



Thèse

2021

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Biomarqueurs et maladies cardio-vasculaires dans le lupus érythémateux systémique

Nigolian, Haig

How to cite

NIGOLIAN, Haig. Biomarqueurs et maladies cardio-vasculaires dans le lupus érythémateux systémique. 2021. doi: [10.13097/archive-ouverte/unige:158719](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:158719)

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch//unige:158719>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:158719](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:158719)



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE



Hôpitaux
Universitaires
Genève

Département de Médecine

Service d'Immunologie et Allergologie

« Biomarqueurs et maladies cardio-vasculaires dans le lupus
érythémateux systémique »

Thèse préparée sous la direction des Professeurs Pascale ROUX-LOMBARD et Carlo CHIZZOLINI

Thèse

Présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Genève

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par

Mr Haïg NIGOLIAN

De

Bex (VD)

Thèse n° **11090**

Genève, le 13 décembre 2021

Référence de publication :

Rheumatology (Oxford). 2020 Mar 1;59(3):534-544. doi: 10.1093/rheumatology/kez306.

TABLE DES MATIERES

<u>RESUME</u>	<u>3</u>
<u>INTRODUCTION</u>	<u>3</u>
<u>BIOMARQUEURS ASSOCIES AU LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE</u>	<u>4</u>
<u>MALADIES CARDIO-VASCULAIRES DANS LE LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE</u>	<u>10</u>
<u>AUTO-ANTICORPS ASSOCIES AUX MALADIES CARDIO-VASCULAIRES</u>	<u>11</u>
<i>Anticorps anti-phospholipides</i>	<i>12</i>
<i>Anticorps anti-Heat shock protein et anti-LDL oxydées</i>	<i>14</i>
<i>Anticorps anti-apolipoprotéine A1</i>	<i>15</i>
<u>ÉTUDE DES ANTI-APOLIPOPROTEINES A1 DANS LA COHORTE SUISSE DES PATIENTS LUPIQUES</u>	<u>16</u>
<u>COMMENTAIRES SUR L'ARTICLE PUBLIE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>19</u>

Résumé

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie rare et complexe, pour laquelle plusieurs nouveaux biomarqueurs d'intérêt sont en cours d'investigation, dans l'espoir d'une meilleure aide au diagnostic, à la stratification des risques et à l'adaptation des traitements. La présence d'autoanticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A-1 (Anti ApoA-1 IgG) a été rapportée dans le LES, dans d'autres maladies et chez des contrôles sains. Dans certains cas, cet anticorps a pu être associés aux maladies cardio-vasculaires (MCV). Notre étude rétrospective a analysé les données de 176 patients de la cohorte suisse des patients lupiques (SSCS) pour établir une corrélation entre les anticorps anti-ApoA-1 IgG, ainsi que les anti-F3L1 IgG (dirigés contre un épitope immunogène de l'ApoA-1) et différents paramètres d'activité du LES comme la leucopénie, l'hématurie, la protéinurie, la consommation du complément, les anti-dsDNA, les anticorps anti-phospholipides, le score d'activité SLEDAI et le traitement par corticostéroïdes systémiques. Ceci argumente en faveur de l'utilisation de ce marqueur dans la pratique clinique. En revanche, nous n'avons pas pu démontrer une association de ce biomarqueur avec la présence de MCV chez les patients de la cohorte SSCS, et cet aspect nécessitera plus d'investigations. Dans le travail qui suit, nous passons en revue différents biomarqueurs d'activité dans le LES, dans les MCV et nous décrivons le lien important entre LES et MCV. Enfin, nous élaborons dans la conclusion et les perspectives quelques pistes pour l'étude future des anti-ApoA-1 IgG comme test pronostic du possible développement de MCV chez les patients lupiques.

Introduction

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie multi-systémique complexe et rare, rendant son étude difficile et passionnante. La perte de tolérance du soi est une caractéristique de cette maladie qui génère une réponse immunitaire contre plusieurs

antigènes cellulaires. L'inflammation et les dégâts tissulaires résultants sont à l'origine des manifestations cliniques pléiotropes dans le LES. En particulier, les complications cardio-vasculaires sont fréquentes et grevées de hautes morbidité et mortalité. Un intérêt croissant est donc porté sur la recherche de biomarqueurs utiles au diagnostic ou au suivi de cette maladie. Certains biomarqueurs pourraient permettre de définir des sous-groupes de patients à haut risque de complications spécifiques d'organes, comme par exemple les atteintes cardio-vasculaires. Dans ce travail, nous effectuons un tour d'horizon des biomarqueurs connus ou étudiés dans le LES, avec un regard particulier pour ceux associés aux maladies cardio-vasculaires (MCV). Puis dans cette continuité, nous décrivons et discutons l'article publié dans la revue *Rheumatology* en mars 2020, abordant l'étude des anticorps anti-apolipoprotéines A-1 (ApoA-1) de classe IgG comme biomarqueur dans un échantillon de la Cohorte Suisse des patients lupiques (SCSS).

Biomarqueurs associés au lupus érythémateux systémique

Les biomarqueurs peuvent être utiles à l'appréciation de la maladie par le clinicien ou en recherche clinique. Un biomarqueur est défini comme un paramètre mesurable sous forme moléculaire, biochimique ou génétique permettant d'identifier et/ou de monitorer un processus biologique, et pouvant comporter une valeur pronostique [1].

Ce paragraphe évoque plusieurs biomarqueurs établis ou en cours d'étude pour une utilisation diagnostique ainsi que pour le suivi du LES. Il s'agit classiquement du facteur anti-nucléaire (FAN), des anti-ADN double brin (dsDNA), du complément C3 et C4, et des paramètres hématologiques, avec une forte association entre les cytopénies (anémie, leucopénie, neutropénie, lymphopénie, thrombopénie) et les exacerbations de la maladie [2]. Des paramètres inflammatoires (C-reactive protein (CRP), vitesse de sédimentation),

peuvent être utilisés en clinique pour le suivi biologique de l'activité de la maladie. Plusieurs auto-anticorps sont utilisés comme biomarqueurs dans le LES, et parmi eux les anticorps anti-Smith (anti-Sm) sont associés à la protéinurie dans le LES, et peuvent être présents chez 15% de patients négatifs pour les anticorps anti-dsDNA [3]. Concernant l'atteinte articulaire dans le LES, on a constaté la présence d'anticorps anti-protéines carbamylés (également utilisé comme biomarqueurs diagnostiques dans la polyarthrite rhumatoïde) chez 50% des patients lupiques présentant des symptômes ostéo-articulaires, et significativement élevés en comparaison aux patients présentant un LES sans symptômes ostéo-articulaires ou aux contrôles sains [4]. Notons également la prévalence plus importante d'hypovitaminose D sévère chez des patients avec un LES actif [5].

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les cytopénies, associées au LES, soit médiées par des anticorps (anticorps anti-granulocytes, anticorps lymphotoxiques, anémie hémolytique autoimmune, thrombopénie autoimmune) par une lyse extravasculaire ou encore par une apoptose excessive des neutrophiles ou des lymphocytes. Ces atteintes peuvent également se présenter comme conséquences des complications de la maladie (infectieuse, néoplasique) ou du traitement [2,6,7]. Concernant les leucocytes, on a démontré chez les patients lupiques une diminution significative des lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfreg), qui inhibent l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh) dans le centre germinatif. De plus une diminution des Tfreg et l'augmentation du ratio Tfh/ Tfreg est corrélé à l'activité de la maladie et au titre des dsDNA [8]. De même, la quantité de lymphocytes identifiés comme « mucosal-associated invariant T cells », lymphocytes effecteurs se comportant comme des cellules de l'immunité innée, sont diminués dans le sang périphérique des patients lupiques en raison d'une apoptose induite par l'activation chronique de ces cellules,

révélée par le marqueur de surface CD69 [9]. A l'analyse de la formule sanguine, une diminution du volume thrombocytaire peut être observée en raison de l'activation des plaquettes chez les patients lupiques, également corrélée à la présence d'anticorps anti-phospholipides [10].

Les approches plus modernes et holistiques concernant les biomarqueurs englobent les connaissances issues de la génomique et de la protéomique. Entre 100 et 150 gènes sont associées au développement du LES [11,12], néanmoins la composante des loci d'intérêt génétique n'explique pas plus de 20% de l'héritabilité du LES [13], avec une prévalence de 25 à 69% de la maladie chez des jumeaux homozygotes [14]. Une grande variété de types de biomarqueurs, notamment génétiques, épigénétiques (p.ex. les micro ARN), et protéiques sont actuellement à l'étude pour leur rôle diagnostique ou pronostic dans le LES. C'est notamment le cas des micro ARN (miARN), ARN simples brins non codants qui lient des ARN messagers (ARNm) cibles et régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes concernés. Les miARN ont été étudiés dans le LES et suggérés comme marqueurs biologiques d'importance, en particulier dans l'atteinte rénale liée au LES par mesure plasmatique [15] ou urinaire [16], notamment pour le dosage des miR-3201 et miR-1273 urinaires qui sont significativement diminués dans la néphrite lupique et corrélés à l'inflammation endocapillaire glomérulaire [17].

Alternativement, l'approche « transcriptomique » peut être utilisée pour la mesure de paramètres dont la variabilité rend la mesure difficile dans le sérum. Par exemple, plusieurs auteurs plutôt que quantifier directement l'interféron de type I (IFN-I) décrit pour son lien dans le développement du LES, ont préféré la détection quantitative des ARNm des gènes induit par IFN-I et par là même de son activité. Cette approche permet non seulement de distinguer des « profils transcriptomiques » propres à chaque patient

selon l'expression de la maladie et les types d'atteintes [18], mais potentiellement également d'adapter la thérapie en fonction de ce profil avec des résultats prometteurs [19–21].

L'approche « protéomique » des biomarqueurs, largement utilisée, permet grâce à différentes techniques (spectrométrie de masse, microarray protéiques, électrophorèse capillaire, chromatographie en phase liquide notamment) d'étudier les protéines traduites et leur modifications ultérieures pouvant altérer leurs fonctions, à la recherche de biomarqueurs pertinents dans le LES. De nombreuses protéines candidates ont été étudiées. Certaines parmi les plus prometteuses sont la protéine S100-A9 phosphorylée (marqueur diagnostic) [22], et la serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP, marqueur pronostic) [23]. D'autres encore sont l'interféron gamma (sanguin et urinaire), la chimiokine C-X-C motif ligand 16 (CXCL16), et l'activateur du plasminogène de type urokinase, qui ont montré une association avec l'activité de la maladie, qui sont sécrétés dans le tissu rénal des patients présentant une néphrite lupique, et sont associés à la sévérité des lésions histopathologiques [24]. Un autre marqueur sérique, l'ostéopontine, composant de la matrice extracellulaire avec un rôle immunomodulateur, est augmentée en moyenne d'un facteur 4 dans le LES, et corrèle avec l'activité de la maladie et les dommages d'organes ainsi qu'avec la présence de syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) [25]. L'IFN- γ inducible protein 10 (IP-10) et la sialic acid-binding Ig-like lectin 1 (SIGLEC1) sont proposés comme pour monitorer l'activité de la maladie et la réponse au traitement car ils sont mieux corrélés aux poussées et aux rémissions de la maladie que les marqueurs classiques [26]. D'autres encore ont été évalués au cours de plusieurs études avec des résultats intéressants, comme pour les annexines A2 and A5, la sérotransferrine, and les apolipoprotéines A-I, CIII, C-I, A-IV [27].

Concernant les patients présentant une néphrite lupique (NL), l'analyse de biopsies rénales a montré des résultats prometteurs pour plusieurs peptides comme la sérotransferrine, les cytokératines 18 and 19, l'albumine et l'annexine A5, ou encore l'alpha-1-antitrypsine urinaire [28]. D'autres marqueurs spécifiques de la NL sont les dosages urinaires de l'alpha-1-antichymotrypsine, de l'haptoglobine, et dans une moindre mesure de la retinol binding protein, qui sont augmentés en cas de NL et absents en cas de LES inactif [29]. De même, le taux de la neutrophil gelatinase-associated lipocaline (NGAL) et la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 ou CCL2) sérique et urinaire est augmentée chez les patients lupiques, en comparaison avec des contrôles sains. De plus chez les patients lupiques présentant une NL en comparaison aux patients lupiques sans atteinte rénale, la NGAL est augmentée de manière marquée, tandis que la MCP-1 urinaire corrèle avec l'activité de la maladie mesurée par le SLE disease activity index (SLEDAI), la diminution de la fraction C3 du complément, la protéinurie et la diminution du taux de filtration glomérulaire [30].

Concernant les atteintes pulmonaires dans le LES, peu de biomarqueurs pertinents sont actuellement identifiés. Dans une cohorte hongroise de 18 patients lupiques dont la moitié présentait une atteinte pulmonaire, le taux sérique d'IP-10 et de chemokine ligand 21 (CCL21) était augmenté de manière significative chez les patients avec une atteinte pulmonaire. De plus, l'augmentation d'IP-10 corrélait avec la capacité vitale forcée (FVC) et le VEMS, tandis le CCL21 corrélait inversement avec les paramètres de diffusion du monoxyde d'oxygène (DLCO et KCO) à l'examen des fonctions pulmonaires [31].

Les biomarqueurs associés à l'atteinte cardiovasculaire dans le LES sont détaillés dans le chapitre suivant. Il est toutefois notable qu'en dehors des marqueurs utilisés dans la pratique pour leur association aux événements cardio-vasculaires (troponine, D-dimères)

et du dosage des anti-phospholipides (associés ou non au SAPL), il n'y a actuellement pas de biomarqueur spécifique à l'atteinte cardio-vasculaire dans le LES malgré une élévation bien démontrée de ce risque d'atteinte chez les patients lupiques (voir chapitre 3). Les scores de Framingham de stratification du risque estimé de MCV à 10 ans ne sont notamment pas assez sensibles pour capturer le risque chez ces patients [32].

Enfin, une approche novatrice pour l'analyse des biomarqueurs est celle de l'analyse du « métabolome », explorant les paramètres métaboliques de certaines cellules des patients affectés afin d'établir une « identité métabolique » spécifique au diagnostic, illustré dans le LES par l'équipe de Wu et al. en 2012 [33]. L'analyse de nombreux métabolites appartenant à différentes voies métaboliques (glycolyse, beta-oxydation des acides gras, etc.) permet de distinguer et d'associer les perturbations importantes de ces voies métaboliques chez les patients lupiques (et également dans d'autres maladies comme la polyarthrite rhumatoïde), en relation notamment avec l'augmentation du stress oxydatif, de l'inflammation, et une diminution de l'énergie cellulaire produite [34]. Une étude de 2016 sur le « métabolome » de 80 patients suivi pour LES comparés à 57 contrôles sains correspondants en âge et sexe a montré une corrélation de certains métabolites avec le score d'activité SLEDAI, avec certaines manifestations organiques (cutanée, muqueuse, musculo-squelettique, hématologique ou rénale) et avec la consommation du complément C3 et C4 [35]. Une autre approche analytique du « métabolome » urinaire chez des patients présentant une néphrite lupique a suggéré la possibilité de distinguer les atteintes de classe III/IV et de stade V [36].

Maladies cardio-vasculaires dans le lupus érythémateux systémique

Les MCV dans le LES sont d'expression variée, et expliquent une partie notable de la morbidité et mortalité de la maladie. La prévalence importante des MCV due à la maladie, en lien avec à l'inflammation chronique ou encore les traitements reçus, représente une cause majeure de mortalité chez les patients lupiques. Leur prévalence s'élève en moyenne à 10% selon les analyses des cohortes de patients lupiques issus des groupes de recherche de Toronto, Pittsburgh, et Baltimore [37–40]. Ces chiffres varient entre études en fonction des critères d'inclusion des MCV utilisés parmi lesquels l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde sont les plus fréquemment admis. Les définitions plus larges intègrent comme événement cardio-vasculaire les AVC, les AIT, les maladies vasculaires périphériques et les morts subites. Ces données représentent probablement une sous-estimation de l'impact réel en raison des de la durée limitée des études disponibles, avec toutefois une durée d'étude de 34 ans pour la cohorte de Toronto. Dans cette cohorte, les résultats décrits par Urowitz et al. montrent une prévalence de l'angine de poitrine et de l'infarctus chez 1087 patients lupiques de 10.9 % [38]. Selon une étude plus récente, le risque d'évènement cardio-vasculaire est augmenté jusqu'à 6 fois dans la première année après le diagnostic, et reste augmenté de manière significative jusqu'à 5 ans après le diagnostic de manière indépendante des facteurs de risque cardio-vasculaires (FRCV) traditionnels (âge, hypertension, hypercholestérolémie, tabagisme, etc.) [41]. On note que le risque cumulé de MCV chez ces patients est 5 à 10 fois supérieur en comparaison avec une population saine après ajustement pour le sexe et l'âge [42]. Le risque d'infarctus du myocarde est 2 à 10 fois plus élevé et le risque d'AVC 2 à 8 fois plus important entre 18 et 44 ans par rapport à des contrôles sains après l'ajustement des FRCV classiques selon des études californienne et montréalaise [43,44]. De même, dans la cohorte de 498 patientes lupiques de Pittsburgh en Pennsylvanie, les femmes de 34 à 44 ans présentaient jusqu'à

50x plus de risque de présenter un infarctus du myocarde en comparaison avec des contrôles sans LES [39,44]. Le LES est associé à une fréquence augmentée de MCV par une association importante avec des FRCV comme l'hypertension et l'insuffisance rénale, de sorte que le diagnostic même de LES est considéré comme un FRCV précoce. Même chez des patients lupiques avec un profil de risque cardiovasculaire estimé faible selon le score de risque Framingham (évaluant le risque cardio-vasculaire à 10 ans), une association a été retenue entre l'élévation basale de la troponine sérique ultrasensible et la présence à l'ultrason de plaques d'artériosclérose carotidienne [32]. Enfin, l'emploi des traitements anti-inflammatoires (AINS ou de corticostéroïdes), participe également au développement des MCV. En effet, la dose cumulée d'inhibiteurs COX et de corticostéroïdes représente un facteur de risque cardio-vasculaire supplémentaire. Enfin, les atteintes vasculaires veineuses (thromboses veineuses profondes, embolies pulmonaires) sont également fréquentes avec un prévalence d'au moins 20 à 30 %, en particulier en association avec le syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) [45]. Le CDL40 sérique a montré une association avec la présence d'APL et de thromboses artérielles chez ces patients [46].

Auto-anticorps associés aux maladies cardio-vasculaires

L'implication de l'immunité innée et adaptative est étudiée chez les patients présentant des MCV associées ou non aux maladies auto-immunes. La présence de certains auto-anticorps corrèle avec un risque augmenté de MCV selon la littérature disponible. Ceux-ci sont classés comme fortement, probablement ou possiblement associés selon la force du niveau d'évidence à disposition. On retrouve en particulier une forte association entre MCV et la présence d'anticorps anti bêta-2-glycoprotéine 1 (β 2GP1), anti-LDL oxydé (oxLDL), et anti-heat-shock proteins (HSP) [47-51]. Les autoanticorps dirigés contre la

cardiolipine, la phosphorylcholine, l'apolipoprotéine A1 (ApoA-1), le complexe oxLDL/ β 2GP1, les HDL, l'enzyme de conversion d'angiotensine (ECA), la sérum amyloïde A (SAA) et la lipoprotéine lipase (LPL) présentent une association classée probable avec les MCV. Les anti-*Trypanosoma cruzi* Shed Acute Phase Antigen (SAPA), anti-insuline, anti-mannose binding protein (MBL), et les anti-CRP quant à eux sont classés comme possiblement associés aux MCV [47]. A noter que d'autres auto-anticorps identifiés chez des patients présentant une cardiopathie hypertensive n'ont pas encore été étudiés chez les patients présentant des connectivites et ne seront pas abordés ici [49]. Ci-dessous, nous passons brièvement en revue quelques caractéristiques et données disponibles dans la littérature concernant les anticorps anti-phospholipides, les anti-Heat-shock protein les anti-LDL oxydés, qui présentent une corrélation forte avec le risque d'évènements cardiovasculaires. Nous abordons également les anticorps anti-apolipoprotéine A1 étudiés dans notre étude décrite plus bas.

Anticorps anti-phospholipides

Ces auto-anticorps sont dépistés sous la forme d'anticorps anti-cardiolipine IgM et/ou IgG, anti- β 2GP1 IgM et/ou IgG, ou de l'anticoagulant lupique. Le nom de ce dernier est évocateur de son effet *in vitro* (allongement du PTT), mais non de son effet *in vivo* (pro-thrombotique). La β 2GP1 ou apolipoprotéine H lie la cardiolipine et génère un effet anticoagulant par effet sur les plaquettes et les facteurs de coagulation, qui peuvent néanmoins s'inverser dans certaines conditions (effet pro-coagulant).

Il existe plusieurs méthodes de dépistage des anticorps anti-phospholipides (APL), comprenant notamment le temps de céphaline activée sensible (aPTT) comme test de dépistage, le dilute Russel Viper Venom Test (dRVVT) pour le dépistage de l'anticoagulant lupique, et les Elisa anti-cardiolipines et anti β 2GP1. Les APL ciblent les phospholipides,

ainsi que de nombreuses protéines plasmatiques avec une affinité pour les molécules anioniques (ex. β 2GP1) mais également exprimées à la surface de cellules comme les cellules endothéliales, les monocytes et les plaquettes [52]. Le complexe β 2GP1 lié aux anticorps anti- β 2GP1 se lie par exemple directement aux thrombocytes et les active de manière indépendante du récepteur Fc plaquettaire [53]. Les cibles de ce complexe moléculaire sont notamment la LDL-receptor related protein 8 (LRP8), l'annexine A2, le toll-like récepteur 4 (TLR4) [54], et possiblement le TLR2 et des éléments de la cascade du complément [55-58], engendrant des signaux de signalisation cellulaires qui promeuvent l'inflammation et l'effet pro-coagulant, et ainsi les événements thrombotiques ou les complications de la grossesse. Néanmoins, tous les mécanismes physiopathologiques associés ne sont pas élucidés [58]. Certains APL comme les anti-phosphatidylsérine IgG et les anti-acide phosphatidique IgG semblent prometteurs comme biomarqueurs d'un risque thrombotique augmenté chez des patients qui ne présentent pas de syndrome classique des APL [59]. D'autres APL comme les anticorps dirigés contre le complexe phosphatidylsérine-prothrombine (aPS/PT), comprenant les anti-phosphatidylinositol, anti-phosphatidyléthanolamine et anti-phosphatidylglycérol, montre aussi une association élevée aux événements thrombotiques et pourraient être utiles en cas de SAPL séronégatif pour les APL classiques [60,61]. D'autres encore comme les anticorps anti-prothrombine, les anti-annexine V, présentent un rôle pathogène controversé, dont la pertinence clinique n'a pas encore pu être démontrée [59,62].

Les APL peuvent être générés dans le cadre de pathologies auto-immunes, d'autres pathologies (ex : microangiopathies, infections) ou de manière isolée, souvent en association avec des événements thrombotiques cliniques ou infracliniques. Un consensus sur les critères de classification du syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) a été établi lors de la conférence de Sapporo en 1996 [63]. Il se

caractérise par l'association d'évènements thrombotiques (thromboses veineuses y compris thrombose veineuse profonde des membres inférieurs, embolie pulmonaire, thromboses artérielles comprenant les AVC, infarctus du myocarde ou autres atteintes artérielles) ou de complications obstétricales (perte de grossesse au-delà du 1^{er} trimestre, pré-éclampsie et naissance prématurée, HELLP syndrome) en présence d'APL confirmés à deux reprises à 12 semaines d'intervalle, posant habituellement l'indication à un traitement anticoagulant au long cours. D'autres atteintes d'organes peuvent être associées : atteinte cardiaque valvulaire, cutanée (livedo, nécroses), rénale et surrénale, pulmonaire, osseuse et ophtalmologique notamment. Le LES est la maladie auto-immune la plus fréquemment associée aux APL, et ces derniers font partie de ses critères de classification selon la ligue européenne contre le rhumatisme (EULAR) et l'association américaine de rhumatologie (ACR) [64]. Les évènements thrombotiques dans ce contexte peuvent toucher les artères ou les veines de toutes tailles. En plus des thromboses artério-veineuses, les manifestations du SAPL peuvent inclure une thrombocytopénie, un *livedo reticularis*, des ulcères cutanés, des atteintes valvulaires cardiaques, rénales, pulmonaires ou neurologiques. Le terme de SAPL catastrophique (CAPS) est utilisé lors de présentations avec atteinte organiques sévères [65].

Anticorps anti-Heat shock protein et anti-LDL oxydées

Ces auto-anticorps sont dirigés contre les Heat shock protein (Hsp), une famille de protéines hautement conservées chez les eucaryotes, avec fonction de chaperonnes impliquées notamment dans la réponse cellulaire au stress. Ces anticorps, en particulier les anti-Hsp 60 et anti-Hsp 65 ont montré une association avec une élévation du risque d'évènement cardiovasculaire [50,66]. La présence des anticorps anti-Hsp 65 a été évaluée chez des patients présentant un LES, montrant une prévalence très hétérogène

de 0 à 50% selon les différentes séries de cas alors qu'elle est de 1 à 3 % chez les contrôles sains [48].

Les anticorps anti-LDL oxydées (anti-oxLDL) quant à eux corrélerent avec l'épaisseur maximale intima/media qui est un reflet du risque cardio-vasculaire [67]. Les anticorps dirigés contre la palmitoyl arachidonoyl phosphocholine oxydée (anti-oxPAPC), un épitope antigénique important de l'oxLDL, ont été associés de manière significative aux évènements cardiovasculaires. Plus récemment, des anticorps dirigés contre le complexe oxLDL/ β 2GP1, fréquemment observé dans le SAPL, a été étudié pour son association avec le développement rapide d'artériosclérose. Néanmoins, une association directe avec l'artériosclérose subclinique n'a pas pu être démontrée [47].

Anticorps anti-apolipoprotéine A1

Les apolipoprotéines représentent la composante protéique des macromolécules lipidiques complexes nommées lipoprotéines. Celles-ci sont caractérisées par leur densité et composition : HDL ou *high density lipoprotein*, IDL ou *intermediate density lipoprotein*, LDL ou *low density lipoprotein*, VLDL ou *very low density protein*, et les chylomicrons. Leur rôle principal consiste à transporter les lipides et les vitamines à travers la circulation sanguine. Parmi elles, les apolipoprotéines A-1 (ApoA-1) entrent dans la composition des HDL et des chylomicrons, et sont reconnues pour leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes avec un rôle protecteur sur le système cardio-vasculaire [68,69]. Des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A-1 (anti-ApoA-1 IgG) ont initialement été décrits chez des patients lupiques présentant un SAPL [70–72]. Par la suite, leur association avec des évènements cardiovasculaires a été illustrée dans le contexte de l'infarctus du myocarde et de la polyarthrite rhumatoïde [73–75]. Il a été observé que la corrélation entre anti-apoA-1 IgG et les évènements cardio-vasculaires est en partie liée

au polymorphisme génétique du CD14 [76]. En effet, l'effet pro-inflammatoire des IgG anti-ApoA-1 est médié par la liaison de l'anticorps au complexe TLR2/CD14 résultant en une chaîne de signalisation pro-inflammatoire via le *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), une voie d'activation également partagée par les APL et les anticorps anti-Hsp [77].

On retrouve également les anti-ApoA-1 IgG dans la population générale (environ 20%) [78], où ils sont associés à un risque cardio-vasculaire et une mortalité augmentés [78–80], avec plus récemment certains résultats contradictoires [76]. Chez les patients présentant des évènements cardio-vasculaires, deux épitopes immunodominants de l'ApoA-1 préférentiellement reconnus par ces anticorps ont été identifiés, et un peptide stable mimant l'hélice alpha C-terminale nommé F3L1 a été synthétisé [81,82].

Étude des anti-apolipoprotéines A1 dans la cohorte suisse des patients lupiques

La Cohorte Suisse de Patients Lupiques ou Swiss SLE Cohort Study (SSCS) pour la recherche sur le LES est un groupe de patients issus de différents centres hospitaliers suisses, suivi de manière multidisciplinaire par des spécialistes du domaine. Elle a été mise en place en 2006 par une équipe collaborative issue des hôpitaux de Bâle, Berne, Genève, Lausanne, Schaffhouse, Sion, St Gall et Zürich avec l'approbation des comités d'éthique respectifs de ces établissements. Tout patient présentant un diagnostic de LES probable ou avéré (compatibles avec les critères de l'American College of Rheumatology) et habitant en Suisse peut être inclus dans la cohorte. Un suivi annuel clinique et biologique standardisé est proposé en complément du suivi habituel. La base de données comprend à ce jour > 700 patients [83]. Pour cette étude, les données en provenance d'un échantillon de 176 patients de la SSCS récoltées entre 2008 et 2013 ont été analysées.

Comme mentionné au chapitre précédent, plusieurs biomarqueurs d'intérêts apportent des informations diagnostiques ou pronostiques importantes dans l'évaluation du LES. Toutefois, bien que les évènements cardio-vasculaires représentent une cause de morbi-mortalité notable chez les patients lupiques, il n'y a malheureusement pas actuellement de marqueur spécifique des MCV dans le LES, en dehors des marqueurs traditionnels de MCV qui sous-estiment parfois ce risque. La présence d'anticorps anti-ApoA-1 IgG (ainsi que les anticorps dirigés contre le F3L1, son épitope immuno-dominant) a été associée de façon controversée dans la littérature à des évènements cardiovasculaires chez des patients sans maladie auto-immune, mais également dans le LES, le SAPL, et la polyarthrite rhumatoïde [70–72,78]. C'est pourquoi il semble intéressant d'élaborer une réponse aux deux questions suivantes en utilisant des échantillons de la SSCS :

- 1) Existe-t-il une corrélation entre la positivité des anti-ApoA-1 et des paramètres d'activité du LES ?
- 2) La présence d'anti-ApoA-1 IgG dans le LES est-elle associée à une augmentation du nombre d'évènements cardio-vasculaires ?

Nous avons donc décrit les caractéristiques des patients de la SSCS inclus dans notre analyse (176 patients). Puis, les mêmes paramètres ont été étudiés dans les deux sous-groupes de patients, respectivement positifs ou négatifs pour les anticorps anti-ApoA-1 IgG, afin de déterminer la présence d'une différence significative entre ces groupes. Cette analyse a été effectuée de manière similaire pour les anticorps anti-F3L1 IgG, et pour les échantillons disponibles à un an d'intervalle de la première visite (matériel supplémentaire de l'étude). Ensuite, nous avons évalué la corrélation entre le titre des anti-ApoA-1 IgG, respectivement anti F3L1 IgG, et les différents paramètres cliniques, biologiques et le score d'activité SLEDAI de la maladie, ainsi que la variation de ces titres

au cours du temps. Enfin, nous avons recherché une corrélation entre le nombre d'évènements cardio-vasculaires et la présence de ces auto-anticorps d'intérêt. L'article décrivant ces résultats a été publié en mars 2020 dans la revue *Rheumatology* (<https://academic.oup.com/rheumatology/article/59/3/534/5543451>) y compris pour les analyses, tables et figures supplémentaires disponibles à la même adresse.

Original article

Anti-apolipoprotein A-1 autoantibodies correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus

Haïg Nigolian¹, Camillo Ribi², Delphine S. Courvoisier³, Sabrina Pagano^{4,5},
Montserrat Alvarez¹, Marten Trendelenburg⁶, Uyen Huynh-Do⁷,
Nicolas Vuilleumier^{4,5}, Jean-Michel Dayer⁸, Carlo Chizzolini^{1,*} and
Pascale Roux-Lombard^{1,*}

Abstract

Objectives. Apolipoprotein A-1 (ApoA-1) is a protein fraction of the high-density lipoproteins with anti-inflammatory and antioxidant properties that play a major role in reverse cholesterol transport. The presence of anti-ApoA-1 IgG has been reported in SLE to be variably associated with disease activity or cardiovascular events (CVEs). We assessed the clinical performance of anti-ApoA-1 IgG and of antibodies directed against its immunodominant F3L1 peptide (F3L1 IgG) in a well-characterized Swiss SLE cohort study.

Methods. A total of 354 biological samples and interviews from 176 individuals were studied. SLEDAI, clinical characteristics, anamnestic CVEs and therapy details were recorded. Sera were tested for the presence of anti-ApoA-1 IgG, anti-F3L1 IgG, anti-dsDNA IgG and aPL.

Results. Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG positivity was associated with higher SLEDAI, mostly due to concomitant positivity of dsDNA IgG and low complement. Variations in time of anti-ApoA-1 IgG correlated positively with variations of anti-dsDNA IgG and inversely to variations of C3 levels. No cross-reactivity was found between anti-ApoA-1 and anti-dsDNA IgG. Positivity for anti-ApoA-1 IgG was more frequent in individuals receiving 10 mg/day or more of prednisone. We did not find any significant association between anti-ApoA-1 IgG positivity and CVEs.

Conclusion. Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG in SLE correlate strongly with laboratory markers of activity, particularly with the presence and titre of dsDNA IgG. These results confirm and extend previous findings and support the use of anti-ApoA-1 IgG in the clinical setting. Their role in CVEs deserves further investigation.

Key words: systemic lupus erythematosus, SLEDAI, anti-apolipoprotein-A1 antibody, anti-F3L1 antibody, anti-dsDNA antibody, anti-phospholipids antibody, biomarker, cardiovascular events

Rheumatology key messages

- Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG are frequently present in SLE.
- Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG correlate with SLEDAI and anti-dsDNA antibodies in SLE.
- Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG antibodies are not associated with cardiovascular events in the Swiss SLE cohort study.

Introduction

SLE is an autoimmune disease characterized by loss of tolerance towards self-components and the generation of a wide variety of autoantibodies (Abs) directed against

ubiquitous as well as organ-specific auto-antigens [1]. However, the extent to which Abs are involved in disease progression and organ damage remains subject to debate [1]. Significantly, SLE clinically progresses through flares and remissions, and biomarkers associated with disease

¹Division of Immunology and Allergy, University Hospital and School of Medicine, Geneva, ²Division of Immunology and Allergy, University Hospital of Lausanne and Lausanne University, Lausanne, ³Division of Rheumatology, University Hospital and School of Medicine, ⁴Division of Laboratory Medicine, Diagnostic Department, ⁵Department of Internal Medicine Specialties, University Hospital and School of Medicine, Geneva, ⁶Laboratory for Clinical Immunology, Department of Biomedicine and Division of Internal Medicine, University Hospital of Basel, Basel, ⁷Division of Nephrology and Hypertension, Inselspital, Bern University Hospital,

Bern and ⁸Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

Submitted 17 April 2019; accepted 21 June 2019

*Carlo Chizzolini and Pascale Roux-Lombard contributed equally to this study.

Correspondence to: Pascale Roux-Lombard, Division of Immunology and Allergy, University Hospital and School of Medicine of Geneva, Rue Gabrielle-Perret-Gentil 4, 1205 Geneva, Switzerland. E-mail: Pascale.Roux-Lombard@hcuge.ch

activity may be clinically useful in identifying patients at risk of disease exacerbations [2]. Furthermore, in SLE, morbidity and mortality are not only associated with organ involvement, but also with cardiovascular events (CVEs), particularly in young individuals [3]. Apolipoproteins are the most important protein components of amphipathic lipoproteins transporting lipids in the blood. Among them, apolipoprotein A-1 (ApoA-1) is the major protein fraction of high-density lipoproteins, which play a key role in reverse cholesterol transport and are endowed with substantial anti-inflammatory and antioxidant properties, thereby exercising a protective role in the cardiovascular system [4, 5]. Notably, Abs directed against ApoA-1 were initially described in patients with SLE and the aPL syndrome [6–8]. The literature has since expanded, illustrating their potential role as risk factors in the development of CVEs, both in diseases with an auto-immune background (such as RA [9]) and in other pathological contexts, particularly coronary heart disease [10–13]. They have also been found in the general population, where these antibodies have been reported to represent an independent CVE risk factor [14] associated with increased mortality, susceptibility polymorphisms and incident coronary events [15, 16], although this has recently been disputed [17].

Moreover, two immunodominant epitopes were identified in ApoA-1, and a synthetic, stable peptide, named F3L1, which mimics a portion of the C-terminal alpha-helix, is preferentially recognized by Abs in individuals with CVEs [18, 19].

When studied in SLE, anti-ApoA-1 Abs (anti-ApoA-1 IgG) have been variably associated with disease activity. It is still debated whether or not their presence is associated with CVEs [20–24], and no data are available on anti-F3L1 antibodies in SLE. We revisited these issues through the lens of the well-characterized, nationwide, multicentric, transdisciplinary Swiss SLE Cohort Study [25].

Methods

Patient cohort

Serum samples were obtained from 176 individuals satisfying at least four ACR SLE criteria and consecutively enrolled in the prospective Swiss SLE Cohort Study from April 2007 to January 2015 [25]. Follow-up samples were collected yearly (a total of 354 distinct samples), and these were processed in a single laboratory in Geneva. Disease activity was captured by Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment (SELENA)-SLEDAI [26], with organ involvement and medication recorded at each study visit [25]. The controls were age- and sex-matched healthy individuals donating blood at the Transfusion Centre of the University Hospital in Geneva. Ethical clearance was granted in all participating Swiss SLE Cohort Study centres. Informed, written consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki.

Determination of human antibodies to ApoA-1/F3L1 by ELISA

Anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG serum levels were assessed as previously described [10, 11, 27]. All samples were tested in duplicates. An index consisting of the ratio between sample absorbance and a standard positive control absorbance $\times 100$ was calculated. Sera from 48 healthy donors served to define the threshold for positivity of anti-ApoA-1 IgG and for anti-F3L1 IgG. The value corresponding to the 97.5th percentile of the normal distribution gave an IgG index of 42 for anti-ApoA-1 and 37 for anti-F3L1. Accordingly, samples tested for anti-ApoA-1 were considered positive when their index was ≥ 42 , and samples tested for anti-F3L1 were considered positive when ≥ 37 .

Determination of antibodies to dsDNA by ELISA

Anti-dsDNA serum levels were measured by ELISA using a commercially available method (QUANTA Lite dsDNA, Inova Diagnostics, San Diego, CA), according to the supplier's instructions, in a single laboratory in Geneva (Laboratory of Immunology and Allergy, University Hospital, Switzerland). The threshold of positivity was 200 U.

Determination of aPL

Lupus anticoagulant was detected using ACL TOP (IL, France), which detected the ability to prolong the phospholipid-dependent DRVVT test. The presence and titre of aCL, anti- $\beta 2$ glycoprotein 1 (anti- $\beta 2$ GP1) IgG and aPS-PT IgG was assessed using the HemosIL AcuStar Coagulation Analyzer (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) [28]. The cut-off values for these tests were based on the 99th percentile and the corresponding 95% confidence interval for each antibody of 626 healthy Blood Bank donors. All the assays were performed in a single laboratory in Geneva (Hemostasis Unit, University Hospital, Switzerland).

Competition ELISA to test the cross-reactivity of anti-ApoA-1 Ab

Sera of patients known to be highly positive for anti-ApoA-1 IgG, anti- $\beta 2$ GP1 IgG and anti-dsDNA IgG were pre-incubated for 2 h at room temperature with or without different competitors: F3L1 (Geneva University, Switzerland), $\beta 2$ GP1 (Haematologic Technologies Inc., USA) and dsDNA (Inova Diagnostics, USA) at three concentrations prior to addition to wells coated with ApoA-1. Anti-ApoA-1 IgG were then assessed according to standard protocol. Tests were performed in triplicate. Percentage maximal ELISA signals were calculated as $100 \times \frac{[\text{signal in well}] - [\text{mean background signal (uncoated well)}]}{[\text{mean maximal signal (no competing peptide)}] - [\text{mean background signal}]}$.

Statistical analysis

To compare groups according to anti-ApoA-1 IgG status, we used the Fisher's exact, χ^2 tests for categorical variables, the Mann-Whitney test for continuous variables. To

compare groups' characteristics at baseline and at the 1 year assessment, we used McNemar's test and the dependent *t* test. Spearman correlations were used for bivariable association. For multivariable association, we used multilevel regression with random intercept to account for the repeated measures per individual. Statistical analysis was performed by using SPSS Statistics® version 25 from IBM Corp. Armonk, NY USA, and Prism® version 7 from Graphpad Software Inc, San Diego, California.

Results

Clinical characteristics of anti-ApoA-1 IgG+ and anti-F3L1 IgG+ SLE patients

This cohort was composed of 176 SLE individuals. Their mean age at inclusion was 44 years (15) [range 17–85], 85% were women, and 78% were of Caucasian origin. The mean age at SLE diagnosis was 35 years (15) [range 12–73]. Of the 176 included SLE patients, 104 individuals contributed an additional sample after 1 year; 47 after 2 years; 20 after 3 years; 6 after 4 years and 1 after 5 years. Anti-ApoA-1 IgG Abs were detected in 76 (43%) initial samples of the 176 patients. The main clinical characteristics, distribution of ACR criteria, as well as treatment at inclusion are reported in Table 1. In general, no major clinical differences were observed when anti-ApoA-1 IgG+ and anti-ApoA-1 IgG- individuals were compared, with the exception of younger age at first assessment [42 (15) years in anti-ApoA-1 IgG+, vs 46 (14) years in anti-ApoA-1 IgG-, $P=0.048$] and lower frequency of seizures in anti-ApoA-1 IgG+ (12% in anti-ApoA-1 IgG- and 3% in anti-ApoA-1 IgG+, $P=0.025$). Notably, however, the frequency of individuals historically positive for aPL, and the frequency of individuals under anti-platelet agents, were both statistically higher in anti-ApoA-1 IgG+ compared with anti-ApoA-1 IgG- individuals. Thus, 62% vs 37% ($P < 0.001$) were positive for aPL and 29% vs 13% ($P < 0.001$) were under anti-platelets agents in anti-ApoA-1 IgG+ and anti-ApoA-1 IgG-, respectively. All sera were also tested for anti-F3L1 antibodies, and 39 patients (22%) were positive at first assessment, with a moderate agreement with anti-ApoA-1 IgG positivity (kappa coefficient=0.348; $P < 0.05$). However, anti-ApoA-1 and anti-F3L1 antibodies titres were highly correlated (Spearman coefficient=0.66, $P < 0.001$). At inclusion, in accordance with associations found with anti-ApoA-1 IgG+, the anti-F3L1 IgG positive compared with negative individuals were more likely to be positive for aPL (74% vs 40%, $P < 0.001$). Other items at inclusion did not differ significantly according to the anti-F3L1 IgG status (Table 1). 'Total cholesterol and triglycerides levels were available in 123 individuals, of which 18 were under statin treatment. Total cholesterol and triglyceride levels were not different in anti-ApoA-1 IgG positive vs negative patients, regardless of whether they were receiving lipid-lowering drugs or antimalarials.'

Intergroup difference in SLE treatments

Anti-ApoA-1 IgG+ showed a trend for higher frequency of use of CSs at inclusion, although this was not significant (Table 1). However, we demonstrated a significantly higher frequency of anti-ApoA-1 among patients grouped by CSs treatment categories <10 mg/day or >10 mg/day ($P=0.04$), in accordance with previous data [24]. No significant difference was found when comparing anti-ApoA-1 IgG+ and anti-ApoA-1 IgG- groups for antimalarial agents, immunosuppressant agents, NSAIDs, lipid-lowering drugs or anti-coagulant use (Table 1).

Association between anti-ApoA-1 IgG/anti-F3L1 IgG and parameters of disease activity in SLE

SLEDAI was slightly but statistically significantly higher in anti-ApoA-1 IgG+, with a median of 6 points (interquartile range 2–10) compared with 4 points (interquartile range 0–8) in anti-ApoA-1 IgG- individuals, $P=0.028$. This was also observed when comparing anti-F3L1 IgG+ and anti-F3L1 IgG- individuals, $P=0.025$ (Table 2). While there was a trend for an association between anti-ApoA-1 IgG+ and arthritis (26% vs 16%, $P=0.093$), no other clinical items captured by SLEDAI were associated with anti-ApoA-1 IgG positivity. However, a number of laboratory items were more frequently abnormal in anti-ApoA-1 IgG+ compared with in anti-ApoA-1 IgG- individuals. These included the presence of haematuria, proteinuria, leukopenia and anti-dsDNA Abs, and lower levels of complement C3 and C4. Similarly, anti-F3L1 IgG+ compared with anti-F3L1 IgG- individuals had significantly higher anti-dsDNA IgG titres, and lower complement levels for both C3 and C4 (Table 2). To foster these observations, we then assessed whether there was a correlation between the titre of anti-ApoA-1 IgG and the titre of anti-dsDNA Abs, and with the C3 and C4 serum levels, in all longitudinal samples that were available ($n=354$). A positive correlation was observed with anti-dsDNA Abs, and a negative correlation with C3 and C4 serum levels (Fig. 1A). Notably, the correlation was lower when the contribution of complement consumption was excluded from the SLEDAI, and was not any more significant when both the contribution of anti-dsDNA antibodies' positivity and complement consumption were excluded (Fig. 1B). Similar results were found for anti-F3L1 IgG, which showed a positive correlation with anti-dsDNA ($n=348$, Spearman $\rho=0.412$, $P < 0.001$) and a negative correlation with C3 ($\rho=-0.299$, $P < 0.001$) and C4 ($\rho=-0.252$, $P < 0.001$) (Fig. 1C). There was a correlation with SLEDAI ($\rho=0.174$, $P=0.001$), which was still significant when complement consumption was removed from the SLEDAI ($P=0.014$), but which lost significance when both anti-dsDNA and complement consumption were removed from the score ($P=0.352$) (Fig. 1D).

Multiple regression analysis

When using multiple regression analysis, both the contribution of anti-ApoA-1 and anti-F3L1 antibodies to

TABLE 1 Characteristics at inclusion into the SLE cohort with respect to anti-ApoA-1/anti-F3L1 IgG status

Clinical/biological features	Anti-ApoA1 IgG - (n = 100)		Anti-ApoA1 IgG + (n = 76)		Anti-F3L1 IgG - (n = 137)		Anti-F3L1 IgG + (n = 89)		P-value
	All (n = 176)	86/14 (86/14)	63/13 (83/17)	56 (74)	114/23 (83/17)	110/136 (81)	28 (72)	35/4 (90/10)	
Baseline characteristics:									
Sex, women/men (%)	149/27 (85/15)	86/14 (86/14)	63/13 (83/17)	56 (74)	114/23 (83/17)	110/136 (81)	28 (72)	35/4 (90/10)	0.318
Caucasian, no. (%)	138 (78)	82 (82)	56 (74)	56 (74)	110/136 (81)	110/136 (81)	28 (72)	28 (72)	0.362
Age at SLE diagnosis, mean (s.d.) [range], years	35 (15) [12-73]	36 (16) [12-73]	33 (15) [12-72]	33 (15) [12-72]	35 (16) [14-62]	35 (16) [14-62]	34 (14) [16-60]	34 (14) [16-60]	0.728
Age at first assessment, mean (s.d.) [range], years	44 (15) [17-85]	46 (14) [19-85]	42 (15) [17-81]	42 (15) [17-81]	45 (15) [24-73]	45 (15) [24-73]	41 (14) [18-71]	41 (14) [18-71]	0.139
BMI, mean (s.d.) [range], kg/m ²	24 (5) [15-40]	25 (6) [16-40]	24 (4) [15-38]	24 (4) [15-38]	24 (5) [18-33]	24 (5) [18-33]	24 (4) [19-32]	24 (4) [19-32]	0.402
Active smoking, no. (%)	44/155 (28)	23/88 (26)	21/67 (31)	21/67 (31)	35/121 (29)	35/121 (29)	9/34 (27)	9/34 (27)	0.833
Smoking in pack-years units, mean (s.d.) [range]	11 (18) [0-91]	13 (20) [0-91]	10 (16) [0-75]	10 (16) [0-75]	13 (20) [0-60]	13 (20) [0-60]	9 (13) [0-40]	9 (13) [0-40]	0.792
ACR criteria at inclusion:									
Arthritis, no. (%)	144 (82)	84 (84)	60 (79)	60 (79)	116 (85)	116 (85)	28 (72)	28 (72)	0.097
Discoid rash, no. (%)	33 (19)	21/99 (21)	12 (16)	12 (16)	28/136 (21)	28/136 (21)	5 (13)	5 (13)	0.356
Malar rash, no. (%)	74 (42)	44 (44)	30 (39)	30 (39)	54 (39)	54 (39)	20 (51)	20 (51)	0.185
Nasopharyngeal ulcers, no. (%)	41 (23)	23 (23)	18 (24)	18 (24)	30 (22)	30 (22)	11 (28)	11 (28)	0.411
Pericarditis, no. (%)	40 (23)	22 (22)	18 (24)	18 (24)	35 (26)	35 (26)	5 (13)	5 (13)	0.129
Photosensitivity, no. (%)	83 (47)	49 (49)	34 (45)	34 (45)	65 (47)	65 (47)	18 (46)	18 (46)	0.887
Pleuritis, no. (%)	42 (24)	25 (25)	17 (22)	17 (22)	34 (25)	34 (25)	8 (21)	8 (21)	0.673
Psychosis, no. (%)	10 (6)	8 (8)	2 (3)	2 (3)	10 (7)	10 (7)	0	0	0.120
Renal disorder, no. (%)	80 (46)	43 (43)	37 (49)	37 (49)	62 (45)	62 (45)	18 (46)	18 (46)	0.921
Seizures, no. (%)	14 (8)	12 (12)	2 (3)	2 (3)	13 (10)	13 (10)	1 (3)	1 (3)	0.310
Anti-dsDNA antibodies positive, no. (%)	119 (68)	62/99 (63)	57 (75)	57 (75)	91/136 (67)	91/136 (67)	28 (71)	28 (71)	0.564
Anti-Sm antibody positive, no. (%)	39 (22)	18/98 (18)	21 (28)	21 (28)	26/135 (19)	26/135 (19)	13 (33)	13 (33)	0.063
Anti-phospholipid antibodies positive ^a , no. (%)	83 (48)	36/98 (37)	47 (62)	47 (62)	54/135 (40)	54/135 (40)	29 (74)	29 (74)	<0.001
Anti-nuclear antibodies positive, no. (%)	172 (98)	98/99 (99)	74 (97)	74 (97)	134/136 (99)	134/136 (99)	38 (97)	38 (97)	0.643
Hematologic disorder, no. (%)	110 (63)	60 (60)	50 (66)	50 (66)	82 (60)	82 (60)	28 (72)	28 (72)	0.174
Treatments:									
Systemic corticosteroids, no. (%)	54 (31)	36 (36)	18 (24)	18 (24)	76 (56)	76 (56)	17 (44)	17 (44)	0.190
Antimalarial agents, no. (%)	102 (58)	56 (56)	46 (61)	46 (61)	79 (58)	79 (58)	23/39 (59)	23/39 (59)	0.884
Immunosuppressant agents, no. (%)	64 (36)	39 (39)	25 (33)	25 (33)	53 (39)	53 (39)	11 (28)	11 (28)	0.230
NSAID on a daily basis, no. (%)	24/167 (14)	10/92 (11)	14/75 (19)	14/75 (19)	16/128 (13)	16/128 (13)	8 (21)	8 (21)	0.295
Anticoagulants, no. (%)	23/170 (14)	11/97 (11)	12/73 (16)	12/73 (16)	40/132 (30)	40/132 (30)	17/38 (45)	17/38 (45)	0.097
Antiaggregants, no. (%)	34/170 (20)	13/97 (13)	21/73 (29)	21/73 (29)	26/132 (20)	26/132 (20)	8/38 (21)	8/38 (21)	0.822
Lipid-lowering drugs, no. (%)	21/173 (12)	15/99 (15)	6/74 (8)	6/74 (8)	15/135 (11)	15/135 (11)	6/38 (16)	6/38 (16)	0.412

^aInclude lupus anticoagulant, anti-cardiolipin IgG and IgM; the anti-beta2-glycoprotein-1 IgG and IgM χ^2 test ($n > 10$) or Fisher test ($n < 10$) were used to compare groups with categorical variables; the Mann-Whitney test was used to compare groups with continuous data; significant *P* values are shown in **bold text**. ApoA-1: apolipoprotein A-1.

TABLE 2 Disease activity at inclusion with respect to the anti-ApoA1/anti-F3L1 IgG status

Disease activity:	All (n = 176)	Anti ApoA1-IgG - (n = 100)	Anti ApoA-1 IgG+ (n = 76)	P-value	Anti-F3L1 IgG - (n = 137)	Anti-F3L1 IgG + (n = 39)	P-value	
SELENA-SLEDAI, median (IQR)	4 (2-9)	4 (0-8)	6 (2-10)	0.028	4 (0-8)	7 (2-11)	0.025	
SLEDAI items:								
Alopecia, no. (%)	15/175 (9)	6 (6)	9/75 (12)	0.181	12/136 (9)	3 (8)	1	
Arthritis, no. (%)	36 (21)	16 (16)	20 (26)	0.093	27 (20)	9 (23)	0.645	
Cerebrovascular accident, no. (%)	0	0	0	1	0	0	1	
Cranial nerve disorder, no. (%)	2 (1)	1 (1)	1 (1)	1	2 (2)	0	1	
Fever, no. (%)	8/175 (5)	3/99 (3)	5 (7)	0.296	5/136 (4)	3 (8)	0.379	
Lupus headache, no. (%)	15 (9)	10 (10)	5 (7)	0.587	11 (8)	4 (10)	0.745	
Mucosal ulcers, no. (%)	16 (9)	7 (7)	9 (12)	0.299	11 (8)	5 (13)	0.354	
Myositis, no. (%)	7/175 (4)	3 (3)	4/75 (5)	0.464	4 (3)	3/38 (8)	0.175	
Organic brain syndrome, no. (%)	0	0	0	1	0	0	1	
Pericarditis, no. (%)	6/175 (3)	2/99 (2)	4 (5)	0.405	6/136 (4)	0	0.340	
Pleuritis, no. (%)	6 (3)	2 (2)	4 (5)	0.405	4 (3)	2 (5)	0.615	
Psychosis, no. (%)	2 (1)	2 (2)	0	0.506	2 (2)	0	1	
Rash, no. (%)	34 (19)	20 (20)	14 (18)	0.793	24 (18)	10 (26)	0.257	
Seizure, no. (%)	1 (1)	1 (1)	0	1	1 (1)	0	1	
Vasculitis, no. (%)	2/175 (1)	1 (1)	1/75 (1)	1	2/136 (2)	0	1	
Visual disturbance, no. (%)	7/175 (4)	4 (4)	3/75 (4)	1	4/136 (3)	3 (8)	0.186	
Anti-dsDNA, no. (%)	68/146 (47)	27/73 (37)	41/73 (56)	0.020	45/109 (41)	23 (62)	0.028	
Hematuria, no. (%)	26/154 (17)	10/88 (11)	16/66 (24)	0.035	19/120 (16)	7/34 (21)	0.604	
Leukopenia, no. (%)	21/169 (12)	7/95 (7)	14/74 (19)	0.033	13/131 (10)	8/38 (21)	0.091	
Low complement, no. (%)	47/148 (32)	19/80 (24)	28/68 (41)	0.023	30/113 (27)	17/35 (49)	0.014	
C3, mean (s.d.) [range], mg/l	0.87 (0.28) [0.27-1.95]	0.94 (0.3) [0.42-1.95]	0.8 (0.24) [0.27-1.4]	0.007	0.91 (0.29) [0.37-1.95]	0.76 (0.23) [0.27-1.36]	0.009	
C4, mean (s.d.) [range], mg/l	0.16 (0.08) [0.02-0.47]	0.17 (0.09) [0.02-0.47]	0.14 (0.07) [0.02-0.4]	0.025	0.17 (0.09) [0.02-0.47]	0.12 (0.06) [0.02-0.27]	0.006	
Proteinuria (>0.5 g/24 h), no. (%)	21/132(16)	7/73 (10)	14/59 (24)	0.033	15/105 (14)	6/27 (22)	0.376	
Pyuria, no. (%)	26/157 (17)	14/90 (16)	12/67 (18)	0.695	18/121 (15)	8/36 (22)	0.313	
Thrombocytopenia, no. (%)	10/172 (6)	3/96 (3)	7/76 (9)	0.109	6/133 (5)	4 (10)	0.237	
Urinary casts, no. (%)	9/152 (6)	4/87 (46)	5/65 (8)	0.498	7/117 (6)	2/35 (6)	1	
PGA	Inactive (0 pts), no. (%)	96/175 (55)	57/99 (58)	39 (51)	0.409	17 (44)	22 (56)	0.109
	Active (1-3 pts), no. (%)	79/175 (45)	42/99 (42)	37 (49)	0 (0-2)	79 (58)	57 (42)	
SLE Damage Index (SLICC/ACR), median (IQR)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0.830	0 (0-2)	0 (0-2)	0.456	

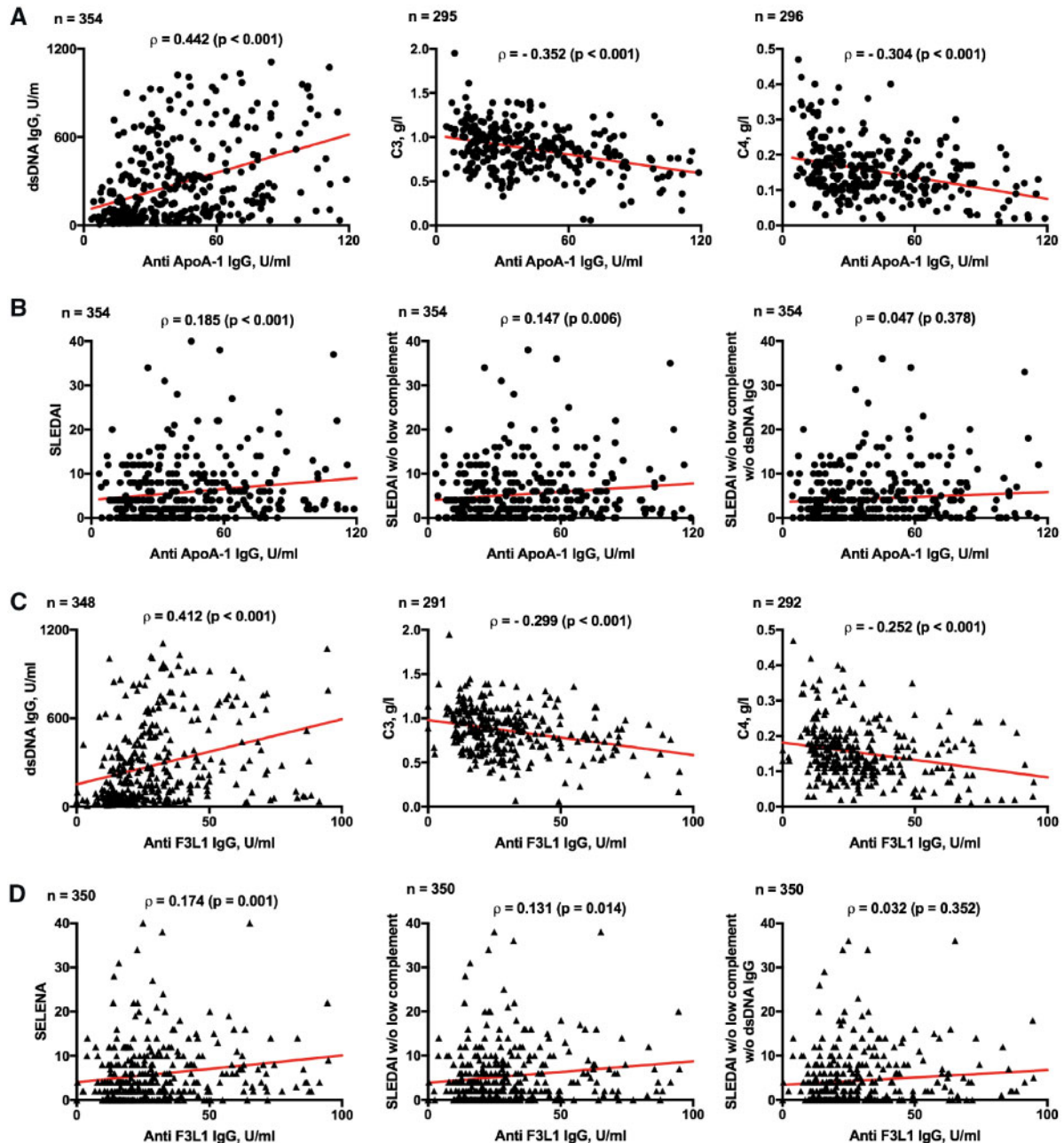
χ^2 test ($n > 10$) or Fisher test ($n < 10$) were used to compare groups with categorical variables; Mann-Whitney test was used to compare groups with continuous data, significant P values are shown in **bold text**. IQR: interquartile range; SELENA: Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment; ApoA-1: apolipoprotein A-1; PGA: Physician Global Assessment.

SLEDAI lost significance when adjusted for anti-dsDNA ($P=0.85$ for anti-ApoA-1 IgG and $P=0.26$ for anti-F3L1 IgG), which may be explained by the strong correlation between anti-dsDNA and anti-ApoA-1 or anti-F3L1 titres.

Covariation over time of anti-ApoA-1/F3L1 IgG titres with anti-dsDNA IgG titres

Given the positive correlation between anti-ApoA-1/anti-F3L1 IgG and anti-dsDNA IgG observed in the 354 samples available, we then assessed whether variations in time in

Fig. 1 Correlation between anti-ApoA-1 IgG/anti-F3L1 IgG and parameters of SLE disease activity



Correlation between anti-ApoA-1 IgG levels and biological parameters of SLE disease activity (**A**) or SELENA-SLEDAI (**B**) as well between anti-F3L1 IgG levels and biological parameters of SLE disease activity (**C**) or SELENA-SLEDAI (**D**) were calculated. DsDNA IgG was determined by ELISA, C3 and C4 determined by nephelometry, all assessed at the time of sample. Rho was computed according to the Spearman test; the red line shows bivariate linear regression. ApoA-1: apolipoprotein A-1; SELENA: Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment.

the titre of anti-ApoA-1 IgG were associated with similar changes in the titre of anti-dsDNA Abs, taking into account the cohort samples obtained at inclusion and 1 year apart ($n=104$). The clinical characteristics of the individuals studied 1 year apart were similar to data at inclusion (not shown). Interestingly, the variations in time in the titre of anti-ApoA-1 IgG+ were statistically associated with variations in the titre of anti-dsDNA IgG (Table 3). Similar analyses conducted with complement C3 and C4 levels indicated significant negative association of anti-ApoA-1 IgG with C3, albeit to a lower level of statistical significance, and a trend for negative association, not statistically significant, for C4. Very similar data were observed for anti-F3L1 IgG (Table 3). Thus, the titre of anti-ApoA-1/F3L1 IgG appears to be exquisitely correlated with the titre of anti-dsDNA IgG and its variation over time.

Association of anti-ApoA-1/F3L1 IgG with aPL

As reported in Table 1, the historic frequency of aPL Abs (ACR criteria) was higher in anti-ApoA-1 IgG+ than in anti-ApoA-1 IgG-. To better characterize this association, we tested the very same inclusion serum samples for which anti-ApoA-1 IgG were assessed for the presence of aCL IgG, anti- β 2GP1 IgG, aPS-PT IgG and DRVVT [28]. The frequency of aCL IgG+ (32% vs 12%, $P=0.001$), anti- β 2GP1 IgG+ (33% vs 14%, $P=0.003$), aPS-PT IgG (22% vs 12%, $P=0.066$) and the positivity of DRVVT (36% vs 13%, $P < 0.001$) were higher in anti-ApoA-1 IgG+ than in anti-ApoA-1 IgG- sera. When such associations were searched for anti-F3L1 reactivity, only aPS-PT IgG was significantly more frequent in anti-F3L1 IgG-positive than anti-F3L1 IgG-negative samples (28% vs 13%, $P=0.025$) (not shown).

No cross-reactivity between anti-ApoA-1 and anti-dsDNA IgG revealed by competition ELISA

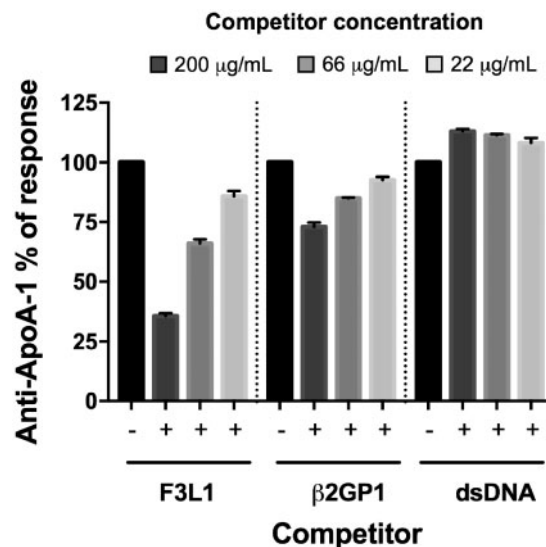
Given the correlations observed between anti-ApoA-1, anti-dsDNA and anti- β 2GP1 IgG, we tested whether cross-reactivity could explain, at least in part, our findings by performing competition assays. Using a triple positive serum for anti-ApoA-1, anti- β 2GP1 and anti-dsDNA IgG, we observed that F3L1 did inhibit dose-dependently the anti-ApoA-1 reactivity. In the same assay, dsDNA did not inhibit, while β 2GP1 was partially inhibitory (Fig. 2). Conversely, dsDNA, but not F3L1, inhibited anti-dsDNA

reactivity, and β 2GP1, but not F3L1, inhibited anti- β 2GP1 reactivity (Supplementary Fig. S1, available at *Rheumatology* online). Thus, the correlation that we observed between anti-ApoA-1 and anti-dsDNA IgG titres was not due to cross-reactivity of the sera.

Anti-ApoA-1 IgG, anti-F3L1 IgG positivity and arterio-venous thrombo-embolic vascular events

Previous reports in pathological conditions other than SLE, as well as in the general population, have

Fig. 2 Cross-reactivity between anti-ApoA-1 and other auto-antibodies



The serum of a representative patient of four tested, known to be positive for anti-ApoA-1 IgG, anti- β 2GP1 IgG and anti-dsDNA IgG, was pre-incubated with or without the various competitors (F3L1, β 2GP1 and dsDNA) at the indicated concentrations prior to addition to assay wells for anti-ApoA1 IgG measurement. Percentage maximal ELISA signals were calculated as $100 \times \frac{[\text{signal in well}] - [\text{mean background signal (uncoated well)}]}{[\text{mean maximal signal (no peptide)}] - [\text{mean background signal}]}$. Results are expressed as mean (s.d.) ($n=3$). ApoA-1: apolipoprotein A-1.

TABLE 3 Covariation in time of anti-ApoA-1/anti-F3L1 IgG and anti-dsDNA IgG titres, complement C3 and C4

		Δ SLEDAI	Δ anti-dsDNA IgG	Δ C3	Δ C4
Δ anti-ApoA-1 IgG	<i>n</i>	104	104	77	77
	Spearman rho	0.114	0.341	-0.228	-0.188
	<i>P</i> value	0.248	<0.001	0.046	0.101
Δ anti-F3L1 IgG	<i>n</i>	101	100	74	74
	Spearman rho	0.169	0.459	-0.213	-0.173
	<i>P</i> value	0.091	<0.001	0.068	0.141

Δ =difference in the titre of the parameter in two samples of the same individual taken 1 year apart. Significant *P* values are shown in **bold text**. ApoA-1: apolipoprotein A-1.

TABLE 4 Presence of anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG is not associated with arterial or venous vascular events

	All (N = 176)	Anti-ApoA-1 IgG - (N = 100)	Anti-ApoA-1 IgG + (N = 76)	P-value	Anti-F3L1 IgG - (N = 137)	Anti-F3L1 IgG + (N = 39)	P-value
Arterial events, no. (%)	20 (11)	12 (12)	8 (11)	0.760	28 (20)	9 (23)	0.824
Venous events, no. (%)	22 (13)	11 (11)	11 (14)	0.490	18 (13)	2 (5)	0.252
Arterial or venous events, no. (%)	37 (21)	20 (20)	17 (22)	0.702	15 (11)	7 (18)	0.274

χ^2 test ($n > 10$) or Fisher test ($n < 10$) were used to compare groups. ApoA-1: apolipoprotein A-1.

documented an association between the presence of anti-ApoA-1 IgG and CVEs. Therefore, we assessed whether this was the case in our cohort. Arterial and venous vascular events were frequent in our study population, with an overall prevalence of 21%, of which 20 were venous, 22 arterial, and 37 either venous or arterial. There was no statistically significant difference in the frequency of CVEs between anti-ApoA-1 IgG+ and IgG- groups, or between anti-F3L1 IgG+ and IgG- groups (Table 4).

Discussion

The results here reported confirm and extend previous findings, by highlighting a striking association of anti-ApoA-1 IgG with anti-dsDNA antibody levels, with other laboratory parameters of disease activity and with steroid dose as shown previously [24], supporting a role for anti-ApoA-1 IgG as a laboratory marker of SLE activity, and suggesting that anti-ApoA-1 IgG may participate in SLE pathogenesis. In addition, we show for the first time that anti-F3L1 Abs correlate with disease activity and anti-dsDNA Abs in SLE patients. Remarkably, we found an association of anti-ApoA-1 IgG with aPL antibodies but not with CVEs.

Previous publications highlighted the link between anti-ApoA-1 IgG and SLE activity when assessed by SLEDAI, ECLAM and BILAG scores [20, 22–24, 29]. We confirm here that anti-ApoA-1 IgG correlates with SELENA-SLEDAI. However, we found that the laboratory items of SELENA-SLEDAI, in particular the presence of anti-dsDNA IgG and lower levels of complement C3 and C4, were more frequent in anti-ApoA-1 IgG+ and anti-F3L1 IgG+ compared with anti-ApoA-1/F3L1 IgG negative. Our data highlight in particular the relationship between the presence and titre of anti-ApoA-1 IgG and anti-dsDNA IgG at inclusion, and the correlation between their titre variations over time. The multiple regression analysis showed that anti-dsDNA IgG rather than anti-ApoA-1 IgG explained the association with disease activity. However, we could not find cross-reactivity in a competition ELISA, which supports a biologically independent role of anti-ApoA-1 IgG. Consistently, a correlation of anti-ApoA-1 IgG with anti-dsDNA IgG was reported in patients with active lupus nephritis [22], not observed by others [8, 23, 24]. The discrepancies may be explained by technical differences characterizing the assays used to detect anti-dsDNA IgG and anti-ApoA-1 IgG. In particular, the ELISA

we used to assess the presence of anti-dsDNA IgG may be more sensitive than the Farr assay used by others [22, 24].

Along the same lines, it is noteworthy that in our cohort the titre of anti-ApoA-1 IgG was in inverse correlation with complement C3 and C4 levels, as already reported [23]. Similar trends were observed for anti-F3L1 IgG. Furthermore, we show an inverse covariance with time in C3 and C4 titres that reinforces the contention that anti-ApoA-1 IgG may take part in important immunologic events in SLE pathogenesis. In this respect, it is important to stress that ApoA-1 is known to potentially interact with several self-components, some of which are decorated with danger-associated molecular patterns. Thus, we could speculate that some of these interactions would favour anti-ApoA-1 autoimmune responses fluctuating consensually with dsDNA antibody titres and inversely with C3 and C4 and accompanying SLE disease activity. The full range of known ApoA-1 interactions with other self-components can be found in BioGRID3.5. [30].

An interesting finding in our study was the association between anti-ApoA-1 IgG and aPL Abs. In addition, the use of anti-platelet agents was significantly more frequent in our anti-ApoA-1 IgG+ population, possibly in relation to the frequent use of low-dose aspirin in individuals positive for aPL but not having experienced thrombotic events [31, 32]. Although some of the previous studies on anti-ApoA-1 IgG in SLE have not found an association with aPL Abs [22, 23], the potential interaction between aCL IgG and anti-ApoA-1 IgG was suggested by studies showing decreased levels of apolipoprotein A1 in individuals positive for aCL Abs [33]. However, our findings indicate a slight inhibition of anti-ApoA-1 IgG reactivity when competed with β 2GP1 protein, suggesting potential cross-reactivity with aPL Abs, in agreement with Delgado *et al.* [34].

In various pathological conditions [10, 11, 35], as well as in the general population [15, 16], the presence of anti-ApoA-1 IgG has been associated with an increased risk of CVEs. This association has recently been questioned [17]. In agreement with three previous reports on SLE patients [22, 24], our results did not reveal an association between the presence of anti-ApoA-1 IgG and arterial or venous vascular events in SLE. This lack of an association is even more surprising given the correlation in the titres of

aPL Abs with anti-ApoA-1 IgG, and the frequent association of aPL Abs with CVEs [36]. However, the overall low number of CVEs in our cohort ($n=37$) may represent a serious limitation for the interpretation of these data. Furthermore, the high frequency of patients in our cohort simultaneously taking low-dose aspirin and HCQ may have had an impact on CVE risk. Indeed, it has been recently observed that this therapeutic combination has additive effects in the primary prevention of CVEs in SLE [37, 38]. It is important to stress that, in the very same Swiss SLE cohort, we found that CVEs were associated with the presence of lupus anticoagulant and anti-phosphatidylserine/prothrombin complex IgG [28].

In our study, the frequency of anti-F3L1 IgG positive sera were about half of our ApoA1 IgG samples, in accordance with previous studies [18, 19]. While precise immunomapping of ApoA-1 was not performed with SLE sera, in our study anti-F3L1 IgG, similarly to anti-ApoA-1 IgG, were associated with SLE activity markers: SELENA-SLEDAI, dsDNA antibodies, and low complement. Furthermore, anti-F3L1 IgG have been reported to be associated with CVEs in individuals without autoimmune diseases [18], a finding that we could not replicate in our SLE cohort. Anti-ApoA-1 IgG in SLE may trigger biological responses qualitatively different from those observed in other conditions. Indeed, anti-ApoA-1 IgG have been shown to interact with TLR2 and 4 and recruit CD14 in the context of atherothrombosis [39–41]. Whether this is the case in SLE requires experimental enquiry. Thus, anti-ApoA-1 and anti-F3L1 IgG do not appear to be associated with CVEs in a cohort in which classical and novel aPL were studied.

There are several limitations in our study. First, the number of individuals included in the cohort at study initiation decreased during follow-up, leading to a risk of selection bias. However, the frequency of positive samples for anti-ApoA-1 IgG as well as disease activity were not different when compared at inclusion and 1 year later (Supplementary Tables S1 and S2 and Supplementary Fig. S2, available at *Rheumatology* online). Second, this is not an inception cohort, and most thrombotic events were recorded by review of the clinical charts. Others have found that thrombotic events accumulate over time [42]. It is possible that the prospective follow-up of our cohort would reveal an association with anti-ApoA-1 IgG. Third, within the anti-ApoA-1 antibody repertoire, we did not test for isotypes other than IgG, thus limiting the potential for detecting important clinical associations.

In conclusion, anti-ApoA-1 IgG are present in a sizable proportion of SLE individuals, and their presence correlates strongly with the presence of anti-dsDNA IgG, with other SLE biomarkers associated with disease activity and with high steroid use. In contrast with the analysis in other populations, but consistent with previous reports in SLE, our data do not indicate that anti-apoA-1 IgG nor anti-F3L1 IgG are associated with CVEs in SLE. Therefore, the possible clinical relevance of anti-apoA-1 IgG in SLE may be of greater interest in better capturing patients at risk of more active SLE disease, than in identifying SLE

patients at higher CVE risk. These data suggest that the routine identification of anti-ApoA-1 IgG may be a useful adjunct for monitoring SLE.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant 310030-159999 from the Swiss National Science Foundation to C.C., in part by a Gebert Ruf grant to M.T., and in part by a Geneva University Hospital Research grant to P.R.L. H.N., P.R.L. and C.C. were responsible for the study conception. C.R., M.T., U.H.-D. and C.C. acquired the clinical data and collected samples. S.P., M.A. and P.R.L. acquired the laboratory data. H.N., P.R.L., C.C. and C.R. analysed the data and drafted the manuscript. H.N., D.S.C. and C.C. performed the statistical analysis. N.V. provided critical reading. All authors approved the final manuscript.

Funding: No specific funding was received from any funding bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this manuscript.

Disclosure statement: N.V. and S.P. are named as co-inventors on the patent PCT/IB2013/059948 related to the use of F3L1 to detect cognate antibodies.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* online.

References

- Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012;18:871–82.
- Fernando MM, Isenberg DA. How to monitor SLE in routine clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2005;64:524–7.
- Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE *et al.* Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:408–15.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233–41.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317–25.
- Merrill JT, Rivkin E, Shen C, Lahita RG. Selection of a gene for apolipoprotein A1 using autoantibodies from a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995;38:1655–9.
- Dinu AR, Merrill JT, Shen C *et al.* Frequency of antibodies to the cholesterol transport protein apolipoprotein A1 in patients with SLE. *Lupus* 1998;7:355–60.
- Abe H, Tsuboi N, Suzuki S *et al.* Anti-apolipoprotein A-I autoantibody: characterization of monoclonal autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:990–5.
- Vuilleumier N, Bas S, Pagano S *et al.* Anti-apolipoprotein A-1 IgG predicts major cardiovascular events in patients

- with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2640–50.
- 10 Vuilleumier N, Reber G, James R *et al*. Presence of auto-antibodies to apolipoprotein A-1 in patients with acute coronary syndrome further links autoimmunity to cardiovascular disease. *J Autoimmun* 2004;23:353–60.
 - 11 Vuilleumier N, Rossier MF, Pagano S *et al*. Anti-apolipoprotein A-1 IgG as an independent cardiovascular prognostic marker affecting basal heart rate in myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010;31:1815–23.
 - 12 Roux-Lombard P, Pagano S, Montecucco F, Satta N, Vuilleumier N. Auto-antibodies as emergent prognostic markers and possible mediators of ischemic cardiovascular diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013;44:84–97.
 - 13 Vuilleumier N, Montecucco F, Spinella G *et al*. Serum levels of anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies and myeloperoxidase as predictors of major adverse cardiovascular events after carotid endarterectomy. *Thromb Haemost* 2013;109:706–15.
 - 14 Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J *et al*. Association between anti-apolipoprotein A-1 antibodies and cardiovascular disease in the general population. Results from the CoLaus study. *Thromb Haemost* 2016;116:764–71.
 - 15 Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J *et al*. Anti-apolipoprotein A-1 IgG predict all-cause mortality and are associated with Fc receptor-like 3 polymorphisms. *Front Immunol* 2017;8:437.
 - 16 Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J *et al*. Impact of CD14 polymorphisms on anti-apolipoprotein A-1 IgG-related coronary artery disease prediction in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:2342–9.
 - 17 Lagerstedt JO, Dalla-Riva J, Marinkovic G *et al*. Anti-ApoA-I IgG antibodies are not associated with carotid artery disease progression and first-time cardiovascular events in middle-aged individuals. *J Intern Med* 2019;285:49.
 - 18 Pagano S, Gaertner H, Cerini F *et al*. The human auto-antibody response to apolipoprotein A-I is focused on the C-terminal helix: a new rationale for diagnosis and treatment of cardiovascular disease? *PLoS One* 2015;10:e0132780.
 - 19 Teixeira PC, Ducret A, Ferber P *et al*. Definition of human apolipoprotein A-I epitopes recognized by autoantibodies present in patients with cardiovascular diseases. *J Biol Chem* 2014;289:28249–59.
 - 20 Shoenfeld Y, Kravitz MS, Witte T *et al*. Autoantibodies against protective molecules—C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1108:227–39.
 - 21 Batuca JR, Ames PR, Isenberg DA, Alves JD. Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit para-oxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1108:137–46.
 - 22 O'Neill SG, Giles I, Lambrianides A *et al*. Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010;62:845–54.
 - 23 Radwan MM, El-Lebedy D, Fouda R, ElSORougy E, Fakhry D. Anti-apolipoprotein A-1 antibodies and carotid intima-media thickness in Egyptian women with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2014;33:493–8.
 - 24 Croca S, Bassett P, Chambers S *et al*. IgG anti-apolipoprotein A-1 antibodies in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity and corticosteroid therapy: an observational study. *Arthritis Res Ther* 2015;17:26.
 - 25 Ribi C, Trendelenburg M, Gayet-Ageron A *et al*. The Swiss Systemic lupus erythematosus Cohort Study (SSCS)—cross-sectional analysis of clinical characteristics and treatments across different medical disciplines in Switzerland. *Swiss Med Wkly* 2014;144:w13990.
 - 26 Petri M, Orbai AM, Alarcon GS *et al*. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012;64:2677–86.
 - 27 Vuilleumier N, Charbonney E, Fontao L *et al*. Anti-(apolipoprotein A-1) IgGs are associated with high levels of oxidized low-density lipoprotein in acute coronary syndrome. *Clin Sci* 2008;115:25–33.
 - 28 Marchetti T, Ribi C, Perneger T *et al*. Prevalence, persistence and clinical correlations of classic and novel anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2018;57:1350–7.
 - 29 Batuca JR, Ames PR, Amaral M *et al*. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008;48:26–31.
 - 30 Stark C, Breikreutz BJ, Reguly T *et al*. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D535–9.
 - 31 Arnaud L, Mathian A, Ruffatti A *et al*. Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2014;13:281–91.
 - 32 Arnaud L, Mathian A, Devilliers H *et al*. Patient-level analysis of five international cohorts further confirms the efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev* 2015;14:192–200.
 - 33 Lahita RG, Rivkin E, Cavanagh I, Romano P. Low levels of total cholesterol, high-density lipoprotein, and apolipoprotein A1 in association with anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1566–74.
 - 34 Delgado Alves J, Kumar S, Isenberg DA. Cross-reactivity between anti-cardiolipin, anti-high-density lipoprotein and anti-apolipoprotein A-I IgG antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 2003;42:893–9.
 - 35 Finckh A, Courvoisier DS, Pagano S *et al*. Evaluation of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: do cardiovascular biomarkers offer added predictive ability over established clinical risk scores? *Arthritis Care Res* 2012;64:817–25.

- 36 Pons-Estel GJ, Andreoli L, Scanzi F, Cervera R, Tincani A. The antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2017;76:10–20.
- 37 Vettori S, Cuomo G, Iudici M *et al.* Early systemic sclerosis: serum profiling of factors involved in endothelial, T-cell, and fibroblast interplay is marked by elevated interleukin-33 levels. *J Clin Immunol* 2014;34:663–8.
- 38 Fasano S, Piero L, Pantano I, Iudici M, Valentini G. Longterm hydroxychloroquine therapy and low-dose aspirin may have an additive effectiveness in the primary prevention of cardiovascular events in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2017;44:1032–8.
- 39 Montecucco F, Brauersreuther V, Burger F *et al.* Anti-apoA-1 auto-antibodies increase mouse atherosclerotic plaque vulnerability, myocardial necrosis and mortality triggering TLR2 and TLR4. *Thromb Haemost* 2015;114:410–22.
- 40 Mannic T, Satta N, Pagano S *et al.* CD14 as a mediator of the mineralocorticoid receptor-dependent anti-apolipoprotein A-1 IgG chronotropic effect on cardiomyocytes. *Endocrinology* 2015;156:4707–19.
- 41 Pagano S, Carbone F, Burger F *et al.* Anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies as active modulators of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2016;116:554–64.
- 42 Pengo V, Ruffatti A, Legnani C *et al.* Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 2011;118:4714–8.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary table S1 Complete characteristics and treatment profile of SSCS patients with anti-ApoA-1 / anti-F3L1 IgG tested after 1 year follow-up

<u>Clinical/biological features</u>	All (n=104)	Anti-ApoA1 IgG - (n= 67)	Anti-ApoA1 IgG + (n=37)	p-value	Anti-F3L1 IgG - (n=87)	Anti-F3L1 IgG + (n=23)	p-value
<u>Baseline characteristics :</u>							
Sex, women/men (%/%)	87/17 (84/16)	56/11 (84/16)	31/6 (84/16)	0.979	70/17 (80/20)	22/1 (96/4)	0.113
Caucasian, no. (%)	77 (74)	49 (73)	28 (76)	0.984	67 (77)	16 (70)	0.746
Age at SLE diagnosis, mean \pm SD [range], yrs	33 \pm 15 [12-73]	35 \pm 15 [13-73]	30 \pm 14 [12-72]	0.148	33 \pm 14 [13-73]	32 \pm 15 [12-65]	0.716
Age at 2 nd assessment, mean \pm SD [range], yrs	44 \pm 15 [20-88]	46 \pm 14 [20-86]	40 \pm 16 [20-83]	0.012	45 \pm 15 [22-86]	40 \pm 16 [20-73]	0.116
BMI, mean \pm SD [range], kg/m ²	24 \pm 5 [15-40]	24 \pm 5 [15-40]	24 \pm 4 [15-33]	0.885	24 \pm 5 [15-40]	23 \pm 4 [19-31]	0.387
Active smoking during follow-up, no. (%)	43/101 (43)	29/65 (45)	14/36 (39)	0.577	22 (25)	9 (39)	0.193
Smoking in pack-years units, mean \pm SD [range]	9 \pm 16 [0-80]	10 \pm 16 [0-60]	7 \pm 15 [0-60]	0.553	10 \pm 16 [0-60]	5 \pm 11 [0-40]	0.498
<u>ACR criteria at inclusion :</u>							
Arthritis, no. (%)	83 (80)	54 (81)	29 (78)	0.787	74 (85)	15 (65)	0.04
Discoid rash, no. (%)	14 (13)	8 (12)	6 (16)	0.541	13 (15)	2 (9)	0.733
Malar rash, no. (%)	47 (45)	30 (45)	17 (46)	0.909	38 (44)	10 (43)	0.986
Nasopharyngeal ulcers, no. (%)	24 (23)	17 (25)	7 (19)	0.455	18 (21)	7 (30)	0.401

Pericarditis, no. (%)	25 (24)	17 (25)	8 (22)	0.668	23 (26)	4 (17)	0.429
Photosensitivity, no. (%)	48 (46)	32 (48)	16 (43)	0.658	42 (48)	9 (39)	0.487
Pleuritis, no. (%)	25 (24)	16 (9)	9 (24)	0.960	22 (25)	5 (22)	1
Psychosis, no. (%)	7 (7)	5 (7)	2 (5)	1	7 (8)	0	0.341
Renal disorder, no. (%)	50 (48)	29 (43)	21 (57)	0.188	43 (49)	12 (52)	0.815
Seizures, no. (%)	10 (10)	8 (12)	2 (5)	0.489	10 (11)	0	0.117
Anti-dsDNA antibodies positive, no. (%)	78 (75)	50 (75)	28 (76)	0.906	66 (76)	15 (65)	0.303
Anti-Sm antibody positive, no. (%)	27 (26)	17 (10)	10 (27)	0.584	22 (25)	5 (22)	1
Anti-phospholipid antibodies positive, no. (%)	58 (57)	32 (48)	26 (70)	0.027	45 (52)	15 (65)	0.248
Anti-nuclear antibodies positive, no. (%)	102 (98)	66 (99)	36 (97)	0.667	85 (98)	22 (96)	0.592
Hematologic disorder, no. (%)	71 (68)	47 (70)	24 (65)	0.579	57 (66)	16 (70)	0.715
<u>Treatments:</u>							
Systemic corticosteroids, no. (%)	53 (51)	32 (48)	21 (57)	0.380	45 (52)	9 (39)	0.467
Antimalarial agents, no. (%)	70 (67)	48 (72)	22 (59)	0.205	55 (63)	15 (65)	0.605
Immunosuppressant agents, no. (%)	40/103 (39)	25 (37)	15/36 (42)	0.666	35 (40)	6 (26)	0.447

NSAID on a daily basis, no. (%)	7 (7)	5 (7)	2 (5)	1	6 (7)	1 (4)	1
Anticoagulants, no. (%)	13/103 (13)	9 (13)	4/36 (11)	1	9 (10)	4 (17)	0.113
Antiaggregants, no. (%)	28/103 (27)	15 (22)	13/36 (36)	0.136	21 (24)	7 (30)	0.450
Lipid-lowering drugs, no. (%)	15(14)	7 (10)	8 (22)	0.120	10 (11)	6 (26)	0.085

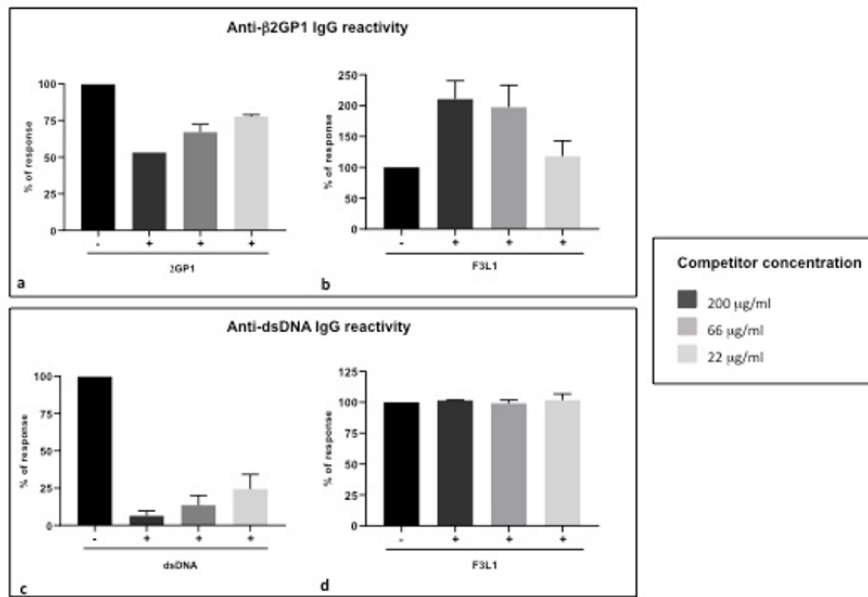
χ^2 test ($n > 10$) or Fisher test ($n < 10$) were used to compare groups with categorical variables ; Mann-Whitney test was used to compare groups with continuous data, significant p values are shown in **bold text**. ACR: American College of Rheumatology; BMI: body mass index; NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drugs; SD: standard deviation; SLE: systemic lupus erythematosus

Supplementary table S2 : Disease activity profile in SSCS patients with anti-ApoA-1 /anti-F3L1 IgG tested after 1 year follow-up

Disease activity :	All (n=104)	Anti ApoA1-IgG - (n=67)	Anti ApoA1-IgG+ (n=37)	p-value	Anti-F3L1 IgG - (n=87)	Anti-F3L1 IgG + (n=23)	p-value
SELENA-SLEDAI, median (IQR)	4 (0-8)	4 (0-8)	7 (2-8)	0.014			
<u>SLEDAI items :</u>							
Arthritis, no. (%)	14 (13)	11 (16)	3 (8)	0.369	13 (15)	1 (4)	0.292
Anti-dsDNA, no. (%)	51 (49)	27 (40)	24 (65)	0.016	28 (32)	8 (35)	0.404
Hematuria, no. (%)	16/98 (16)	7 (10)	9/35 (26)	0.086	16 (18)	0	0.036
Leukopenia, no. (%)	7/103 (7)	4/66 (6)	3 (8)	0.070	4 (5)	3 (13)	0.144
Low complement, no. (%)	22/89 (25)	10/58 (17)	12/31 (39)	0.025	15 (17)	7 (30)	0.227
C3, mean ± SD [range], mg/l	0.87 ± 0.21 [0.33-1.26]	0.9 ± 0.2 [0.33-1.26]	0.8 ± 0.23 [0.36-1.25]	0.037	0.89 ± 0.2 [0.33-1.26]	0.8 ± 0.25 [0.36-1.24]	0.143
C4, mean ± SD [range], mg/l	0.15 ± 0.08 [0.02-0.42]	0.16 ± 0.08 [0.03-0.42]	0.13 ± 0.06 [0.02-0.25]	0.17	0.16 ± 0.07 [0.03-0.42]	0.13 ± 0.07 [0.02-0.26]	0.181
Proteinuria (>0.5g/24h) , no. (%)	11/83(13)	4/54 (7)	7/29 (24)	0.044	8 (9)	3 (13)	0.431
Pyuria, no. (%)	17/98 (7)	10/63 (16)	7/35 (20)	0.592	13 (15)	4 (17)	0.735
Thrombocytopenia, no. (%)	4/102 (4)	2/65 (3)	2 (5)	0.620	2 (2)	2 (9)	0.184
Urinary casts, no. (%)	3/92 (3)	2/62 (3)	1/30 (3)	1	3 (3)	0	1

*X² test (n>10) or Fisher test (n<10) were used to compare groups with categorical variables ; Mann-Whitney test was used to compare groups with continuous data, significant p values are shown in **bold text**. IQR: interquartile range ; SD: standard deviation ; SELENA: Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment ; SLEDAI: SLE Disease Activity Index.*

Supplementary figure 1 :



Supplementary figure 2 :

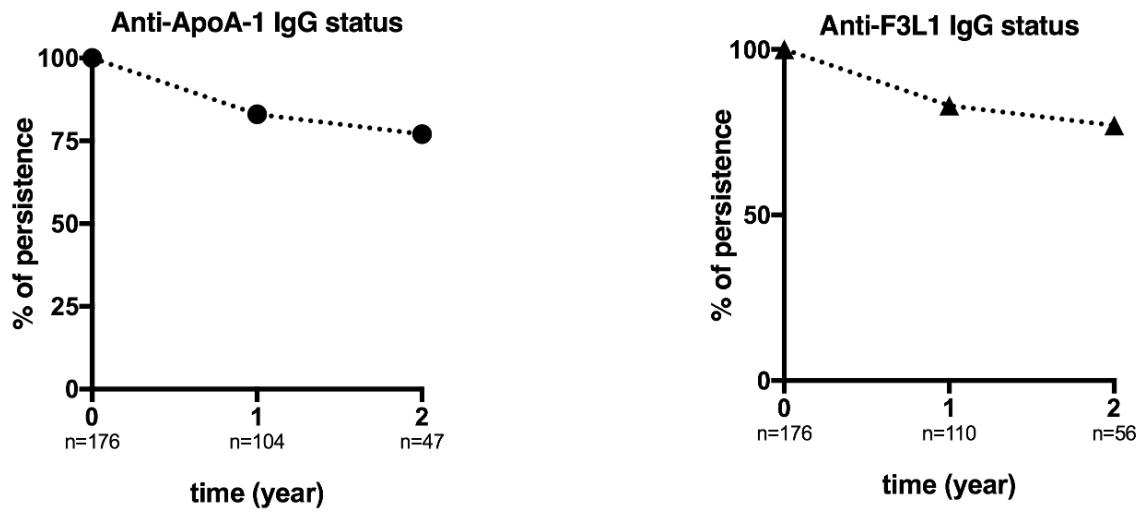


Figure legends

Supplementary figure S1. Competition assays for anti-β2GP1 IgG and anti-dsDNA IgG with β2GP1 , dsDNA and F3L1.

The serum of a representative patient of four tested, known to be positive for anti-ApoA-1 IgG, anti-β2GP1 IgG and anti-dsDNA IgG, was pre-incubated with or without the different competitors (F3L1, β2GP1 and dsDNA) at the indicated concentrations prior to addition to assay wells for anti-β2GP1 IgG (upper panel) or anti-dsDNA IgG measurement (lower panel) . Percent maximal ELISA signals were calculated as $100 \times ([\text{signal in well}] - [\text{mean background signal (uncoated well)}]) / ([\text{mean maximal signal (no peptide)}] - [\text{mean background signal}])$. Results are expressed as mean \pm SD (n=3).

Supplementary figure S2: Persistence of positive or negative samples for anti-Apo A1 IgG and anti-F3L1 IgG over time.

Commentaires sur l'article publié, conclusion et perspectives

Cette étude transversale apporte de nouveaux éléments complétant des données déjà publiées sur l'association entre les anticorps anti-ApoA-1 IgG et l'activité du LES. Elle conforte la corrélation avec les paramètres d'activité du LES, d'une part clinique avec la corrélation à l'arthrite, mais également biologique avec la corrélation au titre des anti-dsDNA, des anti- β 2GP1, et à la consommation du complément [84–86]. De plus nous avons mis en évidence une corrélation avec la dose de prednisone administrée. Nous interprétons ces résultats comme un argument favorable à un rôle de biomarqueur des anti-ApoA-1 IgG dans le suivi biologique du LES, et possiblement de l'implication de ces anticorps dans la physiopathologie de cette maladie, qui nécessitera plus d'investigations. De plus, des résultats similaires retrouvés pour les anticorps anti-F3L1 IgG, dirigés contre l'épitope immunodominant de l'ApoA-1 et présents chez environ la moitié des patients séropositifs pour l'anti-ApoA-1, sont publiés pour la première fois à notre connaissance dans une cohorte de patients lupiques. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation entre la présence d'Ac anti-ApoA-1 et des événements cardio-vasculaires et certaines limites sont à considérer dans l'interprétation de ces résultats. En effet, le nombre total de patients inclus, même s'il est non négligeable pour une pathologie rare telle que le LES, reste faible, avec en conséquence un faible nombre d'évènements cardio-vasculaires, limitant l'interprétation de l'absence de corrélation des anti-Apo-A1 IgG et des évènements cardio-vasculaires dans cette cohorte. En outre, notre étude est rétrospective et l'évaluation de la survenue de MCV essentiellement anamnestique.

Comme mentionné plus haut, les associations entre LES et MCV, LES et APL, ainsi qu'entre APL et MCV, sont bien connues. Fort de ces éléments, une nouvelle étude permettrait d'aborder cette problématique en comparant 2 groupes de patients : un groupe de

patients lupiques issus de la cohorte SCSS et un groupe de contrôles sains appariés pour le sexe, l'âge et les comorbidités. L'approche analytique consisterait en une étude cas-témoin avec analyse de l'aire sous la courbe ROC pour le dosage des anti-ApoA-1 IgG comme test de dépistage prédictif d'apparition d'évènements cardio-vasculaires dans chacun des groupes, permettant l'estimation d'un *odds ratio* (OR) associé. Il faut alors tenir compte de la prévalence estimée de MCV dans une population de jeunes femmes contrôles analogue à celle du groupe LES (18-44 ans, MCV estimée à 4.3% en moyenne de 2008 à 2018, source : *Centers for Disease Control and Prevention*, <https://www.cdc.gov/nchs/data/hus/2019/fig12-508.pdf>), tout en fixant arbitrairement les paramètres suivants : erreur alpha à 0.05, erreur beta à 0.1, OR minimal détectable de MCV à ≥ 1.3 (en référence à l'OR 1.3 retrouvé par Antiochos et al. dans une cohorte lausannoise de contrôles en présence d'anti-ApoA-1 indépendamment des FRCV classiques [78]). Dans ce cas, il serait alors nécessaire d'inclure au moins 11'088 patients dont 5'544 patients lupiques et 5'544 contrôles sains appariés afin d'obtenir une puissance d'étude suffisante (calculateur : <https://biostatgv.sentiweb.fr/>). En cas de résultats probants, une étude de cohorte prospective serait utile afin d'appuyer ces résultats.

Une étude de telle envergure, surtout si elle devait être prospective, serait difficile à organiser notamment en termes de recrutement pour une maladie qui reste relativement rare. Dans ce sens, une collaboration internationale avec la mise en commun des ressources de différentes cohortes de patients disponibles est probablement une piste à explorer pour avancer dans l'étude du lupus érythémateux systémique.

En somme, dans l'approche du LES qui est une maladie rare et complexe, plusieurs nouveaux biomarqueurs d'intérêt sont en cours d'investigation, avec l'espoir d'une meilleure aide au diagnostic, stratification, et à l'adaptation du traitement pour mieux

prendre en charge les patients. Notre étude s'inscrit dans cette ligne avec la démonstration d'une corrélation entre les anticorps anti-ApoA-1 IgG et les paramètres d'activité du LES, et argumente en faveur de l'utilisation de ce marqueur dans la pratique. En revanche l'étude du rôle de ce marqueur dans la relation entre le LES et les MCV nécessitera des études supplémentaires.

Bibliographie

1. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1709–20.
2. Newman K, Owlia MB, El-Hemaidi I, Akhtari M. Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus - Old and new. *Autoimmun Rev.* 2013;12:784–91.
3. Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauss R, Klotsche J, Dähnrich C, et al. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35:598–606.
4. Massaro L, Ceccarelli F, Colasanti T, Pendolino M, Perricone C, Cipriano E, et al. Anti-carbamylated protein antibodies in systemic lupus erythematosus patients with articular involvement. *Lupus.* 2018;27:105–11.
5. Shahin D, El-Farahaty RM, Houssen ME, Machaly SA, Sallam M, ElSaid TO, et al. Serum 25-OH vitamin D level in treatment-naïve systemic lupus erythematosus patients: Relation to disease activity, IL-23 and IL-17. *Lupus.* 2017;26:917–26.
6. Carli L, Tani C, Vagnani S, Signorini V, Mosca M. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia in systemic lupus erythematosus: Prevalence and clinical impact--A systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;45:190–4.
7. Starkebaum G, Price TH, Lee MY, Arend WP. Autoimmune neutropenia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1978;21:504–12.
8. Xu B, Wang S, Zhou M, Huang Y, Fu R, Guo C, et al. The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2017;183:46–53.
9. Chiba A, Tamura N, Yoshikiyo K, Murayama G, Kitagaichi M, Yamaji K, et al. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:58.
10. Lood C, Tydén H, Gullstrand B, Nielsen CT, Heegaard NHH, Linge P, et al. Decreased platelet size is associated with platelet activation and anti-phospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl.* 2017;56:408–16.
11. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:683–92.
12. Teruel M, Chamberlain C, Alarcón-Riquelme ME. Omics studies: their use in diagnosis and reclassification of SLE and other systemic autoimmune diseases. *Rheumatol Oxf Engl.* 2017;56:i78–87.
13. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747–53.
14. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992;35:311–8.

15. Dai Y, Huang Y-S, Tang M, Lv T-Y, Hu C-X, Tan Y-H, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2007;16:939–46.
16. Goilav B, Ben-Dov I, Loudig O, Blanco I, Wahezi D, Putterman C. Deep-sequencing reveals WHO class-specific urinary microRNAs in human lupus nephritis (P3245). *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2013;190:192.8-192.8.
17. Cardenas-Gonzalez M, Srivastava A, Pavkovic M, Bijol V, Rennke HG, Stillman IE, et al. Identification, Confirmation, and Replication of Novel Urinary MicroRNA Biomarkers in Lupus Nephritis and Diabetic Nephropathy. *Clin Chem*. 2017;63:1515–26.
18. Verweij CL, Vosslander S. Combining DNA-microarray data in systemic lupus erythematosus. *Genome Med*. 2011;3:30.
19. Kalunian KC, Merrill JT, Maciucia R, McBride JM, Townsend MJ, Wei X, et al. A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMAb interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann Rheum Dis*. 2016;75:196–202.
20. Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Furie R, Kalunian K, Illei GG, et al. Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:1909–16.
21. Furie R, Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Kalunian K, Brohawn P, et al. Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69:376–86.
22. Pavón EJ, García-Rodríguez S, Zumaquero E, Perandrés-López R, Rosal-Vela A, Lario A, et al. Increased expression and phosphorylation of the two S100A9 isoforms in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: a proteomic signature for circulating low-density granulocytes. *J Proteomics*. 2012;75:1778–91.
23. Wang L, Dai Y, Peng W, Qi S, Ouyang X, Tu Z. Differential expression of serine-threonine kinase receptor-associated protein in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011;20:921–7.
24. Wen S, He F, Zhu X, Yuan S, Liu H, Sun L. IFN- γ , CXCL16, uPAR: potential biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36:36–43.
25. Wirestam L, Frodlund M, Enocsson H, Skogh T, Wetterö J, Sjöwall C. Osteopontin is associated with disease severity and antiphospholipid syndrome in well characterised Swedish cases of SLE. *Lupus Sci Med*. 2017;4:e000225.
26. Rose T, Grützkau A, Klotsche J, Enghard P, Flechsig A, Keller J, et al. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. *Rheumatol Oxf Engl*. 2017;56:1618–26.
27. Nicolaou O, Kousios A, Hadjisavvas A, Lauwerys B, Sokratous K, Kyriacou K. Biomarkers of systemic lupus erythematosus identified using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *J Cell Mol Med*. 2017;21:993–1012.
28. Alaiya A, Assad L, Alkhafaji D, Shinwari Z, Almana H, Shoukri M, et al. Proteomic analysis of Class IV lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl*

Assoc - Eur Ren Assoc. 2015;30:62–70.

29. Aggarwal A, Gupta R, Negi VS, Rajasekhar L, Misra R, Singh P, et al. Urinary haptoglobin, alpha-1 anti-chymotrypsin and retinol binding protein identified by proteomics as potential biomarkers for lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 2017;188:254–62.
30. Živković V, Cvetković T, Mitić B, Stamenković B, Stojanović S, Radovanović-Dinić B, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of systemic lupus erythematosus: an observational study. *Rheumatol Int.* 2018;38:1003–8.
31. Odler B, Bikov A, Streizig J, Balogh C, Kiss E, Vincze K, et al. CCL21 and IP-10 as blood biomarkers for pulmonary involvement in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2017;26:572–9.
32. Divard G, Abbas R, Chenevier-Gobeaux C, Chanson N, Escoubet B, Chauveheid M-P, et al. High-sensitivity cardiac troponin T is a biomarker for atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients: a cross-sectional controlled study. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:132.
33. Wu T, Xie C, Han J, Ye Y, Weiel J, Li Q, et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus. *PloS One.* 2012;7:e37210.
34. Ouyang X, Dai Y, Wen JL, Wang LX. ¹H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2011;20:1411–20.
35. Yan B, Huang J, Zhang C, Hu X, Gao M, Shi A, et al. Serum metabolomic profiling in patients with systemic lupus erythematosus by GC/MS. *Mod Rheumatol.* 2016;26:914–22.
36. Romick-Rosendale LE, Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Nelson S, Petri M, et al. Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R199.
37. Tselios K, Gladman DD, Su J, Ace O, Urowitz MB. Evolution of Risk Factors for Atherosclerotic Cardiovascular Events in Systemic Lupus Erythematosus: A Longterm Prospective Study. *J Rheumatol.* 2017;44:1841–9.
38. Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. Atherosclerotic vascular events in a single large lupus cohort: prevalence and risk factors. *J Rheumatol.* 2007;34:70–5.
39. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:408–15.
40. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992;93:513–9.
41. Aviña-Zubieta JA, To F, Vostretsova K, De Vera M, Sayre EC, Esdaile JM. Risk of Myocardial Infarction and Stroke in Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus: A General Population-Based Study. *Arthritis Care Res.* 2017;69:849–56.
42. Elliott JR, Manzi S, Edmundowicz D. The role of preventive cardiology in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2007;9:125–30.

43. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2331–7.
44. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:338–46.
45. Pons-Estel GJ, Andreoli L, Scanzi F, Cervera R, Tincani A. The antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2017;76:10–20.
46. Kim K-J, Baek I-W, Yoon C-H, Kim W-U, Cho C-S. Elevated levels of soluble CD40 ligand are associated with antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35:823–30.
47. Bassi N, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Rampudda ME, Atzeni F, et al. OxLDL/beta2GPI-anti-oxLDL/beta2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients. *Autoimmun Rev.* 2007;7:52–8.
48. Tishler M, Shoenfeld Y. Anti-heat-shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;26:558–63.
49. Wang X, Zhang Y, Zhang J, Wang Y-X, Xu X-R, Wang H, et al. Multiple Autoantibodies against Cardiovascular Receptors as Biomarkers in Hypertensive Heart Disease. *Cardiology.* 2019;142:47–55.
50. Veres A, Füst G, Smieja M, McQueen M, Horváth A, Yi Q, et al. Relationship of anti-60 kDa heat shock protein and anti-cholesterol antibodies to cardiovascular events. *Circulation.* 2002;106:2775–80.
51. Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet Lond Engl.* 1993;341:255–9.
52. Lutters BC, Meijers JC, Derksen RH, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes. *J Biol Chem.* 2001;276:3060–7.
53. Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermeylen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood.* 2003;101:157–62.
54. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, et al. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood.* 2003;101:3495–500.
55. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2120–4.
56. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106:2340–6.
57. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, et al. Complement

- C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112:1644–54.
58. Müller-Calleja N, Lackner KJ. Mechanisms of Cellular Activation in the Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44:483–92.
59. Park HS, Gu JY, Jung HS, Kim HK. Thrombotic Risk of Non-Criteria Anti-Phospholipid Antibodies Measured by Line Immunoassay: Superiority of Anti-Phosphatidylserine and Anti-Phosphatidic Acid Antibodies. *Clin Lab.* 2019;65.
60. Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, Burnel Y, de Luna G, Dragon-Durey M-A. Prevalence and Significance of Non-conventional Antiphospholipid Antibodies in Patients With Clinical APS Criteria. *Front Immunol.* 2018;9:2971.
61. Peterson LK, Willis R, Harris EN, Branch WD, Tebo AE. Antibodies to Phosphatidylserine/Prothrombin Complex in Antiphospholipid Syndrome: Analytical and Clinical Perspectives. *Adv Clin Chem.* 2016;73:1–28.
62. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2003;102:2717–23.
63. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1309–11.
64. Aringer M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. *Semin Arthritis Rheum.* 2019;49:S14–7.
65. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295–306.
66. Hoppichler F, Koch T, Dzien A, Gschwandtner G, Lechleitner M. Prognostic value of antibody titre to heat-shock protein 65 on cardiovascular events. *Cardiology.* 2000;94:220–3.
67. Doria A, Shoenfeld Y, Wu R, Gambari PF, Puato M, Ghirardello A, et al. Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:1071–7.
68. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473:317–25.
69. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233–41.
70. Merrill JT, Rivkin E, Shen C, Lahita RG. Selection of a gene for apolipoprotein A1 using autoantibodies from a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1655–9.
71. Dinu AR, Merrill JT, Shen C, Antonov IV, Myones BL, Lahita RG. Frequency of antibodies to the cholesterol transport protein apolipoprotein A1 in patients with SLE. *Lupus.* 1998;7:355–60.

72. Abe H, Tsuboi N, Suzuki S, Sakuraba H, Takanashi H, Tahara K, et al. Anti-apolipoprotein A-I autoantibody: characterization of monoclonal autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001;28:990–5.
73. Vuilleumier N, Rossier MF, Pagano S, Python M, Charbonney E, Nkoulou R, et al. Anti-apolipoprotein A-1 IgG as an independent cardiovascular prognostic marker affecting basal heart rate in myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010;31:815–23.
74. Vuilleumier N, Montecucco F, Spinella G, Pagano S, Bertolotto M, Pane B, et al. Serum levels of anti-apolipoprotein A-1 auto-antibodies and myeloperoxidase as predictors of major adverse cardiovascular events after carotid endarterectomy. *Thromb Haemost.* 2013;109:706–15.
75. Roux-Lombard P, Pagano S, Montecucco F, Satta N, Vuilleumier N. Auto-antibodies as emergent prognostic markers and possible mediators of ischemic cardiovascular diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;44:84–97.
76. Lagerstedt JO, Dalla - Riva J, Marinkovic G, Giudice RD, Engelbertsen D, Burlin J, et al. Anti-ApoA-I IgG antibodies are not associated with carotid artery disease progression and first-time cardiovascular events in middle-aged individuals. *J Intern Med.* 2019;285:49–58.
77. Pagano S, Satta N, Werling D, Offord V, de Moerloose P, Charbonney E, et al. Anti-apolipoprotein A-1 IgG in patients with myocardial infarction promotes inflammation through TLR2/CD14 complex. *J Intern Med.* 2012;272:344–57.
78. Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J, Pagano S, Satta N, Bastardot F, et al. Association between anti-apolipoprotein A-1 antibodies and cardiovascular disease in the general population. Results from the CoLaus study. *Thromb Haemost.* 2016;116:764–71.
79. Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J, Pagano S, Satta N, Hartley O, et al. Anti-Apolipoprotein A-1 IgG Predict All-Cause Mortality and Are Associated with Fc Receptor-Like 3 Polymorphisms. *Front Immunol.* 2017;8:437.
80. Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J, Pagano S, Satta N, Hartley O, et al. Impact of CD14 Polymorphisms on Anti-Apolipoprotein A-1 IgG-Related Coronary Artery Disease Prediction in the General Population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:2342–9.
81. Pagano S, Gaertner H, Cerini F, Mannic T, Satta N, Teixeira PC, et al. The Human Autoantibody Response to Apolipoprotein A-I Is Focused on the C-Terminal Helix: A New Rationale for Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disease? *PloS One.* 2015;10:e0132780.
82. Teixeira PC, Ducret A, Ferber P, Gaertner H, Hartley O, Pagano S, et al. Definition of human apolipoprotein A-I epitopes recognized by autoantibodies present in patients with cardiovascular diseases. *J Biol Chem.* 2014;289:28249–59.
83. Ribi C, Trendelenburg M, Gayet-Ageron A, Cohen C, Dayer E, Eisenberger U, et al. The Swiss Systemic lupus erythematosus Cohort Study (SSCS) - cross-sectional analysis of clinical characteristics and treatments across different medical disciplines in Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w13990.
84. Batuca JR, Ames PRJ, Amaral M, Favas C, Isenberg DA, Delgado Alves J. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by

specific antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl.* 2009;48:26–31.

85. Croca S, Bassett P, Chambers S, Davari M, Alber KF, Leach O, et al. IgG anti-apolipoprotein A-1 antibodies in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity and corticosteroid therapy: an observational study. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:26.

86. O’Neill SG, Giles I, Lambrianides A, Manson J, D’Cruz D, Schrieber L, et al. Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62:845–54.