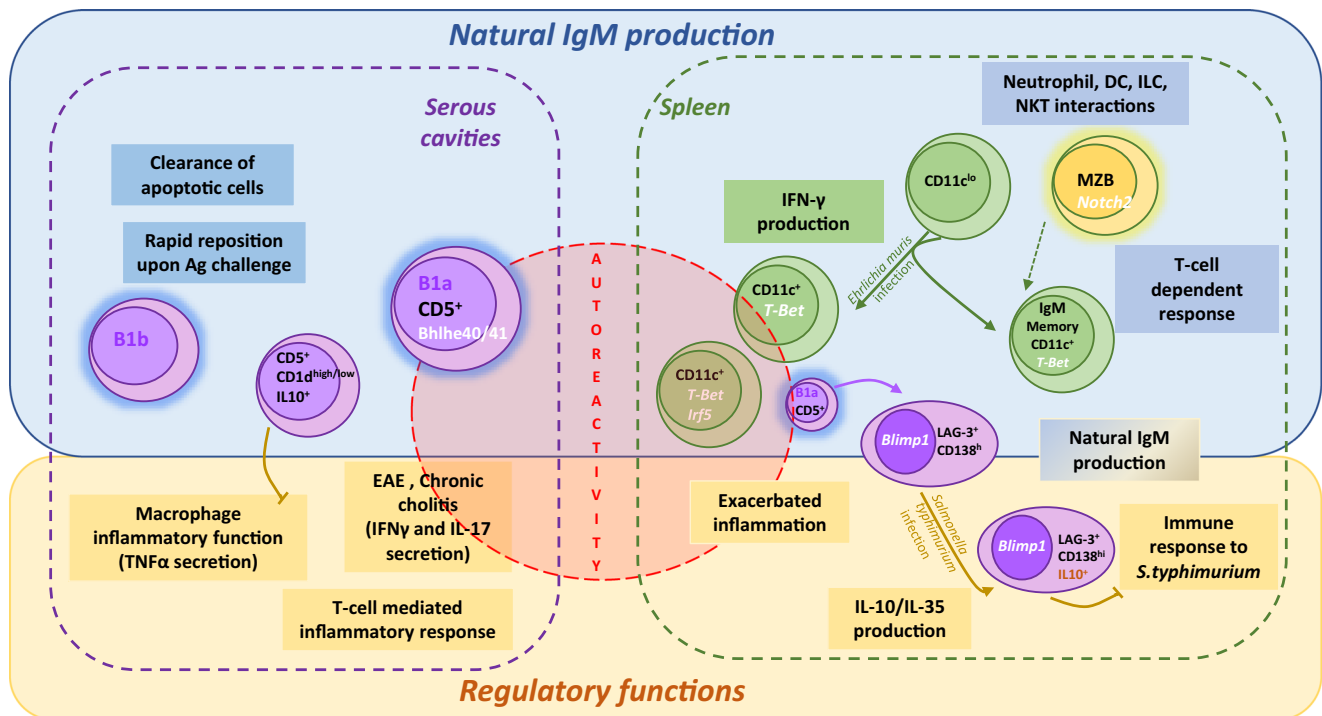


Fig. 1 Versatile sides of innate B cells. EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis); MZB (marginal zone B cell), NKT (natural-killer) T cell, ILC (innate lymphoid cell), DC (dendritic cell). B1 cells (purple) and MZB (orange) cells are the two main contributors to natural IgM production. IgM secretion by B1 cells is independent of the transcription factor Blimp-1 in serous cavities and participates in the clearance of apoptotic cells. T-bet expressing B-cells (green) are a

heterogeneous subset: 1-T-bet+IgM+ B-cells could arise from MZB cells or unknown progenitors secreting natural IgM. 2-T-bet+ CD11c+ B-cells undergo class-switching and participate in the autoreactive response. In another hand, when activated through the TLR pathway, innate B cells display a regulatory role preventing the organism from an exacerbated inflammation. This function is performed by the production of natural IgM and by the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-35

In line with these questions, the selection of the reactivity of MZ-like B cells in the unrestricted human repertoire is still under investigation asking how MZ-like B cells are developmentally linked to the selection of autoreactive B cells. Some studies have revealed that autoreactive B cells against proteinase 3 (PR3) are not restricted to autoimmune patients but also found in healthy controls, and in this case, they exhibit an MZ-like phenotype (IgD⁺CD27⁺) [106]. Intriguingly, a decrease in this subset has been reported in systemic autoimmune diseases and with correction under treatment with immunotherapy [107–111]. How could the proportion of circulating MZ-like B cells reflect the tolerance breach could be asking? Nevertheless, the intricate network established in mice existing between this population and the control of autoreactivity [112] offers promising future tracks for understanding the control of B cell tolerance in humans.

Tissues Resident Innate B Cells

Spleen human B cells located in the mantle zone area around the germinal center are characterized by a specific cell surface phenotype CD27⁺IgD^{low}IgM^{high} [99, 113] and this phenotype included the expression of CD45RB (MEM55 epitope) and the

absence of positive labeling for the mitotracker green (MTG) fluorescence dye [114]. Transcriptomic analysis has defined the transcription factor SOX7 as significantly involved in the MZ-like B cell fate associated with IL21-R and CCR9 suggesting a strong relationship of MZ-like B cells with their microenvironment. More recently, in-depth phenotypic profiling of human B cells from different tissues coupled with mass cytometry and imaging mass cytometry has revealed a phenotypic alignment between the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cell subset and a precursor CD45RB⁺ subset distinct from memory B cells, suggesting a separate developmental branch between MZ-like B cells and memory B cells [115]. Interestingly TACI, CD80, and FcRL4 could be used to distinguish IgD⁺CD27⁺ MZ-like B cells across the spleen, the gut, and the tonsils.

Human IBC Functions

Natural Protection

The molecular pathways that lead to immature B cells to differentiate into either MZB or follicular B cells were extensively studied in mice but remain elusive in humans. In both species, the transmembrane neurogenic locus notch homolog

protein 2 (Notch2) receptor presents an essential role for MZB development through the interaction with one of its ligands, Delta-like 1 (Dll1), that is expressed by fibroblastic reticular stream cell in the spleen [116]. Additionally, BCR engagement on type 1 transitional (T1) B cells via the serine-threonine kinase TAOK3 (TAO kinase 3) is effective to inducing ADAM10 (ADAM metallopeptidase domain 10) expression that is necessary for promoting Notch2 intracellular domain translocation into the nucleus [117]. In addition to the Notch2 pathway, the importance of the signal downstream from the BCR in the choice of MZB and B1 cell fate seems crucial since mutations in genes encoding regulators of the BCR signaling such as CD19 or CD22 result in the profound modification of the IBC compartment (Table 2) [15, 121].

In humans, it was suggested that IBCs are prone to recognize microbial cell-wall fragments from the microbiota protecting against microbial infection. Human splenic MZ-like B cells have the particularity to possess a strong pre-activation state characterized by high metabolic activity coupled with a specific activation gene signature [45]. This gene signature highlights the increase of the mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) signaling pathway depending on the cooperative activation of TACI and TLR9. Interestingly, mTORC1 signaling regulates class switch recombination-inducing signaling pathways specifically. This observation was further extended in an additional study [118]. Those authors demonstrated that IgM-secreting cells are present in humans, but in contrast to mouse, small intestine MZB harbor a large repertoire against a high diversity of microbial communities. The study further suggests that IgM-secreting cells reacting to commensal bacterial compounds are clonally related to a specific IgM⁺ memory B cell subset expressing a gut-specific gene signature that differs from marginal zone B cells. This tissue-specific memory signature is characterized by an upregulation of *FCRL4*, *IL-10*, *CCR9*, and *CD11c*. This study documented the heterogeneity of human IBCs and supports the possibility of mucosal tissue-resident IgM⁺ memory B cells in human, but not in mice.

Conventional IBCs and IgM⁺ memory B cells share some protective functions through the provision of rapid immunoglobulin production that may or may not involve class switch recombination. The dichotomization of the peripheral memory B cell compartment into different subsets based on IgM, IgD, IgG, IgA, CD27, CD38, and CD24 expression has suggested three distinct maturation pathways [122]. The first and second memory B cell subsets were local and systemic and independent of the GC reaction. These pathways encompass IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ called the natural effector B cell subset and corresponding to MZ-like B cells and the CD27⁻ IgA cells. Both populations showed limited proliferation and reduced somatic hypermutation levels. IgM⁺ CD27⁺ IgD⁻ memory B cells present a complex ontogeny as they are suspected arising from IBCs in the primary response but also from the

Table 2 Protective B cell subsets in humans

	CD19	CD20	CD27	CD43	CD5	IgM	IgD	CD21	CD23	CD1c	CD45RB	CD80	ferl4	CD24	CD38	CD10	Reference	TISSUE
Natural protection	+	+	+	+	±	hi	lo	+	-	hi	+			+	-		[87]	Cord blood
Homolog of B1	+	+	+	+		hi	+	+	lo					+			[99]	Blood Spleen
IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ B cells	+	+	+	+		hi	+	+	lo					+			[114]	
IgM ⁺ memory B cells	+	+	+	+		hi	+	+	lo					+			[115]	GALT
T1 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	+	+	+	+		hi	+	+	lo					+				Spleen
CD27 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	+	+	+	+		hi	+	+	lo					+				Tonsil
T2 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	+	+	+	+		+	-	+		hi				+			[118]	Gut
T3 CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	+	+	+	+		hi	lo	lo	Lo					+			[119]	Blood
CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	+	+	+	+		lo	lo	+	+					+				
	+	+	+	+		hi	hi	+	+	hi				+			[120]	Blood

T1, 2 or 3 (transitional type 1, 2 or 3 B cells); GALT (gut-associated lymphoid tissue)

recirculation of germinal center-dependent tissue-resident memory B cells. Although the high complexity of heterogeneity of the human protective response has still not been uncovered, human IBCs may integrate local signals to undergo higher functional activities including local antibody production, commensal bacterial memory B cell generation, and greater capacity to recirculate to provide adequate and broad protection against pathogens.

The Control of the Immune Response

Beyond protection against pathogen, studies in humans have now begun regarding the regulatory functions of IBCs on the immune system begin. Transitional B cells were first ascribed to possess regulatory B cell functions in humans [120] as the homologous of their T2-marginal zone precursor mouse-counterpart. However, human transitional B cells possess different functional subsets [119] and consequently do not represent an exclusive Breg subset. In addition, IBCs express natural features that may render those cells highly compatible for exerting some regulatory mechanisms. Examining IL-10 secretion, we and others have underlined that, in the human peripheral blood, IgM⁺ CD27⁺ (IgD⁺ and IgD^{low}) and transitional type-2 B cells are the major source of IL-10 following innate TLR9 stimulation [119, 123, 124]. Both hIBCs and human Bregs present shared properties including CD5 expression, the rapid capacity to differentiate, and a capacity to produce IgM spontaneously or after activation [120, 125, 126]. Some pathological situations have emphasized the ability of IBCs to exert regulatory functions as highlighted in a longitudinal phenotypic analysis of HIV-1 infected patients [127]. Additional studies demonstrated an increase of IL-10-expressing MZ-like B cells in HIV patients, associated with a high level of lymphotoxin- α [128] that was suggested to be involved in suppression of anti-viral T effector functions.

Studies regarding graft-versus-host diseases (GVHD) have underlined the fact that data in this area are often contradictory and fail to provide a uniform concept of the human Breg. In an initial study, IgM⁺ CD27⁺ CD38^{low} human MZB and transitional B cells were enriched in IL-10 producing B cells when activated by CD40L and could control T cell proliferation as well as IFN- γ production. This population was impaired in patients with chronic GVHD. In another study, IL-10⁺ B cells were assessed in controls and patients with active or remitting GVHD. B cells were activated by CpG and CD40 demonstrating that IL-10 production was enriched in the CD24⁺ CD27⁺ and in the plasmablast compartment and that this pool was defective in active GVHD patients [129]. Although the first stimulation inducing IL-10 was different in both studies, they underline one of the standard features while examining Breg functions that B cells could undertake regulatory functions depending on the microenvironment. However, some B cell populations may have distinct properties to undertake

regulatory abilities. Among them, human and mouse IBCs may represent the most potent B cell subsets able to display regulatory functions in the immune system.

The existing and recurrent link between plasmablast differentiation and acquired regulatory function may represent the missing link between IBCs and Bregs [130]. IBCs are cells poised to differentiate in response to many different signals. IBCs integrate signals from cytokines, TLR, and BCR and from interaction with other cells like DCs, ILCs, or neutrophils. All those interactions have been demonstrated to trigger regulatory functions in B cell. One recent study shows that CpG-stimulated human peripheral B cells gradually induce TNF-receptor R2 (TNFR2) upregulation and develop into IL-10⁺ IgM⁺ plasmablast. Researchers have shown that IgM⁺ CD27⁺ cells were the primary source of IL-10 positive Ab-secreting cells confirming the appropriate link between IBCs and regulatory functions [131]. What could be the purpose of triggering regulatory mechanisms in B cells dedicated to the protective response? Although more questions than answers remain, IL-10 is a complex actor that may fulfill different roles that could sustain Ab production while controlling exacerbated immune response. Regulatory mechanisms of IBCs may act as a homeostatic counter-regulator of inflammation.

Conclusion

Overall, a great interest has emerged this past decade for better understanding of the heterogeneity of innate mechanisms in humans as reported in this special issue [132–140]. Of particular interest are questions about molecular mechanisms regulating the multiple layers of innate B cells with different functions. Further studies that will focus on delineating cellular and molecular switch programming innate B cells from effector to regulatory cells are bound to yield valuable new insights into the biology of B cells promoting effective Ab protection as well as B cells driving or preventing cancer and autoimmunity.

Acknowledgments We are thankful to Dr. Wesley H. Brooks (University of South Florida, USA) for editorial assistance and to Simone Forest and Genevieve Michel for secretarial assistance.

Funding All authors work in a department supported by the Brest University, CHU Brest, and INSERM.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical Approval Ethical approval is not applicable as this is a review article.

Informed Consent Informed consent is not applicable as this is a review article.

References

1. Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR et al (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430:174–180
2. Herrin BR, Alder MN, Roux KH, Sina C, Ehrhardt GRA, Boydston JA, Turnbough CL, Cooper MD (2008) Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2040–2045
3. Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, LaPatra S, Tort L, Sunyer JO (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7:1116–1124
4. Parra D, Rieger AM, Li J, Zhang YA, Randall LM, Hunter CA, Barreda DR, Sunyer JO (2012) Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 91:525–536
5. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF (2001) Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1:177–186
6. Gu H, Tarlinton D, Muller W, Rajewsky K, Forster I (1991) Most peripheral B cells in mice are ligand selected. *J Exp Med* 173:1357–1371
7. Shaw PX, Horkko S, Chang MK et al (2000) Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 105:1731–1740
8. Pape KA, Maul RW, Dileepan T, Paustian AS, Gearhart PJ, Jenkins MK (2018) Naive B cells with high-avidity germline-encoded antigen receptors produce persistent IgM(+) and transient IgG(+) memory B cells. *Immunity* 48:1135–1143 **e1134**
9. Raposo B, Dobritzsch D, Ge C, Ekman D, Xu B, Lindh I, Förster M, Uysal H, Nandakumar KS, Schneider G, Holmdahl R (2014) Epitope-specific antibody response is controlled by immunoglobulin V(H) polymorphisms. *J Exp Med* 211:405–411
10. Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Ronnelid J (2007) High anti-collagen type-II antibody levels and induction of proinflammatory cytokines by anti-collagen antibody-containing immune complexes in vitro characterise a distinct rheumatoid arthritis phenotype associated with acute inflammation at the time of disease onset. *Ann Rheum Dis* 66:537–541
11. Cao D, Khmaladze I, Jia H, Bajtner E, Nandakumar KS, Blom T, Mo JA, Holmdahl R (2011) Pathogenic autoreactive B cells are not negatively selected toward matrix protein collagen II. *J Immunol* 187:4451–4458
12. Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, Gui M, Allman D, Stewart CL, Silver J, Hardy RR (1999) Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285:113–116
13. Lam WW, Lam TP, Saing H, Chan FL, Chan KL (1999) MR cholangiography and CT cholangiography of pediatric patients with choledochal cysts. *AJR Am J Roentgenol* 173:401–405
14. Tatu C, Ye J, Arnold LW, Clarke SH (1999) Selection at multiple checkpoints focuses V(H)12 B cell differentiation toward a single B-1 cell specificity. *J Exp Med* 190:903–914
15. Martin F, Kearney JF (2000) Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12:39–49
16. Brink R, Phan TG (2018) Self-reactive B cells in the germinal center reaction. *Annu Rev Immunol* 36:339–357
17. Degn SE, van der Poel CE, Firl DJ, Ayoglu B, al Qureshah FA, Bajic G, Mesin L, Reynaud CA, Weill JC, Utz PJ, Victora GD, Carroll MC (2017) Clonal evolution of autoreactive germinal centers. *Cell* 170:913–926 **e919**
18. Chumley MJ, Dal Porto JM, Cambier JC (2002) The unique antigen receptor signaling phenotype of B-1 cells is influenced by locale but induced by antigen. *J Immunol* 169:1735–1743
19. Hippen KL, Schram BR, Tze LE, Pape KA, Jenkins MK, Behrens TW (2005) In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance. *J Immunol* 175:909–916
20. Choi YS, Baumgarth N (2008) Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med* 205:3053–3064
21. Cerutti A, Cols M, Puga I (2013) Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13:118–132
22. Ha SA, Tsuji M, Suzuki K, Meek B, Yasuda N, Kaisho T, Fagarasan S (2006) Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med* 203:2541–2550
23. Schneider K, Loewendorf A, De Trez C et al (2008) Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell Host Microbe* 3:67–76
24. Stoermann B, Kretschmer K, Duber S, Weiss S (2007) B-1a cells are imprinted by the microenvironment in spleen and peritoneum. *Eur J Immunol* 37:1613–1620
25. Waffan EE, Hastey CJ, Dixit N, Soo Choi Y, Cherry S, Kalinke U, Simon SI, Baumgarth N (2015) Infection-induced type I interferons activate CD11b on B-1 cells for subsequent lymph node accumulation. *Nat Commun* 6:8991
26. Ravichandran KS, Lorenz U (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7:964–974
27. Chen Y, Khanna S, Goodyear CS, Park YB, Raz E, Thiel S, Gronwall C, Vas J, Boyle DL, Corr M, Kono DH, Silverman GJ (2009) Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J Immunol* 183:1346–1359
28. Ogden CA, Kowalewski R, Peng Y, Montenegro V, Elkon KB (2005) IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 38:259–264
29. Miles K, Simpson J, Brown S et al (2017) Immune tolerance to apoptotic self is mediated primarily by regulatory B1a cells. *Front Immunol* 8:1952
30. Nguyen TT, Elsner RA, Baumgarth N (2015) Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. *J Immunol* 194:1489–1502
31. Holodick NE, Tumang JR, Rothstein TL (2009) Continual signaling is responsible for constitutive ERK phosphorylation in B-1a cells. *Mol Immunol* 46:3029–3036
32. Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, Leyton DL, Coughlan RE, Khan M, Jensen KT, Buckley CD, Dougan G, MacLennan ICM, Lopez-Macias C, Cunningham AF (2009) The porin OmpD from nontyphoidal Salmonella is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9803–9808
33. Savage HP, Yenson VM, Sawhney SS, Mousseau BJ, Lund FE, Baumgarth N (2017) Blimp-1-dependent and -independent natural antibody production by B-1 and B-1-derived plasma cells. *J Exp Med* 214:2777–2794
34. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF (2008) A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28:639–650
35. Lino AC, Dang VD, Lampropoulou V, Welle A, Joedicke J, Pohar J, Simon Q, Thalmensi J, Baures A, Flühler V, Sakwa I, Stervbo U, Ries S, Jouneau L, Boudinot P, Tsubata T, Adachi T, Hutloff A, Dörner T, Zimmer-Strobl U, de Vos AF, Dahlke K, Loh G, Korniotis S, Goosmann C, Weill JC, Reynaud CA, Kaufmann SHE, Walter J, Fillatreau S (2018) LAG-3 inhibitory receptor expression identifies immunosuppressive natural regulatory plasma cells. *Immunity* 49:120–133 **e129**
36. Racine R, Chatterjee M, Winslow GM (2008) CD11c expression identifies a population of extrafollicular antigen-specific splenic

- plasmablasts responsible for CD4 T-independent antibody responses during intracellular bacterial infection. *J Immunol* 181:1375–1385
37. Winslow GM, Papillion AM, Kenderes KJ, Levack RC (2017) CD11c+ T-bet+ memory B cells: immune maintenance during chronic infection and inflammation? *Cell Immunol* 321:8–17
 38. Yates JL, Racine R, McBride KM, Winslow GM (2013) T cell-dependent IgM memory B cells generated during bacterial infection are required for IgG responses to antigen challenge. *J Immunol* 191:1240–1249
 39. Racine R, Jones DD, Chatterjee M, McLaughlin M, MacNamara KC, Winslow GM (2010) Impaired germinal center responses and suppression of local IgG production during intracellular bacterial infection. *J Immunol* 184:5085–5093
 40. Rubtsov AV, Rubtsova K, Kappler JW, Jacobelli J, Friedman RS, Marrack P (2015) CD11c-expressing B cells are located at the T cell/B cell border in spleen and are potent APCs. *J Immunol* 195:71–79
 41. Rubtsova K, Rubtsov AV, Thurman JM, Mennona JM, Kappler JW, Marrack P (2017) B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. *J Clin Invest* 127:1392–1404
 42. Wang S, Wang J, Kumar V et al (2018) IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE. *Nat Commun* 9:1758
 43. Shi W, Liao Y, Willis SN, Taubenheim N, Inouye M, Tarlinton DM, Smyth GK, Hodgkin PD, Nutt SL, Corcoran LM (2015) Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat Immunol* 16:663–673
 44. Chorny A, Casas-Recasens S, Sintes J, Shan M, Polentarutti N, García-Escudero R, Walland AC, Yeiser JR, Cassis L, Carrillo J, Puga I, Cunha C, Bastos H, Rodrigues F, Lacerda JF, Morais A, Dieguez-Gonzalez R, Heeger PS, Salvatori G, Carvalho A, Garcia-Sastre A, Blander JM, Mantovani A, Garlanda C, Cerutti A (2017) Correction: the soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. *J Exp Med* 214:1559
 45. Sintes J, Gentile M, Zhang S, Garcia-Carmona Y, Magri G, Cassis L, Segura-Garzón D, Ciociola A, Grasset EK, Bascones S, Comerma L, Pybus M, Lligé D, Puga I, Gutzeit C, He B, DuBois W, Crespo M, Pascual J, Mensa A, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Serrano S, Lloreta J, Meffre E, Hahne M, Cunningham-Rundles C, Mock BA, Cerutti A (2017) mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nat Commun* 8:1462
 46. Attanavanich K, Kearney JF (2004) Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 172:803–811
 47. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG (2008) Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9:54–62
 48. Lu TT, Cyster JG (2002) Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 297:409–412
 49. Song H, Cerny J (2003) Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 198:1923–1935
 50. Chappell CP, Draves KE, Giltiay NV, Clark EA (2012) Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J Exp Med* 209:1825–1840
 51. Puga I, Cols M, Barra CM et al (2011) B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13:170, 2012
 52. Kleiman E, Salyakina D, De Heusch M et al (2015) Distinct transcriptomic features are associated with transitional and mature B-cell populations in the mouse spleen. *Front Immunol* 6:30
 53. Barral P, Eckl-Dorna J, Harwood NE, de Santo C, Salio M, Illarionov P, Besra GS, Cerundolo V, Batista FD (2008) B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8345–8350
 54. Batista FD, Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9:15–27
 55. Gaya M, Barral P, Burbage M, Aggarwal S, Montaner B, Warren Navia A, Aid M, Tsui C, Maldonado P, Nair U, Ghneim K, Fallon PG, Sekaly RP, Barouch DH, Shalek AK, Bruckbauer A, Strid J, Batista FD (2018) Initiation of antiviral B cell immunity relies on innate signals from spatially positioned NKT cells. *Cell* 172:517–533 e520
 56. Magri G, Miyajima M, Bascones S, Mortha A, Puga I, Cassis L, Barra CM, Comerma L, Chudnovskiy A, Gentile M, Llige D, Cols M, Serrano S, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Merad M, Fagarasan S, Cerutti A (2014) Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol* 15:354–364
 57. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. (1996) Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 184:2271–2278
 58. Zhang X, Deriaud E, Jiao X, Braun D, Leclerc C, Lo-Man R (2007) Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 204:1107–1118
 59. Gonzalez-Garcia I, Ocana E, Jimenez-Gomez G, Campos-Caro A, Brieva JA (2006) Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *J Immunol* 176:4042–4050
 60. Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG (2004) Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol* 173:6346–6356
 61. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG (2010) Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 125:1114–1124 e1118
 62. Velupillai P, Harn DA (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:18–22
 63. Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M et al (2010) Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol* 184:886–894
 64. Di Niro R, Lee SJ, Vander Heiden JA et al (2015) Salmonella infection drives promiscuous B cell activation followed by Extrafollicular affinity maturation. *Immunity* 43:120–131
 65. Salazar GA, Penalzoza HF, Pardo-Roa C et al (2017) Interleukin-10 production by T and B cells is a key factor to promote systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Front Immunol* 8:889
 66. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, Kühl AA, Loddenkemper C, Haury M, Nedospasov SA, Kaufmann SHE, Steinhoff U, Calado DP, Fillatreau S (2010) Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33:777–790
 67. Seibert SA, Mex P, Kohler A, Kaufmann SH, Mitrucker HW (2010) TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunol Lett* 127:126–134
 68. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, Ries S, Dang VD, Jaimes Y, Daridon C, Li R,

- Jouneau L, Boudinot P, Wilantri S, Sakwa I, Miyazaki Y, Leech MD, McPherson RC, Wirtz S, Neurath M, Hoehlig K, Meinl E, Grützkau A, Grün JR, Horn K, Kühl AA, Dörmer T, Bar-Or A, Kaufmann SHE, Anderton SM, Fillatreau S (2014) IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during auto-immune and infectious diseases. *Nature* 507:366–370
69. Buendia AJ, Del Rio L, Ortega N et al (2002) B-cell-deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of Chlamydia abortus infection. *Infect Immun* 70:6911–6918
70. Madan R, Demircik F, Surianarayanan S, Allen JL, Divanovic S, Trompette A, Yogev N, Gu Y, Khodoun M, Hildeman D, Boespflug N, Fogolin MB, Grobe L, Greweling M, Finkelman FD, Cardin R, Mohrs M, Muller W, Waisman A, Roers A, Karp CL (2009) Nonredundant roles for B cell-derived IL-10 in immune counter-regulation. *J Immunol* 183:2312–2320
71. Goenka R, Parent MA, Elzer PH, Baldwin CL (2011) B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis* 203:1136–1146
72. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, Chen A, Blair P, Dusheiko G, Gill U, Kennedy PT, Brunetto M, Lampertico P, Mauri C, Maini MK (2012) IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 189:3925–3935
73. Liu J, Zhan W, Kim CJ, Clayton K, Zhao H, Lee E, Cao JC, Ziegler B, Gregor A, Yue FY, Huibner S, MacParland S, Schwartz J, Song HH, Benko E, Gyenes G, Kovacs K, Kaul R, Ostrowski M (2014) IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PLoS One* 9:e89236
74. Yosef N, Regev A (2016) Writ large: genomic dissection of the effect of cellular environment on immune response. *Science* 354:64–68
75. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T (2004) Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117:663–676
76. Barneda-Zahonero B, Roman-Gonzalez L, Collazo O et al (2013) HDAC7 is a repressor of myeloid genes whose downregulation is required for transdifferentiation of pre-B cells into macrophages. *PLoS Genet* 9:e1003503
77. Cirovic B, Schonheit J, Kowenz-Leutz E et al (2017) C/EBP-induced transdifferentiation reveals granulocyte-macrophage precursor-like plasticity of B cells. *Stem Cell Reports* 8:346–359
78. Audzevich T, Bashford-Rogers R, Mabbott NA, Frampton D, Freeman TC, Potocnik A, Kellam P, Gilroy DW (2017) Pre/pro-B cells generate macrophage populations during homeostasis and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E3954–E3963
79. Zhang M, Dong Y, Hu F et al (2018) Publisher correction: transcription factor Hoxb5 reprograms B cells into functional T lymphocytes. *Nat Immunol* **In Press**
80. Johnson BA 3rd, Kahler DJ, Baban B et al (2010) B-lymphoid cells with attributes of dendritic cells regulate T cells via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10644–10648
81. Wang S, Xia P, Chen Y, Huang G, Xiong Z, Liu J, Li C, Ye B, du Y, Fan Z (2016) Natural killer-like B cells prime innate lymphocytes against microbial infection. *Immunity* 45:131–144
82. Kerdiles YM, Almeida FF, Thompson T, Chopin M, Vienne M, Bruhns P, Huntington ND, Raulet DH, Nutt SL, Belz GT, Vivier E (2017) Natural-killer-like B cells display the phenotypic and functional characteristics of conventional B cells. *Immunity* 47:199–200
83. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264
84. Topalian SL (2017) Targeting immune checkpoints in cancer therapy. *JAMA* 318:1647–1648
85. van der Vlist M, Kuball J, Radstake TR, Meyaard L (2016) Immune checkpoints and rheumatic diseases: what can cancer immunotherapy teach us? *Nat Rev Rheumatol* 12:593–604
86. Steiniger B, Timphus EM, Barth PJ (2006) The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. *Histochem Cell Biol* 126:641–648
87. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* 208:67–80
88. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Riblet RJ, Hayakawa K (1989) A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J Immunol* 142:3643–3651
89. Lalor PA, Morahan G (1990) The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *Eur J Immunol* 20:485–492
90. Mageed RA, Garaud S, Taher TE, Parikh K, Pers JO, Jamin C, Renaudineau Y, Youinou P (2012) CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte. *Autoimmun Rev* 11:795–798
91. Renaudineau Y, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P (2005) An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood* 106:2781–2789
92. Descatoire M, Weill JC, Reynaud CA, Weller S (2011) A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med* 208:2563–2564
93. Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJM, Orfao A, van Zelm MC (2011) The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med* 208:2565–2566
94. Huang B, Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Goyert JW, Zhou JZ, el-Hage NG, Deng J, Lin J, Yao F, Dewar RS, Jassal JS, Sandberg ML, Dai J, Cols M, Shen C, Polin LA, Nichols RA, Jones TB, Bluth MH, Puder KS, Gonik B, Nayak NR, Puscheck E, Wei WZ, Cerutti A, Colonna M, Chen K (2017) Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med* 23:128–135
95. Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, el-Mousleh T, Costa SD, Dechend R, Zenclussen AC (2012) CD19+CD5+ cells as indicators of preeclampsia. *Hypertension* 59:861–868
96. Mebius RE, Nolte MA, Kraal G (2004) Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol* 24:449–464
97. Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J (1995) Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med* 182:559–566
98. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K (1997) Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89:1288–1298
99. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC (2004) Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104:3647–3654
100. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C, Cordier C, Lecoeuche D, Gauthier F, Weill JC, Reynaud CA (2008) Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med* 205:1331–1342
101. Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, le Deist F, de Saint Basile G, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC (2001) CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1166–1170
102. Tangye SG, Good KL (2007) Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J Immunol* 179:13–19
103. Seifert M, Przekopowicz M, Taudien S, Lollies A, Ronge V, Drees B, Lindemann M, Hillen U, Engler H, Singer BB, Küppers R (2015) Functional capacities of human IgM memory B cells in

- early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E546–E555
104. Bagnara D, Squillario M, Kipling D, Mora T, Walczak AM, da Silva L, Weller S, Dunn-Walters DK, Weill JC, Reynaud CA (2015) A reassessment of IgM memory subsets in humans. *J Immunol* 195:3716–3724
 105. Martin V, Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK (2015) Age-related aspects of human IgM(+) B cell heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci* 1362:153–163
 106. Cornec D, Berti A, Hummel A, Peikert T, Pers JO, Specks U (2017) Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J Autoimmun* 84:122–131
 107. Gazeau P, Alegria GC, Devauchelle-Pensec V, Jamin C, Lemerle J, Bendaoud B, Brooks WH, Saraux A, Cornec D, Renaudineau Y (2017) Memory B cells and response to abatacept in rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 53:166–176
 108. Carvajal Alegria G, Gazeau P, Hillion S, Daien CI, Cornec DYK (2017) Could lymphocyte profiling be useful to diagnose systemic autoimmune diseases? *Clin Rev Allergy Immunol* 53:219–236
 109. Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Perez-Venegas JJ, Rodriguez C, Brieva JA (2010) Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* 12:R108
 110. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, Tomar D, Woodruff MC, Simon Z, Bugrovsky R, Blalock EL, Scharer CD, Tipton CM, Wei C, Lim SS, Petri M, Niewold TB, Anolik JH, Gibson G, Lee FEH, Boss JM, Lund FE, Sanz I (2018) Distinct effector B cells induced by unregulated toll-like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic lupus erythematosus. *Immunity* 49:725–739 e726
 111. Simonin L, Pasquier E, Leroyer C, Cornec D, Lemerle J, Bendaoud B, Hillion S, Pers JO, Couturaud F, Renaudineau Y (2017) Lymphocyte disturbances in primary antiphospholipid syndrome and application to venous thromboembolism follow-up. *Clin Rev Allergy Immunol* 53:14–27
 112. Ichikawa D, Asano M, Shinton SA, Brill-Dashoff J, Formica AM, Velcich A, Hardy RR, Hayakawa K (2015) Natural anti-intestinal goblet cell autoantibody production from marginal zone B cells. *J Immunol* 194:606–614
 113. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE (1998) Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 188:1691–1703
 114. Descatoire M, Weller S, Irtan S, Sarnacki S, Feuillard J, Storck S, Guiochon-Mantel A, Bouligand J, Morali A, Cohen J, Jacquemin E, Iascone M, Bole-Feysot C, Cagnard N, Weill JC, Reynaud CA (2014) Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J Exp Med* 211:987–1000
 115. Zhao Y, Uduman M, Siu JHY, Tull TJ, Sanderson JD, Wu YCB, Zhou JQ, Petrov N, Ellis R, Todd K, Chavele KM, Guesdon W, Vossenkamper A, Jassem W, D’Cruz DP, Fear DJ, John S, Scheel-Toellner D, Hopkins C, Moreno E, Woodman NL, Ciccarelli F, Heck S, Kleinstein SH, Bemarck M, Spencer J (2018) Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nat Commun* 9:3857
 116. Fasnacht N, Huang HY, Koch U, Favre S, Auderset F, Chai Q, onder L, Kallert S, Pinschewer DD, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F, Ludewig B, Luther SA, Radtke F (2014) Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J Exp Med* 211:2265–2279
 117. Hammad H, Vanderkerken M, Pouliot P, Deswarte K, Toussaint W, Vergote K, Vandersarren L, Janssens S, Ramou I, Savvides SN, Haigh JJ, Hendriks R, Kopf M, Craessaerts K, de Strooper B, Kearney JF, Conrad DH, Lambrecht BN (2017) Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nat Immunol* 18:313–320
 118. Magri G, Comerma L, Pybus M, Sintes J, Lligé D, Segura-Garzon D, Bascones S, Yeste A, Grasset EK, Gutzeit C, Uzzan M, Ramanujam M, van Zelm MC, Albero-González R, Vazquez I, Iglesias M, Serrano S, Márquez L, Mercade E, Mehandru S, Cerutti A (2017) Human secretory IgM emerges from plasma cells clonally related to gut memory B cells and targets highly diverse commensals. *Immunity* 47:118–134 e118
 119. Simon Q, Pers JO, Cornec D, le Pottier L, Mageed RA, Hillion S (2016) In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J Allergy Clin Immunol* 137:1577–1584 e1510
 120. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F et al (2010) CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 32:129–140
 121. Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM (2005) Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22:9–18
 122. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V et al (2011) Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118:2150–2158
 123. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, Musette P (2010) IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* 40:2686–2691
 124. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF (2011) Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117:530–541
 125. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C (2011) Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 36:228–238
 126. Nouel A, Segalen I, Jamin C et al (2014) B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 85: 590–599
 127. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, French AL, Landay A (2013) Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol* 93:811–818
 128. Chagnon-Choquet J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M, for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups (2014) IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 9:e101949
 129. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H et al (2015) CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 125:1830–1839
 130. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, Baba Y (2014) Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41:1040–1051
 131. Ticha O, Moos L, Wajant H, Bekeredjian-Ding I (2017) Expression of tumor necrosis factor receptor 2 characterizes TLR9-driven formation of Interleukin-10-producing B cells. *Front Immunol* 8:1951
 132. Guia S, Vivier E, Narni-Mancinelli E (2019) Helper-like innate lymphoid cells: definition, functions and clinical implications in inflammatory diseases and cancer. *Clin Rev Allergy Immunol*. In Press

133. Brilland B, Scherlinger M, Khoryati L et al (2019) Platelets and IgE: shaping the innate immune response in systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
134. Maddur MS, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD et al (2019) Natural antibodies: from first line defense against pathogens to perpetual immune homeostasis. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
135. Defendia F, Thielensb NM, Clavarinoa G, Cesbron JY, Dumestre-Pérard C (2019) Autoantibodies targeting complement components and associated diseases. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
136. Bordron A, Bagacean C, Tempescul A et al (2019) Complement system: a neglected pathway in immunotherapy. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
137. Arleevskaya MI, Larionova RV, Brooks WH, Bettacchioli E, Renaudineau Y (2019) TLR, infections and rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
138. Charras A, Arvaniti P, Le Dantec C et al (2019) JAK1/2 inhibitors suppress epigenetic reprogramming of two innate immune cytokines (IFN α , IFN γ) and reactive oxygen species: a promise for patients with Sjögren's syndrome. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
139. Hillion S, Arleevskaya MI, Brooks WH et al (2019) The innate part of the adaptive immune system. *Clin Rev Allerg Immunol*. In Press
140. Arleevskaya MI, Aminov R, Brooks WH, Manukyan G, Renaudineau Y (2019) Editorial: shaping of human immune system and metabolic processes by viruses and microorganisms. *Front Microbiol* 10:816

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

Titre : CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES B AUTOREACTIFS DANS LE SYNDROME DE SJÖGREN

Mots clés : Syndrome de Sjögren, lymphocytes B, LB auto-réactifs, auto-immunité, tolérance

Résumé : Les LB jouent un rôle central dans le syndrome de Sjögren primitif (SSp), cependant très peu d'études ont été réalisées sur les caractéristiques des LB auto-réactifs qui sécrètent des autoanticorps contre l'auto-antigène SSA. Nous avons cherché à caractériser les LB circulants spécifiques de la SSA (LB SSA⁺), afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la rupture de la tolérance chez les patients atteints du SSp.

En utilisant une méthode de cytométrie en flux, basée sur la spécificité du BCR, nous avons détecté et caractérisé phénotypiquement les LB SSA⁺ circulants chez des patients atteints de SSp et chez des contrôles sains (HCs). Nous avons testé leur capacité à sécréter des immunoglobulines spécifiques de la SSA *in vitro* après stimulation. Ensuite, nous avons réalisé une première expérience de profilage transcriptionnel de ces cellules par RNA seq unicellulaire afin de mieux comprendre le rôle des LB auto-réactifs chez les sujets sains.

L'analyse du phénotype a montré une expansion d'un sous-ensemble de LB naïfs CD19⁺IgD⁺CD27⁻CD21^{low/-}CD11c⁻SSA⁺ avec un BCR régulé à la baisse chez les patients atteints de SSp.

Les LB SSA⁺ étaient également enrichis parmi les LB mémoires non commutés IgM^{low} chez les patients, ainsi que dans les LB mémoires DN (IgD⁻CD27⁻) et commutés des différents isotypes. Les LB SSA⁺ triés, provenant d'un sujet sain, étaient capables de sécréter *in vitro* des immunoglobulines IgM mais pas IgG anti-SSA, contrairement aux LB SSA⁺ provenant de patients atteints de SSp, qui sont capables de sécréter des autoanticorps IgG spécifiques de SSA. Sur le plan transcriptomique, les DEG du cluster enrichi en LB SSA⁺ ont montré une régulation positive des gènes HLA impliqués dans la présentation de l'antigène ainsi qu'une régulation négative du BCR par la surexpression de CD72.

Nos résultats suggèrent que les LB SSA⁺ auto-réactifs, chez les patients atteints de SSP, sont enrichis dans le compartiment mémoire, ce qui suggère qu'ils échappent aux différents points de contrôle de la tolérance périphérique et se différencient *in vivo* en cellules sécrétant des anticorps anti-SSA.

Title: CHARACTERISATION OF AUTOREACTIVE B CELLS IN SJÖGREN'S SYNDROME

Keywords: Sjögren's syndrome; B cells; autoreactive B cells; autoimmunity; tolerance checkpoints

Abstract: B cells play a central role in primary Sjögren's syndrome (pSS), but little is known about the autoreactive B cells that secrete autoantibodies against the autoantigen SSA. Here, we aimed to characterize the circulating SSA-specific B cells (SSA⁺ B cells), in order to better understand the mechanisms leading to the breakdown of self-tolerance in patients with pSS.

Using a flow-cytometry-based method, we detected and phenotypically characterized SSA⁺ B cells among peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from patients with pSS and from healthy controls (HCs). We tested their ability to secrete SSA-specific immunoglobulins *in vitro* following stimulation. Then, we performed a first experience of transcriptional profiling of these cells by single-cell RNA seq to understand further the characteristics of these autoreactive B cells in healthy subjects.

Phenotype analysis showed an expansion of a CD19⁺IgD⁺CD27⁻CD21^{low/-}CD11c⁻SSA⁺ naïve B-cell subset with a downregulated B cell receptor in pSS patients.

SSA⁺ B cells were also enriched within the IgM^{low} unswitched memory B-cell subset in patients, as well as in double negative (IgD⁻CD27⁻) and switched memory B cells of the different isotypes. Sorted SSA⁺ B cells from HCs were able to secrete *in vitro* IgM but not IgG anti-SSA immunoglobulins contrary to SSA⁺ B cells from pSS patients, that were able to secrete IgG autoantibodies. From the scRNA-seq analysis in a healthy subject, we obtained 6 clusters with 2 enriched in SSA⁺ B cells. DEG from clusters enriched with SSA⁺ B cells, showed upregulation of HLA genes implicated in the antigen presentation and negative regulation of BCR.

Our results show that autoreactive SSA⁺ B cells in pSS patients mature and reach the memory compartment, suggesting that they escape to the different layers of peripheral tolerance checkpoints and differentiate *in vivo* into anti-SSA antibody-secreting cells