



HAL
open science

A proliferation inducing ligand (APRIL), une molécule, deux fonctions opposées dans l'autoimmunité

Laurie Baert

► **To cite this version:**

Laurie Baert. A proliferation inducing ligand (APRIL), une molécule, deux fonctions opposées dans l'autoimmunité. Immunothérapie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV008 . tel-02191630

HAL Id: tel-02191630

<https://theses.hal.science/tel-02191630v1>

Submitted on 23 Jul 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Virologie - Microbiologie - Immunologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurie BAERT

Thèse dirigée par **Bertrand HUARD, Professeur des
universités, Université Grenoble-Alpes**

préparée au sein de l'**Institut pour l'Avancée des
Biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

A proliferation inducing ligand (APRIL), une molécule, deux fonctions opposées dans l'auto- immunité

Thèse soutenue publiquement le **27 Mars 2019**,
devant le jury composé de :

Pr. Alain BUISSON

Professeur des universités, université Grenoble-Alpes, président

Pr. Diego VERGANI

Professeur, King's College London Faculty of Life Sciences &
Medicine, rapporteur

Pr. Doron MERKLER

Professeur associé, université de Genève, rapporteur

Dr. Benedetta TERZIROLI BERETTA-PICCOLI

Docteur en médecine, Epatocentro Ticino, examinateur

Pr. Bertrand HUARD

Professeur des universités, université Grenoble-Alpes, membre



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement tous les membres du jury qui ont généreusement acceptés d'évaluer mes travaux de thèse. Particulièrement au Docteur Doron Merkler et au professeur Diego Vergani pour m'avoir fait l'honneur d'être présents en tant que rapporteurs ainsi que le Dr Benedetta Terziroli Beretta-Piccoli et le Professeur Alain Buisson en tant qu'examineurs.

Je souhaite en tout premier remercier Bertrand pour m'avoir accueilli dans son équipe il y a maintenant presque 5 ans. A cette époque en stage de M1, je n'avais aucune expérience dans la recherche. Ces 2 mois m'ont donné envie de continuer. Tu m'as ensuite enrôlée dans « l'aventure sclérose en plaques » et je t'en remercie. Après des hauts et des BAS au concours de l'école doctorale, tu ne m'as finalement pas lâchée. Ma thèse a débutée et tous tes conseils, ton écoute et ta rigueur ont permis que cette thèse se déroule à merveille. Outre le côté scientifique, merci de m'avoir donné l'opportunité de quitter le nid familial pendant ce voyage au Japon (qui était tout de même professionnel) et de m'avoir donné l'envie de prendre mon envol car tu sais à quel point j'étais accrochée à mon côté sédentaire. Et finalement on aura réussi à le publier cet article !!!

Merci à tous nos collaborateurs proches ou loin des différents instituts qui ont gentiment acceptés de partager leur savoir, compétences, plateformes et permis que ces projets avancent si bien.

Un merci spécial à nos collaborateurs Japonais qui m'ont accueilli si généreusement. A mon baptême de Kimono, séance photos, spécialités culinaires en tout genre et au saké chaud.

En dehors du côté scientifique, un remerciement s'impose aux personnes de l'IAB présentes à chaque moment ou presque et ceux de mon équipe. Je pense à Mashal, Christine, Alexis, Arin, Benoît, Marion, Keerthi, Michael, Alexandre (Mention spéciale : merci pour la batterie !!) et Mina. Toutes ces discussions et moments partagés ont fait que cette thèse ce soit passée dans les meilleures conditions possibles.

Un énorme merci à Patrick. Notre première rencontre à l'animalerie, visage caché par cet accoutrement grotesque ne nous a pas empêché d'échanger des mots qui, sans le savoir aller nous conduire à cette très forte amitié. Une rencontre inoubliable, des après-midis jeux extraordinaires et ces derniers mots qui te rappelleront que de bons souvenirs : Visons l'EXCELLENCE !!! A si et pour le prochain repas de Noel c'est nous qui faisons les courses....

Je ne pouvais pas faire sans te citer, oui MINA tu es dans cette rubrique spéciale car avec toutes ces années on ne peut pas t'oublier. Tes rires si fort qu'un sourd les entendrait ou encore tes entrées intempestives dans notre bureau pour soit disant « remplacer Alexis » étaient magiques. Toutes tes idées d'activités n'ont pas toujours eu les résultats escomptés surtout auprès de BH mais faut avouer que tu me vends du rêve quand tu défies BH et le saoul pour faire un restau avec l'équipe de cœur et tout ça A SA CHARGE !!

Mon best, je ne sais pas comment on a fait pour se supporter toutes ces années mais je suis sûre d'une chose c'est que si tu n'avais pas été là, St Cyprien, Nice ou encore l'Australie n'auraient pas été pareils. On en aura eu des fous rires et anecdotes et cela va continuer encore longtemps car tu ne vas pas te débarrasser de moi aussi facilement.

Loïck, mon frère ou plutôt mon jumeau de 8 ans d'écart, je ne sais pas pourquoi je te dis merci car tu n'as absolument pas contribué à ce travail !! Malgré tout je pense ta contribution psychologique à fait son effet. Tes mots résonnent dans ma tête.... « t'as raté médecine, t'es nul.. T'as raté médecine !!! » Et bien je tiens à te dire que désormais tu seras quand même obligé de m'appeler DOCTEUR (si tout se passe bien).

Il faut sans nul doute remercier ceux qui me supportent depuis ma naissance, Maman, Papa, sinon il n'y aurait jamais eu ces prodigieux travaux de thèse (tout en ironie bien entendu !!). Plus sérieusement, vous m'avez soutenu et poussé toujours plus haut et plus loin et cru en moi. L'objectif des 15 de moyenne n'a pas toujours été atteint et toutes vos tentatives « d'assassinats » sur ma personne ont échouées mais m'ont endurcie. Et non papa, je n'ai pas eu de notes aujourd'hui, c'est fini !!

Résumé

Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire. L'étiologie de la pathologie reste souvent inconnue, compliquant la conception de traitements adaptés. Ce projet de thèse s'est focalisé sur la molécule « *a proliferation inducing ligand* » (APRIL), facteur de survie des plasmocytes (PC) produisant les anticorps, dans l'hépatite auto-immune (HAI) et la sclérose en plaques (SEP). Dans l'HAI, une principale caractéristique histologique est la présence d'un infiltrat lymphoplasmocytaire formant une hépatite d'interface dommageable. Dans cette maladie, nous avons d'abord pu mettre en évidence une corrélation positive entre l'expression d'APRIL et l'infiltration des PC dans les espaces portes. *In vitro*, nous avons observé une survie augmentée des PC du foie en présence d'APRIL. La corticothérapie communément prise par les patients HAI ne cible pas directement les PC. Cependant, nous avons remarqué une réduction simultanée de la densité de PC et de l'expression d'APRIL. Ainsi, cette étude étend le rôle de facteur de survie d'APRIL aux PC du foie dans l'HAI. Les rechutes sont fréquentes après arrêt du traitement, nous indiquant que les cellules pathogènes sont épargnées par la thérapie. Nos résultats montrent que le ciblage d'APRIL pourrait être précieux dans l'HAI. Propre de son rôle sur les PC, APRIL a été ciblée avec succès dans plusieurs maladies auto-immunes. Outre ces succès, un essai clinique visant à bloquer APRIL dans la SEP à malheureusement conduit à une exacerbation inattendue de la maladie. Nous avons été capables de montrer qu'APRIL cible un nouveau type cellulaire dans le système nerveux central, les astrocytes. La fixation d'APRIL à la surface des astrocytes dépend d'un nouveau partenaire de liaison, exprimé par ces derniers, les chondroïtines sulfates protéoglycans. Cette interaction induit la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, conduisant à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de souris déficientes pour *APRIL* dans le modèle standard de la SEP nous a permis de confirmer le rôle neuro-protecteur d'APRIL. Finalement, après injection d'APRIL recombinante dans ce modèle murin, une réduction de la sévérité de la maladie a été observée. Globalement, nous avons identifié APRIL comme une molécule à double rôle dans les maladies auto-immunes.

Mots-clés : A proliferation inducing ligand (APRIL), Auto-immunité, Sclérose en plaques (SEP), hépatite auto-immune (HAI), Inflammation.

Abstract

Autoimmune diseases result from a dysfunction of the immune system. The disease etiology is often unknown, complicating the design of appropriate treatments. This thesis project focused on the molecule “a proliferation inducing ligand” (APRIL), a survival factor for antibody-producing plasma cells (PC), in autoimmune hepatitis (AIH) and multiple sclerosis (MS). In AIH, one main histological feature is the presence of a lymphoplasmacytic infiltration forming a damaging interface hepatitis. In this disease, we first noticed a positive correlation between APRIL expression and PC infiltration in portal spaces. *In vitro*, we further observed an extended survival of liver PC in the presence of APRIL. The corticosteroid therapy commonly applied to AIH patients does not directly target PC. However, we noticed a concomitant reduction in portal PC density and APRIL expression. Hence, this study is extending the survival role of APRIL to liver PC in AIH. Relapses are frequent after treatment withdrawal, telling us that pathogenic cells are spared by the therapy. Our results indicate that APRIL targeting might also be valuable in AIH. Own to its role on PC, APRIL has been successfully targeted in several autoimmune diseases. Besides successes, a clinical trial aiming at APRIL blockade in MS has unfortunately led to an unexpected disease exacerbation. We have been able to show that APRIL targets a new cell type in the central nervous system, the astrocyte. The APRIL binding to astrocyte surface depends on a new binding partner, expressed by the latter, the chondroitin sulfate proteoglycans. This binding induces the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, leading to the inhibition of, self-reactive T-cell proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion. Use of *APRIL*-deficient mice in the standard model of MS allowed us to confirm the neuroprotective role of APRIL. Finally, after recombinant APRIL injection in this model, a lowered disease severity was observed. Overall, we identified APRIL as a dual role molecule in autoimmune diseases.

Keywords: A proliferation inducing ligand (APRIL), Autoimmunity, Multiple sclerosis, Autoimmune hepatitis, Inflammation.

Tables des matières

Résumé.....	5
Introduction générale.....	12
Index des figures.....	13
Abréviations.....	14

PARTIE 1 : INTRODUCTION

Chapitre 1 : APRIL

I. Généralités sur la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF).....	18
I.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles.....	19
I.2 Signalisation.....	20
II. Découverte d'APRIL.....	21
II.1 Structure.....	21
II.2 Identification des récepteurs.....	21
II.3 Fonction biologiques d'APRIL.....	25
a) Expression d'APRIL et de ses récepteurs.....	25
b) Effets d'APRIL <i>in vitro</i>	26
c) Effets d'APRIL <i>in vivo</i>	27
II.4 Rôle d'APRIL dans les maladies auto-immunes.....	28

Chapitre 2 : Lymphocyte B et auto-immunité

I. Régulation de la tolérance lymphocytaire B.....	46
I.1 Rupture de la tolérance B dans l'auto-immunité.....	47
a) Signalisation.....	47

b) Ig auto-réactives.....	48
c) Survie des LB.....	48
I.2 Cause de la rupture de la tolérance B dans l'auto-immunité.....	48
a) Facteurs environnementaux.....	48
b) Les risques génétiques.....	49
II. Fonction des LB dans l'auto-immunité.....	49
II.1 Les autoanticorps.....	50
a) Complexes immuns.....	50
b) Stimulation et inhibition de la fonction des récepteurs.....	51
c) Absorption de l'antigène.....	51
II.2 LB comme cellules présentatrices d'antigènes.....	52
II.3 Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.....	52
II.4 Modulation de la transformation et présentation de l'antigène.....	52
II.5 Formation de CG ectopiques.....	52
III. Approche thérapeutiques.....	53

Chapitre 3 : Hépatite auto-immune

I. Hépatites auto-immunes (HAI).....	56
I.1 Epidémiologie des HAI.....	56
I.2 Physiopathologie des HAI.....	57
a) Facteurs de prédisposition.....	57
b) Pathogénèse.....	58
II. Diagnostic.....	59
II.1 Caractéristiques cliniques, biologiques et histologiques.....	59
a) Clinique.....	59

b) Biologie.....	61
c) Histologie.....	62
II.2 Syndrome de chevauchement.....	64
III. Traitement.....	65
IV. Modèles animaux.....	68

Chapitre 4 : Sclérose en plaques

I. Sclérose en plaques (SEP).....	70
I.1 Historique et définition de la SEP.....	70
I.2 Epidémiologie de la SEP.....	71
a) Prévalence et incidence.....	71
b) Age et sexe.....	72
I.3 Etiologie de la SEP.....	72
a) Facteurs impliqués dans la SEP.....	72
b) Symptômes.....	74
c) Les formes cliniques et évolution.....	75
II. Diagnostic.....	77
III. Physiopathologie.....	78
IV. Traitements.....	79
V. Etude de la SEP dans les modèles animaux.....	81

PARTIE 2 : RESULTATS

Chapitre 1 : APRIL et HAI

I. Contexte et objectif de l'étude.....	85
II. Manuscrit.....	86

Chapitre 2 : APRIL et SEP

I. Contexte et objectif de l'étude.....108

II. Manuscrit.....108

PARTIE 3 : DISCUSSION, CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. APRIL et HAI.....125

II. APRIL et SEP.....129

III. Conclusion générale.....133

Références bibliographiques.....134

Introduction générale

Les membres de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Parmi ces membres, on retrouve le ligand APRIL (*a proliferation inducing ligand*) qui améliore la survie des lymphocytes B et plasmocytes, les cellules produisant les anticorps. Bien que leur rôle dans la pathogénèse des maladies auto-immunes ne soit pas toujours bien établi, les traitements visent le plus souvent à réduire la réponse immunitaire.

Les travaux de cette thèse ont eu pour but d'étudier le rôle de la molécule APRIL dans deux maladies auto-immunes dont l'étiologie reste encore méconnue, la sclérose en plaques et l'hépatite auto-immune.

Dans la première partie comportant 4 chapitres nous aborderons l'état de l'art. Après avoir présenté la superfamille des facteurs de nécrose tumorale et plus particulièrement la découverte d'APRIL, nous nous focaliserons pour le 2^{ème} chapitre sur le rôle des lymphocytes B et plasmocytes dans l'auto-immunité. Par la suite nous présenterons dans deux chapitres distincts le développement de la sclérose en plaques et de l'hépatite auto-immune.

Dans la deuxième partie, nous présenterons les différents résultats acquis au cours de cette thèse. Un chapitre sera consacré à l'étude d'APRIL dans les hépatites auto-immunes et un autre chapitre pour l'étude d'APRIL dans la sclérose en plaques. Les résultats obtenus pour les deux études seront présentés sous la forme d'articles scientifiques acceptés pour publication ou en cours de soumission. Pour plus de simplicité et éviter la redondance, la partie « matériel et méthodes », les figures ainsi que les références correspondantes à chaque étude seront directement intégrées dans le chapitre correspondant. Chaque chapitre présentera d'abord le contexte avec les observations ayant initiées le projet, puis le manuscrit associé à l'étude sera intégré sous sa forme finale d'acceptation/soumission.

Pour finir, une dernière partie permettra de restituer les avancées faites grâce aux travaux de cette thèse dans un contexte plus global et de discuter des perspectives générales.

Index des figures

Figure 1 : Diagramme représentatif des ligands TNFSF et de leurs récepteurs respectifs

Figure 2 : Voies de signalisations des TNFRSF

Figure 3 : Représentation des interactions entre APRIL/BAFF et leurs récepteurs

Figure 4 : Représentation de la structure de la protéine APRIL

Figure 5 : Structure des héparanes sulfate protéoglycans

Figure 6 : Structure des CSPG

Figure 7 : Expression des récepteurs d'APRIL et de BAFF sur les LB

Figure 8 : Développement et différenciation des LB

Figure 9 : Fonctions des LB dans l'auto-immunité

Figure 10 : Mécanismes de la pathogénèse de l'HAI

Figure 11 : Tableaux des auto-anticorps dans l'HAI

Figure 12 : Score METAVIR

Figure 13 : Histologie du foie lors d'HAI

Figure 14 : Schéma du traitement conventionnel des HAI

Figure 15 : Description histologique de la SEP

Figure 16 : Prévalence et Incidence

Figure 17 : Evolution du handicap en fonction du temps

Figure 18 : Echelle EDSS : Echelle de cotation du handicap

Figure 19 : IRM de patients SEP

Liste des Abréviations

ADCC : Antibody-dependent-cellular cytotoxicity
ALAT : Alanine amino-transférases
ANA : Anti-nuclear antibodies
APRIL : A proliferation inducing ligand
ASAT : Aspartate amino-transférases
BAFF : B-cell activating factor
BCMA : B cell maturation antigen
BCR : B-cell receptor
BHE : Barrière Hémato-encéphalique
CBP : Cholangite biliaire primitive
CD : Cellules dendritiques
CDC : Complement-dependent cytotoxicity
CG : Centre germinatif
CIA : Collagen-induced arthritis
CIS : Clinical Isolated Syndrom
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CRD : cysteine-rich domain
CS : chondroïtines sulfates
CSP : cholangite sclérosante primitive
CSPG : Chondroïtines sulfates protéoglycans
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DD : Death domain
DS : Dermatane sulfate
EAE : Encephalite auto-immune expérimentale

EBV : Epstein Barr virus
EDSS : Expanded Disability Status Scale
ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase
FADD Fas-associated DD
Fc : partie constante d'une Ig
GAG : Glycoaminoglycanes
GWAS : Genome-wide association study
HAI : Hépatite auto-immune
HLA : Human Leukocyte Antigen
HS : Héparanes sulfates
HSPG : Héparanes sulfates protéoglycans
IAIHG : International Autoimmune Hepatitis Group
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobulines
IgG4-RD : IgG4-Related Disease
IL- : Interleukine
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JNK : Jun N-terminal Kinase
KS : Kératanes sulfates
LB : Lymphocytes B
LC-1 : Anti-liver cytosol-1
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LES : Lupus érythémateux systémique
LKM-1 : Anti-liver-kidney microsomal-1
LP : Liver pancreas antigen
LT Th1 : Lymphocyte T helper 1
LT : Lymphocytes T
MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MBP : Myelin basic protein
 MEC : Matrice extracellulaire
 MMF : Mycophénolate mofétil
 MO : Moelle osseuse
 MOG : Myelin oligodendrocyte protein
 NF-κB : Nuclear Factor-KappaB
 NK : Natural killer
 NL : Nécrose lobulaire
 NMO : Neuromyéélite optique
 NO : Neurite optique
 NP : Nécrose parcellaire
 OLS : Organes lymphoïdes secondaires
 PB : Plasmablastes
 PC : Plasmocytes
 PI3K : Phosphoinositide-3 kinase
 PLP : Proteolipid protein
 PPMS : Primary Progressive Multiple Sclerosis
 PR : Polyarthrite rhumatoïde
 RFc : Récepteurs Fc
 RRMS : Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis
 S1P-R : Récepteurs de la sphingosine 1 phosphate
 SEP : Sclérose en plaques
 SLA : Anti-soluble liver antigen
 SMA : Anti-smooth muscle antibodies
 SNC : Système nerveux central
 SPMS : Secondary Progressive Multiple Sclerosis
 SS : Syndrome de Sjögren
 T regs : Lymphocytes T régulateurs
 TAC1 : transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor
 TCR : T-cell receptor
 THD : TNF homology domain
 TNF : Facteur de nécrose tumorale
 TNFR : Récepteurs des TNF
 TNFRSF : Superfamille des TNFR
 TNFSF : Superfamille des TNF
 TRADD : TNFR1-associated DD
 TRAF : TNF receptor-associated factor
 TSH : thyroid stimulating hormone
 TWEAK : TNF-related weak inducer of apoptosis
 UI : Unités internationales
 VLA-4 : Very late antigen-4
 VNS : Valeur normale supérieure

PARTIE 1 :

INTRODUCTION

Chapitre 1 :

APRIL

I. Généralités sur la superfamille des facteurs de nécrose tumorale

La superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) est composée à ce jour de 19 ligands et 30 récepteurs. Les interactions ligand-récepteur sont complexes car un ligand peut interagir avec plusieurs récepteurs et un même récepteur peut avoir différents ligands (figure 1). Les signaux médiés par les TNF participent à un large panel de fonctions biologiques comme la régulation de l'inflammation, l'apoptose, la prolifération cellulaire ou encore la morphogénèse. Ces fonctions essentielles assurées par la superfamille des TNF (TNFSF) en font une cible préférentielle dans le traitement de plusieurs maladies comme le cancer, les maladies infectieuses ou encore auto-immunes [1].

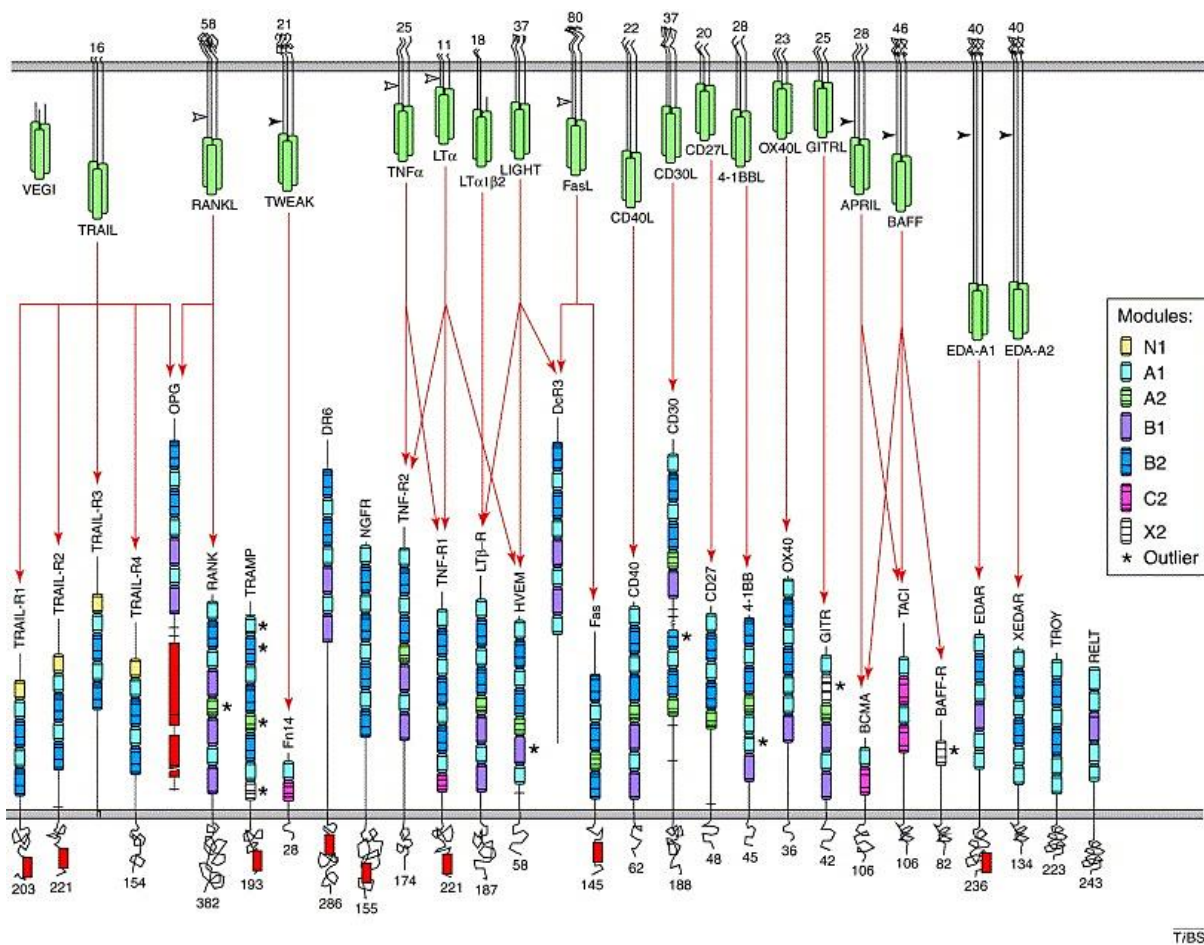


Figure 1 : Diagramme représentatif des ligands TNFSF et de leurs récepteurs respectifs.

Les ligands (verts) sont trimériques et certains peuvent être solubilisés (flèche au niveau du site de clivage). Les récepteurs respectifs à chaque ligand présentent des domaines riches en cystéines (bleu) et également certains présentent des domaines de mort (rouge). (Schéma de Bodmer et al., 2002)

I.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles

Malgré une homologie de séquence modérée de 20 à 30%, les membres de la TNFSF partagent tous une homologie structurale très élevée [2]. La plupart des ligands de la TNFSF sont des protéines transmembranaires de type II (extrémité N-terminale intracellulaire) exprimées à la membrane. L'extrémité C-terminale extracellulaire contient un domaine d'homologie TNF (THD, *TNF homology domain*). Les THD s'assemblent sous la forme d'homotrimères non covalents. Des formes hétérotrimériques ont également été retrouvées [3,4]. Ainsi chaque ligand possède 3 sites de liaisons aux récepteurs TNF (TNFR). Certains ligands peuvent subir un clivage protéolytique entraînant la solubilisation de ceux-ci.

Les récepteurs de la TNFSF (TNFRSF, *TNF receptor superfamily*) sont des protéines transmembranaires de type I comportant un ectodomaine de structure allongée formé de plusieurs domaines riches en cystéines (CRD, *cysteine-rich domain*), un domaine transmembranaire et une partie intracellulaire qui recrute les protéines de transduction de signal à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs peuvent être classés en 3 groupes :

- Les récepteurs possédant un domaine de mort (DD, *death domain*) dans la partie intracellulaire. L'interaction récepteur-ligand active la mort cellulaire par apoptose en faisant intervenir les DD soit via une protéine adaptatrice Fas (FADD, *Fas-associated DD*) ou par le récepteur R1 du TNF- α (TRADD, *TNFR1-associated DD*) par exemple.
- Les récepteurs interagissant avec les membres de la famille TRAF (*TNF receptor-associated factor*). Le recrutement de ces molécules adaptatrices permet l'activation de diverses cascades de signalisation comme NF- κ B (*Nuclear Factor-KappaB*), JNK (*Jun N-terminal Kinase*), ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinase*) ou PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*).
- Les récepteurs « leurres ». Ces récepteurs n'ont aucun partenaires interagissant avec le domaine intracellulaire et fonctionnent ainsi comme des inhibiteurs de ligands TNFSF.

II. Découverte d'APRIL

II.1 Structure

APRIL (*A Proliferation Inducing Ligand*) a été identifiée pour la première fois en 1998 par *Hahne et al* [6]. Le gène d'APRIL se situe sur le chromosome 17p13, assez proche d'un autre membre de la TNFSF, TWEAK (*TNF-related weak inducer of apoptosis*). En terme de structure, APRIL est beaucoup plus proche d'un autre TNF ligand, BAFF (*B cell Activating Factor* ou aussi connu comme BlyS) avec ~48% d'homologie de séquence dans le domaine TNF.

Les TNF ligands s'assemblent en homotrimères [2] et BAFF et APRIL n'échappent pas à la règle. Ce sont des protéines transmembranaires de type II qui subissent un clivage protéolytique sur un motif multi basique/site consensus [7]. Contrairement à BAFF, APRIL n'est jamais retrouvée comme une forme liée à la membrane. Elle est clivée dans l'appareil de Golgi par une protéase de type furine suivi par la sécrétion de la forme biologiquement active d'APRIL [7]. La forme soluble est un trimère non covalent d'environ 63kDa. Il existe une diversité importante des formes matures d'APRIL en raison des différents épissages et événements post-traductionnels [8]. Du fait de la proximité des gènes d'APRIL et de TWEAK, il existe une forme alternative nommé TWE-PRIL formée d'un ARNm hybride de TWEAK et APRIL [9]. Cette protéine est composée de la portion transmembranaire et cytoplasmique de TWEAK fusionnée avec la partie C-terminale du domaine TNF d'APRIL. Cette forme pourrait représenter une forme d'APRIL liée à la membrane. APRIL peut également former des hétérotrimères avec BAFF dans certaines conditions pathologiques, la stœchiométrie du trimère oriente l'affinité pour un TNFR et donc le type de signalisation sous-jacente [4,10].

II.2 Identification des récepteurs

Les TNFRSF sont généralement des protéines de type I avec des CRD dans leur portion extracellulaire. BAFF a d'abord été démontré pour se lier au TNFR TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*) [11]. Puis peu de temps après, plusieurs publications ont montrées qu'APRIL et BAFF signalisés via TACI et BCMA (*B cell maturation antigen*) [12,13]. BAFF-R est un autre TNFR pouvant lier BAFF mais pas APRIL [14]. Les hétérotrimères APRIL/BAFF semblent se lier uniquement à TACI même si il n'existe aucune démonstration (figure 3). Pour la forme TWE-PRIL, aucun récepteur n'est connu mais

comme le domaine TNF de liaison est celui d'APRIL, il est logique de penser que cette forme peut se lier à TACI et BCMA.

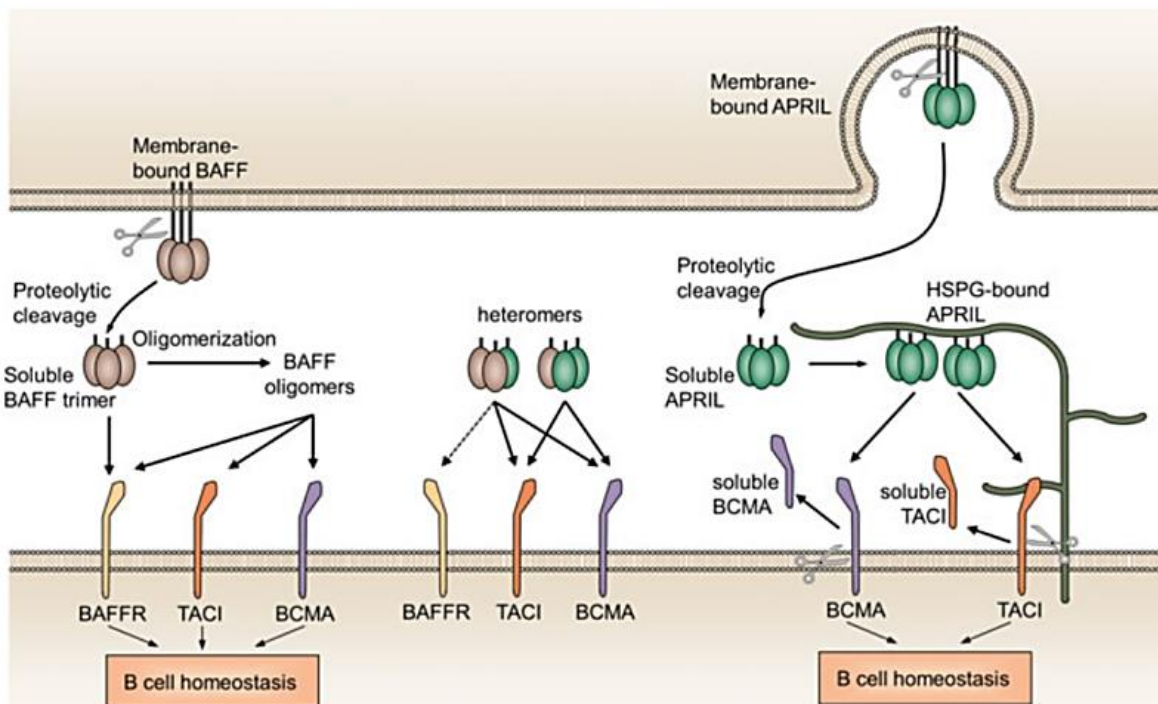


Figure 3 : Représentation des interactions entre APRIL/BAFF et leurs récepteurs.

Le produit sécrété d'APRIL interagit avec les récepteurs TACI, BCMA et les HSPG. BAFF possède en plus de TACI et BCMA un récepteur unique BAFF-R. APRIL/BAFF peuvent former des hétérotrimères qui se lient préférentiellement à un de ces récepteurs en fonction de leur stœchiométrie (schéma de Pascal Schneider, Epalinges).

Les récepteurs interagissant avec APRIL et BAFF diffèrent significativement de la structure canonique des TNFR. Ces 3 récepteurs sont des protéines transmembranaires de type III sans peptide signal ni de DD. Dans le cas de BCMA, seulement un CRD est présent, 2 CRD (CRD1 et CRD2) pour TACI et aucun CRD canonique pour BAFF-R [15].

Plusieurs évidences vont dans le sens de l'existence d'un 3^{ème} récepteur spécifique d'APRIL. En effet il a été démontré une stimulation de la prolifération chez certaines cellules comme par exemple les Jurkat, les cellules épithéliales de poumons A549, les fibroblastes NIH-3T3, cellules cancéreuses du colon HT-29, mais aucune de ces cellules n'expriment TACI ou BCMA [6,16]. De plus, BAFF ne se lie pas aux cellules tumorales répondant à APRIL et n'induit aucun signal de prolifération [16,17]. Grâce à une différence structurale entre BAFF et APRIL, un nouveau partenaire d'APRIL a pu être identifié, étant les héparanes sulfate protéoglycans (HSPG), faisant partie de la famille des glycosaminoglycans. Un stretch d'acides aminés

basiques (QKQKKQH) proche de l'acide aminé terminal présent sur la protéine mature APRIL est impliqué dans la liaison aux HSPG (figure 4). La liaison entre les charges négatives des HSPG et la séquence basique d'APRIL est inhibée par l'ajout d'héparine, un héparane sulfate (HS) soluble. Il est démontré que les HSPG servent de co-récepteurs pour APRIL permettant son oligomérisation à la surface des cellules cibles afin d'engendrer un signal suffisant via les récepteurs TACI et BCMA [17,18].

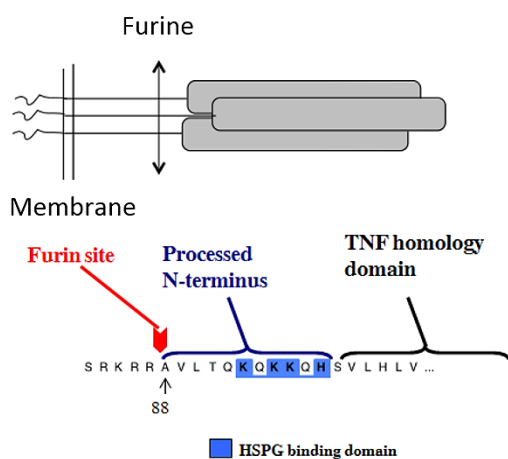


Figure 4 : Représentation de la structure de la protéine APRIL

Un clivage protéolytique par une furine entraîne la sécrétion de l'extrémité C-terminale d'APRIL. Un stretch composé d'acides aminés chargés positivement (QKQKKQH) permet d'interagir avec les HSPG.

Cas particulier des glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des macromolécules glucidiques ubiquitaires chargées négativement. Ce sont des chaînes linéaires sulfatées présentes à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire (MEC) d'un grand nombre de cellules et tissus. Elles se composent de répétitions disaccharidiques et peuvent se lier à une protéine formant ainsi un protéoglycan (figure 5). Ce sont des cofacteurs essentiels dans les processus d'adhésion matrice-cellule, et impliqués dans les interactions récepteur-facteurs de croissance [19].

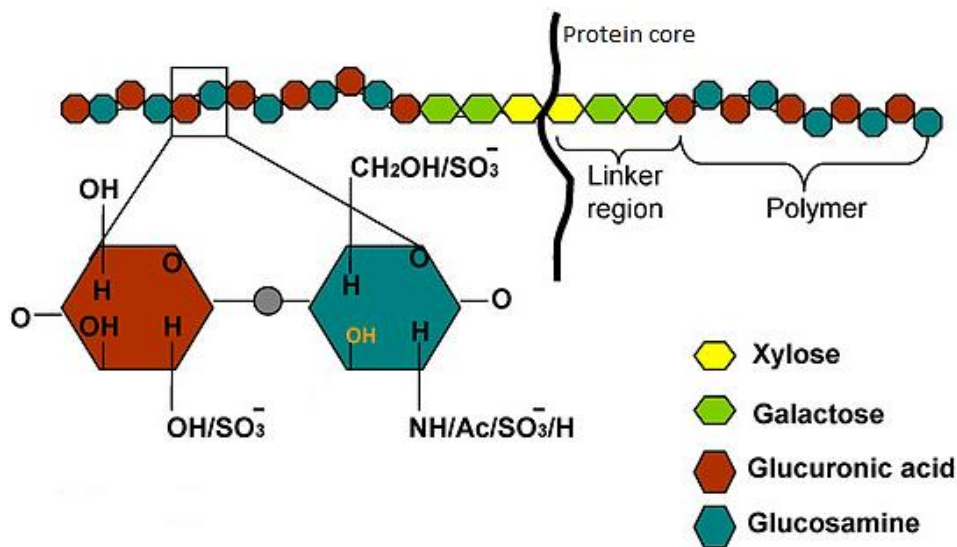


Figure 5 : Structure des héparanes sulfate protéoglycans

Les chaînes de HSPG sont des glycoprotéines linéaires qui s'assemblent à partir d'un tétrasaccharide (région « linker ») sur un résidu sérine d'un corps protéique. La synthèse de la chaîne se fait par l'addition d'un disaccharide de base répétitif composé d'acide Glucuronique (GlcA) et Glucosamine (GlcNAc). L'extension de la chaîne est également accompagnée de sulfatations sur ces résidus. Ces charges négatives interagissent avec la protéine APRIL.

On distingue plusieurs types de GAG selon la prédominance du type de disaccharide qui les composent. On retrouve notamment en plus des HS, les chondroïtines sulfates (CS), dermatanes sulfates (DS) et kératanes sulfates (KS). L'expression de chaque GAG varie selon le tissu. On peut citer l'importante expression des CS protéoglycans (CSPG) dans la MEC du cerveau qui sont impliqués dans le développement neural et le guidage des axones. Plusieurs types de CS existent en fonction de la position et du nombre de sulfates ajoutés sur la chaîne (figurer 6). Ils sont largement surexprimés par les astrocytes lors de lésions du système nerveux et forment ce que l'on appelle « la cicatrice gliale ». Ceci permet d'empêcher la propagation des lésions mais inhibe également la pousse axonale au niveau des sites de lésions [20]. Les CSPG ont été reportés comme s'accumulant dans les lésions de sclérose en plaques (SEP) [21]. L'échec de la remyélinisation étant un obstacle majeur au rétablissement de la SEP, les CSPG sont donc probablement une des causes de cet échec.

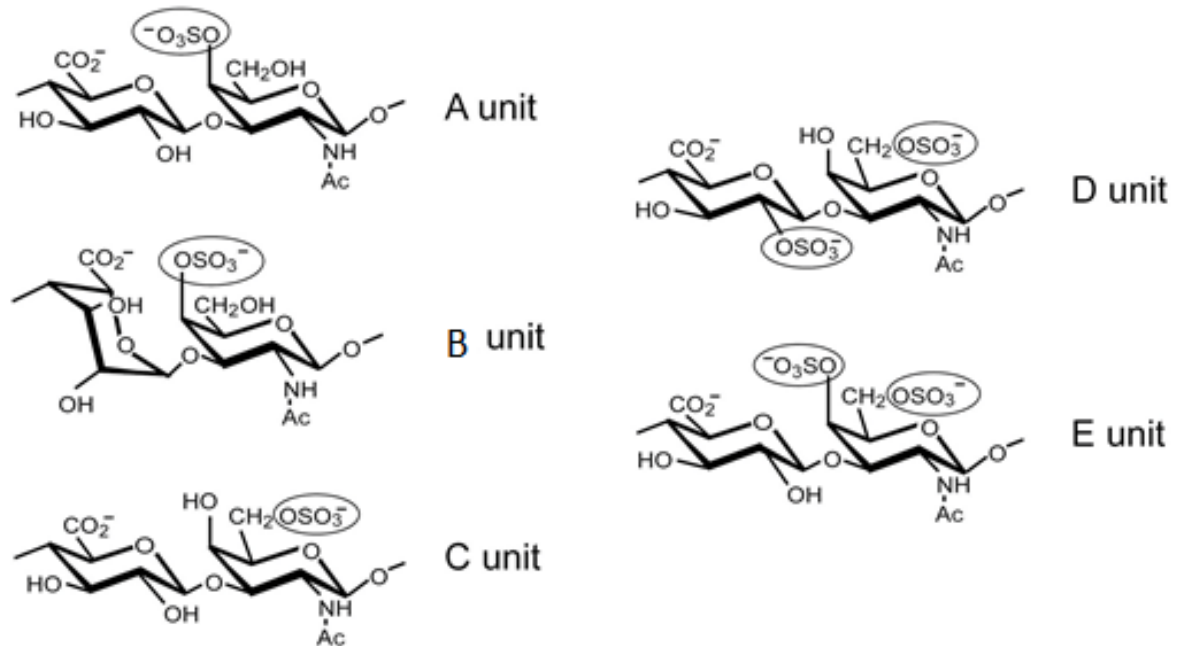


Figure 6 : Structure des CSPG

Les chaînes de CSPG se distinguent selon la position et le nombre de sulfate (OSO₃⁻) sur la chaîne glycosidique. Les types A, B et C sont monosulfatés et les types D et E sont disulfatés. L'addition des sulfates se fait sur les carbones 2, 4 ou 6 selon le type de CS (Schéma adapté de Swarup et al., 2013).

Affinité

Les affinités de liaison d'APRIL pour les différents récepteurs divergent. APRIL se fixe préférentiellement à BCMA et a une plus faible affinité pour TACI [16]. Du côté de BAFF les affinités pour TACI et BCMA sont similaires. Alors que BCMA lie BAFF et APRIL, l'affinité de liaison de BCMA avec APRIL est 10 fois supérieure par rapport à celle avec BAFF [22,23].

II.3 Fonction biologiques d'APRIL

a) Expression d'APRIL et de ses récepteurs

APRIL est exprimée dans des sous-populations de cellules immunitaires : les monocytes, macrophages, cellules dendritiques (CD) et lymphocytes T (LT) [24,25]. APRIL est également trouvée dans des cellules non immunes, incluant les ostéoclastes et les tissus tumoraux [9,26,27]. Bien qu'APRIL soit exprimée par les mêmes types cellulaires que BAFF, APRIL est d'abord clivée dans la cellule puis sécrétée alors que BAFF est exprimée à la surface des cellules et peut ensuite être sécrétée par clivage [7,28,29]. La protéine fusion TWE-PRIL est retrouvée dans les monocytes ainsi que les LT activés et naïfs [9]. Une forte quantité de l'ARNm d'APRIL est détectée dans les lignées de cellules transformées, dans les cancers du

côlon humain, les tissus lymphoïdes et la thyroïde *in vivo* [6]. APRIL est de manière aberrante retrouvée dans les lymphocytes B (LB) malins et dans le microenvironnement des tumeurs de LB [30–32].

Les récepteurs BAFF-R pour BAFF et TACI et BCMA sont exprimés sur les LB à des stades différents, dépendant de la maturation et de l'activation de la cellule (figure 7). **BAFF-R** est exprimé sur les LB naïfs et LB du centre germinatif (CG). A ce stade l'expression de TACI apparaît. Au stade le plus tardif de la différenciation, soit les plasmocytes (PC), on retrouve l'expression de BCMA et également de CD138 ou encore syndecan-1, type de HSPG exprimé par les PC [33–35].

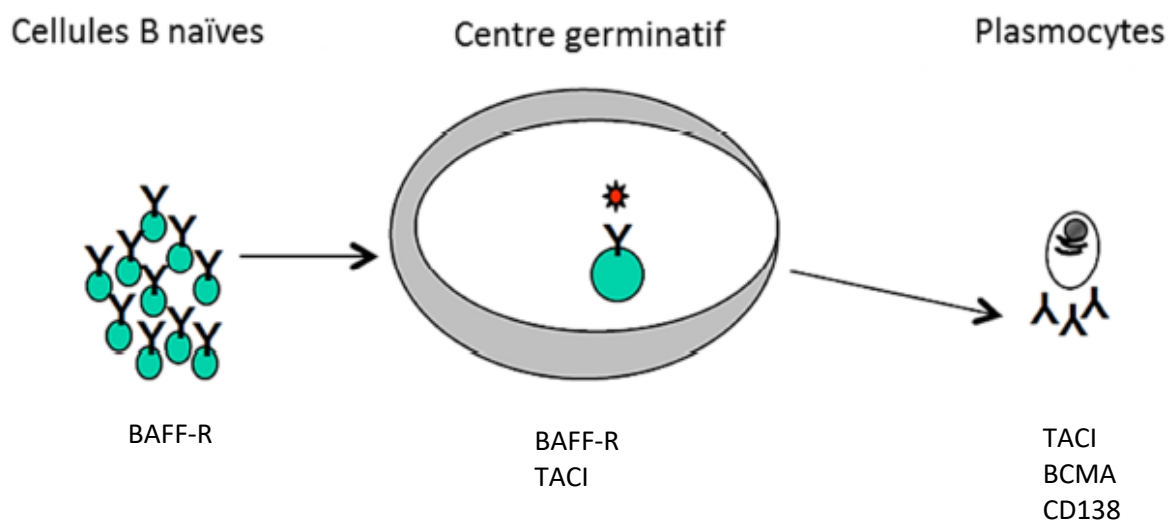


Figure 7 : Expression des récepteurs d'APRIL et de BAFF sur les LB

Selon le stade de maturation et l'endroit où se trouvent les LB, l'expression de TACI, BCMA, BAFF-R et CD138 varie.

b) Effets d'APRIL *in vitro*

Du faite de la difficulté importante de reproduire une protéine APRIL recombinante active de haute spécificité, l'étude d'APRIL dans des expériences *in vitro* et *in vivo* ainsi que son rôle ont longtemps été controversés [36]. APRIL est connu pour agir principalement sur les LB. Il a été démontré qu'APRIL induisait spécifiquement la prolifération rapide des PB en division à partir des LB mémoires activés en augmentant leur survie *in vitro*, via le récepteur BCMA. Cependant, l'importance d'APRIL dans le maintien des PC différenciés n'est pas totalement connu [25]. APRIL est également impliquée dans la surexpression de plusieurs

molécules co-stimulatoires exprimés sur les LB et par conséquent augmente la fonction de présentation d'antigène de ceux-ci [37].

APRIL peut aussi avoir une action sur d'autres types cellulaires comme les LT.

L'APRIL murine a montré la capacité de co-stimuler la prolifération des LT induite avec un anti-CD3 [38].

c) Effets d'APRIL *in vivo*

Différents groupes ont développés des souris transgéniques et knockout pour étudier APRIL. Des souris sur-exprimant le gène *APRIL* humain sous le contrôle d'un promoteur spécifique des LT ont montrées un doublement du pourcentage de LB dans les ganglions lymphatiques, ainsi que du niveau d'immunoglobulines (Ig) de type M en absence de tout challenge antigénique [39]. Après un challenge antigénique, les LT transgéniques pour *APRIL* survivent plus longtemps *in vivo* et *in vitro* comparé aux LT non transgéniques. Ceci semble être dû à l'expression augmentée du gène anti-apoptotique *BCL-2* par ces cellules T transgéniques. Les souris *APRIL* transgéniques ont également montrées une réponse altérée aux antigènes indépendants des LT, menant à une élévation du taux d'IgM et IgG spécifique de l'antigène. Concernant les IgA, leur taux dans le sérum a été augmenté dans les souris transgéniques plus âgées [40].

Deux groupes différents ont générés des souris déficientes pour *APRIL* avec des résultats plutôt divergents. 1 groupe n'a démontré aucun effets ni sur les organes et tissus, ni dans le développement des LB et LT, ou encore dans la réponse humorale suite à un challenge antigénique [41]. De manière controversée, le second groupe a démontré une augmentation du nombre de LT mémoires effecteurs, des CG élargis et une réponse IgG aux antigènes dépendants des LT augmentée. APRIL joue également un rôle en induisant le switch isotypique des IgG1 et IgA dans les LB à partir de souris knockout pour CD40. Suggérant qu'APRIL réduit les réponses anticorps dépendant des LT et favorise le switch isotypique des IgA.

Ces différentes observations peuvent s'expliquer par l'utilisation de différents fonds génétiques pour la création de ces souris déficientes [41,42].

II.4 Rôle d'APRIL dans les maladies auto-immunes

Il y a plusieurs évidences indiquant qu'APRIL à un rôle important dans le développement ou le maintien de plusieurs maladies auto-immunes comme notamment, le lupus érythémateux systémique (LES), la polyarthrite rhumatoïde (PR), le syndrome de Sjögren (SS), la néphropathie à IgA ou la SEP. Cette partie a fait l'objet d'une revue scientifique publiée dans Journal of Autoimmunity [43].



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

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

The role of APRIL - A proliferation inducing ligand - In autoimmune diseases and expectations from its targeting

Laurie Baert^a, Benoit Manfroi^a, Olivier Casez^b, Nathalie Sturm^{a,c}, Bertrand Huard^{a,*}

^a Institute for Advanced Biosciences, University Grenoble-Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, La Tronche, 38700, France

^b General Neurology Unit, Psychiatry and Neurology Department, University Hospital, Grenoble, 38043, France

^c Department of Pathology, University Hospital, Grenoble, 38043, France

ABSTRACT

Autoimmunity occurs when an adaptive immune response is directed against a self-antigen. As such, autoimmune reactions associated with the production of autoantibodies are common. These autoantibodies may either be pathogenic by inducing the initial damage to self, or exacerbate the reaction secondarily to the initial damage. In both cases, the pathway(s) leading to exposure of the immune system to the self-antigen inducing the production of autoantibodies is largely unknown. The latter is largely complicating the setting of putative prophylactic treatments. As a consequence, one possible way to control these diseases is to eliminate the cells producing antibodies. We will see that this approach is not yet part of any treatment in autoimmunity. Indeed, all the currently available non-specific immunosuppressive treatments do not target directly quiescent antibody-producing plasma cells. However, treatments aimed at depleting precursors of plasma cells, mature B-lymphocytes and/or antigen-experienced B cells not yet fully differentiated into plasma cells, are emerging. Such strategies were recently proven to be highly successful in several autoimmune disorders by two independent ways. The first way is by induction of B-cell cytotoxicity with an antibody directed against the surface antigen CD20. The second way is by antagonism of a key B-cell survival factor, the B-cell activation factor from the TNF superfamily (BAFF). In the present review, we will focus on the current knowledge regarding the role of a molecule related to BAFF, a proliferation-inducing ligand (APRIL), in autoimmune diseases, which acts on antibody-producing plasma cells. We will discuss expectations deriving from APRIL targeting in autoimmune diseases.

1. Introduction

Autoimmunity is defined by the occurrence of an adaptive immune response misdirected against a self-antigen. In late stages, this response may affect several self-antigens through a process known as epitope spreading. Unfortunately, autoimmunity frequently leads to a severe disease associated with failure of the targeted organ. Autoantibodies may be at the basis of the pathogenic process, causing the initial cell death that ultimately results in organ failure. In this case, molecular mimicry between the self-antigen and a non-self antigen present on an exogenous compound, most often of microbial origin, has been long postulated [1]. During the second Swiss autoimmune liver disease meeting held in Lugano, Switzerland, a quite distinct concept, dual reactivity, has been presented. The dual reactivity concerns also a combined reactivity against a self and a non-self antigen. However, in this case these two antigens may have a totally different structure. The reactivity against the self is acquired following somatic hyper-mutations occurring during the germinal center reaction, while the un-mutated common ancestor is not self-reactive. This process has been well demonstrated in pulmonary alveolar proteinosis with the generation of pathogenic autoantibodies directed against a differentiation factor for alveolar macrophages, the granulocyte/macrophage colony stimulating

factor [2]. This autoimmune reaction leads to depletion of lung macrophages and accumulation of toxic products. Pathogenic autoantibodies may not necessarily be the initial trigger of the disease, but instead arise secondarily following the initial damage. These antibodies are believed to exacerbate tissue inflammation and disease progression. The best evidence for such secondary autoantibodies are antibodies directed against cytoplasmic and/or nuclear autoantigens in autoimmune patients. Due to their cellular localization, it is clear that the immune system cannot be exposed to such antigens, unless a primary event, of autoimmune origin or not, leading to cell death, occurs. Autoimmune diseases in which a molecular mimicry or dual reactivity pathway was probed remain a minority. In most cases, the early steps in the production of autoantibodies are not known for both triggering and secondary antibodies. This renders complicated the design of a prophylactic intervention for these antibody-associated autoimmune reactions. A therapeutic setting after disease initiation is believed to be more likely. Obviously, targeting the cells producing autoantibodies may be of high value. There are two well-characterized antibody-producing cells, which correspond to late differentiation stages of B lymphocytes, the so-called plasmablasts (PB), produced in secondary lymphoid organs, and the fully differentiated plasma cells (PC), originating from a PB. In the steady state, PC home and establish in the bone

* Corresponding author.

E-mail address: Bertrand.huard@univ-grenoble-alpes.fr (B. Huard).

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.016>

Received 16 October 2018; Accepted 17 October 2018

0896-8411/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

marrow (BM). This can also occur in inflamed tissues, such as tissues undergoing an autoimmune reaction. In contrast to PB, PC can be extremely long-lived. This is the case in the BM. In tissues, they persist until the resolution of the inflammatory process. Here, we will review the literature relevant to the physiological function of a proliferation inducing ligand (APRIL) on antibody-producing cells. Next, we will discuss the current knowledge on the role of APRIL in autoimmune diseases. Finally, we will comment on what could be expected in these diseases from APRIL-targeting as compared to existing B-cell modulatory agents.

2. APRIL biology

Two laboratories simultaneously cloned APRIL [3,4]. The protein sequence revealed a homology of around 20% with several members of the tumor necrosis factor superfamily (TNFSF), of which APRIL became the 13th member (TNFSF13). The *APRIL* gene is located on chromosome 17 in humans [5]. As for almost all TNF members, *APRIL* is adjacent to another member of the superfamily, the TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK, TNFSF12). Such proximity and the same transcriptional direction between the two genes explain the generation of hybrid mRNA molecules containing the cytoplasmic/transmembrane and stalk domains of tweak and the receptor binding domain of APRIL by an intergenic splicing event [6]. Members of the TNFSF are recognized to play pleiotropic functions that may be as diverse as cell activation and cell death. At the time of cloning, the APRIL function was controversial, with one group reporting stimulation of cell proliferation, and the other induction of cell death. The identification of APRIL receptors did not reveal the presence of a canonical death-inducing domain in their cytoplasmic domain, explaining why induction of apoptosis was not confirmed later. Like all members of the TNFSF, APRIL is produced as a homo-trimer, and similarly to other secreted TNFSF members, APRIL contains in the membrane proximal part of its extracellular domain, a site for protease cleavage. For APRIL, it is a site recognized by furin proteases localized in the Golgi apparatus, explaining its usual absence from the plasma membrane of APRIL-producing cells [7]. Note that isoforms lacking the furin cleavage site have been identified [8]. Very soon after APRIL cloning, the B-cell activation factor from the TNF superfamily, BAFF (TNFSF13b), sharing a homology as high as 48% with APRIL, was reported. Such high homology is at the origin of the formation of BAFF/APRIL hetero-trimers [9]. Two APRIL receptors belonging to the TNF-receptor superfamily (TNFRSF), the B cell maturation antigen (BCMA, TNFRSF17) and the transmembrane activator and CAML-interactor (TACI, TNFRSF13b) were identified two years after APRIL cloning [10,11]. The homology between BAFF and APRIL also leads to the sharing of these two receptors, but BAFF has also its own specific receptor, BAFF-R [10,12]. Notably, the surface expression of all these receptors is regulated by protease shedding not always in a ligand dependent manner [13]. It was rapidly discovered that cells lacking expression of TACI/BCMA still bound APRIL, leading to the discovery of a third receptor, the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) [14,15]. In the TNFSF, this phenomenon is quite unique, since only one other member, the ectodysplasin A, also binds to HSPG [16]. APRIL, unlike other secreted members of the TNFSF, is unable to efficiently signal into target cells. It requires oligomerization, and HSPG, designed as co-receptor without signaling function, mediates APRIL oligomerization [17]. Considering this, APRIL is very similar to many growth factors that also require HSPG to signal [18]. Additionally, one of the APRIL receptors, TACI, also binds to HSPG [19,20]. Such a tri-molecular interaction exists also in the growth factor family for the fibroblast growth factor and its receptor [21]. Up to now, no interaction of BCMA with HSPG has been reported. Fig. 1 displays APRIL and its receptors at the surface of PC.

Myeloid cells produce APRIL. This is the case for macrophages/dendritic cells and blood monocytes [22–24]. Polymorphonuclear (PMN) cells also produce APRIL, at least neutrophils and eosinophils

[23,25,26]. The fact that a wide range of myeloid cells produces APRIL may indicate that APRIL production is turned on very early in the differentiation process of this lineage. This is at least true for PMN, since APRIL production in BM peaks in precursors cells [24]. APRIL is also produced by megakaryocytes [27]. Megakaryocytes originate from a myeloid precursor, arguing for the early production of APRIL in a myeloid precursor. APRIL production in myeloid cells has a constitutive component. However, some but not all ligands of toll-like receptors (TLR) may enhance its production [22,28]. Beside myeloid cells, APRIL is produced in epithelial cells also with a positive regulation by TLR ligands [25,29].

3. APRIL physiological functions

Three murine lines deficient in APRIL were independently generated. At first glance, there was no immune impact for APRIL deficiency [30]. More extensive analyses with the second line revealed a mild phenotype affecting the production of only one immunoglobulin isotype, the IgA [31]. Steady state IgA reduction was later confirmed in the first line. Finally, the third line was specifically assessed for the T-cell response in mouse models of arthritis and lung allergy [32,33]. Both studies reported a modulation of the T-cell polarization profile. Table 1 summarizes all the physiological functions identified for APRIL and discussed below.

As first evidenced by the second APRIL-deficient mouse line, APRIL is involved in the production of IgA. More specifically, APRIL induces a switch towards IgA in humoral responses independent of T cells. This has been demonstrated by three independent groups [29,34,35]. Genetically deficient mice allowed the demonstration of a role for the receptor TACI in the development of T-independent responses [36]. This TACI role was further pinpointed at the level of the IgA switch in these T-independent responses [37].

Beside the switch process, a second key role of APRIL has rapidly emerged at the level of PC survival. Several groups have independently demonstrated this role in BM [23,24,38,39]. This role has been recently confirmed in long-term cell-free *in vitro* PC survival [40]. BM PCs are responsive to APRIL signaling, since they all express BCMA, and a fraction expresses TACI [19]. This highlights a key function of BCMA in BM PC survival, which has been demonstrated experimentally in *BCMA*-deficient mice [41]. No PC survival function in BM was probed for TACI in *TACI*-deficient mice [42]. In addition, all PCs express one unique HSPG, CD138, also called syndecan-1 [43,44]. CD138 is also clearly important for PC to respond to APRIL [45]. The constitutive production of APRIL by myeloid cells in BM discussed above explains why PC have the ability to survive for decades in this organ. Some observations made during the investigations of the APRIL function in BM are puzzling, and may challenge the current dogma on BM-derived long-term protective immunity. First, APRIL has no impact on BM PC survival shortly after an antigen challenge. Indeed, reduction of antigen-specific BM PC upon APRIL antagonism was successfully reported only after 6–12 weeks following the antigen challenge [24,38]. At that time the scientific community hypothesized that PB generated in the periphery because of antigen persistence and not dependent on APRIL are still feeding the pool of BM PC. A short term survival effect (few days) in BM is only seen when PBs are transferred in antigen naive animals [39]. The most surprising observation is that APRIL deficiency has never been reported to impact the total number of BM PC in the steady state, in the absence of induced immunization, and this despite extensive investigations. The number of BM PC is constant and limited in the steady state. This may mean that PB from the periphery constantly feed and replace the pool of BM PC. Hence, new PB incomers may displace BM resident PC. According to this, BM PC may not be the only cellular source of antibodies maintaining a long-term seropositivity. This observation warrants further investigations. The role of APRIL on cell survival has also been probed for mucosal PC. Extended PC survival in the presence of APRIL has been well

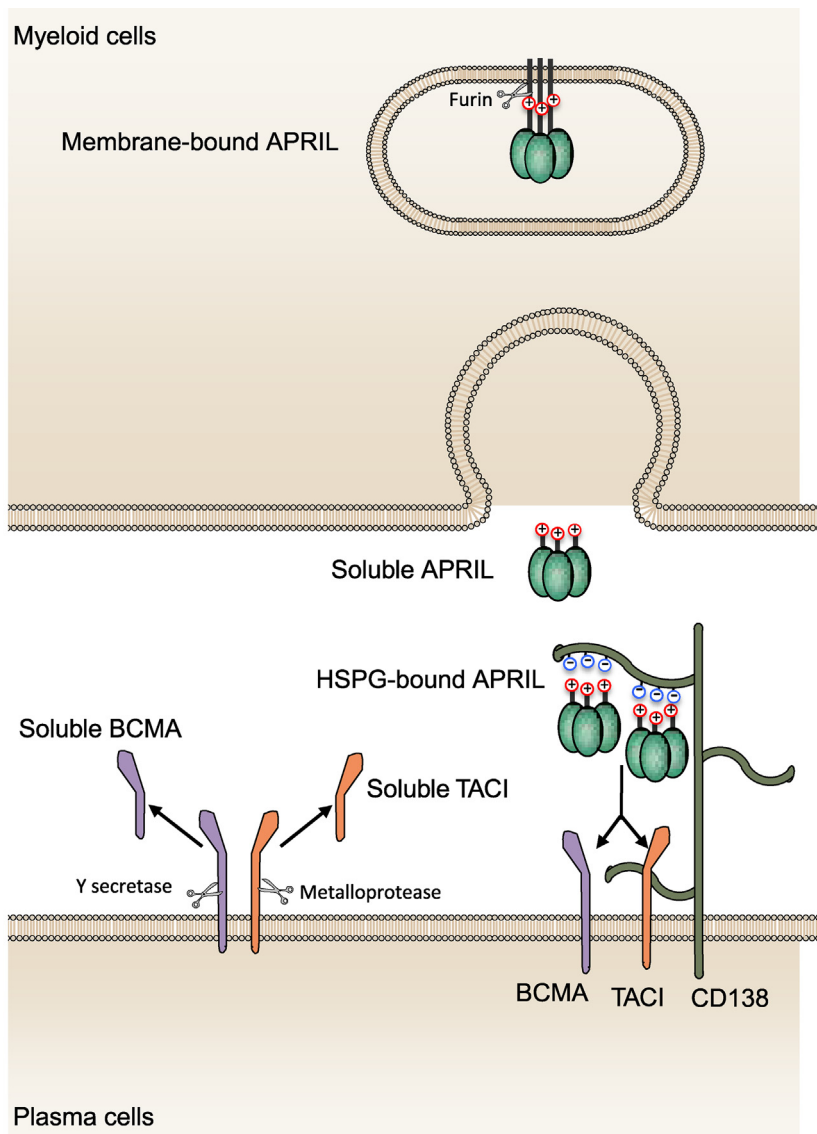


Fig. 1. APRIL and its (co)receptors. APRIL is first produced in myeloid cells as a transmembrane homo-trimer. In the Golgi apparatus, furin-like proteases process APRIL to release a soluble product containing a positively charged tail. This tail interacts with negatively charged sulfate residues distributed all along the heparan sulfate side chains of proteoglycans (HSPG). HSPG (CD138 for plasma cells) serve as APRIL concentrator at the surface of target cells to mediate an efficient signaling via TACI and/or BCMA. Note that one of the two APRIL-signaling receptors, TACI, also binds to HSPG. A shedding process implicating the indicated proteases regulates surface expression of APRIL-signaling receptors. This process is not necessarily APRIL-dependent.

Table 1
APRIL physiological functions.

	Receptor	<i>In vitro</i> demonstration	<i>In vivo</i> demonstration
Proinflammatory			
PC survival	BCMA	Survival of purified tonsil PC (see Ref. [25]).	Transfer of primed spleen B cells in <i>APRIL</i> -deficient mice (see Ref. [39])
T-independent IgA switch	TACI	IgA production by purified B cells stimulated by anti-BCR/IL-4 (see Ref. [29])	Mucosal IgA + PC in <i>CD40</i> -deficient patients (see Ref. [29])
B2 cell-costimulation	TACI?	Proliferation of purified B cells stimulated by anti-BCR/IL-21 (see Ref. [46])	None
T-dependent switch	TACI	IgG1 and IgE production by purified B cells stimulated by anti-CD40/IL-4/IL-21 (see Ref. [47])	None
PB output from GC	TACI	Differentiation of B cells into PB upon TACI transduction (see Ref. [51])	Spleen at the GC/T interface of immunized mice upon anti- <i>APRIL</i> treatment (see Ref. [52])
T-cell costimulation	TACI	Proliferation of purified T cells stimulated by anti-CD3 (see Ref. [57])	Bcl2 expression in T cells from <i>APRIL</i> -transgenic mice (see Ref. [58])
Anti-inflammatory			
Breg. immunosuppressive function	TACI	IL-10 production by B cells from total PBMC (see Ref. [54])	None
Treg. immunosuppressive function	TACI	Treg. suppressive function on Tconv. stimulated by anti-CD3 (see Ref. [55])	None

PC: plasma cell.
PB: plasmablast.
Reg.: regulatory.
Con.: conventional
PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

demonstrated in the gut for IgA PC but also for gut total immunoglobulin production induced by an oral challenge [25,31].

APRIL is unlikely to act on mature naïve B cells, since this cellular pool is unaffected in APRIL-deficient mice. This is in sharp contrast with the related molecule BAFF, whose deletion severely reduces the number of mature B cells, owing to BAFF-R expression at that stage [12]. Besides IgA switch and PC survival, some reports argue in favor of an APRIL role early in the germinal center (GC) reaction. Indeed, recombinant APRIL sustains the proliferation of human activated conventional B2 cells [46]. Recombinant APRIL also boosts a T-cell dependent switch [47]. There is no report for a role of the receptor BCMA in GC regarding these functions, and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) did not detect BCMA expression in GC [38]. By contrast, the second receptor TACI is clearly involved in the GC reaction. Indeed, one striking phenotype of TACI-deficient mice is GC enlargement due to an increased number of GC B cells [48]. In fact, TACI mediates GC B cell apoptosis, which may even lead to B-cell lymphoma development and/or autoimmunity in its absence [42]. Patients with common variable immunodeficiency associated to a functional inactivation in TACI also present enlarged GC, confirming the GC role of TACI in humans [49]. The TACI ligand mediating this effect is not known, since no such phenotype was reproduced in BAFF and/or APRIL deficient mice [30,50]. One cannot exclude that TACI has a ligand-independent function. Notably, transduction of TACI in B cells by itself without any ligand stimulation is able to drive PB differentiation [51]. In fact, a role for APRIL in GC remains elusive, since to the best of our knowledge, APRIL expression in GC has never been reported even when investigated by sensitive RT-PCR [52]. Only an extra-GC production of APRIL in secondary lymphoid organs by medullary cord macrophages has been reported [53]. Despite this extra-GC production, memory B cells from secondary lymphoid organs appear to be independent of APRIL [38]. Recently, APRIL production by stromal cells at the GC/T cell interface was also reported, and APRIL antagonism resulted in a moderate reduction in the output of TACI⁺CD138⁺ PB from GC [52].

Quite distinct but still related to the B-cell lineage, a role for APRIL in the generation of regulatory B cells producing the T-cell immunosuppressive IL-10 has been reported [54,55]. This function is shared by BAFF with an involvement of TACI [56].

The third mouse line deficient in APRIL suggested a role for APRIL on T cells. A costimulation effect was reported with recombinant APRIL or use of purified T cells from APRIL transgenic mice [57,58]. BCMA expression in T cells has been excluded by many groups including ourselves, and the reported expression of TACI in T cells is highly controversial [59]. We did not find ourselves TACI expression by sensitive RT-PCR in T cells no matter their state of activation (unpublished observations). Very recently, a role for the APRIL/TACI axis on T cells has reemerged in a pathological situation, multiple myeloma, with the support of regulatory T cell survival and suppressive function [55]. Hence, the role of APRIL on T cells is still open to debate. By contrast, a role for BAFF in T-cell costimulation is clearly established [59,60].

4. APRIL pathological function in autoimmunity

4.1. Preclinical evidences

The first evidences were indirect with the use of a soluble form of TACI, the receptor shared by APRIL and BAFF, able to antagonize them both [61]. Afterwards, the involvement of each ligand was assessed with specific antagonism and/or use of mouse lines genetically deficient for these ligands. In this section, we will describe the effects on diseases first obtained with soluble TACI. We will then discuss whether a specific role has been attributed to BAFF in these models. Finally, we will present data specifically reporting a role of APRIL. Table 2 is summarizing the pathogenic role of APRIL identified during these preclinical studies.

4.1.1. Systemic lupus erythematosus

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease strongly associated to the production of autoantibodies, mostly directed against nuclear antigens. Immediately after its cloning, the effect of soluble TACI injection was assessed in SLE models. In 2000, soluble TACI consisting of the extracellular domain of the receptor fused with an Fc part of an immunoglobulin (TACI-Fc) was tested in the NZBWF1 lupus model starting before disease onset. Treatment revealed a reduced kidney dysfunction with less proteinuria and an overall longer mouse survival [62]. A second group using an adenovirus coding for TACI-Fc reported in the same model also before disease onset a delay in proteinuria associated to a reduction in IgM anti-double stranded DNA [63]. Recently, TACI-Fc and BAFFR-Fc (BAFF-only blockade) were compared in this model after disease onset [64]. In this setting, TACI-Fc but not BAFFR-Fc normalized proteinuria. The favorable effect of TACI-Fc on the disease compared to BAFFR-Fc treatment was associated to a reduction of IgG anti-double stranded DNA and less IgG deposit in the kidney. APRIL-specific treatment with an antagonistic antibody was also tested in this model before disease onset [65]. This treatment delayed proteinuria and prolonged survival. This reduction in disease severity was associated to a reduction in IgM anti-double stranded DNA and less IgM deposit in kidneys. A specific role of APRIL was also confirmed by the use of APRIL-deficient mice in a second lupus model, the Nba2.yaa model [66]. In this model, the APRIL/TACI axis revealed to be key, since the production of auto-reactive B cells was severely reduced in their absence. Taken together, this set of data would indicate that APRIL, but not BAFF, is implicated in preclinical lupus. However, this is not the case. First, lupus-like autoimmune serology and kidney immunoglobulin deposit were observed in BAFF-overexpressing transgenic animals [67,68]. Second, the role of both molecules is model-dependent. Indeed, BAFFR-Fc had a similar effect as TACI-Fc in the NZM model [69]. A study showing that APRIL-deficiency, at variance to BAFF-deficiency, did not modulate the disease in this NZM model, confirmed the model dependency [70,71]. In summary, it may be concluded that there is a contribution of APRIL in the production of pathogenic autoantibodies in animal models of lupus. BAFF is also involved in preclinical lupus. At this stage, we would like to mention that the exacerbated disease has been observed in BCMA-deficient animals [72]. This phenotype is very similar to the one reported in TACI-deficient animals, and it might have to do with a decoy function of these two receptors after shedding from the PC surface [13].

4.1.2. Rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disorders affecting joints. In this disease, one autoantibody is the so-called rheumatoid factor, corresponding to antibodies recognizing the Fc portion of IgG. Others autoantibodies recognize a common post-transductional modification in citrullinated proteins. Almost simultaneously to lupus, the effect of soluble TACI was assessed in a model of RA, the collagen induced arthritis (CIA) model. Two studies with TACI-Fc injection administered before and after disease onset revealed the same marked inhibition of disease development [73,74]. In one study, the effect on the disease was associated to a reduction in total anti-collagen antibody production. A similar reduction in disease development was observed with adjuvant-induced arthritis in the rat system [75,76]. BAFFR-Fc was not tested in CIA, but treatment with a BAFF-specific peptibody showed disease severity inhibition [77]. This peptibody consists in a 12-mer BAFF-binding peptide isolated from a phage display library selected on recombinant BAFF and fused to a human IgG1 Fc part. In this study, the authors reported that the peptibody is also active in the NZBWF1 lupus model. Regarding APRIL, a reduction of CIA disease incidence was reported in APRIL-deficient mice, revealing an APRIL pathogenic effect [32]. This effect was associated to a modulation in the polarization of the T-cell response raised against the collagen antigen, with a skewing towards Th1 and Th17 cells. There were no data regarding PC in this report. Transgenic mice overexpressing APRIL were

Table 2
APRIL pathological functions (preclinical).

	Receptor	<i>In vivo</i> demonstration
Pathogenic		
Autoantibodies in lupus	TACI	Anti-APRIL treatment (see Ref. [65]) Use of APRIL-deficient mice (see Ref. [66]) Superior effect of TACI-Fc over BAFFR-Fc (see Ref. [64])
Anti-IgA in IgAN	?	Anti-APRIL treatment (see Ref. [82])
Mature blood B cells in EAE	?	Anti-APRIL treatment (see Ref. [85])
IL-17 in CIA	?	Use of APRIL-deficient mice (see Ref. [32])
Protective		
Autoantibodies in CIA	TACI?	Use of APRIL-transgenic mice (see Ref. [78])
T-cell immunosuppression in EAE	CSPG/other	Use of APRIL-deficient mice (submitted for publication)

CSPG: chondroitin sulfate proteoglycan.

also assessed in CIA [78]. Surprisingly the disease was also dampened in terms of incidence and severity with a lowered antibody response to collagen, indicating a protective effect for APRIL in this model. This result should be taken with caution, however, since APRIL was expressed ectopically in T cells in the transgenic animals. This may mean that provision of exogenous APRIL such as injection of recombinant APRIL may have a protective activity. The same group reported later for the first time a positive effect of APRIL in the generation of regulatory B cells producing IL-10 [54]. Taken together these observations indicate that, although there is undoubtedly a pathogenic role for the combination APRIL/BAFF and BAFF alone, there is no straightforward conclusion on the role of APRIL by itself in CIA. This might be due to the fact that either CIA is predominantly dependent on T cells, or that in CIA APRIL has a protective role by positively modulating regulatory B cells. Also, the predominant BAFF pathogenic effect may involve a function different from the regulation of antibody production such as its costimulatory effect reported on T cells [79].

4.1.3. IgA nephropathy

This disease is associated with the overproduction of aberrantly glycosylated (galactose-deficient) IgA, secondarily inducing autoantibody production directed against galactose-deficient immunoglobulins [80]. Soluble TACI has not been tested in this model. For BAFF, upregulated expression driven by ectopic transgenesis in mouse liver by itself is able to induce kidney IgA deposit and circulating, aberrantly glycosylated, IgA in addition to lupus features [81]. This result means that BAFF when upregulated, at least in liver cells, may be associated to IgAN disease features. However, it remains to be demonstrated whether such features also occur when BAFF is upregulated in an orthotopic fashion. An anti-APRIL antagonist was tested in the classical IgAN model spontaneously occurring in the type BB grouped ddy mouse strain [82]. Anti-APRIL treatment led to a reduction in both total serum IgA and glomerular kidney deposition. In summary, APRIL appears to have a role in the mouse model of IgAN. BAFF may also be involved.

4.1.4. Multiple sclerosis and optic neuritis

Multiple sclerosis (MS) and optic neuritis (ON) are two autoimmune neurodegenerative diseases, wherein autoantibodies against central and peripheral nervous antigens, such as the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) and the aquaporin 4, are frequently identified. A soluble form of the second shared receptor between APRIL and BAFF, BCMA (BCMA-Fc) was used in the mouse model of MS, experimental autoimmune encephalitis (EAE) [83]. Reduction in mouse paralysis was reported whenever treatment start was (before and after disease onset). TACI-Fc was used in rat EAE also in a pre-disease setting [84]. At variance, TACI-Fc did not modulate rat paralysis. However, increased inflammation, demyelination and neuronal cell death in the optic nerves were observed. This latter is more reminiscent of ON. EAE in non-human primates (marmoset) was also tested with anti-APRIL and anti-BAFF antagonist antibodies [85]. Each reagent lowered monkey paralysis. In this study, the anti-BAFF expectedly decreased the pool of

mature CD20⁺ B cells in blood and secondary lymphoid organs. Notably, this was also observed at a similar extent in the blood with the anti-APRIL. The anti-APRIL did not impact mature B cells in secondary lymphoid organs. A similar effect for an anti-APRIL on mature B cells has not been found in rodents, indicating that a different mature B-cell regulation may exist in rodents and primates. One should note that all these models were induced by animal immunization with the full length MOG as a self antigen. In this situation, the induced EAE is dependent on the antigen-presenting function of B cells to pathogenic T cells, so that the protective effect reported are largely expected. We induced EAE in APRIL-deficient mice (second line) with the CD4⁺ T-cell dominant peptide of MOG. In this case, the induced EAE is independent of B cells. Quite surprisingly, we observed that paralysis was exacerbated in the absence of APRIL (Baert et Al., submitted). Along the line, J. Gommermann in Toronto reported that BAFF-Tg mice are fully resistant to EAE induced either by the MOG protein or peptide [86]. This effect is likely due to the BAFF/BAFFR axis, since BAFFR deficiency resulted in exacerbated mouse EAE induced with the MOG peptide [87]. EAE severity may be reduced by targeting BAFF and/or APRIL. However, this should be taken with high cautious, since several models also indicated that both molecule may have a protective effect.

4.2. Clinical evidences

In this section, we will first present the human autoimmune diseases with a demonstrated upregulation of APRIL expression. We will then describe the results obtained from the different clinical trials testing antagonism of combined APRIL/BAFF and BAFF on its own in these diseases.

4.2.1. Systemic lupus erythematosus

A single nucleotide polymorphism present in the first exon of APRIL has been first defined as conferring susceptibility to SLE in a Japanese cohort [88]. This was later confirmed in other ethnicities [89]. In the circulation, APRIL concentration correlates with disease severity [90,91]. However, quite contrary results also exist with two reports indicating an inverse correlation between high circulating APRIL and disease severity [92,93]. Two cellular sources of APRIL were defined in SLE, the first being the kidney itself with the abnormal presence of infiltrating macrophages and the second being circulating B cells [94,95]. APRIL kidney expression was further correlated with resistance to treatment [96]. APRIL aberrant production by B cells has been reproduced with healthy cells exposed to a chronic stimulation by TLR ligands [97]. This latter may represent an autocrine pathway in B cells leading to autoantibody production. High APRIL serum concentration was also reported in systemic sclerosis that may be considered an overlapping syndrome with SLE [98,99].

The soluble TACI-Fc compound was named ataccept in clinical trials. The phase I testing of ataccept in patients with a moderate disease was successful with a good tolerability and achievement of an expected biological response with the reduction of circulating mature B

cells/PB and all immunoglobulin isotypes, IgM, IgG and IgA [100,101]. No effect was observed at the level of the anti-double stranded DNA antibodies serum titers. This was explained by the moderate disease activity of the study cohort associated to low baseline levels of auto-antibodies. A phase II trial was conducted in patients with a moderate to severe disease. The trial was terminated early because of adverse events including infections. Similar adverse events were seen in a phase II/III trial testing atacicept in active lupus nephritis [102]. Reappraisal of the study led to the finding that the adverse events were not more frequent compared to other B-cell modulatory treatments and/or not directly due to atacicept [103]. *Post hoc* analyses of the phase II confirmed the biological response with the reduction of B cells/PB and in IgM/IgG/IgA serum levels [104]. Notably, the authors reported a reduction in anti-double stranded DNA antibodies serum titers. They further reported a clinical response with the reduction in the risk of flare for the highest atacicept dose tested. Consequently, a new phase II was launched [105]. This trial confirmed the absence of an increased risk of serious adverse events whether or not related to infections. A biological response was achieved with reduction in total IgM/IgG/IgA, as well as anti-double stranded DNA antibodies serum titers. Reduction of flare frequency was reproduced. Notably, the trial showed for the first time a reduction in the disease activity at the highest dose tested. This latter clinical response was best seen in serologically positive and high disease activity patients. No phase III has been announced yet. We are also unaware of any trial testing atacicept in systemic sclerosis. Collectively, these trials showed that atacicept treatment is safe, decreases total immunoglobulin levels including that of autoantibodies, and reduces SLE activity.

Three BAFF-only antagonists, two monoclonal antibodies (belimumab and tabalumab) and one peptibody (blisibimod) have been tested in SLE, and showed efficacy. Both the food and drug administration and the European medicines agency approved belimumab in 2011 as an add-on therapy for the treatment of active SLE positive for anti-double stranded DNA and/or anti-nuclear antibodies [106]. It does not include patients with active SLE in the kidney and central nervous system. An initial phase I trial with belimumab reported in 2008 showed a reduction of circulating B cells/PB [107]. There was no significant reduction in total immunoglobulins and anti-double-stranded DNA antibodies serum titers in the whole study cohort. However, anti-double stranded DNA antibodies titers were significantly reduced in the subset of patients with high baseline levels. The phase II trial first did not reach primary endpoints defined as a reduction of time to flare and disease activity [108]. However, efficacy on the disease activity was found in the subset of patients with a serologically active disease. This clinical response was associated to a decline in B cells/PB and antibodies against double-stranded DNA. Two phase III trials in serologically active patients showed improved response rate and disease activity reduction in the presence of belimumab [109,110]. In these two studies, belimumab did not increase the adverse event rate compared to placebo.

4.2.2. Rheumatoid arthritis

Seropositive patients with RA have a high serum concentration of APRIL [111]. In RA patients, circulating monocytes aberrantly express APRIL on their surface, likely originating from the furin-uncleavable isoforms of APRIL [112]. The level of surface APRIL on these cells correlates with APRIL serum concentration, and disease activity. Circulating APRIL/BAFF hetero-trimers were first detected in this disease, followed by SLE [113,114]. APRIL concentration is also upregulated locally, in the synovial fluid [111,115]. This is likely due to the local APRIL production mediated by myeloid cells (macrophages, neutrophils and dendritic cells) and synovial fibroblasts [116–118].

Two phase II trials tested atacicept in methotrexate- and TNF antagonist-resistant patients [119,120]. Biological responses included non-specific reduction in total mature B cells/PB and total immunoglobulins IgM/IgG/IgA. Rheumatoid factor but not anti-

citruinated antibody titers were also decreased. Despite the biological responses, these two trials did not ameliorate the response to treatment based on the level of circulating C-reactive protein. The anti-BAFF, belimumab, was also tested in RA as a phase II trial, and a clinical response was demonstrated [121]. An even better improvement in the response to treatment was observed in serologically active (rheumatoid factor and anti-citruinated protein antibody positive) patients. While both compounds showed similar efficacy in SLE, the results are quite different in RA patients treated with atacicept, the drug not modulating disease activity at variance with belimumab. This difference remains unexplained.

4.2.3. Sjögren's syndrome

Sjögren's syndrome (SS) is another rheumatic disease affecting salivary glands often occurring with RA. The rheumatoid factor is also present in this disease. Other autoantibodies are directed against RNA-interacting proteins. At variance with RA, no APRIL upregulation could be observed in salivary glands from SS patients, even in salivary glands harboring ectopic GC [122]. Another study even reported a local downregulation of APRIL [123]. By contrast, the authors and an independent group reported an upregulation in APRIL serum concentration [124]. This shows that serum data may not reflect the tissue situation. It is also showing that autoimmune reactions occurring in two related diseases may differ in their fine molecular regulation. This difference may also explain why BAFF-only antagonism with belimumab has been tried in SS [125]. We are not aware of any trials with atacicept in this disease.

4.2.4. IgA nephropathy

An APRIL polymorphism, different from the one identified in SLE, has also been defined as a susceptibility gene in IgAN in the Chinese population [126]. High APRIL concentration in the serum of IgAN patients correlates with disease severity [127]. This study further showed that treatment of peripheral blood mononuclear cells from patients with APRIL led to the production of galactose-deficient IgAN *in vitro*. In these patients, circulating B cells harbor an upregulation of APRIL mRNA. Another study also reported aberrant expression of APRIL in B cells *in situ*, in GC from tonsils [128]. Non furin-cleavable forms of APRIL were also detected in these IgAN tonsillar GC B cells, and chronic stimulation of B cells from healthy donors with a TLR9 ligand reproduced aberrant APRIL expression in B cells. Considering that TLR9 stimulation has been frequently associated with IgAN progression, an autocrine APRIL-dependent B-cell activation pathway may be involved in IgAN pathogenesis. Based on the phase I trials already completed in other autoimmune diseases and discussed previously, a phase II trial (NCT02808429) testing atacicept was launched. We are not aware of an ongoing BAFF-specific trial in this disease.

4.2.5. Multiple sclerosis and optic neuritis

In the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients, APRIL is either slightly upregulated or unmodulated compared to control CSF from patients suffering from non-inflammatory neurodegenerative disorders [129,130]. In ON, APRIL concentration in CSF is increased [130]. We did not find upregulation of APRIL concentration in either the serum or CSF of MS and ON patients (unpublished results). In the MS parenchyma, Tangarajh et al. reported that reactive astrocytes produced APRIL [131]. The authors used an anti-human APRIL antibody, Aprily-8, we made, and misinterpreted its reactivity. It is in fact a subset of monocytes/macrophages that secretes APRIL in MS lesions, and reactive astrocytes in lesions bind paracrine APRIL (Baert et Al., submitted for publication). We did not observe in human MS lesions evidence for a neuronal expression of APRIL reported in the mouse system [132].

Neurodegenerative diseases constitute a paradigm regarding treatment with B-cell modulating reagents targeting BAFF/APRIL. Indeed, atacicept exacerbated the disease in the phase II trials atacicept in MS

Table 3
APRIL-only reagents for clinical usage.

	Epitope	Patent	Clinical trial
Anti-APRIL (see ref. [145])	TACI/BCMA binding site	WO 2010/100056 A2	Multiple myeloma
Anti-APRIL (see ref. [85])	None disclosed	WO 2016/110587 A1	NCT03340883
Anti-APRIL (no ref.)	TACI/BCMA binding site	WO 2002/094192 A2	None
CAR APRIL (see ref. [146])	HSPG binding site	WO 2011/047121 A1	None
	APRIL w/o HSPG binding site/CD28TM-cyt/OX40cyt/CD3cyt	WO 2013154760 A1	Multiple myeloma
	APRIL w/o HSPG binding site/CD8 stalk-CD28TM-cyt/OX40cyt/CD3cyt		NCT03287804
	APRIL w/o HSPG binding site/CD8 stalk-CD28TM-cyt/OX40cyt/CD3cyt		

CAR: chimeric antigen receptor.

TM: transmembrane.

Cyt: cytoplasmic.

(ATAMS) and ON (ATON) [133,134]. Disease exacerbation was evidenced by an increase in the relapse rate and the conversion to clinically definitive MS in MS and ON, respectively. Note that in ATON, atacicept treatment was associated to a weaker loss of the retinal nerve fiber layer thickness in the affected eye. Nevertheless, these led to early trial halts. In both trials, the obtained biological responses were expected with a drop in peripheral B cell counts combined to decrease serum concentrations in total IgM, IgA and IgG. The existence of a pool of Breg dependent on BAFF and/or APRIL was rapidly put forward to explain these unexpected clinical responses [135]. However, this would mean that disease exacerbation should have been seen in other diseases. Hence, it has to be specific of autoimmune neurodegenerative diseases. We have had access to MS autopsies of treated patients and biopsies at diagnosis. In both cases, we observed that APRIL has a non B-cell cellular target in the central nervous system (CNS), the reactive astrocyte (Baert et Al., submitted). In the latter cell, APRIL triggers an anti-inflammatory response, explaining, at least in part, clinical trial failures. For BAFF, the clinical trial NCT00882999 testing an anti-BAFF in relapse remitting multiple sclerosis was launched in 2009 and completed in 2012. There is currently no report on this trial. According to now existing preclinical data, none of these two molecules should be targeted in autoimmune neurodegenerative diseases.

4.2.6. Other diseases

Are there other autoimmune diseases that may be dependent on APRIL? None has been identified in animal models. Alopecia areata, myasthenia gravis, and bullous pemphigoid are three additional autoimmune diseases associated with autoantibodies and showing increased APRIL serum concentration [136–138]. These diseases may be dependent on APRIL, but evidences are still scarce. We believe that stronger evidences exist for diseases harboring a dense PC infiltrate in the inflamed organ as a hallmark. IgG4-related disease (IgG4-RD) is such an example. Recently, Kawakami et al., observed that APRIL-producing macrophages were abundant in IgG4-RD kidney and salivary gland lesions [139]. *In situ* binding of secreted APRIL onto infiltrating IgG4⁺ PC could be identified. Furthermore, the PC reduction after successful glucocorticoid treatment correlated with the reduction of APRIL-producing macrophages. One should note that the serum level of APRIL inversely correlated with circulating IgG4 in this disease [140]. Obviously, data stem from two different cohorts, but this indicates that serum data might sometimes be misleading compared to analyses in the affected organ(s). The Kawakami *in situ* report warrants further preclinical studies in a relevant animal model.

We would like next to discuss liver autoimmunity, the subject of the meeting held in Lugano. There are two autoimmune disorders affecting the liver, which are characterized by autoantibodies and PC infiltration, namely primary biliary cholangitis (PBC) and autoimmune hepatitis (AIH). Serum level of APRIL has been studied in PBC, and no change has been reported [141]. There are currently no published data on APRIL in AIH. We have recently started a study on *in situ* APRIL expression in AIH. Our preliminary results are comparable to those

reported in IgG4-RD with an abundant production of APRIL in lesions, and a correlation pre- and post-treatment between APRIL expression and the density of liver PC infiltration. These observations make autoimmune liver diseases, especially AIH, disorders to investigate for a possible pathogenic involvement of APRIL.

5. Expectations from APRIL targeting

B-cell modulatory agents have recently shown a striking success in several autoimmune diseases. The entire story started with the introduction of an anti-CD20 antibody called rituximab, a biological agent with B-cell cytotoxic activity. As discussed here, it was followed by an antagonist to BAFF, belimumab, able to block a key mature B-cell survival factor. Another B-cell specific compound showing efficacy in autoimmunity is atacicept, combining the blockade of BAFF and the related APRIL. Recently another version of TACI-Fc, RCT-18, was engineered with a higher molecular weight than atacicept, and tested in phase 1 trials for rheumatoid arthritis and lupus [142–144]. Effects reported on circulating B-cell count and Ig were similar to atacicept. APRIL-only antagonism has not yet been tested in humans. This should come soon, since antagonist monoclonal antibodies directed against human APRIL with an avidity below the nanomolar range have been validated preclinically [85,145]. There is also an APRIL-based chimeric antigen receptor that has been generated to deplete TACI/BCMA positive PC [146]. A detailed description of these agents is shown in Table 3. For the moment, some of these agents are tested in multiple myeloma, but there is presently no known chief barrier for their use in autoimmune diseases as well. Finally, multiple reagents including antibodies and chimeric antigen receptors have been created to target BCMA. These reagents are also currently tested in multiple myeloma. All these reagents have been reviewed recently by others [147]. The question we have to ask is whether APRIL antagonism is worth testing in autoimmunity and what improvement could we expect from it. There is no doubt that APRIL acts on PC, and there are no convincing data demonstrating a role for APRIL in the early phases of humoral response as discussed previously. This is not the case for the anti-CD20 and the anti-BAFF. In view of the invasiveness for the required procedure, clinical trials could not assess depletion of BM PC during BAFF and CD20 targeted trials. However, expression pattern of the respective receptors provides key informations. CD20 expression is high on mature naive B cells, and is gradually lost upon B-cell differentiation. At the PC stage, CD20 is fully turned off. Mouse experiments confirmed the absence of depletion of BM PC upon CD20 targeting [148]. Regarding PB, some authors reported loss of CD20 expression at that differentiation stage, at least in the blood [149]. This might explain the persistence of circulating PB after rituximab treatment in patients [150]. One question mark remains regarding the susceptibility of PB at their site of production in secondary lymphoid organs. Mouse experiments showed that PB in secondary lymphoid organs, at least in the spleen, are susceptible to the anti-CD20 [148]. BAFFR harbors a very similar expression pattern to CD20, with also a complete expression loss at the PC

differentiation stage. As discussed previously, all PC express BCMA. However, BCMA on PC is unresponsive to BAFF stimulation [151]. A subset of PC expresses TACI, and TACI does respond to recombinant BAFF but only to an oligomerized form, mimicking BAFF 60-mer [151]. This highly oligomerized form of BAFF represents only a minor fraction of native BAFF, at least when measured in the circulation. These findings indicate that PC should be largely BAFF independent. The unaltered survival of transferred PC in the BM of BAFF-deficient hosts, while reduced in APRIL-deficient hosts, is a relevant *in vivo* confirmation to this possibility. This absence of BAFF dependency may be present in humans, since belimumab is unable to alter protective immunity conferred by long-lived BM PC generated after vaccination [152]. Regarding PB, belimumab depletes IgM- but not IgG-producing cells [153]. This indicates that BAFF-R expression loss may be induced after the isotype switch process. For the APRIL receptors, in addition to BCMA that is expressed ubiquitously, PC also ubiquitously gain the expression of the co-receptor HSPG, CD138. PC responsiveness to APRIL as inferred by an extended survival was demonstrated *in vivo* as discussed above. In addition, soluble TACI, but not soluble BAFFR, depletes BM PC in mouse [64]. However, that specific role of soluble TACI has still not yet been demonstrated in humans, since atacicept, similar to belimumab, does not significantly modulate vaccine-induced protective immunity in treated patients [100]. In conclusion, there is currently no available B-cell modulating agent with a demonstrated activity on long-lived BM PC in human, leaving a key window of opportunity for the investigation of APRIL antagonism.

The anti-BAFF, belimumab, is approved for SLE treatment, and the anti-CD20, rituximab, is currently used off-label in resistant cases [154]. Both reagents showed also efficacy in RA. A humanized form of an anti-CD20, ocrelizumab, was approved by the FDA and EMA in MS [155]. There is yet no similar data regarding an anti-BAFF in MS. It will most likely not come out for the reasons discussed above. These two agents and related compounds are currently tested in a wide range of other autoimmune diseases, exceeding the scope of the present review. We will only discuss ongoing investigations in liver autoimmunity. Rituximab has been tested in PBC. Two independent studies including 6 and 14 patients reported a decreased level of anti-mitochondrial antibodies and a significant reduction of serum alkaline phosphatase level [156,157]. A subsequent phase II study with 57 patients showed the same biochemical response but no significant improvement on fatigue [158]. Rituximab has also been tested in treatment-resistant AIH. A first although small study with 6 patients showed a promising biochemical response with lowering of circulating aspartate aminotransferase level [159]. Notably, a second study reported complete remission by the association to low dose standard immunosuppressive treatment [160]. This is at the basis for the increasing use of rituximab as a rescue therapy in AIH [161]. A clinical trial (NCT03217422) testing in AIH a cytotoxic antibody, ianalumab, directed against the BAFF-R has been launched. This latter approach is expected to give a biological response similar to that of BAFF ligand antagonism. The main drawback of these B-cell targeted therapies is that they may be still viewed as non-specific immunosuppressive treatments due to the profound depletion in the entire mature B-cell pool. Nevertheless, they are active and we should draw conclusions from their efficacy. Indeed, since both (anti-CD20 and anti-BAFF antibodies) do not affect PC, it implies that pathogenesis in these diseases, at least in part, does not originate from antibodies produced by already established long-lived PC. Obviously, this is correct if one assumes that autoantibodies are pathogenic in these diseases. However, it cannot yet be excluded that the anti-BAFF and anti-CD20 are effective because they suppress functions other than antibody production such as antigen-presentation/cytokine production (anti-CD20 and anti-BAFF) and T-cell co-stimulation (anti-BAFF). What effect will have APRIL antagonism targeting PC in the diseases responding to the anti-BAFF and anti-CD20 therapies? Would it improve the outcome? As of today, demonstrated efficacy for APRIL antagonism remains at the preclinical stage in two autoimmune models, SLE and IgAN. In addition,

we should also be asking ourselves whether autoimmune diseases involving antibodies produced by long-lived PC do exist. If they do, they should be largely responsive to APRIL antagonism.

Author contributions

LB, BM, OC and NS revised the manuscript. BH wrote the manuscript.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

NS is supported by a grant from the French Society of Hepatology (AFEF). BH is supported by the University Grenoble Alpes, the "Institut national pour la santé et la recherche médicale" (INSERM), the association for the "Aide à la recherche sur la sclérose en plaques" (ARSEP), and the Agence nationale pour la recherche (ANR, program center of excellence in neurodegeneration obtained within the Grenoble excellence in neurodegeneration network).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.016>.

References

- [1] T. Dyrberg, M.B. Oldstone, Peptides as probes to study molecular mimicry and virus-induced autoimmunity, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 130 (1986) 25–37.
- [2] L. Piccoli, I. Campo, C.S. Fregni, B.M.F. Rodriguez, A. Minola, F. Sallusto, M. Luisetti, D. Corti, A. Lanzavecchia, Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7375.
- [3] K. Kelly, E. Manos, G. Jensen, L. Nadauld, D.A. Jones, APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death, *Cancer Res.* 60 (2000) 1021–1027.
- [4] M. Hahne, T. Kataoka, M. Schröter, K. Hofmann, M. Irmeler, J.L. Bodmer, P. Schneider, T. Bornand, N. Holler, L.E. French, B. Sordat, D. Rimoldi, J. Tschopp, APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1185–1190.
- [5] G.W. Glenney, G.D. Wiens, Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis, *J. Immunol.* 178 (2007) 7955–7973.
- [6] B. Pradet-Balade, J.P. Medema, M. López-Fraga, J.C. Lozano, G.M. Kolfschoten, A. Picard, C. Martínez-A, J.A. García-Sanz, M. Hahne, An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein, *EMBO J.* 21 (2002) 5711–5720.
- [7] M. López-Fraga, R. Fernández, J.P. Albar, M. Hahne, Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase, *EMBO Rep.* 2 (2001) 945–951.
- [8] S. Maia, M. Pelletier, J. Ding, Y.-M. Hsu, S.E. Sallan, S.P. Rao, L.M. Nadler, A.A. Cardoso, Aberrant expression of functional BAFF-system receptors by malignant B-cell precursors impacts leukemia cell survival, *PLoS One* 6 (2011) e20787.
- [9] S. Schuepbach-Mallepell, D. Das, L. Willen, M. Vigolo, A. Tardivel, L. Lebon, C. Kowalczyk-Quintas, J. Nys, C. Smulski, T.S. Zheng, K. Maskos, A. Lammens, X. Jiang, H. Hess, S.-L. Tan, P. Schneider, Stoichiometry of heteromeric BAFF and APRIL cytokines dictates their receptor binding and signaling properties, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 16330–16342.
- [10] S.A. Marsters, M. Yan, R.M. Pitti, P.E. Haas, V.M. Dixit, A. Ashkenazi, Interaction of the TNF homologues BlyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI, *Curr. Biol.* 10 (2000) 785–788.
- [11] P. Rennert, P. Schneider, T.G. Cachero, J. Thompson, L. Trabach, S. Hertig, N. Holler, F. Qian, C. Mullen, K. Strauch, J.L. Browning, C. Ambrose, J. Tschopp, A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1677–1684.
- [12] J.S. Thompson, S.A. Bixler, F. Qian, K. Vora, M.L. Scott, T.G. Cachero, C. Hession, P. Schneider, I.D. Sizing, C. Mullen, K. Strauch, M. Zafari, C.D. Benjamin, J. Tschopp, J.L. Browning, C. Ambrose, BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF, *Science* 293 (2001) 2108–2111.
- [13] E. Meinel, F.S. Thaler, S.F. Lichtenthaler, Shedding of BAFF/APRIL receptors controls B cells, *Trends Immunol.* 39 (2018) 673–676.
- [14] K. Ingold, A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q.G. Steiner, T.G. Cachero, F. Qiang,

- L. Gorelik, S.L. Kalled, H. Acha-Orbea, P.D. Rennett, J. Tschopp, P. Schneider, Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1375–1383.
- [15] J. Hendriks, L. Planelles, J. de Jong-Odding, G. Hardenberg, S.T. Pals, M. Hahne, M. Spaargaren, J.P. Medema, Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 637–648.
- [16] L.K. Swee, K. Ingold-Salamin, A. Tardivel, L. Willen, O. Gaide, M. Favre, S. Demotz, M. Mikkola, P. Schneider, Biological activity of ectodysplasin A is conditioned by its collagen and heparan sulfate proteoglycan-binding domains, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 27567–27576.
- [17] F.C. Kimberley, L. van Bostelen, K. Cameron, G. Hardenberg, J.A. Marquart, M. Hahne, J.P. Medema, The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking, *FASEB J. Off. Publ. Federation Am. Soc. Exp. Biol.* 23 (2009) 1584–1595.
- [18] S. Tumova, A. Woods, J.R. Couchman, Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (2000) 269–288.
- [19] J. Moreaux, A.-C. Sprynski, S.R. Dillon, K. Mahtouk, M. Jourdan, A. Ythier, P. Moine, N. Robert, E. Jourdan, J.F. Rossi, B. Klein, APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop, *Eur. J. Haematol.* 83 (2009) 119–129.
- [20] D. Bischof, S.F. Elsawa, G. Mantchev, J. Yoon, G.E. Michels, A. Nilson, S.L. Sutor, J.L. Platt, S.M. Ansell, G. von Bulow, R.J. Bram, Selective activation of TACI by syndecan-2, *Blood* 107 (2006) 3235–3242.
- [21] L. Pellegrini, Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 629–634.
- [22] G. Hardenberg, L. Planelles, C.M. Schwarte, L. van Bostelen, T. Le Huong, M. Hahne, J.P. Medema, Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2900–2911.
- [23] V.T. Chu, A. Fröhlich, G. Steinhauser, T. Scheel, T. Roch, S. Fillatreau, J.J. Lee, M. Löhning, C. Berek, Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 151–159.
- [24] T. Matthes, I. Dunand-Sauthier, M.L. Santiago-Raber, K.H. Krause, O. Donze, J. Passweg, T. McKee, B. Huard, Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow, *Blood* 118 (2011) 1838–1844.
- [25] B. Huard, T. McKee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zuppler, J.P. Guyot, P. Schneider, E. Roosnek, APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa, *J. Clin. Investig.* 118 (2008) 2887–2895.
- [26] I. Puga, M. Cols, C.M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D.M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J.B. Busnel, S. Serrano, J.A. Lorente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baró, C.D. de Heredia, N. Torán, A. Català, M. Torredadell, C. Fortuny, V. Cusi, C. Carreras, G.A. Diaz, J.M. Blander, C.-M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L.D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.-L. Casanova, S.C. Ganai, A. Diefenbach, J.I. Aróstegui, M. Juan, J. Yagüe, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, A. Cerutti, B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen, *Nat. Immunol.* 13 (2011) 170–180.
- [27] O. Winter, K. Moser, E. Mohr, D. Zotos, H. Kaminski, M. Szyska, K. Roth, D.M. Wong, C. Dame, D.M. Tarlinton, H. Schulze, I.C.M. MacLennan, R.A. Manz, Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow, *Blood* 116 (2010) 1867–1875.
- [28] B. Manfroi, T. McKee, J.F. Mayol, S. Tabruyn, S. Moret, C. Villiers, C. Righini, M. Dyer, M. Callanan, P. Schneider, A. Tzankov, T. Matthes, N. Sturm, B. Huard, CXCL-8/IL8 produced by diffuse large B-cell lymphomas recruits neutrophils expressing a proliferation-inducing ligand APRIL, *Cancer Res.* 77 (2017) 1097–1107.
- [29] B. He, W. Xu, P.A. Santini, A.D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D.M. Knowles, M. Rescigno, A. Cerutti, Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL, *Immunity* 26 (2007) 812–826.
- [30] E. Varfolomeev, F. Kischkel, F. Martin, D. Seshasayee, H. Wang, D. Lawrence, C. Olsson, L. Tom, S. Erickson, D. French, P. Schow, I.S. Grewal, A. Ashkenazi, APRIL-deficient mice have normal immune system development, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 997–1006.
- [31] E. Castigli, S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A.K. Bhan, E. Mizoguchi, R.S. Geha, Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 3903–3908.
- [32] Y. Xiao, S. Motomura, E.R. Podack, APRIL (TNFSF13) regulates collagen-induced arthritis, IL-17 production and Th2 response, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 3450–3458.
- [33] Y. Xiao, S. Motomura, V. Deyev, E.R. Podack, TNF superfamily member 13, APRIL, inhibits allergic lung inflammation, *Eur. J. Immunol.* 41 (2011) 164–171.
- [34] J.C. Massacand, P. Kaiser, B. Ernst, A. Tardivel, K. Bürki, P. Schneider, N.L. Harris, Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production, *PLoS One* 3 (2008) e2588.
- [35] G. Hardenberg, L. van Bostelen, M. Hahne, J.P. Medema, Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL, *Immunol. Cell Biol.* 86 (2008) 530–534.
- [36] G.U. von Bülow, J.M. van Deursen, R.J. Bram, Regulation of the T-independent humoral response by TACI, *Immunity* 14 (2001) 573–582.
- [37] E. Castigli, S.A. Wilson, S. Scott, F. Dedeoglu, S. Xu, K.-P. Lam, R.J. Bram, H. Jabara, R.S. Geha, TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 35–39.
- [38] M.J. Benson, S.R. Dillon, E. Castigli, R.S. Geha, S. Xu, K.P. Lam, R.J. Noelle, Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL, *J. Immunol.* 180 (2008) 3655–3659.
- [39] E. Belnoue, M. Pihlgren, T.L. McGaha, C. Toungne, A.F. Rochat, C. Bossen, P. Schneider, B. Huard, P.H. Lambert, C.A. Siegrist, APRIL is critical for plasma-blast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells, *Blood* 111 (2008) 2755–2764.
- [40] D.C. Nguyen, S. Garimalla, H. Xiao, S. Kyu, I. Albizua, J. Galipeau, K.-Y. Chiang, E.K. Waller, R. Wu, G. Gibson, J. Roberson, F.E. Lund, T.D. Randall, I. Sanz, F.E.-H. Lee, Factors of the bone marrow microenvironment that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion, *Nat. Commun.* 9 (2018) 3698.
- [41] B.P. O'Connor, V.S. Raman, L.D. Erickson, W.J. Cook, L.K. Weaver, C. Ahonen, L.-L. Lin, G.T. Mantchev, R.J. Bram, R.J. Noelle, BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 91–98.
- [42] M. Yan, H. Wang, B. Chan, M. Roose-Girma, S. Erickson, T. Baker, D. Tumas, I.S. Grewal, V.M. Dixit, Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 638–643.
- [43] J. Wijdenes, W.C. Vooijs, C. Clément, J. Post, F. Morard, N. Vita, P. Laurent, R.X. Sun, B. Klein, J.M. Dore, A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1, *Br. J. Haematol.* 94 (1996) 318–323.
- [44] C. Bret, D. Hose, T. Reme, A.-C. Sprynski, K. Mahtouk, J.-F. Schved, P. Quittet, J.-F. Rossi, H. Goldschmidt, B. Klein, Expression of genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells, *Br. J. Haematol.* 145 (2009) 350–368.
- [45] M.J. McCarron, P.W. Park, D.R. Fooksman, CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival, *Blood* 129 (2017) 2749–2759.
- [46] P.K.A. Mongini, J.K. Inman, H. Han, R.J. Fattah, S.B. Abramson, M. Attur, APRIL and BAFF promote increased viability of replicating human B2 cells via mechanism involving cyclooxygenase 2, *J. Immunol.* 176 (2006) 6736–6751.
- [47] E. Castigli, S.A. Wilson, A. Elkhail, E. Ozcan, L. Garibyan, R.S. Geha, Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (2007) 885–891.
- [48] S. Tsuji, L. Stein, N. Kamada, G. Nuñez, R. Bram, B.A. Vallance, A.E. Sousa, J.L. Platt, M. Cascalho, TACI deficiency enhances antibody avidity and clearance of an intestinal pathogen, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 4857–4866.
- [49] U. Salzer, H.M. Chapel, A.D.B. Webster, Q. Pan-Hammarström, A. Schmitt-Graeff, M. Schlesier, H.H. Peter, J.K. Rockstroh, P. Schneider, A.A. Schäffer, L. Hammarström, B. Grimbacher, Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans, *Nat. Genet.* 37 (2005) 820–828.
- [50] B. Schiemann, J.L. Gommerman, K. Vora, T.G. Cachero, S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, E. Frew, M.L. Scott, An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway, *Science* 293 (2001) 2111–2114.
- [51] Y. Garcia-Carmona, M. Cols, A.T. Ting, L. Radigan, F.J. Yuk, L. Zhang, A. Cerutti, C. Cunningham-Rundles, Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI, *Blood* 125 (2015) 1749–1758.
- [52] Y. Zhang, L. Tech, L.A. George, A. Acs, R.E. Durrett, H. Hess, L.S.K. Walker, D.M. Tarlinton, A.L. Fletcher, A.E. Hauser, K.-M. Toellner, Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells, *J. Exp. Med.* 215 (2018) 1227–1243.
- [53] E. Mohr, K. Serre, R.A. Manz, A.F. Cunningham, M. Khan, D.L. Hardie, R. Bird, I.C.M. MacLennan, Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature, *J. Immunol.* 182 (2009) 2113–2123.
- [54] C. Hua, R. Audo, N. Yeremenko, D. Baeten, M. Hahne, B. Combe, J. Morel, C. Daïen, A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells, *J. Autoimmun.* 73 (2016) 64–72.
- [55] Y.-T. Tai, L. Lin, L. Xing, S.-F. Cho, T. Yu, C. Acharya, K. Wen, P.A. Hsieh, J. Dulos, A. van Elsland, N. Munshi, P. Richardson, K.C. Anderson, APRIL Signaling via TACI Mediates Immunosuppression by T Regulatory Cells in Multiple Myeloma: Therapeutic Implications, (2018) Leukemia.
- [56] D. Saulep-Easton, F.B. Vincent, P.S. Quah, A. Wei, S.B. Ting, C.M. Croce, C. Tam, F. Mackay, The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells, *Leukemia* 30 (2016) 163–172.
- [57] G. Yu, T. Boone, J. Delaney, N. Hawkins, M. Kelley, M. Ramakrishnan, S. McCabe, W.R. Qiu, M. Kornuc, X.Z. Xia, J. Guo, M. Stolina, W.J. Boyle, I. Sarosi, H. Hsu, G. Senaldi, L.E. Theill, APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 252–256.
- [58] J.V. Stein, M. Lopez-Fraga, F.A. Elustondo, C.E. Carvalho-Pinto, D. Rodriguez, R. Gomez-Caro, J. De Jong, A.C. Martinez, J.P. Medema, M. Hahne, APRIL modulates B and T cell immunity, *J. Clin. Investig.* 109 (2002) 1587–1598.
- [59] F. Mackay, H. Leung, The role of the BAFF/APRIL system on T cell function, *Semin. Immunol.* 18 (2006) 284–289.
- [60] I. Moisini, A. Davidson, BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases, *Clin. Exp. Immunol.* 158 (2009) 155–163.
- [61] B. Gatto, Atacicept, a homodimeric fusion protein for the potential treatment of diseases triggered by plasma cells, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 1216–1227.
- [62] J.A. Gross, J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S.R. Dillon, K. Madden, W. Xu, J. Parrish-Novak, D. Foster, C. Lofton-Day, M. Moore, A. Littau, A. Grossman, H. Haugen, K. Foley, H. Blumberg, K. Harrison, W. Kindsvogel, C.H. Clegg, TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune

- disease, *Nature* 404 (2000) 995–999.
- [63] M. Ramanujam, X. Wang, W. Huang, L. Schiffer, C. Grimaldi, A. Akkerman, B. Diamond, M.P. Madaio, A. Davidson, Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 173 (2004) 3524–3534.
- [64] P. Haselmayer, M. Vigolo, J. Nys, P. Schneider, H. Hess, A mouse model of systemic lupus erythematosus responds better to soluble TACI than to soluble BAFFR, correlating with depletion of plasma cells, *Eur. J. Immunol.* 47 (2017) 1075–1085.
- [65] B. Huard, N.L. Tran, M. Benkhoucha, C. Manzin-Lorenzi, M.L. Santiago-Raber, Selective APRIL blockade delays systemic lupus erythematosus in mouse, *PLoS One* 7 (2012) e31837.
- [66] N.L. Tran, P. Schneider, M.-L. Santiago-Raber, TACI-dependent APRIL signaling maintains autoreactive B cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus, *Eur. J. Immunol.* 47 (2017) 713–723.
- [67] F. Mackay, S.A. Woodcock, P. Lawton, C. Ambrose, M. Baetscher, P. Schneider, J. Tschopp, J.L. Browning, Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1697–1710.
- [68] S.D. Khare, I. Sarosi, X.Z. Xia, S. McCabe, K. Miner, I. Solovyev, N. Hawkins, M. Kelley, D. Chang, G. Van, L. Ross, J. Delaney, L. Wang, D. Lacey, W.J. Boyle, H. Hsu, Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 3370–3375.
- [69] M. Ramanujam, R. Bethunackan, W. Huang, H. Tao, M.P. Madaio, A. Davidson, Selective blockade of BAFF for the prevention and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis in NZM2410 mice, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1457–1468.
- [70] C.O. Jacob, L. Pricop, C. Putterman, M.N. Koss, Y. Liu, M. Kollaros, S.A. Bixler, C.M. Ambrose, M.L. Scott, W. Stohl, Paucity of clinical disease despite serological autoimmunity and kidney pathology in lupus-prone New Zealand mixed 2328 mice deficient in BAFF, *J. Immunol.* 177 (2006) 2671–2680.
- [71] C.O. Jacob, S. Guo, N. Jacob, R.D. Pawar, C. Putterman, W.J. Quinn, M.P. Cancro, T.-S. Migone, W. Stohl, Dispensability of APRIL to the development of systemic lupus erythematosus in NZM 2328 mice, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 1610–1619.
- [72] C. Jiang, W.M. Loo, E.J. Greenley, K.S. Tung, L.D. Erickson, B cell maturation antigen deficiency exacerbates lymphoproliferation and autoimmunity in murine lupus, *J. Immunol.* 186 (2011) 6136–6147.
- [73] H. Wang, S.A. Marsters, T. Baker, B. Chan, W.P. Lee, L. Fu, D. Tumas, M. Yan, V.M. Dixit, A. Ashkenazi, I.S. Grewal, TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 632–637.
- [74] J.A. Gross, S.R. Dillon, S. Mudri, J. Johnston, A. Littau, R. Roque, M. Rixon, O. Schou, K.P. Foley, H. Haugen, S. McMillen, K. Waggie, R.W. Schreckhise, K. Shoemaker, T. Vu, M. Moore, A. Grossman, C.H. Clegg, TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. Impaired B cell maturation in mice lacking BlyS, *Immunity* 15 (2001) 289–302.
- [75] Y. Chang, Y. Wu, D. Wang, W. Wei, Q. Qin, G. Xie, L. Zhang, S. Yan, J. Chen, Q. Wang, H. Wu, F. Xiao, W. Sun, J. Jin, W. Wang, Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses, *Rheumatology (Oxford)* 50 (2011) 862–870.
- [76] D. Wang, Y. Chang, Y. Wu, L. Zhang, S. Yan, G. Xie, Q. Qin, J. Jin, W. Wang, J. Fang, W. Wei, Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis, *Clin. Exp. Immunol.* 163 (2011) 225–234.
- [77] H. Hsu, S.D. Khare, F. Lee, K. Miner, Y.-L. Hu, M. Stolina, N. Hawkins, Q. Chen, S.-Y.J. Ho, H. Min, F. Xiong, T. Boone, D.J. Zack, A novel modality of BAFF-specific inhibitor AMG623 peptide reduces B-cell number and improves outcomes in murine models of autoimmune disease, *Clin. Exp. Rheumatol.* 30 (2012) 197–201.
- [78] L. Fernandez, G.F. Salinas, C. Rocha, C.E. Carvalho-Pinto, N. Yeremenko, L. Papon, J.P. Medema, B. Combe, J. Morel, D. Baeten, M. Hahne, The TNF family member APRIL dampens collagen-induced arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 72 (2013) 1367–1374.
- [79] B. Huard, P. Schneider, D. Mauri, J. Tschopp, L.E. French, T cell costimulation by the TNF ligand BAFF, *J. Immunol.* 167 (2001) 6225–6231.
- [80] J. Novak, Z. Moldoveanu, B.A. Julian, M. Raska, R.J. Wyatt, Y. Suzuki, Y. Tomino, A.G. Gharavi, J. Mestecky, H. Suzuki, Aberrant glycosylation of IgA1 and anti-glycan antibodies in IgA nephropathy: role of mucosal immune system, *Adv. Otorhinolaryngol.* 72 (2011) 60–63.
- [81] D.D. McCarthy, J. Kujawa, C. Wilson, A. Papandile, U. Poreci, E.A. Porfilio, L. Ward, M.A.E. Lawson, A.J. Macpherson, K.D. McCoy, Y. Pei, L. Novak, J.Y. Lee, B.A. Julian, J. Novak, A. Ranger, J.L. Gommerman, J.L. Browning, Mice over-expressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3991–4002.
- [82] Y.G. Kim, M. Alvarez, H. Suzuki, S. Hirose, S. Izui, Y. Tomino, B. Huard, Y. Suzuki, Pathogenic Role of a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) in Murine IgA Nephropathy, *PLoS One* 10 (2015) e0137044.
- [83] N.D. Huntington, R. Tomioka, C. Clavarino, A.M. Chow, D. Liñares, P. Maña, J. Rossjohn, T.G. Cachero, F. Qian, S.L. Kalled, C.C.A. Bernard, H.H. Reid, A BAFF antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting cell-mediated and humoral immune responses, *Int. Immunol.* 18 (2006) 1473–1485.
- [84] B. Kretschmar, K. Hein, Z. Moifan, B. Konnecke, M.B. Sattler, H. Hess, R. Weissert, M. Bahr, Treatment with atacept enhances neuronal cell death in a rat model of optic neuritis, *J. Neuroimmunol.* 268 (2014) 58–63.
- [85] S.A. Jagessar, N. Heijmans, L. Oh, J. Bauer, E.L.A. Blezer, J.D. Laman, T.-S. Migone, M.N. Devalaraja, A. Bert, Antibodies against human BlyS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7 (2012) 557–570.
- [86] J. Gommerman, XIII International Meeting in Neuroimmunology, 2016 Jerusalem, Israel.
- [87] S.S. Kim, D.P. Richman, S.S. Zamvil, M.A. Agius, Accelerated central nervous system autoimmunity in BAFF-receptor-deficient mice, *J. Neurol. Sci.* 306 (2011) 9–15.
- [88] T. Koyama, H. Tsukamoto, K. Masumoto, D. Himeji, K. Hayashi, M. Harada, T. Horiuchi, A novel polymorphism of the human APRIL gene is associated with systemic lupus erythematosus, *Rheumatology (Oxford)* 42 (2003) 980–985.
- [89] Y.H. Lee, F. Ota, X. Kim-Howard, K.M. Kaufman, S.K. Nath, APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility, *Rheumatology (Oxford)* 46 (2007) 1274–1276.
- [90] T. Koyama, H. Tsukamoto, Y. Miyagi, D. Himeji, J. Otsuka, H. Miyagawa, M. Harada, T. Horiuchi, Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 64 (2005) 1065–1067.
- [91] M. Hegazy, H. Darwish, H. Darweesh, A. El-Shehaby, Y. Emad, Raised serum level of APRIL in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with disease activity indices, *Clin. Immunol.* 135 (2010) 118–124.
- [92] W. Stohl, S. Metyas, S.-M. Tan, G.S. Cheema, B. Oamar, V. Roschke, Y. Wu, K.P. Baker, D.M. Hilbert, Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004) 1096–1103.
- [93] J. Morel, C. Roubille, L. Planelles, C. Rocha, L. Fernandez, C. Lukas, M. Hahne, B. Combe, Serum levels of tumour necrosis factor family members a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B lymphocyte stimulator (BlyS) are inversely correlated in systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 68 (2009) 997–1002.
- [94] M.A. Neusser, M.T. Lindenmeyer, I. Edenhofer, S. Gaiser, M. Kretzler, H. Regele, S. Segerer, C.D. Cohen, Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis, *Mod. Pathol.* 24 (2011) 98–107.
- [95] V.T. Chu, P. Enghard, S. Schürer, G. Steinhauser, B. Rudolph, G. Riemekasten, C. Berek, Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 2083–2093.
- [96] W. Treamtrakanpon, P. Tantivitayakul, T. Benjachat, P. Somparn, W. Kittikowit, S. Eiam-ong, A. Leelahavanichkul, N. Hirankarn, Y. Avihingsanon, APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis, *Arthritis Res. Ther.* 14 (2012) R252.
- [97] V.T. Chu, P. Enghard, G. Riemekasten, C. Berek, In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 5947–5957.
- [98] T. Matsushita, M. Fujimoto, M. Hasegawa, C. Tanaka, S. Kumada, F. Ogawa, K. Takehana, S. Sato, Elevated serum APRIL levels in patients with systemic sclerosis: distinct profiles of systemic sclerosis categorized by APRIL and BAFF, *J. Rheumatol.* 34 (2007) 2056–2062.
- [99] M. Bielecki, K. Kowal, A. Lapinska, P. Bernatowicz, L. Chyczewski, O. Kowal-Bielecka, Increased production of a proliferation-inducing ligand (APRIL) by peripheral blood mononuclear cells is associated with antitopoisomerase I antibody and more severe disease in systemic sclerosis, *J. Rheumatol.* 37 (2010) 2286–2289.
- [100] M. Dall'Era, E. Chakravarty, D. Wallace, M. Genovese, M. Weisman, A. Kavanaugh, K. Kalunian, P. Dhar, E. Vincent, C. Pena-Rossi, D. Wofsy, Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 4142–4150.
- [101] C. Pena-Rossi, E. Nasonov, M. Stanislav, V. Yakusevich, O. Ershova, N. Lomareva, H. Saunders, J. Hill, I. Nestorov, An exploratory dose-escalating study investigating the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous atacept in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus* 18 (2009) 547–555.
- [102] E.M. Ginzler, S. Wax, A. Rajeswaran, S. Copt, J. Hillson, E. Ramos, N.G. Singer, Atacept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial, *Arthritis Res. Ther.* 14 (2012) R33.
- [103] E. Samy, S. Wax, B. Huard, H. Hess, P. Schneider, Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases, *Int. Rev. Immunol.* 36 (2017) 3–19.
- [104] D. Isenberg, C. Gordon, D. Licu, S. Copt, C.P. Rossi, D. Wofsy, Efficacy and safety of atacept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomised trial), *Ann. Rheum. Dis.* 74 (2015) 2006–2015.
- [105] J.T. Merrill, D.J. Wallace, S. Wax, A. Kao, P.A. Fraser, P. Chang, D. Isenberg, ADDRESS II investigators, efficacy and safety of atacept in patients with systemic lupus erythematosus: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-arm, phase IIb study, *Arthr. Rheumatol. Hoboken, N.J.* 70 (2018) 266–276.
- [106] D.L. Horowitz, R. Furie, Belimumab is approved by the FDA: what more do we need to know to optimize decision making? *Curr. Rheumatol. Rep.* 14 (2012) 318–323.
- [107] R. Furie, W. Stohl, E.M. Ginzler, M. Becker, N. Mishra, W. Chatham, J.T. Merrill, A. Weinstein, W.J. McCune, J. Zhong, W. Cai, W. Freimuth/Belimumab Study Group, Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BlyS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 10 (2008) R109.
- [108] D.J. Wallace, W. Stohl, R.A. Furie, J.R. Lisse, J.D. McKay, J.T. Merrill, M.A. Petri, E.M. Ginzler, W.W. Chatham, W.J. McCune, V. Fernandez, M.R. Chevrier, Z.J. Zhong, W.W. Freimuth, A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 61 (2009) 1168–1178.

- [109] R. Furie, M. Petri, O. Zamani, R. Cervera, D.J. Wallace, D. Tegzová, J. Sanchez-Guerrero, A. Schwartz, J.T. Merrill, W.W. Chatham, W. Stohl, E.M. Ginzler, D.R. Hough, Z.J. Zhong, W. Freimuth, R.F. van Vollenhoven, BLISS-76 Study Group, A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 3918–3930.
- [110] S.V. Navarra, R.M. Guzmán, A.E. Gallacher, S. Hall, R.A. Levy, R.E. Jimenez, E.K.-M. Li, M. Thomas, H.-Y. Kim, M.G. León, C. Tanasescu, E. Nasonov, J.-L. Lan, L. Pineda, Z.J. Zhong, W. Freimuth, M.A. Petri, BLISS-52 Study Group, Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet* 377 (2011) 721–731.
- [111] J. Zhao, J. Guo, L. Wang, W. Zhou, Z. Zhang, The role of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheumatol.* 43 (2014) 462–469.
- [112] A.J. Weldon, I. Moldovan, M.G. Cabling, E.A. Hernandez, S. Hsu, J. Gonzalez, A. Parra, A. Benitez, N. Daoud, K. Colburn, K.J. Payne, Surface APRIL is elevated on myeloid cells and is associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 42 (2015) 749–759.
- [113] V. Roschke, S. Sosnovtseva, C.D. Ward, J.S. Hong, R. Smith, V. Albert, W. Stohl, K.P. Baker, S. Ullrich, B. Nardelli, D.M. Hilbert, T.-S. Migone, BlyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases, *J. Immunol.* 169 (2002) 4314–4321.
- [114] S.R. Dillon, B. Harder, K.B. Lewis, M.D. Moore, H. Liu, T.R. Bukowski, N.B. Hamacher, M.M. Lantry, M. Maurer, C.M. Krejsa, J.L. Ellsworth, S. Pederson, K.B. Elkon, M.H. Wener, M. Dall'Era, J.A. Gross, B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R48.
- [115] S.-M. Tan, D. Xu, V. Roschke, J.W. Perry, D.G. Arkefeld, G.R. Ehresmann, T.-S. Migone, D.M. Hilbert, W. Stohl, Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 982–992.
- [116] T.M. Seyler, Y.W. Park, S. Takemura, R.J. Bram, P.J. Kurtin, J.J. Goronzy, C.M. Weyand, BlyS and APRIL in rheumatoid arthritis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3083–3092.
- [117] C. Gabay, V. Krenn, C. Bosshard, C.A. Seemayer, C. Chizzolini, B. Huard, Synovial tissues concentrate secreted APRIL, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R144.
- [118] M. Bombardieri, N.-W. Kam, F. Brentano, K. Choi, A. Filer, D. Kyburz, I.B. McInnes, S. Gay, C. Buckley, C. Pitzalis, A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 1857–1865.
- [119] R.F. van Vollenhoven, N. Kinnman, E. Vincent, S. Wax, J. Bathon, Atacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1782–1792.
- [120] M.C. Genovese, N. Kinnman, G. de La Bourdonnaye, C. Pena Rossi, P.P. Tak, Atacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumor necrosis factor antagonist therapy: results of a phase II, randomized, placebo-controlled, dose-finding trial, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1793–1803.
- [121] W. Stohl, J.T. Merrill, J.D. McKay, J.R. Lisse, Z.J. Zhong, W.W. Freimuth, M.C. Genovese, Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study, *J. Rheumatol.* 40 (2013) 579–589.
- [122] T. Lombardi, S. Moll, P. Youinou, J.O. Pers, A. Tzankov, C. Gabay, M.L. Santiago-Raber, C. Chizzolini, B. Huard, Absence of up-regulation for a proliferation-inducing ligand in Sjögren's sialadenitis lesions, *Rheumatology* 50 (2011) 1211–1215.
- [123] J.L. Vosters, N. Roescher, E.J. Polling, G.G. Illei, P.P. Tak, The expression of APRIL in Sjögren's syndrome: aberrant expression of APRIL in the salivary gland, *Rheumatology (Oxford)* 51 (2012) 1557–1562.
- [124] M.V. Jonsson, P. Szodoray, S. Jellestad, R. Jonsson, K. Skarstein, Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjögren's syndrome, *J. Clin. Immunol.* 25 (2005) 189–201.
- [125] X. Mariette, R. Seror, L. Quartuccio, G. Baron, S. Salvin, M. Fabris, F. Desmoulin, G. Nocturne, P. Ravaut, S. De Vita, Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study, *Ann. Rheum. Dis.* 74 (2015) 526–531.
- [126] X.-Q. Yu, M. Li, H. Zhang, H.-Q. Low, X. Wei, J.-Q. Wang, L.-D. Sun, K.-S. Sim, Y. Li, J.-N. Foo, W. Wang, Z.-J. Li, X.-Y. Yin, X.-Q. Tang, L. Fan, J. Chen, R.-S. Li, J.-X. Wan, Z.-S. Liu, T.-Q. Lou, L. Zhu, X.-J. Huang, X.-J. Zhang, Z.-H. Liu, J.-J. Liu, A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy, *Nat. Genet.* 44 (2011) 178–182.
- [127] Y.-L. Zhai, L. Zhu, S.-F. Shi, L.-J. Liu, J.-C. Lv, H. Zhang, Increased APRIL Expression Induces IgA1 Aberrant Glycosylation in IgA Nephropathy, *Medicine (Baltimore)* 95 (2016) e3099.
- [128] M. Muto, B. Manfroï, H. Suzuki, K. Joh, M. Nagai, S. Wakai, C. Righini, M. Maiguma, S. Izui, Y. Tomino, B. Huard, Y. Suzuki, Toll-like receptor 9 stimulation induces aberrant expression of a proliferation-inducing ligand by tonsillar germinal center B cells in IgA nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 28 (2016) 1227–1238.
- [129] F. Piazza, J.C. DiFrancesco, M.L. Fusco, D. Corti, L. Pirovano, B. Frigeni, L. Mattavelli, S. Andreoni, M. Frigo, C. Ferrarese, G. Tredici, G. Cavaletti, Cerebrospinal fluid levels of BAFF and APRIL in untreated multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 220 (2010) 104–107.
- [130] H. Wang, K. Wang, X. Zhong, W. Qiu, Y. Dai, A. Wu, X. Hu, Cerebrospinal fluid BAFF and APRIL levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients during relapse, *J. Clin. Immunol.* 32 (2012) 1007–1011.
- [131] M. Thangaraj, T. Masterman, J. Hillert, S. Moerk, R. Jonsson, A proliferation-inducing ligand (APRIL) is expressed by astrocytes and is increased in multiple sclerosis, *Scand. J. Immunol.* 65 (2007) 92–98.
- [132] C. Osorio, P.J. Chacon, M. White, L. Kisiswa, S. Wyatt, A. Rodriguez-Tebar, A.M. Davies, Selective regulation of axonal growth from developing hippocampal neurons by tumor necrosis factor superfamily member APRIL, *Mol. Cell. Neurosci.* 59 (2014) 24–36.
- [133] L. Kappos, H.P. Hartung, M.S. Freedman, A. Boyko, E.W. Radu, D.D. Mikol, M. Lamarine, Y. Hyvert, U. Freudensprung, T. Plitz, J. van Beek, A.S. Group, Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 353–363.
- [134] R.C. Sergott, J.L. Bennett, P. Rieckmann, X. Montalban, D. Mikol, U. Freudensprung, T. Plitz, J. van Beek, A.T. Group, ATON: results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacept in patients with optic neuritis, *J. Neurol. Sci.* 351 (2015) 174–178.
- [135] F. Lühder, R. Gold, Trial and error in clinical studies: lessons from ATAMS, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 340–341.
- [136] Y. Kuwano, M. Fujimoto, R. Watanabe, N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Ohno, S. Yano, N. Yazawa, H. Okochi, K. Tamaki, Serum BAFF and APRIL levels in patients with alopecia areata, *J. Dermatol. Sci.* 50 (2008) 236–239.
- [137] M. Thangaraj, T. Masterman, L. Helgeland, U. Rot, M.V. Jonsson, G.E. Eide, R. Pirskanen, J. Hillert, R. Jonsson, The thymus is a source of B-cell-survival factors-APRIL and BAFF-in myasthenia gravis, *J. Neuroimmunol.* 178 (2006) 161–166.
- [138] R. Watanabe, M. Fujimoto, N. Yazawa, H. Nakashima, N. Asashima, Y. Kuwano, Y. Tada, N. Maruyama, H. Okochi, K. Tamaki, Increased serum levels of a proliferation-inducing ligand in patients with bullous pemphigoid, *J. Dermatol. Sci.* 46 (2007) 53–60.
- [139] T. Kawakami, I. Mizushima, K. Yamada, H. Fujii, K. Ito, S. Izui, M. Yamagishi, B. Huard, M. Kawano, Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* (2018), <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy296> Epub ahead of print.
- [140] K. Kiyama, D. Kawabata, Y. Hosono, K. Kitagori, N. Yukawa, H. Yoshifuji, K. Omura, T. Fujii, T. Mimori, Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance, *Arthritis Res. Ther.* 14 (2012) R86.
- [141] K. Migita, B. Ilyassova, E.F. Kovzel, A. Nersesov, S. Abiru, Y. Maeda, A. Komori, M. Ito, K. Yano, H. Yatsuhashi, S. Shimoda, H. Ishibashi, M. Nakamura, Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC, *Clin. Immunol.* 134 (2010) 217–225.
- [142] Q. Zhao, X. Chen, Y. Hou, J. Jiang, W. Zhong, X. Yao, W. Wang, L. Li, J. Fang, F. Zhang, P. Hu, Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and clinical activity of multiple doses of RCT-18 in Chinese patients with systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Pharmacol.* 56 (2016) 948–959.
- [143] X. Chen, Q. Zhao, Y. Hou, J. Jiang, W. Zhong, W. Wang, X. Yao, L. Li, J. Fang, F. Zhang, P. Hu, Pharmacokinetics, pharmacodynamics, short term efficacy and safety of RCT-18, a novel BlyS/APRIL fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82 (2016) 41–52.
- [144] X. Chen, Y. Hou, J. Jiang, Q. Zhao, W. Zhong, W. Wang, X. Yao, L. Li, J. Fang, F. Zhang, P. Hu, Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of single ascending doses of RCT-18 in Chinese patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Pharmacokinet.* 53 (2014) 1033–1044.
- [145] M. Guadagnoli, F.C. Kimberley, U. Phan, K. Cameron, P.M. Vink, H. Rodermond, E. Eldering, A.P. Kater, H. van Eenennaam, J.P. Medema, Development and characterization of APRIL antagonistic monoclonal antibodies for treatment of B-cell lymphomas, *Blood* 117 (2011) 6856–6865.
- [146] L. Lee, B. Draper, N. Chaplin, B. Philip, M. Chin, D. Galas-Filipowicz, S. Onuoha, S. Thomas, V. Baldan, R. Bughda, P. Maciocia, E. Kokalaki, M.P. Neves, D. Patel, M. Rodriguez-Justo, J. Francis, K. Yong, M. Pule, An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma, *Blood* 131 (2018) 746–758.
- [147] S.-F. Cho, K.C. Anderson, Y.-T. Tai, Targeting B cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: potential uses of BCMA-based immunotherapy, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1821.
- [148] D.J. DiLillo, Y. Hamaguchi, Y. Ueda, K. Yang, J. Uchida, K.M. Haas, G. Kelsoe, T.F. Tedder, Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice, *J. Immunol.* 180 (2008) 361–371.
- [149] M. Jourdan, A. Caraux, G. Caron, N. Robert, G. Fiol, T. Rème, K. Bolloré, J.-P. Vendrell, S. Le Gallou, F. Mourcin, J. De Vos, A. Kassambara, C. Duperray, D. Hose, T. Fest, K. Tarte, B. Klein, Characterization of a transitional pre-plasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation, *J. Immunol.* 187 (2011) 3931–3941.
- [150] H.E. Mei, D. Frölich, C. Giesecke, C. Lodenkemper, K. Reiter, S. Schmidt, E. Feist, C. Daridon, H.-P. Tony, A. Radbruch, T. Dörner, Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab, *Blood* 116 (2010) 5181–5190.
- [151] C. Bossen, T.G. Cachero, A. Tardivel, K. Ingold, L. Willen, M. Dobles, M.L. Scott, A. Maquelin, E. Benoue, C.-A. Siegrist, S. Chevrier, H. Acha-Orbea, H. Leung, F. Mackay, J. Tschopp, P. Schneider, TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts, *Blood* 111 (2008) 1004–1012.
- [152] W. Chatham, A. Chadha, J. Fettiplace, C. Kleoudis, D. Bass, D. Roth, D. Gordon, A randomized, open-label study to investigate the effect of belimumab on

- pneumococcal vaccination in patients with active, autoantibody-positive systemic lupus erythematosus, *Lupus* 26 (2017) 1483–1490.
- [153] A.M. Jacobi, W. Huang, T. Wang, W. Freimuth, I. Sanz, R. Furie, M. Mackay, C. Aranow, B. Diamond, A. Davidson, Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 201–210.
- [154] I. Sanz, Systemic lupus erythematosus: extent and patterns of off-label use of rituximab for SLE, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2016) 700–702.
- [155] A. Juanatey, L. Blanco-Garcia, N. Tellez, Ocrelizumab: its efficacy and safety in multiple sclerosis, *Rev. Neurol.* 66 (2018) 423–433.
- [156] R.P. Myers, M.G. Swain, S.S. Lee, A.A.M. Shaheen, K.W. Burak, B-cell depletion with rituximab in patients with primary biliary cirrhosis refractory to ursodeoxycholic acid, *Am. J. Gastroenterol.* 108 (2013) 933–941.
- [157] M. Tsuda, Y. Moritoki, Z.-X. Lian, W. Zhang, K. Yoshida, K. Wakabayashi, G.-X. Yang, T. Nakatani, J. Vierling, K. Lindor, M.E. Gershwin, C.L. Bowlus, Biochemical and immunologic effects of rituximab in patients with primary biliary cirrhosis and an incomplete response to ursodeoxycholic acid, *Hepatology* 55 (2012) 512–521.
- [158] A. Khanna, L. Jopson, D. Howel, A. Bryant, A. Blamire, J.L. Newton, D.E. Jones, Rituximab is ineffective for treatment of fatigue in primary biliary cholangitis: a phase-2 randomised controlled trial, *Hepatology* (2018) Epub ahead of print.
- [159] K.W. Burak, M.G. Swain, T. Santodomingo-Garzon, T. Santodomingo-Garzon, S.S. Lee, S.J. Urbanski, A.I. Aspinall, C.S. Coffin, R.P. Myers, Rituximab for the treatment of patients with autoimmune hepatitis who are refractory or intolerant to standard therapy, *Can. J. Gastroenterol.* 27 (2013) 273–280.
- [160] D. D'Agostino, A. Costaguta, F. Álvarez, Successful treatment of refractory autoimmune hepatitis with rituximab, *Pediatrics* 132 (2013) e526–530.
- [161] R. Liberal, Y.S. de Boer, R.J. Andrade, G. Bouma, G.N. Dalekos, A. Floreani, D. Gleeson, G.M. Hirschfield, P. Invernizzi, M. Lenzi, A.W. Lohse, G. Macedo, P. Milkiewicz, B. Terziroli, B. van Hoek, J.M. Vierling, M.A. Heneghan, International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG), Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45 (2017) 723–732.

Lupus érythémateux systémique

Le LES est une maladie caractérisée par une production augmentée d'auto-anticorps, d'un dysfonctionnement des fonctions des LB et LT, d'une production de cytokines et d'une déposition de complexes immuns qui s'accompagnent de manifestations cliniques systémiques (neurologique, dermique, rénal, musculo-squelettique et hématologique). Le taux d'APRIL dans le sérum de ces patients est largement augmenté mais ne corrèle pas avec le taux d'IgG ou d'IgM dans le sérum [44]. Cette surexpression d'APRIL corrèle avec la sévérité de la maladie [45]. Cependant d'autres études ont reportées une corrélation inverse [46,47]. La source de production d'APRIL dans le LES vient du rein affecté lui-même ainsi que la présence anormale de macrophages infiltrants et de LB circulants [48,49]. L'expression rénale d'APRIL corrèle également avec la résistance au traitement [50].

Des essais cliniques sur des patients atteints de LES ont testé une forme soluble du récepteur TACI fusionné avec la partie constante (Fc) d'une Ig, TACI-Fc nommé atacicept. La phase I a montré une bonne tolérance et une réduction des LB, PB ainsi que les Ig de type IgA, IgM et IgG [51,52]. La phase II ainsi qu'un autre essai clinique testant cette molécule ont été stoppés à cause d'effets secondaires comme par exemple des infections [53]. Une réévaluation des effets secondaires a permis de conclure que ces effets n'étaient pas augmentés comparé à d'autres traitements modulateurs des LB et que ce n'était pas directement dû à atacicept [54]. Par conséquent, un nouvel essai clinique de phase II a débuté et a clairement démontré une réduction des Ig totales, une réduction de l'activité de la maladie à la plus forte dose d'atacicept testée [55]. Ces essais confirment que le traitement avec atacicept est sûr, baisse le taux d'Ig totales dont les autoanticorps et réduit la sévérité du LES.

L'utilisation de la molécule TACI-Fc dans un modèle de souris (NZBWF1) visant à bloquer l'action de la molécule APRIL et BAFF a démontré une réduction du dysfonctionnement rénal avec une protéinurie diminuée et prolonge la survie de ces souris [12]. Une seconde étude a confirmé ces résultats. Selon l'étude, la plupart des auto-anticorps circulants proviendraient des PC dépendant des signaux donnés par APRIL et ce traitement viserait à dépléter ces PC circulants [56]. Un traitement visant spécifiquement APRIL avec un anticorps antagoniste avant le début de la maladie a retardé la protéinurie et la survie a été associée à une baisse des IgM anti-ADN et de moins de déposition d'IgM sur les reins [57]. Ces résultats permettent de conclure qu'APRIL contribue au développement du lupus.

Polyarthrite rhumatoïde

Cette maladie chronique inflammatoire entraîne la destruction de la membrane synoviale de l'articulation, due à la formation de complexes immuns. Le tissu entourant ces articulations et certains organes peuvent également être touchés (cartilage et os). Le niveau d'APRIL est augmenté chez ces patients avec un taux plus élevé dans le liquide synovial comparé au sérum, suggérant une production locale aux sites d'inflammations [58].

Des essais cliniques de phase II sur des patients atteints de PR testant atacicept démontrent une réduction des LB, PB et des IgM, IgG et IgA. Les facteurs rhumatoïdes (Ig dirigées contre la partie Fc d'une IgG) ont été réduits mais pas les anticorps anti-peptide citrique citrulliné (marqueurs reconnus de la PR). Cependant atacicept n'a montré aucun effet sur l'activité de la maladie [59,60].

Dans un modèle de souris de la PR (*collagen-induced arthritis*, CIA), l'inhibition d'APRIL avec TACI-Fc empêche la progression de la maladie et réduit à la fois le score clinique même après le début des symptômes mais aussi la production d'anticorps anti-collagène [61,62]. Une réduction de la maladie a également été observée chez des souris déficientes pour APRIL, révélant son rôle pathogénique [63]. Récemment un groupe a démontré pour la 1ère fois un effet positif d'APRIL dans la génération de LB régulateurs produisant l'IL-10 [64]. Ce même groupe ayant montré plus tôt, de manière opposé aux précédentes études, un effet protecteur d'APRIL chez des souris transgéniques [65]. Un rôle protecteur d'APRIL au niveau du développement de LB régulateurs a été pour la première fois dévoilé.

La Néphropathie à IgA

Aussi appelé maladie de Berger, elle mène à une insuffisance rénale provoquée par l'inflammation des glomérules (unités anatomiques de chaque reins qui filtrent le sang pour produire l'urine). Cette inflammation est produite par une accumulation dans les reins d'IgA anormalement glycosylée. Une surexpression d'APRIL dans le sérum de ces patients a été corrélée à la sévérité de la maladie [66]. Un essai clinique testant atacicept a débuté en 2017 pour évaluer la sureté, la tolérance, la dose réponse ainsi que l'efficacité chez des patients atteints de Néphropathie à IgA (NCT02808429).

La molécule TACI-Ig n'a pas été testée dans un modèle animal, en revanche le traitement par un anti-APRIL dans une souche de souris développant spontanément ce type

de maladie (souche ddy) a conduit à la réduction du taux d'IgA totales dans le sérum ainsi que de la déposition sur les glomérules [67].

Autres maladies

D'autres maladies auto-immunes associées à la présence d'autoanticorps ont révélées une surexpression d'APRIL dans le sérum [68–70]. Il est possible que d'autres maladies arborant une infiltration importante de PC au site de l'inflammation montrent de fortes évidences pour une implication d'APRIL dans leur pathogénèse. Récemment un groupe a démontré que les macrophages produisant APRIL étaient abondants dans les maladies à IgG4 (IgG4-RD, *IgG4-related diseases*) et que l'APRIL sécrétée se fixait aux PC infiltrants. Une réduction du nombre de PC après traitement avec des glucocorticoïdes à corrélée avec une réduction du nombre de macrophages produisant APRIL [71]. D'autres maladies associées aux autoanticorps sont liées à une forte infiltration de PC. Notamment l'hépatite auto-immune (HAI) et la cholangite biliaire primitive (CBP). Une étude sur des patients CBP n'a montré aucune différence dans le niveau d'APRIL sérique comparé à des sujets sains [72].

Aucune étude n'a encore été menée sur les HAI. C'est pourquoi dans cette thèse une partie s'est consacrée au rôle d'APRIL dans les HAI.

Atacicept a été testée en essai clinique dans d'autres maladies où cette fois il a malheureusement dû être stoppé à cause d'effets inattendus aggravant la maladie. Cela a été le cas pour la neurite optique (NO) et la SEP [73,74]. La NO est une maladie inflammatoire du nerf optique qui peut être présente chez des patients SEP mais également survenir chez des patients atteints de neuromyéélite optique (NMO). La NMO est une maladie auto-immune qui a longtemps été confondue avec une forme de SEP mais que l'on sait maintenant être dû à la présence d'autoanticorps dirigés contre l'aquaporine 4 [75,76]. Une étude a montré une concentration très élevée d'APRIL dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de NMO et SEP comparé à des patients sains [77]. Comme l'axe APRIL/BAFF est connu pour être important pour stimuler les réponses des LB, il était normal de penser qu'APRIL et BAFF puissent être impliqués comme facteurs clés et refléter la sévérité de la maladie.

Malgré l'échec de ces 2 essais cliniques, il nous a parus intéressant d'approfondir et d'étudier pourquoi le blocage d'APRIL et/ou BAFF entraînait un résultat néfaste. Dans la deuxième partie de ces travaux de thèse on s'est focalisé sur le cas de la SEP.

Bien que APRIL et BAFF forment normalement des homotrimères, des formes hétérotrimériques actives sont parfois retrouvées [4]. Ces formes ont été trouvées circulantes dans le sérum de patients atteints notamment de LES et PR en plus forte quantité que dans le sérum de patients sains et peuvent stimuler les LB. Il est donc possible que ces hétérotrimères contribuent au développement, à la maintenance ou à la progression de maladies auto-immunes.

Fort du rôle d'APRIL dans l'immunité humorale, le chapitre suivant abordera les dérégulations qui peuvent survenir au sein des LB et PC conduisant ainsi à l'auto-immunité.

Chapitre 2 :

Lymphocytes B et auto- immunité

I. Régulation de la tolérance lymphocytaire B

Les LB ont un rôle prépondérant dans l'immunité. Les recherches indiquant leur contribution dans l'auto-immunité a donc augmenté l'intérêt d'étudier comment ces cellules opèrent, à la fois dans les réponses humorales et dans l'immunité adaptative cellulaire. Un des rôles majeurs des LB est de générer des PB et PC sécrétant les anticorps, ainsi que des LB mémoires ayant la capacité de répondre rapidement et spécifiquement à un antigène.

Sous des conditions normales, les LB voient leur cycle de vie finement régulé par des points de vérifications à différents stades pour éviter le développement de LB autoréactifs. La tolérance centrale s'effectue dans la moelle osseuse (MO) où les LB se développent à partir de cellules souches subissant une série d'étapes durant lesquelles les gènes variables des Ig sont réarrangés afin de générer un répertoire de liaison spécifique à chaque antigène. Les LB subissent une sélection négative s'ils présentent une autoréactivité. Les LB exprimant les IgM et IgD non spécifiques à leur surface sortent de la MO pour gagner les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et deviennent des LB naïfs. Après contact avec un antigène étranger dans les follicules des OLS comme la rate et les ganglions lymphatiques, et l'aide des LT, ils subissent un nombre de réactions dans le CG permettant l'expansion clonale, le réarrangement des gènes des Ig aussi appelé hypermutation somatique et le switch isotypique des chaînes lourdes des Ig. Ces processus moléculaires uniques aux LB permettent une affinité et une spécificité de liaison largement augmentée face à l'antigène. A ce niveau, la présence de nouveaux autoantigènes non présents dans la MO oblige une seconde sélection négative appelée tolérance périphérique. Les LB avec une forte avidité à un autoantigène sont délétés alors que ceux qui ont une faible ou très faible avidité se retrouvent en anergie ou ignorés, respectivement. A la fin de ces réactions dans le CG, seulement les LB avec une forte spécificité pour un antigène étranger survivent et se différencient soit en LB mémoires ou en PC producteurs d'anticorps (figure 8).

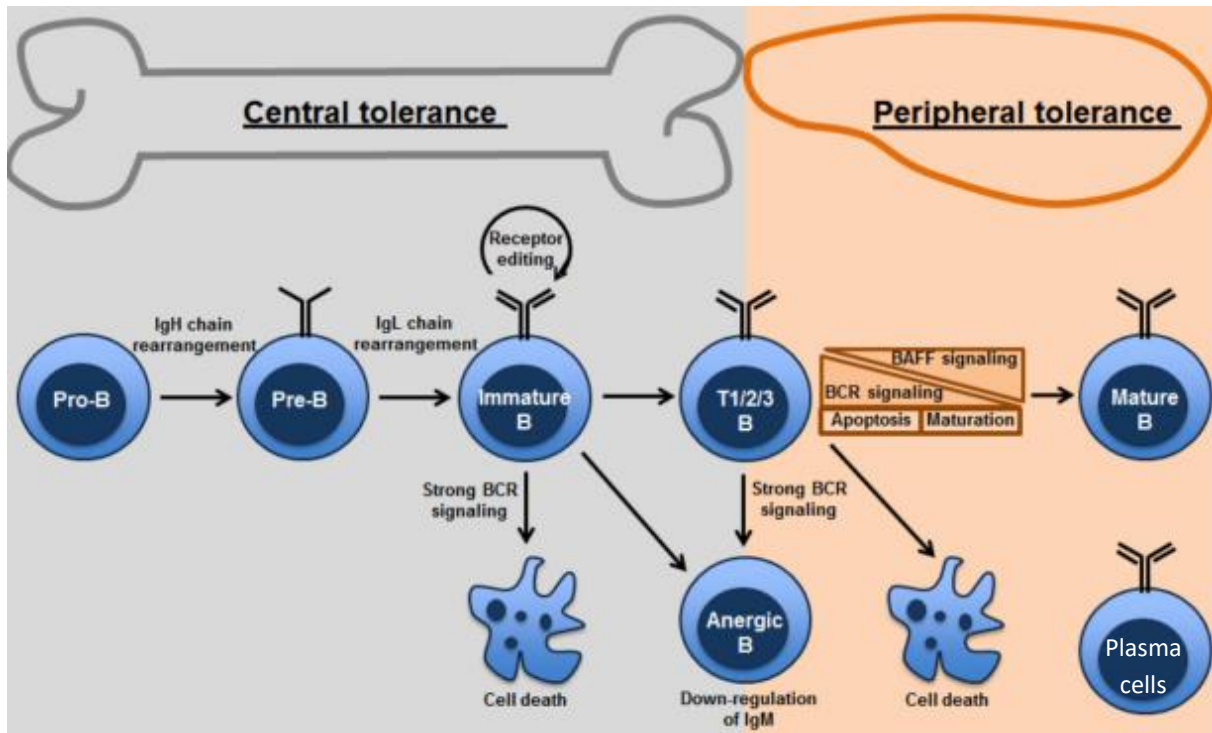


Figure 8 : Développement et différenciation des LB

Mécanismes de tolérance des LB dans la MO et en périphérie. La délétion clonale et l’anergie sont deux mécanismes utilisés aussi bien en central qu’en périphérie. La force de la signalisation via le BCR affecte le sort du LB lors de la tolérance. Le réarrangement des gènes des Ig apparait premièrement dans la MO. Les LB transitionnels (T1/2/3) sont retrouvés dans la MO et la rate. La tolérance périphérique a d’abord lieu dans la rate où le seuil de signalisation est défini par le BCR et où BAFF délivre des signaux de survie. (Schéma adapté de Gururajan et al, 2014)

I.1 Rupture de la tolérance B dans l’auto-immunité

Malgré une suppression efficace et importante de LB auto-réactifs et 2 points de contrôles au niveau de la tolérance centrale et périphérique, certains LB auto-réactifs échappent à la tolérance et se retrouvent dans la circulation systémique. Mais quels mécanismes peuvent être impliqués dans le défaut de tolérance B ?

a) Signalisation

La reconnaissance d’un auto-antigène se faisant par le BCR (*B-cell receptor*), la signalisation joue donc un rôle essentiel dans le contrôle et la sélection des LB auto-réactifs. Une signalisation anormale via le BCR a notamment été reportée dans le LES [78]. Cette étude montre d’aberrants signaux de transductions très tôt dans le LB, en augmentant la phosphorylation des résidus tyrosine médié par la liaison au BCR. Un autre défaut peut aussi provenir d’une surexpression ou d’une diminution de molécules stimulatrices et inhibitrices

du signal BCR. La molécule CD19 est une molécule de surface du LB qui décroît le seuil de stimulation du BCR. En sur-exprimant cette molécule chez des souris, un niveau augmenté d'anticorps sérique et une activation des LB accrue ont été retrouvés, alors que la suppression de CD19 a inversée ce phénotype [79]. Une perte de molécules inhibant la signalisation BCR conduit à une augmentation de cette signalisation et a initié le développement d'auto-immunité chez la souris. C'est le cas pour le récepteur FcγRIIB, qui est normalement exprimée sur les LB où il régule l'activation des signaux BCR [80–82]. Chez l'homme, son importance dans l'auto-immunité a été appuyé car les patients atteints de LES ont une expression basse de FcγRIIB à la surface des LB. Ce qui serait dû à un polymorphisme du promoteur de FcγRIIB [83] ou du récepteur lui-même [84].

b) Ig auto-réactives

La génération d'Ig auto-réactives durant le processus d'hypermutation somatique peut aussi être en cause. Le nombre important d'hypermutations somatiques pour la maturation d'affinité des Ig peut par inadvertance entraîner le développement d'Ig auto-réactives.

c) Survie des LB

Une augmentation de la survie des LB auto-réactifs est aussi impliquée. En effet, BAFF décrit précédemment, est un facteur de survie des LB et sa surexpression chez des souris transgéniques a engendrée une expansion de LB périphériques avec un niveau plus élevé d'auto-anticorps entraînant des maladies auto-immunes comme le lupus [85]. De plus, une concentration sérique élevée de BAFF a été retrouvée chez des patients atteints de PR, de LES et SS [86–88].

I.2 Cause de la rupture de la tolérance B dans l'auto-immunité

Toutes ces étapes importantes dans la tolérance B peuvent être sujettes à un défaut par des mutations génétiques et des facteurs environnementaux.

a) Facteurs environnementaux

Une infection peut fortement être impliquée en rompant la tolérance périphérique. En effet l'exposition à un antigène du soi au système immunitaire se fait à cause d'une rupture des barrières cellulaires et vasculaires, d'une importante mort cellulaire par nécrose ou encore

par l'activation « bystander » de macrophages et LT, fournissant ainsi des signaux de co-stimulations.

Un autre processus appelé mimétisme moléculaire est largement impliqué dans l'activation des LB et LT auto-réactifs. Il est défini par des similitudes de séquences entre les autoantigènes et les antigènes d'un micro-organisme, ou constituant de la nourriture. Etant suffisamment similaires, cela induit une réaction croisée de la réponse immune.

L'auto-immunité pourrait également survenir à cause d'une surexpression aberrante d'une molécule du soi à la surface cellulaire. En effet, l'environnement interne créé en présence de cancers ainsi que les dommages provoqués par les tumeurs sont à l'origine d'une défense immunitaire mal organisée/conduite contre le cancer et sont associés au développement de maladies auto-immunes.

b) Les risques génétiques

Toutes les maladies auto-immunes ou non peuvent survenir dû à des prédispositions génétiques. La première piste est que la susceptibilité génétique peut être spécifique du tissu et de la maladie avec une réponse dirigée envers un autoantigène particulier. Les gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) déterminent quels autoantigènes sont présentés au système immunitaire, les gènes codant la spécificité des récepteurs antigéniques sur les LB et LT influencent quelles molécules sont attaquées, et les gènes peuvent aussi influencer la susceptibilité d'un tissu cible en particulier à une attaque auto-immune.

La seconde est une susceptibilité générale à l'auto-immunité à travers les gènes qui influencent l'apoptose, la tolérance ou les réponses inflammatoires. Ces gènes expliquent la tendance des auto-immunités familiales. Notamment la protection contre l'auto-immunité ou la susceptibilité dépend des allèles présents ou non chez les individus. C'est le cas pour le diabète de type 1 et la PR. De plus en plus, la susceptibilité génétique aux maladies auto-immunes est étudiée par l'identification de variants alléliques [89].

II. Fonctions des LB dans l'auto-immunité

La complexité des régulations immunes entraîne parfois des dysfonctionnements et anomalies menant à une perturbation des fonctions de ces LB. Ces perturbations sont

impliqués à la fois dans les maladies traditionnellement médiées par les anticorps mais aussi celles par les LT et peuvent conduire aux maladies auto-immunes. La figure 9 montre les fonctions des LB pouvant contribuer aux maladies auto-immunes. Ces fonctions vont être discutées dans les paragraphes suivants.

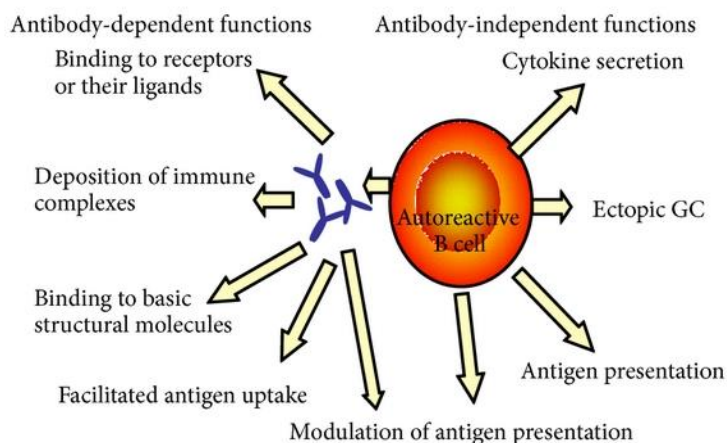


Figure 9 : Fonctions des LB dans l'auto-immunité

II.1 Les autoanticorps

La présence d'autoanticorps circulants est généralement retrouvée dans beaucoup de maladies auto-immunes et font d'eux d'excellents marqueurs au diagnostic ou éléments de prédiction pour une maladie. Les autoanticorps eux-mêmes sont parfois pathogéniques.

a) Complexes immuns

Les complexes immuns formés par les autoanticorps et autoantigènes sont une caractéristique importante dans plusieurs maladies auto-immunes dont la PR, le LES. Ces complexes peuvent entraîner l'activation du système du complément et des fonctions effectrices dépendantes des récepteurs Fc (RFc). Soit la partie Fc de l'autoanticorps se lie aux différents composants du complément (C1q) déclenchant la cascade du complément, ce qui attire les cellules comme les neutrophiles ou les cellules natural killer (NK). Il y a relargage d'enzymes protéolytiques et de cytokines inflammatoires. Soit le complexe immunitaire peut directement se lier sur les RFc présents à la surface des cellules effectrices conduisant à la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependent-cellular cytotoxicity*).

b) Stimulation et inhibition de la fonction des récepteurs

Les autoanticorps peuvent affecter certaines fonctions de récepteurs. En se liant à ces récepteurs, ils bloquent ou stimulent leur fonction. C'est le cas par exemple des autoanticorps du récepteur de la TSH (*thyroid stimulating hormone*), qui une fois fixés, stimulent ce récepteur et entraînent la libération d'hormones thyroïdiennes conduisant au développement de l'hyperthyroïdie dans la maladie de Basedow [90]. L'effet inverse se produit dans l'hypothyroïdie auto-immune, où cette fois les autoanticorps bloquent la fixation de la TSH sur son récepteur et empêchent ainsi la sécrétion des hormones thyroïdiennes [91]. D'autres exemples d'autoanticorps bloquants sont retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes telles que la myasthénie, où le blocage des récepteurs à l'acétylcholine empêche la neurotransmission à la jonction musculaire conduisant aux symptômes de fatigue et faiblesse musculaire [92] ou encore la neuropathie [93]. Parfois les autoanticorps peuvent aussi cibler les ligands de ces récepteurs comme c'est le cas pour les autoanticorps anti-TSH pour éviter leur liaison au récepteur [94].

c) Absorption de l'antigène

Les autoanticorps peuvent faciliter l'absorption des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les monocytes et DC via les RFc présents à leur surface [95]. Ce mécanisme est très efficace et permet une concentration d'antigène très basse pour stimuler les LT. Il a été démontré notamment pour être impliqué dans la SEP. L'absorption de la myéline par les macrophages est facilitée par les autoanticorps et inversement la suppression de la partie Fc des anticorps empêche l'absorption de l'antigène [96]. Également, il a été montré que les souris déficientes pour la sous-unité gamma (γ) du RFc (RFc γ), étaient protégées contre l'induction de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle murin de la SEP. Ceci serait dû à l'inefficacité de présentation du peptide de la myéline, suggérant que l'absorption des autoanticorps liés à la myéline par les RFc des CPA est impliquée dans la pathogénèse de la SEP [97]. Les autoanticorps peuvent aussi rompre la tolérance des LT normaux. C'est-à-dire que les autoanticorps augmentent considérablement l'absorption de l'antigène par les CPA et par conséquent l'activation des LT auto-réactifs. Ce mécanisme d'absorption facilité de l'antigène est donc critique dans la pathogénèse des maladies auto-immunes médiée par les LT.

II.2 LB comme cellules présentatrices d'antigènes

Les LB servent de CPA dans plusieurs maladies auto-immunes telles que la PR et le diabète de type 1 [98,99]. Les LB capturent spécifiquement l'antigène via leur récepteurs BCR et le présente avec succès à de très basses concentrations aux LT. Dans un modèle de souris de la PR où l'arthrite est induite par les protéoglycans, les souris déficientes pour les IgM circulantes ou pour les LB ne développent pas la maladie. Les LT isolés de ces souris transgéniques exprimant uniquement des IgM membranaires sont incapables de transférer la maladie par transfert adoptif, indiquant que ces LT ne sont pas amorcés de manière adéquate et que les LB spécifiques de l'antigène sont nécessaires dans ce processus [98].

II.3 Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires

Les LB activés peuvent sécréter de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'Interleukine 6 (IL-6), l'interféron gamma (IFN- γ), et l'IL-4 [100,101]. Elles sont impliquées dans la migration des CD, l'activation des macrophages, la régulation des fonctions des LT, et fournissent des signaux pour d'avantage stimuler les LB.

II.4 Modulation de la transformation et présentation de l'antigène

Le mode de transformation de l'antigène peut être modulé à la fois par les anticorps solubles et membranaires [102,103]. Selon l'épitope antigénique qui est reconnu par le BCR sur les LB ou l'anticorps soluble, il y a différents déterminants qui peuvent être présentés aux LT sur les molécules du CMH [104–106]. En effet, la protéolyse du complexe antigène-anticorps donne des fragments protéiques qui ne sont pas présents en absence d'anticorps [107]. La présence d'un anticorps peut protéger certaines séquences peptidiques sur l'antigène de la dégradation et ainsi interférer avec le chargement des peptides sur les molécules du CMH [108]. Ce mécanisme s'est révélé dans des maladies auto-immunes, notamment la thyroïde, où les anticorps dirigés contre la thyroglobuline altèrent la transformation et peuvent booster ou supprimer la présentation de déterminants pathogéniques non dominants aux LT durant la maladie [109].

II.5 Formation de centres germinatifs ectopiques

Pendant les périodes d'inflammation chronique, les LB participent à la création de CG ectopiques dans les tissus enflammés [110]. Ces structures sont similaires aux CG des OLS et

ont été décrits dans le LES, la PR, la maladie de Basedow et de Hashimoto, le SS et la SEP [111–113]. Le rôle potentiellement pathogénique des CG ectopiques reste encore peu connu mais les PC participant et résidant dans ces CG sécrètent les autoanticorps, faisant des CG un lieu de maintenance des cellules pathogéniques et donc de la pathologie sous-jacente [114–116]. On note que les LB et LT activés qui infiltrent le site d'inflammation expriment fortement la forme membranaire de la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ qui permet la différenciation des cellules stromales résidentes en CD folliculaires, et le développement de CG ectopiques [117,118].

III. Approches thérapeutiques

Les connaissances croissantes sur le rôle pathologique des LB dans les maladies auto-immunes prouvent clairement l'intérêt d'utiliser des traitements visant à dépléter les LB. La déplétion des LB par ciblage de molécules de surface des LB peut avoir pour but l'élimination du LB ou la suppression de la survie des LB.

Le CD20 est une molécule de surface exprimée par les LB matures, les LB tumoraux mais pas les PC et l'utilisation du rituximab, un anticorps anti-CD20 permettant leur élimination a montré un réel succès dans plusieurs maladies auto-immunes [119–121]. Les mécanismes menant à la déplétion des LB combine à la fois l'ADCC, la cytotoxicité dépendante du complément (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) et l'apoptose [122]. Cependant, les risques d'infections sévères liés à la déplétion des LB sont à prendre en compte avant tout traitement [123,124].

La neutralisation des facteurs de survie spécifiques des LB comme BAFF et APRIL avec la molécule atacccept bloquant à la fois BAFF et APRIL, a ensuite montré son efficacité dans certaines maladies auto-immunes, excepté la SEP et la NO. Un anticorps bloquant spécifiquement BAFF, le belimumab a été testé chez l'homme mais jamais un antagoniste spécifique d'APRIL. On se demande donc si l'antagonisme seul d'APRIL ne vaudrait pas la peine d'être testé.

Concernant l'anti-CD20, il faut savoir que l'expression du CD20 est perdue au stade de PC comme au stade de PB [125,126]. C'est le cas également pour le récepteur BAFF-R qui n'est plus exprimé à ces stades. Dans toutes les maladies auto-immunes évoquées précédemment, la présence d'autoanticorps sécrétés par les PC est responsable des symptômes déclenchant la maladie. Par conséquent, l'utilisation du rituximab comme celui du belimumab semble inappropriée et négligeable sur les principales cellules pathogéniques que sont les PC [127–129]. En conclusion, il n'y a pas pour le moment de composé disponible ayant un effet sur les

PC à longue durée de vie dans la MO. Un intérêt et donc spécialement à envisager pour le blocage d'APRIL seul.

Une combinaison de plusieurs de ces facteurs peut intervenir et conduire à la dérégulation de la tolérance B centrale ou périphérique et par conséquent déclencher certaines maladies auto-immunes. Comme décrit précédemment dans le chapitre 1, de précédentes études ou essais cliniques nous ont conduits à nous intéresser plus particulièrement à deux maladies auto-immunes : l'HAI et la SEP qui vont être décrit dans les deux chapitres suivants.

Chapitre 3 :

HAI

I. Hépatites auto-immunes (HAI)

I.1 Epidémiologie des HAI

La plus ancienne description d'une forme de maladie chronique du foie date de 1942 [130]. Ces observations avaient été reportées davantage chez les femmes et caractérisées par une augmentation sérique de protéines et une hyper-gammaglobulinémie. Décrite par la suite par Waldenström et Kunkel dans les années 50, elle a été connue sous des noms différents, dont l'hépatite chronique active, la cirrhose des jeunes femmes et l'hépatite à plasmocytes [131]. Elle portera aussi le nom d'hépatite lupoïde due aux similarités cliniques et biologiques avec le LES [132]. Une dénomination commune à toutes ces entités a été introduite en 1992 sous le terme « d'hépatite auto-immune » par le Groupe International des Hépatites Auto-immunes (IAIHG, *International Autoimmune Hepatitis Group*) [133]. C'est une maladie inflammatoire chronique qui peut apparaître à tout âge et chez toutes origines ethniques mais qui touche plus fréquemment les femmes avec un sexe ratio Femme : Homme de 3,6 : 1. Elle est considérée comme rare avec une incidence moyenne de 1-2/100 000 et une prévalence estimée à 11-17/100 000 en Europe [134]. Pour la grande majorité des cas, un traitement par immunosuppresseur est très efficace et l'espérance moyenne de vie est comparable à celle de la population normale. En revanche, certains patients peuvent présenter des formes très aiguës et une transplantation est nécessaire mais le pronostic vital atteint maintenant 80% [135].

L'HAI est une maladie chronique du foie liée à une réaction immunitaire dirigée contre les hépatocytes. Elle est caractérisée par une hypergammaglobulinémie, des auto-anticorps circulants définissant deux types d'HAI, une hépatite d'interface et une infiltration lymphoplasmocytaire importante en histologie. Enfin une réponse favorable à l'immunosuppression confirme le diagnostic. Toutes ces caractéristiques seront discutées dans les paragraphes suivants. En l'absence de traitement, elle évolue vers la cirrhose et le décès.

I.2 Physiopathologie des HAI

L'étiologie de la pathologie n'est pas complètement élucidée mais l'hypothèse implique une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux.

a) Facteurs de prédisposition

Facteurs génétique

L'HAI est une maladie complexe polygénique. Etant donné qu'elle est susceptible de survenir dans différentes ethnicités, les associations génétiques à la maladie peuvent varier selon la population étudiée. Plusieurs gènes influencent les manifestations cliniques, la réponse au traitement et le pronostic général de la maladie mais le plus commun reste le HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Le HLA-DR3 (allèle DRB1*0301) et HLA-DR4 (DRB1*0401) sont les principaux facteurs de susceptibilité dans la population Nord-Européenne. Chez les patients japonais on retrouve l'allèle HLA-DRB1*0405 et l'allèle DRB1*0404 chez les mexicains. Le HLA-DR4 est aussi reconnu pour être associé au genre féminin, moins sévère et un âge de début de la maladie plus tardif [136].

D'autres gènes en dehors du CMH ont été étudiés. Notamment le CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) où une plus forte proportion de base guanine a été retrouvée chez des patients atteints d'HAI de type I [137]. Récemment, d'autres *loci* ont été identifiés grâce au *genome-wide association study* (GWAS) [138].

Facteurs environnementaux

Comme facteur déclencheur, on retrouve également l'exposition à des agents viraux ou médicamenteux. Le mécanisme de mimétisme moléculaire a été impliqué chez des patients HAI ayant été précédemment infectés par le virus de l'hépatite A, B, C ou E. De même, certains médicaments comme la Minocycline, l'Infliximab ont été proposés pour induire l'HAI [139].

b) Pathogénèse

Malgré une compréhension de la pathogénèse encore évasive il est admis que l'HAI est liée à une réaction immunitaire contre les hépatocytes. Les mécanismes potentiellement impliqués sont illustrés en figure 10. L'initiation commencerait avec la présentation d'un peptide antigénique du soi aux LT naïfs (Th0) via le T-cell receptor (TCR). Cette présentation se fait grâce aux CPA comme les macrophages, CD et LB. Certaines études montrent que la présentation aux LT CD4⁺ et CD8⁺ peut se faire localement dans le tissu étant donné que le foie est un organe qui possède plusieurs populations de CPA spécialisées dont les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie), les CD et les cellules endothéliales sinusoidales du foie. Ceci expliquerait que le foie soit un site primaire d'activation des LT par cross-présentation [140,141]. Après présentation et avec la présence de signaux de co-stimulations appropriés, les Th0 s'activent et subissent une différenciation dépendante des cytokines du milieu en Th1, Th2 ou Th17. A la suite de cela, on aura une activation des LT CD8⁺ produisant l'IFN- γ , permettant la surexpression des molécules du CMH de classe I et II sur les hépatocytes, ceci conduisant à l'activation continue des LT et aux dommages permanent des hépatocytes [142]. L'IFN- γ participe également à la différenciation des monocytes en macrophages qui contribuent à l'augmentation des NK [143]. On peut aussi avoir une maturation des LB en PC et par conséquent la production d'auto-anticorps impliqués dans l'ADCC [144]. D'ailleurs, dans les HAI la présence de différents auto-anticorps circulants est retrouvée et la composition de ces auto-anticorps permet de définir deux sous-types d'HAI : le type I et le type II qui seront décrit plus tard, mais le rôle pathogénique de ces auto-anticorps n'est pas encore établi [145]. Pour les Th17, elles ont été montrées pour être élevées dans la circulation et dans le foie des patients HAI, cependant leur implication est encore sous investigations [146].

Un défaut d'immuno-régulation peut également être mis en cause dans la pathogénèse de l'HAI. L'immunosuppression en périphérie sur les CPA et LT effecteurs est exercée par les T regs. Des études ont démontrées le lien entre des T regs déficients et les maladies auto-immunes dont l'HAI [147]. Les T regs venant de patients HAI ont des défauts dans la capacité de contrôle de la prolifération des CD4 et CD8 comparé aux T regs venant de patients HAI en rémission ou de sujets sains [148]. Une rupture de la tolérance pourrait donc favoriser l'HAI.

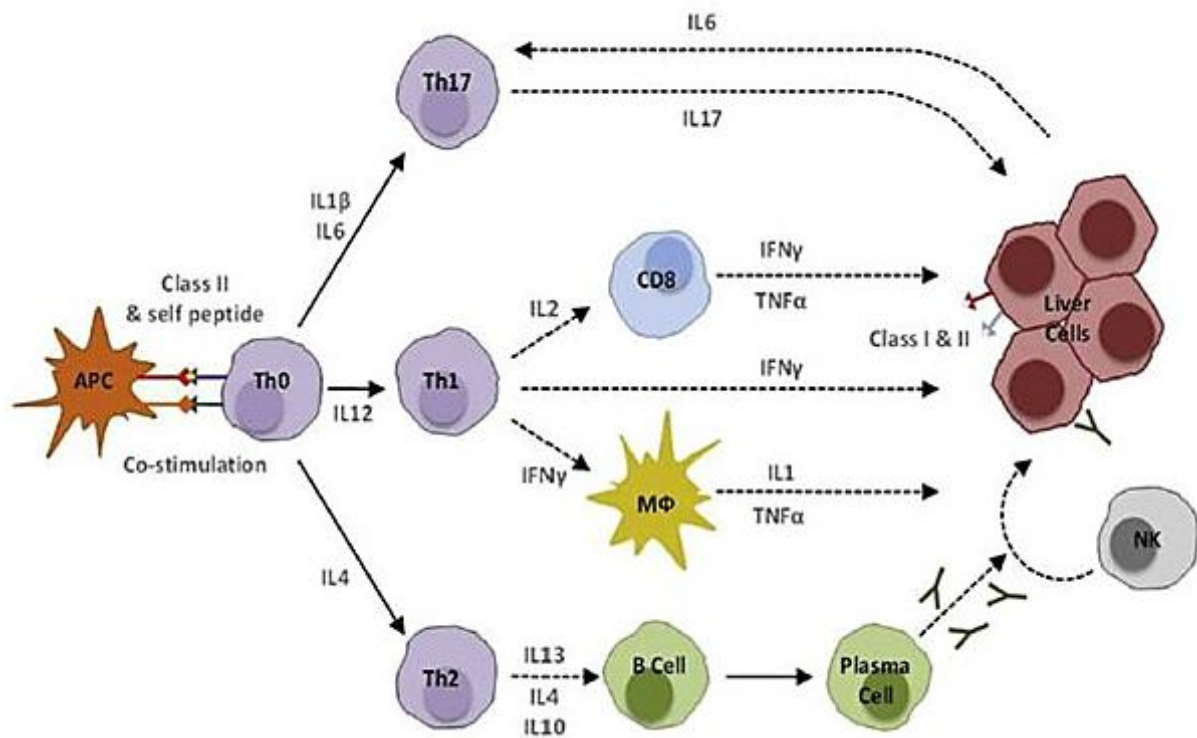


Figure 10 : Mécanismes de la pathogénèse de l’HAI

Les dommages hépatiques sont initiés après présentation de l’auto-antigène par les CPA aux LT Th0. La différenciation en LT compétents (Th1, Th2 et Th17) dépend des cytokines présent dans le milieu. Chaque type cellulaire contribue ensuite aux dommages hépatiques soit directement par les cellules cytotoxiques CD8⁺, macrophages et auto-anticorps produits par les PC ou indirectement via l’activation du complément et des cellules NK par ADCC (Schéma de Liberal et al, 2012).

II. Diagnostic

Il n’existe pas de signe clinique ou symptomatique capable de caractériser spécifiquement à lui seul la maladie. Le diagnostic de l’HAI repose sur un panel de caractéristiques cliniques, biochimiques, immunologiques, et histologiques, et l’exclusion d’autres pathologies hépatiques, en s’appuyant sur des scores internationaux.

II.1 Caractéristiques cliniques, biologiques et histologiques

a) Clinique

L’HAI peut se présenter sous plusieurs formes : chronique ou aiguë, asymptomatique ou avec des symptômes aspécifiques. Plus d’un tiers des cas sont asymptomatiques et leur

découverte est fortuite, un autre tiers des cas présentent des symptômes plutôt aspécifiques comme :

- malaise
- anorexie
- perte de poids
- nausées
- asthénie
- ictère fluctuant
- douleur à l'hypochondre droit
- démangeaisons

En général, l'examen clinique est normal mais on peut retrouver parfois une hépatomégalie ou une splénomégalie. Le pronostic dépend essentiellement du délai d'initiation du traitement, c'est pourquoi un diagnostic rapide de l'HAI est nécessaire même si pour le moment le diagnostic des HAI reste tardif. Environ un tiers des cas sont diagnostiqués à un stade avancé, souvent au stade de cirrhose où le pronostic vital est négatif.

On peut également soupçonner une HAI car elle peut être associée à d'autres maladies auto-immunes présentes avant le diagnostic HAI ou apparaître durant l'évolution [149].

Le plus fréquemment on retrouve :

- thyroïdite de Hashimoto
- maladie de coéliqua
- arthrites
- maladies inflammatoires de l'intestin

Certaines sont plus rares comme :

- Diabète de type 1
- PR
- vitiligo

b) Biologie

Le diagnostic repose énormément sur les analyses biologiques. Les analyses sanguines mettent en évidence plusieurs critères dont :

- **L'augmentation des transaminases** : les valeurs généralement retrouvées chez un patient HAI sont comprises entre 1.5 et 30 fois la valeur normale supérieure (VNS) et peut parfois atteindre 50 fois la VNS dans les formes aiguës. Les transaminases sont des enzymes localisées dans les cellules de plusieurs organes et très abondantes dans le foie. Elles reflètent en cas d'élévation, une lésion cellulaire au niveau du foie, cœur, reins ou muscles car elles sont relâchées dans la circulation sanguine après lyse des cellules. On distingue deux types de transaminases, les aspartate amino-transférases (ASAT) ou alanine amino-transférases (ALAT). Les valeurs normales se situent entre 8 et 30 unités internationales (UI)/L de sang pour les hommes et entre 6 et 25UI/L pour les femmes concernant les ASAT. Le taux d'ALAT est situé entre 8 et 35UI/L pour les hommes et entre 6 et 25UI/L pour les femmes. En revanche le taux d'élévation des transaminases n'est pas corrélé à la sévérité de la maladie.

- **L'augmentation de la bilirubine** : la bilirubine est un pigment jaune présent dans la bile, produit de dégradation de l'hémoglobine et est en faible quantité dans le sang. La bilirubinémie est parfois élevée dans les HAI et peut être associée à l'augmentation des phosphatases alcalines. Ces données peuvent également être augmentées dans d'autres maladies cholestatiques comme la cholangite sclérosante primitive (CSP) ou la CBP.

- **Hypergamma-globulinémie** : dans environ 85% des cas on retrouve une élévation du taux d'IgG qui est compris entre 1.5 et 3 fois la VNS qui est de 10-12g/L de sang. L'évaluation de la rémission des patients passe par le suivi du taux d'Ig car il est corrélé à l'amélioration de l'activité des patients [150].

- **Présence d'auto-anticorps** : elle représente un des éléments clés dans le diagnostic des HAI. En effet on retrouve différents types d'auto-anticorps dans le sérum, permettant de mettre en évidence deux types d'HAI (figure 11). Cependant leur pathogénicité n'est pas démontrée contrairement à d'autres maladies auto-immunes comme le LES et PR.

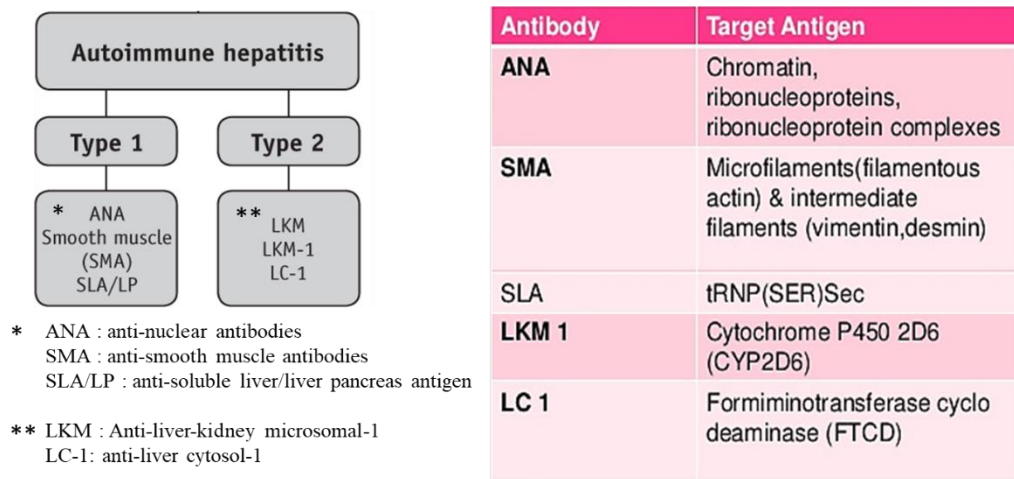


Figure 11 : Tableaux des auto-anticorps dans l’HAI

Selon le type d’auto-anticorps retrouvés dans le sérum, on distingue l’HAI de type 1 et celle de type 2. Chaque auto-anticorps reconnaît une cible différente.

Dans l’HAI de type 1, 75% des patients expriment ces auto-anticorps mais ils sont aspécifiques de la maladie car les ANA peuvent également être retrouvés dans d’autres maladies et chez des patients sains et les SMA réagissent à plusieurs éléments du cytosquelette dont l’actine-F.

L’HAI de type 2 représente environ 10% des HAI et est plus fréquente chez l’enfant. Elle est souvent plus sévère avec une réponse amoindrie au traitement et un risque de rechute plus élevé. Les auto-anticorps retrouvés dans ce type 2 reconnaissent des cibles bien identifiées mais sont toujours aspécifiques de l’HAI car ils peuvent être retrouvés chez des patients atteints d’hépatite C notamment [151].

Il existe 10% des patients HAI qui sont séronégatifs. L’apparition des auto-anticorps peut se faire parfois plusieurs mois après le diagnostic en cas d’hépatite aigüe inaugurale. Le suivi immunologique de ces patients est donc intéressant. Ils ont une bonne réponse au traitement comme ceux du type 1 [152].

c) Histologie

La biopsie hépatique est généralement faite avant tout traitement et est déterminante dans le diagnostic de l’HAI. Elle sert à l’établissement du score METAVIR, établi par l’IAIHG et correspond à l’activité de l’HAI pour chaque patient. L’activité, faisant référence à la sévérité de l’HAI, est donnée en fonction de deux composantes appelées nécrose parcellaire (NP) et nécrose lobulaire (NL) (figure 12).

stade	Nécrose parcellaire (NP)
0	Aucune
1	Minimale, Inégale
2	Légère impliquant une partie ou tous les espaces portes
3	Sévère impliquant tous les espaces portes et peut présenter une nécrose en pont

stade	Nécrose lobulaire (NL)
0	Aucune
1	Nécrose occasionnelle et peu de lésions hépatocellulaires
2	Lésions hépatocellulaires proéminentes et diffuses

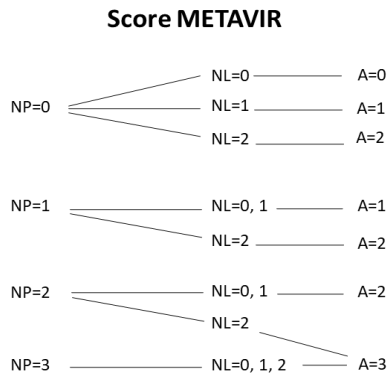


Figure 12 : Score METAVIR

Le score METAVIR définit un grade d'activité (A) de 0 (aucune) à 3 (sévère) en fonction de la sévérité de l'HAI. Elle se compose de la nécrose parcellaire (NP) de 0 à 3 et de la nécrose lobulaire (NL) de 0 à 2.

- **L'hépatite d'interface ou NP** (figure 13A) : ce sont des lésions nécrotico-inflammatoires au niveau péri-portal. Elle est présente chez 84 à 98% des patients mais n'est pas spécifique de l'HAI et peut être présente dans les hépatites virales ou médicamenteuses. On distingue 4 stades en fonction de l'intensité de la nécrose

- **L'hépatite centro-lobulaire ou NL** (figure 13B) : souvent présente dans les formes aiguës, elle peut disparaître pendant l'évolution de la maladie. On distingue 3 stades selon les dommages au niveau hépatocytaire

On retrouve d'autres caractéristiques histologiques importantes :

- **L'infiltration lymphoplasmocytaire** : Une forte infiltration inflammatoire de LT CD4⁺, LT CD8⁺, de LB et de PC et une caractéristique clé dans le diagnostic des HAI. Cependant dans un tiers des cas cette infiltration est absente.

- **Les signes de régénération** : le parenchyme hépatique subit une désorganisation des travées hépatocytaires sous forme de « rosettes » due à la régénération du tissu (figure 13C).

- **L'empériplase** : c'est un autre signe évocateur de la maladie qui se présente sous la forme de la pénétration de lymphocytes intacts dans le cytoplasme d'un hépatocyte (figure 13D).

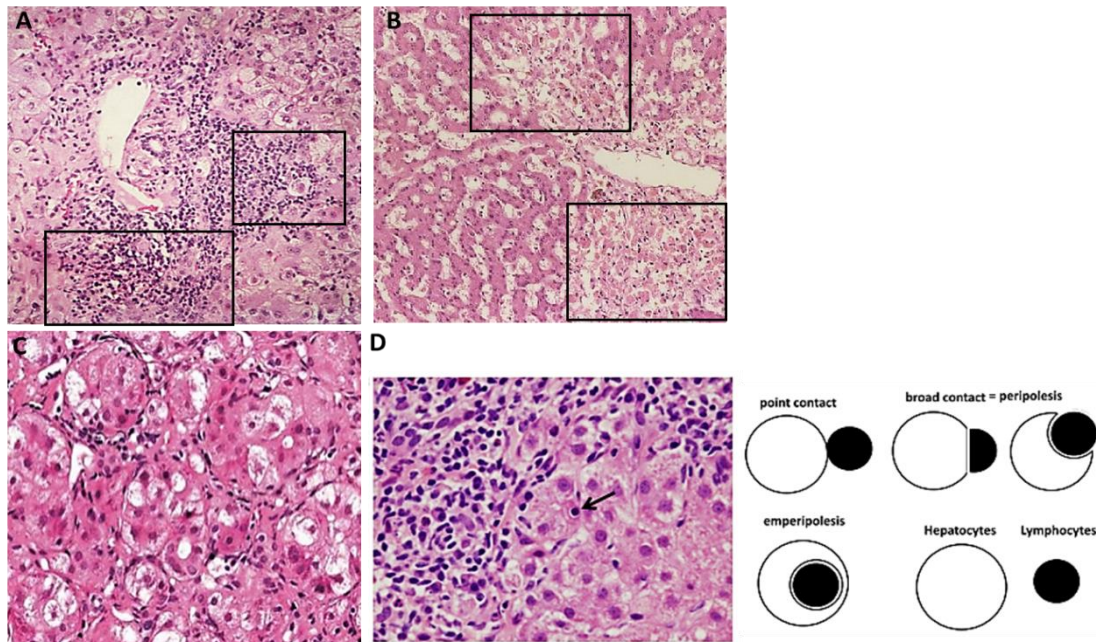


Figure 13 : Histologie du foie lors d’HAI

Images représentatives de A) nécrose parcellaire (carrés noirs), B) nécrose lobulaire (carrés noirs), C) formation de « rosettes » par les hépatocytes en régénération et D) phénomène d’empériopolèse (flèche) retrouvé chez les patients HAI.

La biopsie permet également de mettre en évidence ou d’exclure toutes autres maladies. En effet, la présence de cholangite, de stéatose ou de granulome peut être décelée. On peut associer au diagnostic HAI un syndrome de chevauchement avec une CBP ou une CSP [153].

II.2 Syndrome de chevauchement

Certaines HAI peuvent présenter simultanément ou consécutivement des caractéristiques cliniques, biologiques, et histologiques de CBP ou CSP et inversement. Pour décrire ces associations on utilise le terme de syndrome de chevauchement. Des lésions biliaires sont présentes chez 5 à 11% des patients avec une HAI typique [154]. Un diagnostic de syndrome de chevauchement doit être suspecté en présence de lésions cholestatiques ou de non réponse au traitement initial ou rechute. Les formes cholestatiques sont explorées par imagerie de résonance magnétique (IRM) biliaire. L’examen de la biopsie reste l’argument de base pour le diagnostic d’un syndrome de chevauchement même si on ne retrouve pas de spécificité de lésions dans ces cas.

On peut également trouver la coexistence avec une hépatite virale. Le risque est d’éliminer à tort une HAI lorsque l’on a une sérologie virale positive et ainsi de ne pas traiter pour l’HAI. Avec les nouveaux traitements de l’hépatite C sans IFN, il est plus facile de traiter

d'abord l'hépatite virale puis l'HAI. Il est important de réaliser un bilan auto-immun et de faire une évaluation attentive de la biopsie pour identifier la présence de deux causes d'hépatites.

Un diagnostic d'HAI peut être confondu avec une hépatite médicamenteuse. L'élément principal est l'historique d'exposition aux médicaments qui peuvent induire l'HAI. Dans certains cas on retrouve des hypersensibilités comme de la fièvre, une hyper-éosinophilie et des éruptions cutanées. L'activité histologique est souvent moindre. Le suivi continu de ces patients va permettre de différencier ces deux types d'hépatites : les corticoïdes peuvent être interrompus sans rechute dans les hépatites induites par les médicaments, en revanche à l'arrêt des corticoïdes la rechute est quasiment inévitable lors d'une HAI typique.

III Traitement

L'une des caractéristiques de l'HAI est sa corticosensibilité. Le traitement basé sur l'utilisation d'immunosuppresseurs se fait à long terme et le but est d'obtenir une rémission complète et de prévenir la progression de l'atteinte hépatique. Les HAI modérés à sévères ont un pronostic très péjoratif sans traitement.

Le traitement basique est la corticothérapie avec ou sans azathioprine. L'efficacité de la corticothérapie seule ou combinée est similaire, en revanche la bithérapie engendre beaucoup moins d'effets indésirables [155]. L'azathioprine seule cause elle une mortalité élevée [156] et n'est donc pas recommandée. Le schéma de traitement est adapté individuellement et est présenté en figure 14.

Après un minimum de temps de traitement, la rémission est obtenue dans 65% des cas à 18 mois et 80% des cas à 3 ans. La rémission est définie par une normalisation des IgG et des transaminases. Une persistance des transaminases est souvent prédictive d'une rechute à l'arrêt du traitement. Lorsque la réponse au traitement est rapide avec une normalisation complète des transaminases et IgG après son instauration, la biopsie n'est pas requise pour prouver la réponse au niveau histologique. Étant donné que la procédure de biopsie est une méthode invasive, elle n'est pas nécessaire lors du suivi des patients, uniquement en cas d'effets indésirables ou de réponse incomplète aux immunosuppresseurs.

Monothérapie

Corticoïdes (2,5-10mg/jour) ou Azathioprine (50-100mg/jour)

Bithérapie

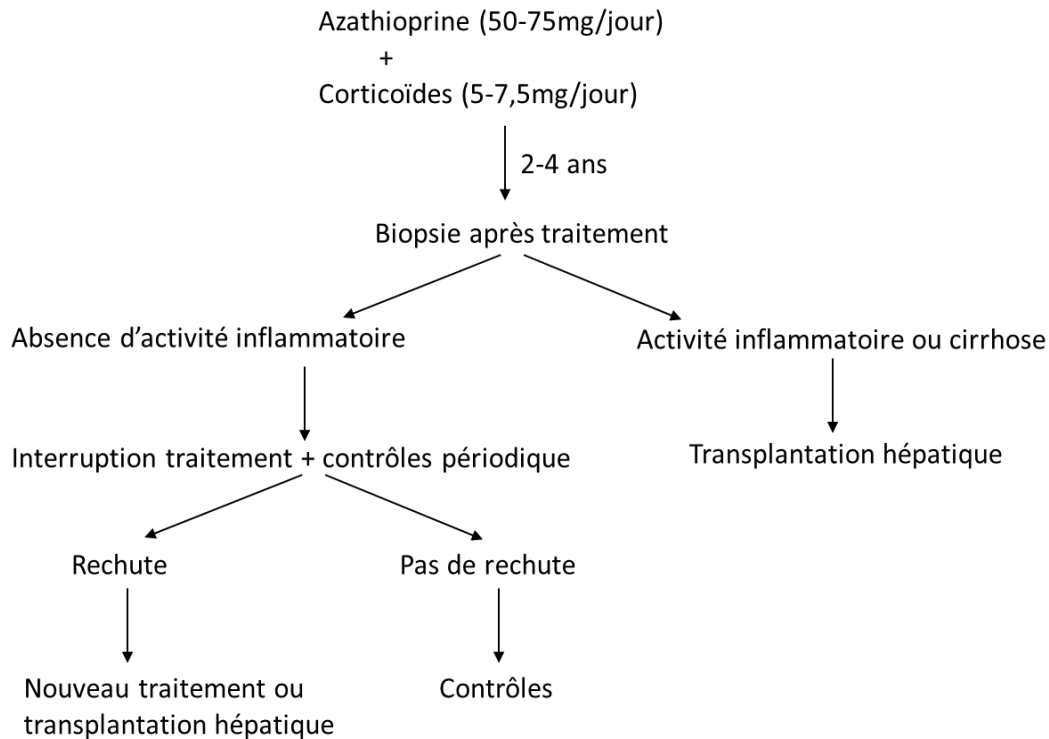


Figure 14 : Schéma du traitement conventionnel des HAI

Une non-réponse est rare. Elle est caractérisée par l'absence de diminution de 25% du taux de transaminases au bout de 2 semaines. Les patients avec une insuffisance hépatique sévère lors du diagnostic, et aucune amélioration de la bilirubine sous traitement doivent être surveillés rapidement et évalués pour une transplantation hépatique sinon le risque de décès est élevé. Pour les patients sans insuffisance hépatique sévère et encéphalopathie, la posologie est augmentée ou alors une modification du traitement est effectuée. On distingue deux types de non-réponse : l'échec thérapeutique et la réponse incomplète.

Echec

L'échec thérapeutique se définit par une aggravation des paramètres cliniques, biologiques et/ou histologiques. Environ 7% des cas montrent un échec suite au traitement conventionnel. Les facteurs de risques sont multiples [157] :

- début de la maladie avant 40 ans
- hépatite fulminante
- ictère au diagnostic

- absence d'amélioration des transaminases après 2 semaines de traitement

Réponse incomplète

On retrouve une amélioration des paramètres cliniques, biologiques et histologiques mais sans normalisation complète. Le but est d'avoir une activité biochimique minimale avec le moins d'effets indésirables possibles. La posologie d'azathioprine peut être majorée ou un traitement alternatif peut être administré.

La rechute est fréquente à l'arrêt du traitement, de 50 à 90% des cas et survient généralement dans l'année de l'arrêt. On la caractérise par une élévation des ALAT supérieure à 3 fois la VNS et une augmentation des IgG peut apparaître.

Traitements alternatifs

Si la plupart des patients répondent au traitement conventionnel, certains présentent un échec thérapeutique, une réponse incomplète ou encore des intolérances et effets indésirables, nécessitent une adaptation du traitement. Un traitement alternatif est alors discuté :

- le mycophénolate mofétil (MMF) est un inhibiteur de inosine monophosphate déshydrogénase, et a un effet anti-prolifératif des LT et LB. C'est une alternative efficace aux intolérances à l'azathioprine.
- tacrolimus et cyclosporine sont des inhibiteurs de la calcineurine. Leur efficacité a été démontrée dans des petites séries de patients réfractaires au traitement conventionnel et en particulier chez les enfants.
- transplantation hépatique est faite en dernier recours et la survie à 10 ans des patients atteint plus de 70 à 80%. Une rechute après transplantation hépatique est possible allant de 17 à 42% des patients [158].

Effets indésirables

La corticothérapie à long terme peut être responsable de nombreux effets indésirables comme l'acné, vergetures, prise de poids, cataracte, hypertension artérielle, ostéoporose et décompensation psychiatrique. La bithérapie avec l'azathioprine permet de diminuer ces

effets et quand la tolérance le permet, une augmentation de la posologie de l'azathioprine permet de diminuer la corticothérapie et donc ses effets indésirables.

25% des patients présentent une intolérance à l'azathioprine. On note des réactions allergiques, syndrome pseudo-grippal, nausées, malaise, douleurs abdominales, hépatotoxicité. Le MMF est un alternatif de choix dans ces cas.

IV Modèles animaux

Les modèles animaux reflétant toutes les caractéristiques d'une HAI n'existent pas. Un bon modèle animal doit être déclenché par un évènement initiateur bien défini conduisant à l'inflammation chronique et la fibrose. Deux modèles utilisent la CYP2D6, cible de l'auto-anticorps LKM-1 présent dans l'HAI de type 2. Une étude utilise un plasmide contenant la région N-terminale de la CTLA-4 murine avec la région antigénique de la CYP2D6 humaine. L'immunisation se fait chez les souris C57BL/6 femelles et elles montrent une élévation du taux d'ALAT. Une infiltration inflammatoire portale, péri-portale et intra-lobulaire est observée en histologie. La présence de LT CD4⁺, CD8⁺ et LB est retrouvée dans le foie. Ce modèle décrit l'HAI de type 2 humaine et est expliqué par mimétisme moléculaire [159]. Une autre étude utilise des souris transgéniques CYP2D6 dans le but de rompre la tolérance. Les souris sont infectées avec un adénovirus exprimant la CYP2D6 humaine. Une infiltration cellulaire, une nécrose hépatique et une histologie semblable au HAI est générée [160]. Bien entendu d'autres modèles animaux existent, chez le rat notamment et sont répertoriés dans la revue de Christen U en 2018.

Les modèles animaux sont utiles pour améliorer la compréhension de la pathogénèse des HAI et peut aussi aider à explorer de nouvelles possibilités de thérapies et préventions.

Chapitre 4 :

SEP

I. Sclérose en plaques (SEP)

I.1 Historique et définition de la SEP

C'est au XIII^e siècle que le premier cas mettant en évidence des troubles de la parole, des problèmes moteurs de type tremblements et de locomotion suivi de périodes de récupération aurait été décrit. Cette femme appartenant au peuple Viking présentait à cette époque, pour la première fois, des symptômes similaires à ceux de la « sclérose en plaques », terme n'étant pas encore employé à cette époque. Depuis, d'autres cas évoquant ces mêmes types de symptômes et une paralysie lente des membres sont apparus à travers l'Europe.

En 1835, le professeur et anatomiste Jean Cruveilhier fait une description de lésions caractéristiques du cerveau et de la moelle épinière qu'il appelle « sclérose en taches ou en îles ». Des illustrations de ces lésions par le docteur Robert Carswell en 1838, mettent en évidence des petites taches brunes à la fois dans la matière blanche et grise (Figure 15 A, B).

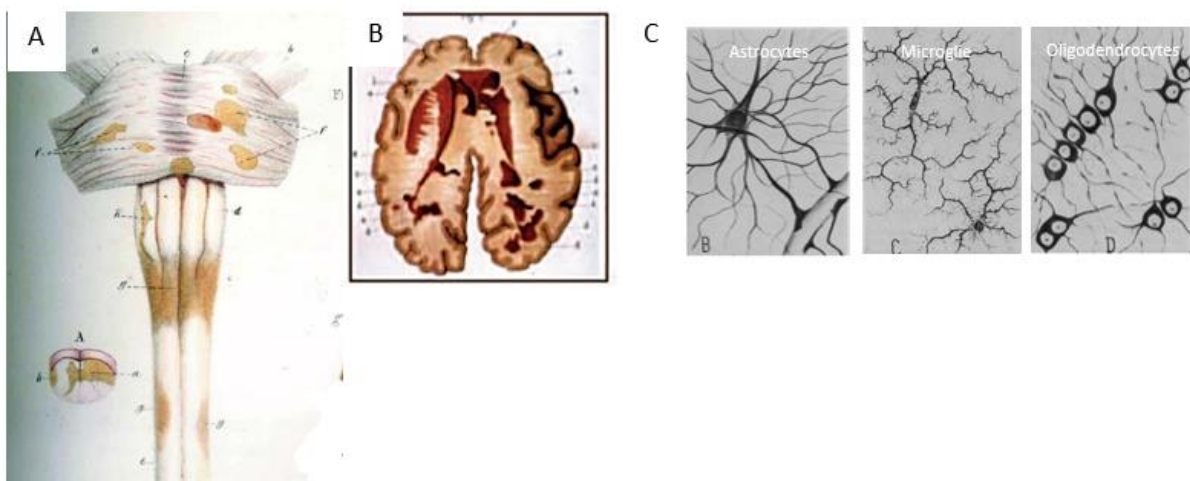


Figure 15 : Description histologique de la SEP

Dessins anatomiques par Cruveilhier et Carswell montrant les lésions de A) la moelle épinière et B) le cerveau. De petites taches brunes sont présentes dans les matières blanches et grises et décrivent pour la première fois la « sclérose en taches ou en îles ». C) Identification des cellules gliales Astrocytes, Microglie et Oligodendrocytes par Rio Hortega.

Cette première dénomination de « sclérose en taches ou en îles » faisait sans nul doute référence à la SEP de nos jours. Le terme SEP a été utilisé pour la première fois par Alfred Vulpian en 1866, « sclérose » décrivant un durcissement des tissus dans les régions atteintes du cerveau et de la moelle épinière et « plaques » un nombre important de lésions focalisées. C'est avec la participation de Jean-Martin Charcot, neurologue à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris en 1868, qu'ils décrivent ensemble pour la première fois les symptômes caractéristiques

de la maladie avec l'association de trois symptômes : trouble de la parole (dysarthrie), vision double (diplopie) ou mouvement saccadé des yeux (nystagmus), et tremblements des membres avec un trouble de la marche. Ces critères cliniques appelés triade de Charcot servant au diagnostic de la SEP à cette époque. Charcot contribuera notamment à la description d'autres pathologies neurologiques comme la sclérose latérale amyotrophique (ou maladie de Charcot).

Au XX^e siècle, la notion de préservation des axones des neurones dans les zones anciennement démyélinisées et d'inflammations péri-vasculaires sont introduite par J.D. Dawson. L'avancée dans la découverte des cellules gliales par Rio del Horta [161] telle que les oligodendrocytes, cellules produisant la gaine myéline entourant les axones, a permis une percée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie avec le processus de myélinisation/démyélinisation et remyélinisation (Figure 15 C). Malgré de nombreuses hypothèses qu'un agent infectieux (bactérien, viral, fongique) cause la maladie, les expériences menées n'ont jamais été conclusives. La probabilité d'auto-immunité comme processus physiopathologique fait son apparition avec la découverte d'un taux de gammaglobulines élevé dans le LCR en 1942 et de bandes oligoclonales en 1964.

De nos jours, l'étiologie de la SEP et son développement reste mal connu mais peut être définie comme une maladie chronique inflammatoire et démyélinisante du système nerveux central (SNC) comprenant le cerveau, la moelle épinière et les nerfs optiques. La perte de la myéline, gaine protectrice des neurones, retardent considérablement l'influx nerveux et engendre d'importants désordres neurologiques avec la perte de fonctions motrices et cognitives.

I.2 Epidémiologie de la SEP

a) Prévalence et incidence

La SEP est la deuxième cause de handicap après les accidents de la route et est la maladie neurodégénérative la plus connue. Elle touche aujourd'hui plus de 2.5 millions de personnes dans le monde, 400 000 en Europe et environ 100 000 personnes sont atteintes en France, avec une incidence¹ de 5000 nouveaux cas par an. La prévalence² est très hétérogène selon la géographie et les populations. Elle est augmentée quand on s'éloigne de l'équateur

¹ Nombre de nouveaux cas observés par an dans une population donnée.

² Nombre d'individus malades relevés dans une population à un moment donné.

vers les pôles. Elle touche de manière plus importante les personnes d'origines nord-européenne et les pays industrialisés. Cette hétérogénéité mondiale est également représentée au sein même de la France avec une prévalence plus élevée dans le Nord-Est de la France que dans le Sud-Ouest [162,163] (Figure 16 A, B, C).

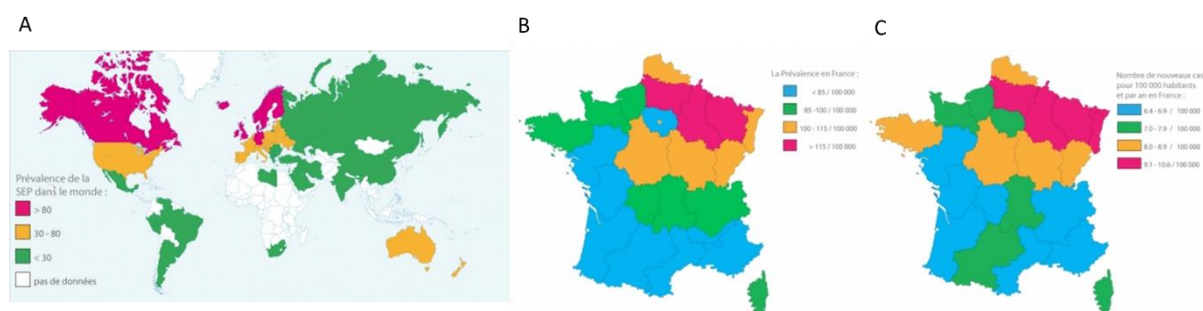


Figure16 : Prévalence et Incidence

Représentation géographique de A) Prévalence de la SEP dans le monde, B) Prévalence de la SEP en France, C) Incidence de la SEP en France (Schéma de la fondation ARSEP).

b) Age et sexe

L'âge moyen de début de la maladie se situe entre 20-40 ans dans 70% des cas. Cependant il existe des formes dites pédiatriques où l'apparition de la maladie se fait avant 18 ans et d'autres formes qui débutent après 40 ans. Parmi les personnes atteintes, les femmes sont plus souvent touchées avec un ratio femme/homme fixé à 2.6. Cette prédominance féminine reste encore aujourd'hui inexpliquée. Chez les femmes enceintes, il a été observé une baisse de la survenue des crises/poussées pendant le troisième trimestre puis une aggravation de la maladie dans les 3 mois suivant l'accouchement pour finalement revenir à l'état initial avant la grossesse [164,165].

I.3 Etiologie de la SEP

a) Facteurs impliqués dans la SEP

Les causes de la SEP restent encore inconnues. Etant donné que c'est une maladie avec une répartition géographique et ethnique hétérogène, il semblerait que la SEP est une origine multifactorielle. Une association de facteurs génétiques et environnementaux seraient impliqués.

Facteurs génétiques

Des études démontrent clairement l'implication de facteurs génétiques avec une composante héréditaire. En effet, le risque chez des jumeaux homozygotes de développer la

maladie pour l'un si l'autre est touché est de 30%, contrairement à des hétérozygotes, qui est seulement de 5-7% [166]. La plupart des gènes impliqués correspondent à des gènes de l'immunité. Notamment le gène codant pour le CMH II est le plus significativement lié à la SEP [167,168]. Les variants polymorphiques du CMH, plus précisément l'allèle HLA-DRB1*1501 avec un odds ratio³ de 3.1 présenterait une forte association avec la SEP [169,170]. Egalement d'autres allèles contribuent au développement de la maladie comme l'allèle des chaînes alpha des récepteurs à l'IL-2, IL-17 ou le CD58 [171]. On a donc une proportion importante de gènes pouvant affecter la susceptibilité de la SEP.

Facteurs environnementaux

Un panel important de facteurs environnementaux ont été décrits comme l'exposition au soleil, les infections virales et le tabac.

- ❖ **Exposition au soleil** : Plusieurs études ont clairement démontrées que l'exposition au soleil pendant l'enfance et tôt dans l'adolescence était associé à un faible risque de développer la maladie [172,173] contrairement à une insuffisante exposition entraînant une déficience en vitamine D [174,175]. Le précurseur de la vitamine D est produit par l'action des UV ou par l'alimentation et subit plusieurs transformations aboutissant à la forme active 1,25-hydroxyvitamin D qui va ensuite se lier au récepteur de la vitamine D et induire la transcription d'un nombre important de gènes. Ce facteur soleil corrèle donc très bien avec la répartition de la SEP selon un gradient Nord-Sud où la prévalence est élevée dans le nord. De plus, des études thérapeutiques visant à apporter de la vitamine D montrent une baisse de l'inflammation chez les patients SEP [176,177]. D'autres études mettent en évidence le rôle de la vitamine D sur les cellules de l'immunité et notamment sur les T régulateurs (T regs). Le taux de 1,25-hydroxyvitamin D corrélant positivement avec la fréquence et l'activité des T regs mais négativement avec les T effecteurs capables de traverser la barrière hématoencéphalique [178,179].

- ❖ **Infections virales** : Des facteurs déclenchant la SEP semblent exister. Le rôle d'un agent infectieux a longtemps fait débat mais aujourd'hui on ne peut ni affirmer ni contester l'association entre virus et déclenchement de la SEP. Chez certains patients il a été trouvé

³ L'odds ratio, également appelé rapport des chances, est une mesure statistique, souvent utilisée en épidémiologie, exprimant le degré de dépendance entre des variables aléatoires qualitatives et permet de mesurer l'effet d'un facteur.

un taux élevé d'anticorps dirigés contre certains virus comme le virus Epstein-Barr (EBV). D'autres études ont étudié l'influence d'autres virus comme le virus de l'herpès humain 6, *chlamydia pneumoniae*, le cytomegalovirus et d'autres encore [180].

L'EBV semble être le plus intéressant et essentiel dans le déclenchement de la SEP. Il est le seul virus affectant la quasi-totalité des patients SEP et son infection précède l'apparition de la SEP [181]. De plus, c'est un virus avec la capacité de vivre dans une cellule hôte toute sa vie et le seul qui infecte et modifie les LB. Le rôle de l'EBV dans l'apparition de la SEP a fait appel à plusieurs hypothèses [182,183] :

- cross-réactivité des LT spécifiques de l'EBV avec des antigènes du SNC
 - l'effet bystander : dommages secondaires causés dans le SNC suite à une attaque initial dirigé contre l'EBV
 - les LB auto-réactifs infectés par l'EBV migrent chez les personnes ayant une susceptibilité génétique dans les organes cibles et produisent des auto-anticorps. Ces cellules B stimulent les LT auto-réactifs qui vont déclencher une attaque immunitaire en recrutant des macrophages et des LB.
- ❖ **Le tabac** : Des études ont montré un lien important entre la SEP et le tabac chez les femmes fumant plus de 15 cigarettes par jour par rapport à celles qui n'ont jamais fumé, avec une incidence 2 fois supérieure [184,185]. Une étude a recensé le même résultat chez les hommes [186]. Une étude suggère que le tabagisme entraîne une conversion précoce du premier épisode des symptômes neurologiques appelé CIS (*clinical Isolated Syndrom*) en SEP [187]. Chez des patients SEP établis, le tabagisme mènerait à l'aggravation des symptômes avec une augmentation des lésions T2 en IRM chez les fumeurs comparé à des non-fumeurs [188]. Malgré des différences en termes de recrutement ou de méthodes d'analyses selon les études, elles montrent un impact du tabac dans l'apparition et/ou progression de la maladie.

b) Symptômes

Les symptômes sont extrêmement variables d'une personne à une autre, et d'une poussée à l'autre. Dans la plupart des cas, la maladie débute par un seul type de symptôme et dépend de la localisation des plaques. Les principaux symptômes sont :

- **Des troubles de la vue** : il constitue le premier symptôme dans environ 20% des cas. Les troubles causés par l'atteinte du nerf optique entraînent une vision double, une perte de la vision complète ou partielle d'un œil à la fois généralement, des douleurs oculaires lors du mouvement des yeux ou encore des mouvements involontaires.
- **Des troubles sensitifs** : des sensations anormales de fourmillements, de décharges électriques sont ressenties, en particulier lors du mouvement de la tête.
- **Des troubles moteurs** : tel que des engourdissements ou faiblesses dans un ou plusieurs membres, des tremblements et difficultés dans le contrôle des mouvements, perte d'équilibre, et spasmes musculaires.
- **Des troubles cognitifs** : troubles de la mémoire, de l'humeur et de la concentration.

Evidemment d'autres types de symptômes peuvent survenir lors de l'évolution de la maladie. On peut noter également une réactivation des symptômes neurologiques anciens en cas d'élévation de la température corporelle (fièvre, effort physique, bain chaud) mais ce ne sont pas de réelles poussées car les symptômes disparaissent une fois la température redescendue. Il s'agit d'un phénomène transitoire appelé « phénomène d'Uhthoff » [189].

c) Les formes cliniques et évolution

La SEP peut être définie selon différentes formes cliniques. Ces formes augmentent ainsi considérablement la complexité de la maladie, il est donc important de bien identifier chaque forme lors d'une étude avant de tirer des conclusions. La majorité des patients commencent leur maladie avec une poussée correspondant à un événement démyélinisant appelé CIS. Le terme CIS décrit des symptômes d'atteintes inflammatoires et démyélinisants du SNC d'une durée minimale de 24h sans fièvre, infections ou encéphalopathies. C'est un épisode isolé dans le temps qui touche généralement les jeunes adultes et peut affecter le nerf optique, le tronc cérébral ou la moelle épinière. Une fois la conversion d'un CIS en SEP déclarée, l'évolution de la maladie est différente chez chaque patient [190]. On peut distinguer 3 formes selon l'évolution du handicap au cours du temps (figure 17) :

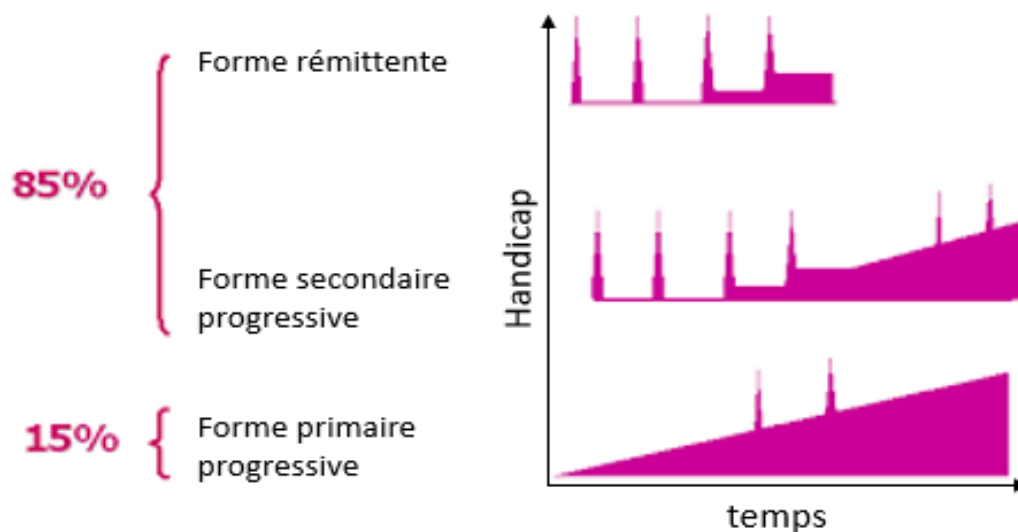


Figure 17 : Evolution du handicap en fonction du temps

Les 3 principales formes sont la forme rémittente évoluant vers une forme secondaire progressive et enfin la forme primaire progressive. Les pics représentent chaque poussée au cours du temps (Image de réseau Rhones-alpes SEP).

- **La forme rémittente ou RRMS** (*Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*), présente dans environ 85% des cas, est caractérisée par des épisodes de poussées suivis de rémissions complète ou partielle [191,192]. Une poussée est définie comme une période de survenue de nouveaux signes neurologiques ou de réapparition d'anciens symptômes durant au moins 24 h.

- **La forme primaire progressive ou PPMS** (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*). 15% des patients peuvent développer cette forme où la progression de la maladie est lente et constante, dès son diagnostic. On ne remarque pas de réelles poussées au cours du temps malgré certaines aggravations par moments [193]. Il faut savoir que les patients ayant cette forme ne répondent pas aux traitements actuels.

- **La forme secondaire progressive ou SPMS** (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis*). Après une forme rémittente au début, la maladie s'aggrave peu à peu de manière continue. L'apparition de poussées n'est pas suivie de réelles rémissions. La plupart des patients présentant une forme rémittente évolueront vers une forme progressive dans les 15 ans qui suivent le diagnostic de la maladie [194].

L'évolution de la SEP est malheureusement imprévisible et unique pour chaque patient. A la fois ni le nombre de poussées, ni le type de symptômes, ni l'âge du diagnostic ne peuvent être prévus. Certaines autres formes bénignes n'entraînent aucune difficultés physiques même après plusieurs années alors que d'autres évoluent très rapidement, invalidant fortement les patients. L'invalidité des patients ainsi que leur évolution au cours du temps sont évaluées à l'aide de l'échelle EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) présentée en figure 18. Un score global est donné en fonction des atteintes fonctionnelles des patients et permet ainsi de juger l'évolution de la maladie.

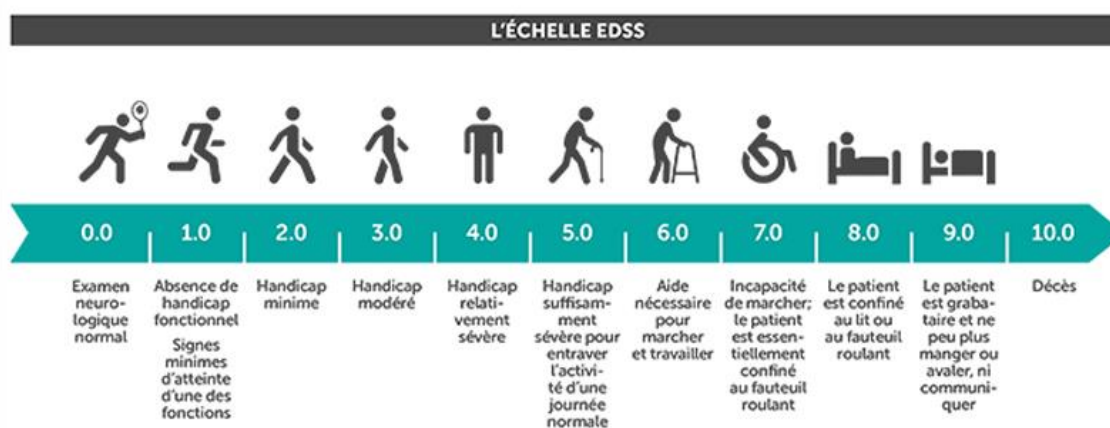


Figure 18 : Echelle EDSS : Echelle de notation du handicap

Le niveau de handicap et l'évolution de la SEP chez les patients sont évalués selon l'échelle EDSS où chaque score correspond à une ou des atteintes fonctionnelles de plus en plus importantes (Images de Medipedia SEP).

II. Diagnostic

Le diagnostic de la SEP reste quelque chose de très difficile étant donné qu'il n'existe aucun biomarqueur spécifique ou de test sanguin pour la SEP. De plus, les lésions nerveuses provoquent, comme décrit précédemment, un large panel de symptômes qui peuvent être associés à de nombreuses autres maladies et la manifestation des symptômes similaires engendrent donc souvent des erreurs de diagnostic. Un taux d'erreur d'environ 5 à 10% est observé à cause de maladies infectieuses ou inflammatoires telles que la maladie de Lyme et le LES respectivement [195,196].

Les critères diagnostiques de la SEP combinent à la fois une interprétation exacte des symptômes, des résultats d'examens physiques et cliniques et des images cérébrales par IRM [197]. Pour être plus précis chaque partie consiste en :

- **La vérification des antécédents médicaux** : Il permet d'établir un historique des problèmes ou manifestations neurologiques antérieures à l'aide d'un questionnaire médical.
- **L'examen physique** : Il sert à évaluer la vision, le tonus et la force musculaire, les réflexes, la coordination, les fonctions sensorielles, l'équilibre et la capacité à se déplacer. Une mesure des potentiels évoqués visuels peut être faite pour évaluer l'activité électrique des neurones du cortex visuel. C'est-à-dire que le temps qui se passe entre la diffusion d'un stimulus visuel et la réponse du cortex visuel est calculé. En cas de SEP la vitesse de l'influx nerveux est diminuée.
- **Les IRM** : Permet la visualisation des lésions dans la substance blanche contenant la myéline au niveau du cerveau, du cervelet et de la moelle épinière. Elles peuvent mettre en évidence une dissémination spatiale des lésions mais également temporelle avec un suivi des patients dans le temps qui permet ainsi de détecter de nouvelles lésions (figure 19).

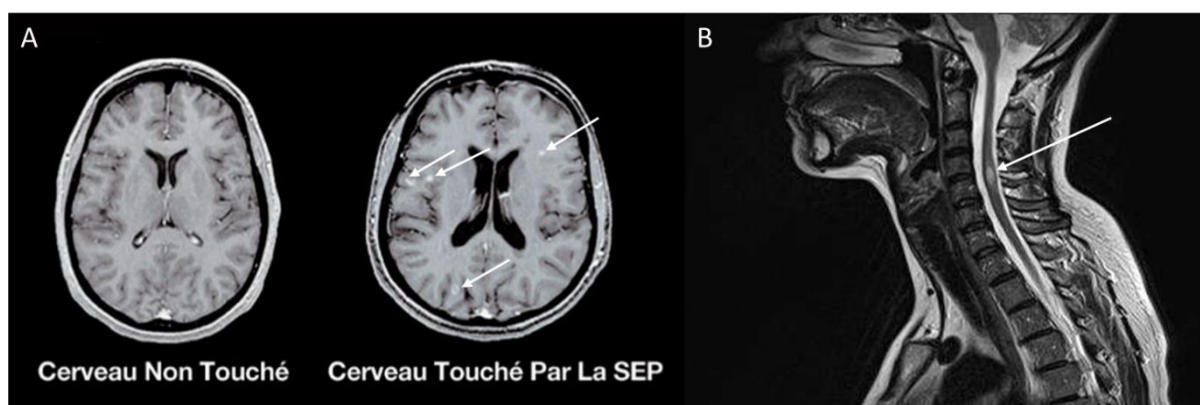


Figure 19 : IRM de patients SEP

IRM représentatives des lésions A) du cerveau chez des patients sains (panel de gauche) et atteints de SEP (panel de droite) et B) de la moelle épinière. Les flèches blanches indiquent la présence de lésions.

En général il faut avoir subi plus de 2 poussées pour confirmer le diagnostic. Il doit y avoir une atteinte de la myéline au minimum à deux endroits différents (critère d'ordre spatial) et les atteintes doivent être survenues à deux périodes différentes (critère d'ordre temporel).

- **L'examen clinique** : La ponction du LCR en lombaire permet de déterminer l'augmentation de certaines protéines ou une production anormale d'anticorps appelé bandes oligoclonales.

III. Physiopathologie

Les lésions SEP ont été mieux caractérisées avec l'autopsie des patients. On retrouve un infiltrat périvasculaire avec une expansion clonale de CD8⁺, des CD4⁺ et monocytes mais

très peu de LB et de PC [198–200]. Prineas en 1978 a également montré la présence d'Ig, du complément et de macrophages phagocytant les débris de myéline dans les lésions actives de patients. La présence d'infiltrat est généralement localisée au bord des plaques dans les lésions chroniques actives traduisant la présence d'une activité inflammatoire tout au long de la formation de la lésion [201].

Le rôle de l'auto-immunité comme facteur étiologique n'est pas complètement établi. Plusieurs modèles mécanistiques existent pour expliquer le déclenchement de la SEP :

- L'activation des LT Th1 (T helper) en périphérie par mimétisme moléculaire comme par exemple la présentation des épitopes de l'EBV qui sont très proches de ceux de la myéline. Ces LT Th1 activés vont ensuite migrer à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et vont créer un environnement inflammatoire avec le recrutement d'autres cellules immunitaires dans le SNC [202].

- Un défaut de régulation immunitaire en périphérie. On peut supposer que l'activation des LT par mimétisme moléculaire n'est pas atténuée par les mécanismes de régulation chez les patients SEP. Une plus forte expression de molécules de co-stimulation sur les CPA, un niveau plus bas de CTLA-4 (*a checkpoint inhibitor*) et une plus basse sécrétion d'IL-10 entraineraient un seuil d'activation des LT auto-réactifs plus bas et donc une activation et migration de ces LT plus rapide et en plus grand nombre dans le SNC [203].

- Une dégénérescence des oligodendrocytes suivie d'un relargage de peptides myéliniques en périphérie entraînant une activation du système immunitaire [204].

- Enfin une dérégulation de la perméabilité de la BHE irait dans le sens d'une augmentation de l'entrée des LT et LB activés en périphérie dans le SNC [205].

La SEP est une maladie à composante auto-immune où les acteurs majeurs sont les LT et les LB. C'est pour cela que les traitements utilisés dans cette maladie sont à visés immuno-modulateur.

IV. Traitements

A ce jour, aucun traitement curatif n'existe pour la SEP. Sa complexité et son étiologie inconnue sont sans doute en cause. Pour le moment, les traitements utilisés ne ciblent uniquement que la composante immunologique. On retrouve 3 types de traitements de fond : les thérapies immuno-modulatrices, immuno-suppressives et les inhibiteurs des molécules

d'adhésion visant à réduire l'activité du système immunitaire et par conséquent ralentir la destruction de la myéline. Ils sont proposés dès le début de la SEP rémittente et sont pris régulièrement même en absence de symptômes.

- **L'IFN- β** : Membre de la famille des IFN de type I, elle inhibe l'activation des CPA comme les monocytes et CD en diminuant la production d'IL-2 et IL-10 [206,207]. Elle a aussi un rôle de modulation des voies d'apoptoses et peut inhiber la migration à travers l'endothélium en diminuant l'expression de VLA-4 (*Very late antigen-4*) [208]. Avec ce traitement, le nombre de poussées est diminué et on observe un ralentissement dans l'évolution des symptômes [209]. Certains patients ne répondent pas à ce traitement et des effets secondaires pseudo-grippaux apparaissent comme la fièvre, des maux de tête, des frissons et douleurs musculaires.

- **Acétate de glatiramère** : C'est un peptide de 4 acides aminés mimant ceux présents à la surface de la myéline et agit donc comme un leurre. Il est bien toléré chez les patients atteints de RRMS, réduit de manière importante l'évolution de l'EDSS et baisse de 30% les poussées [210]. Cette molécule conduit les LT vers un profil Th2 en périphérie et au niveau du SNC [211]. Les effets secondaires sont très rares.

- **Fingolimod** : C'est un inhibiteur des récepteurs de la sphingosine 1 phosphate (S1P-R). Les S1P-R sont exprimés par les LT et les cellules du SNC comme les astrocytes, oligodendrocytes et neurones [212]. Ce traitement vise à réduire le nombre de LT naïfs et mémoires en périphérie en agissant comme antagoniste et provoque ainsi la séquestration des cellules dans les ganglions lymphatiques. On diminue ainsi l'infiltration des LT pathogènes dans le SNC. Cette thérapie réduit à la fois le nombre de poussées et le handicap, cependant des troubles cardio-vasculaires peuvent survenir car la S1P est très importante dans la vaso-régulation [212,213].

- **Natalizumab** : C'est un anticorps monoclonal ciblant la molécule d'adhésion VLA-4 qui contrôle la migration des LB et LT à travers la BHE. Sa première utilisation dans le modèle murin EAE a réduit le développement clinique des symptômes et chez les patients RRMS, une diminution des poussées et lésions actives ont été observées [214,215]. Une affection mortelle sous Natalizumab a été recensée à 1/1000 [216].

- **Rituximab** : Cet anticorps monoclonal ciblant le CD20 exprimé à la surface des LB a montré son intérêt dans les maladies auto-immunes telles que la PR, le LES et la SEP. Son administration permet de dépléter les LB en périphérie pendant plusieurs mois et aussi dans

le LCR des patients atteints de RRMS [217]. On observe encore une fois une réduction des poussées et des lésions [218].

Ces traitements ciblant soit les cellules immunitaires soit des mécanismes de réponses immunitaires montrent des effets bénéfiques non négligeables et confirment le rôle prédominant de l'auto-immunité dans la SEP. Cependant les effets secondaires observés sont parfois importants et empêche leur utilisation à long terme.

V. Etude de la SEP dans les modèles animaux

La démyélinisation caractéristique de la SEP indique une attaque de la myéline. Il existe un nombre important d'antigènes dérivés de la myéline qui pourraient déclencher la maladie. Leur capacité à induire l'EAE a été montrée et est caractérisée par la destruction de la gaine de myéline, la présence d'Ig dans le SNC et dans le LCR et enfin des lésions principalement localisées au niveau de la moelle épinière. L'EAE est étudiée dans un grand nombre d'animaux comme le lapin, le cochon d'inde, le marmoset et le macaque mais elle est plus communément utilisée chez le rat et la souris [219]. L'EAE est déclenchée à partir de 3 principaux antigènes dérivés de la myéline : la PLP (*proteolipid protein*), la MBP (*myelin basic protein*) et la MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Deux méthodes d'induction sont utilisées. La méthode active qui consiste en l'immunisation des animaux avec des extraits de SNC ou des antigènes purifiés (cités précédemment) en combinaison avec l'adjuvant complet de Freund qui va stimuler le système immunitaire, et la toxine pertussique qui va augmenter la perméabilité de la BHE. La méthode passive où l'immunisation se fait par transfert de LT auto-réactifs activés *in vitro* ou provenant directement d'animaux malades [220].

Les modèles animaux permettent d'étudier des aspects précis de la maladie. Notamment les modèles induits par des virus apportent des arguments en faveur de l'implication d'un facteur viral dans la pathologie [180]. La démyélinisation déclenchée lors de cette infection virale peut être expliquée par le mimétisme moléculaire ou un effet *bystander*. Des peptides d'origines viraux ou bactériens mimant la PLP ont été utilisés mettant en évidence cette hypothèse [221]. On a pu aussi souligner davantage le rôle déterminant du facteur génétique. En effet des souris transgéniques pour le HLADRB1*1502 développent une EAE sévère après immunisation avec de la MOG recombinante de rat [222]. La susceptibilité du gène codant la chaîne α du récepteur de l'IL-7 a également été décrite [223].

De manière générale, l'utilisation du modèle EAE permet d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie de la SEP et d'explorer toutes les hypothèses concernant son déclenchement. Ces modèles animaux sont également indispensables au développement de nouveaux traitements même si l'efficacité d'un traitement chez l'animal n'a pas toujours garanti son succès chez l'homme avec même des échecs importants conduisant à l'augmentation de la maladie [224]. Malgré l'impossibilité de représenter entièrement la maladie sur un seul modèle animal, les différentes variantes de la SEP peuvent être reproduites selon les différents auto-antigènes utilisés, les différentes souches animales et également les méthodes d'immunisations. Le choix du bon modèle animal EAE pour répondre à notre question scientifique doit donc être primordial pour se rapprocher au mieux de la maladie humaine.

PARTIE 2 :

RESULTATS

Chapitre 1 :

APRIL et HAI

I. Contexte et objectif de l'étude

L'infiltration lymphoplasmocytaire représente une des principales caractéristiques de l'HAI. Cependant les mécanismes menant à l'attraction et l'accumulation des PC ne sont pas connus. Les cytokines présentes dans le sérum peuvent être impliquées dans la pathogénèse de l'HAI via dérégulation du système immunitaire. Une étude (Migita et al, 2007) s'est intéressée au rôle de la molécule BAFF, membre également des TNF et connu pour son rôle dans la survie et maturation des LB. Le but de cette étude a été d'évaluer le niveau sérique de BAFF chez les patients HAI et de déterminer sa relation avec les caractéristiques cliniques de la pathologie. De manière globale, un niveau plus élevé de BAFF a été retrouvé dans le sérum de patients HAI comparé aux sujets sains. Une corrélation positive entre BAFF et la concentration d'ASAT, d'ALAT, et de bilirubine a été montrée. En revanche aucune corrélation n'a été démontrée entre BAFF et la concentration d'Ig. La corticothérapie a mené à la réduction importante de BAFF. Tous ces résultats leur ont permis de suggérer que BAFF contribuait au développement de la maladie.

Il n'existe aucune étude à ce jour se focalisant sur APRIL, l'autre molécule très proche de BAFF et membre des TNF. L'infiltration lymphoplasmocytaire et la présence d'auto-anticorps chez les patients HAI font d'APRIL une cible d'étude beaucoup plus appropriée dans la pathogénèse. En effet, son rôle est plus ciblé au niveau de la survie des PC, les cellules produisant les anticorps.

Nous avons donc choisi de focaliser notre étude sur le rôle plus particulier d'APRIL dans les HAI en étudiant son expression au niveau tissulaire avant et après traitement et d'évaluer la corrélation entre APRIL et les paramètres biologiques centrés sur les PC et les Ig.

Référence

Migita, Kiyoshi, Seigo Abiru, Yumi Maeda, Minoru Nakamura, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Shinsuke Fujiwara, et al. 2007. « Elevated Serum BAFF Levels in Patients with Autoimmune Hepatitis ». *Human Immunology* 68 (7): 586-91. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.03.010>.

II. Manuscrit

Cette étude a permis la rédaction d'un manuscrit soumis pour publication

APRIL produced by infiltrating myeloid cells generates a suitable environment for plasma-cell maintenance in autoimmune hepatitis lesions

L. Baert¹, S. D'Alnoncourt², B. Manfroi¹, L. David-Boudet², E.Col², T. Aoshisma³, K. Yamada³, M. Kawano³, K. Harada³, V. Leroy⁴, B. Huard¹, N. Sturm^{1,2}

Affiliations:

¹ Institute for advanced biosciences, University Grenoble-Alpes/INSERM U1209/CNRS UMR5309, La Tronche, France.

² Department of Anatomy and Cytopathology, University Hospital, Grenoble, France

³ Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa, Japan

⁴ Department of Hepato-gastro-enterology, University hospital, Grenoble, France

Author correspondence:

Pr Nathalie Sturm

Department of Pathology

Institute of Biology and Pathology

CS10217

38043 Grenoble Cedex 09

France

Nsturm@chu-grenoble.fr

Abstract

Interface hepatitis with marked plasma cell (PC) infiltration is a histological hallmark of autoimmune hepatitis (AIH). PC are believed to be the cellular source of the autoantibodies described in AIH. However, it is currently not known how PC persist in autoimmune livers. Here, we report the expression and role of a proliferation inducing ligand (APRIL), a member of the TNF superfamily involved in PC survival, in AIH. At diagnosis, neutrophils and a subset of macrophages infiltrating AIH liver produced APRIL. The number of APRIL-producing cells increased with Metavir activity, and correlated to the density of PC infiltration in the portal space. Steroid/azathioprine treatment, although not directly acting on PC, decreased the number of interface PC, simultaneously to APRIL expression. Notably, secreted APRIL was rich in the interface area, and bound *in situ* to PC, expressing the B-cell maturation antigen, one of the APRIL signaling receptors. Furthermore, recombinant APRIL improved liver PC survival *in vitro*. Taken together, our study shows that APRIL may generate a suitable environment for PC maintenance in the portal space of AIH livers.

Highlights:

- APRIL is produced by neutrophils and a subset of blood-derived macrophages in autoimmune hepatitis.
- In portal space of autoimmune hepatitis, the level of APRIL expression positively correlates with disease activity.
- Level of APRIL expression positively correlates with density of infiltrating plasma cells at diagnosis and post-treatment.
- APRIL binds to liver plasma cells and induces a survival signal.

Keywords

Autoimmune hepatitis, plasma cells, inflammation

1-Introduction

AIH is a progressive inflammatory disease of unknown etiology leading to gradual destruction of the liver parenchyma. Genetic susceptibilities, environmental factors and dysregulation of immune mechanisms have all been implicated in disease onset [1,2]. Peak incidence occurs in the second decade of life, and females are more frequently affected [3,4]. Disease prevalence ranges between 0.1 and 1.2 cases for 100 000 persons. At a biochemical level, an increase in transaminases as well as gammaglobulins (especially IgG) is detected [5]. One of the hallmark of AIH is the present of a dense infiltrate of antibody-producing plasma cells (PC) [6].

Currently, two types of AIH have been described according to the reactivity of circulating autoantibodies in patient serum [7]. Type 1 AIH is defined by anti-smooth muscle antibodies (SMA) directed against actin filaments and associated or not with anti-nuclear antibodies (ANA). Type 2 AIH, more frequent in Europe, is characterized by liver-kidney microsomal type 1 (LKM1) antibodies directed against cytochrome P450-2D6, and/or liver-cytosol type 1 (LC1) antibodies targeting formiminotransferase-cyclodeaminase (FTCD). Taking into account this definition, a some AIH patients present seronegativity at diagnosis, with <7% and 1–34% in acute/severe and chronic presentations, respectively [8]. It would be misleading to classify these cases devoid of autoantibody, since the respective patients usually harbors autoantibodies outside the diagnosis panel [9]. Hence, AIH is clearly an autoimmune disease with a dominant association to autoantibody production.

A proliferation-inducing ligand (APRIL), is a member of the TNF superfamily (TNFSF13) playing a role in humoral immunity [10]. A predominant role of APRIL has been attributed at the level of PC survival. This has been demonstrated in tissues like bone marrow and mucosa [11–15]. APRIL is first produced as a transmembrane protein, rapidly cleaved in the Golgi apparatus by furin-like proteases, leading to the secretion of an active domain, while

a transmembrane part remains within APRIL-producing cells [16,17]. The APRIL signaling receptors belonging to the TNF-receptor superfamily, the transmembrane activator and CAML-interactor (TACI, TNFRSF13b) and the B cell maturation antigen (BCMA, TNFRSF17) are expressed on cells from the B-cell lineage [18]. The goal of this study was to describe APRIL *in situ* expression in AIH, and assess its putative role on infiltrating liver PC.

2-Materials and Methods

2.1-Patients

Fifty-two patients with a diagnosis of AIH were included, retrospectively selected from the database of the department of pathology of the University Hospital of Grenoble-Alpes between 1996 and 2018. Definitive AIH was diagnosed according to the scoring system established by the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) which combined biochemical, serological and histological features following recommendations of Alvarez et al., [19]. Patients initially or late diagnosed with an overlap syndrome with primary biliary cholangitis (PBC) or primary sclerosing cholangitis (PSC) were excluded, as well as patients with other chronic hepatitis (nonalcoholic steatohepatitis, alcoholic hepatitis and viral hepatitis B, C, D, E) and previous liver transplantation. The inclusion criterion was a liver biopsy of a least 10 mm obtained at the time of diagnosis, prior to any immunosuppressive therapy. Histologically, AIH activity has been assessed according to the Metavir scoring system [20]. Twenty-two patients had paired biopsies to monitor response treatment. Patient demographics are shown in table 1. Seven Japanese patients from the Department of Human Pathology in Kanazawa University were also retrospectively studied for the presence of germinal centers (GC) as defined by a lymphocyte aggregate positive for CD21 staining as inclusion criterion. Three fresh liver biopsies were also included for *in vitro* studies. Human experimentation was performed according to the Helsinki's declaration. Samples were obtained after patients' consent.

2.2-Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded biopsies of 3µm were stained with Stalk-1 (rabbit polyclonal) and Aprily-2 (mouse IgG1) detecting APRIL-producing cells and secreted APRIL, respectively [17]. Antigen retrieval with citrate pH 6.0 was applied. Detection was based on a horseradish peroxidase (HRP)-labelled polymer conjugated with secondary antibodies (EnVision@+, Dako). An additional amplification step with tyramide (TSA) was performed according to manufacturer's instructions (Perkin Elmer). Development was done using 3-amino-9-ethyl-carbazol (Sigma-Aldrich) and counterstain with Mayer's hematoxylin (Dako). Plasma cell detection was performed with an anti-multiple myeloma oncogene 1 (MUM-1) (mouse IgG1, Dako, 1/30) with the use of an automate Benchmark XT Ventana (Roche Diagnostics). Briefly, after antigen retrieval with Tris-Borate/EDTA pH 8.4, slides were stained with anti-MUM-1 and amplified using an ultraview diaminobenzidine substrate (DAB) detection kit + amplifier kit (RD). Stained slides were scanned with Scanscope-Aperio (Leica Biosystems) at magnification x 40. Stalk-1 and MUM-1 positive cells were counted using calpix software on the entire biopsies, and cells present in portal tracts and lobules were distinguished. Cell count was reported by mm² of biopsy. Aprily-2 positive stained area was calculated using ImageJ software, in portal spaces only.

For two-color immunofluorescence stainings, Stalk-1/ CD68 (EDTA based antigen retrieval, clone PG-M1, mouse IgG3, 1/50, Dako), Stalk-1/Elastase (without antigen retrieval, mouse IgG1, 1/100e, Dako) and Aprily-2/ MUM-1 were used. PE-, Alexa-488- conjugated anti-Ig secondary reagents were used for detection. DAPI (Dako) was used for nucleus staining. Immunofluorescence stainings were visualized with an Olympus BX-41 epifluorescence microscope (Leica Biosystem).

2.3-Flow cytometry

Fresh biopsies from AIH patients were mechanically homogenized into one single cell suspension. Cells were stained for APRIL binding (Flag-tagged ACRP30headless-APRIL, 10 µg/ml, Adipogen), TACI, (clone 11H3, 10 µg/ml, Thermofisher), and BCMA (Vicky-1, 10

µg/ml, Enzo Life Sciences), followed by PE-conjugated anti-Flag (M2, Sigma) and anti-Ig secondary antibodies. For PC gating, cells were costained with APC-conjugated CD45 and FITC-conjugated CD138 antibodies (BD Biosciences). Fluorescence was analyzed by flow cytometry on an LSRII apparatus (BD Biosciences). For the *in vitro* survival assay, CD45⁺ CD138⁺ PC were sorted on a FACSAria III (BD Biosciences), seeded at 0.1 10e⁶/ml in the presence of 10 µg/ml Fc-APRILA88 (88-233) or control Fc-EDA (254-391) described elsewhere [21,22]. Living cells were counted by Trypan blue exclusion.

2.4-Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Mann-Whitney U test and Pearson's correlation coefficient was used. *In vitro* survival was analyzed by using a parametric unpaired T-test. Significant differences were defined as $p < 0.05$.

3-Results

3.1-Characterization of APRIL-producing cells at AIH diagnosis

We first studied the cell types producing APRIL in AIH lesions. A subset of CD68⁺ macrophages produced APRIL (yellow arrow, figure 1A). We also observed CD68⁻ non-macrophage cells producing APRIL (red arrow, figure 1A). We identified these cells as elastase⁺ neutrophils (red arrow, figure 1B). On the contrary to macrophages, all infiltrating neutrophils produced APRIL. This first analysis shows that neutrophils and a subset of macrophages in AIH livers produce APRIL.

3.2-PC infiltration and APRIL expression at AIH diagnosis

APRIL-producing cells were particularly abundant in patients with a severe activity (figure 2A). As AIH activity is both characterized by piecemeal necrosis (PN) and lobule necrosis (LN), we next separated portal regions and hepatic lobules. In lobules, the number of APRIL-producing cells was similar in the LN0-1 group with absent/focal necrosis and the LN2

group with bridging necrosis (figure 2B). Most of the APRIL-producing cells in low LN cases were neutrophils with a trilobated nucleus (see insert), not infiltrated in the liver parenchyma, but present in blood vessels. In lobules, no correlation existed between PC number and APRIL-producing cells. Resident kupffer macrophages characterized by an elongated shape did not produce APRIL (figure 1sup). The situation was different in portal spaces. Indeed, the PN0-1 group with a net/focal edging blade contained significantly less APRIL-producing cells than in the PN2-3 group with frequent crossings of the bordering blade (figure 2C). The mean of APRIL-producing cell number was about 4 times higher in portal spaces than in lobules when severe forms of the disease were considered. There, we observed that the PC number positively correlated with the number of APRIL-producing cells. Considering the latter, we next focused on portal spaces when we followed the fate of secreted APRIL. Secreted APRIL was barely present in low PN cases (figure 3A). In the same way than APRIL-producing cells, PN modulated the level of secreted APRIL in a grade-dependent manner, and PC number also positively correlated with the level of secreted APRIL (figure 3B). In this analysis, we observed a positive correlation between the two APRIL parameters, number of producing cells and level of tissue retention of the secreted product (figure 2sup, left panel). Taken together, these indicate that APRIL may play a role on infiltrating PC in the portal spaces of AIH liver.

3.3-PC infiltration and APRIL expression after AIH treatment

We next assessed how AIH treatment might influence PC infiltration and APRIL expression. After treatment, we still observed a strong positive correlation between APRIL production and secreted APRIL in the portal spaces (Figure 2 sup, right panel). As expected from the literature, staining of paired biopsies at diagnosis and post-treatment showed a severe decrease in PC number (figure 4A). In some patients, PC were no more detectable in any of the portal space present in the follow-up biopsy. The drop in PC was associated to a similar drop in the number of APRIL-producing cells and the level of secreted APRIL retained in the tissue (Figure 4B, C). A combined drop in these three parameters after treatment was observed in 21

out of 22 patients. Only one case (marked with a star in figure 4) showed stability in PC number. Notably, APRIL-producing cells and secreted APRIL even increased in this peculiar case. After treatment, we also observed a positive correlation between PC density and APRIL expression (APRIL production and secreted APRIL) (figure 4D). Taken together, this analysis showing a matched decline between PC number and APRIL parameters upon treatment is another argument in favor of a role of APRIL on infiltrating PC in AIH liver.

3.4-APRIL provides a survival signal to infiltrated PC in AIH

Ectopic GC formation associated to *in situ* PC generation within portal tracts may occur in AIH livers [23]. We did not find APRIL production and very little if any of secreted APRIL at the border of these GCs (figure 5A). By contrast, costaining for PC and secreted APRIL revealed that portal PC were immersed in a secreted APRIL-enriched environment (figure 5B). Some PC had even secreted APRIL bound onto their surface (figure 5B, right panel). We confirmed APRIL binding to AIH liver PC *ex vivo* by flow cytometry (Figure 5C). These PC expressed as APRIL signaling receptor BCMA but not TACI. Finally, AIH-infiltrating PC showed an enhanced survival in a short-term *in vitro* assay when stimulated with recombinant APRIL (figure 5D). Taken together, these results demonstrate that AIH-infiltrating PC are responsive to APRIL. APRIL does not play a role in their generation but rather in their survival.

4-Discussion

While AIH has been historically defined by a lymphoplasmatic infiltration in the portal space, it has been later demonstrated that myeloid cells with macrophages differentiating from infiltrating blood-borne monocytes and neutrophils also infiltrate the portal space [24,25]. Our retrospective study showed that these latter are the cellular source of APRIL. This result is highly consistent with previous reports conducted in two other autoimmune diseases, rheumatoid arthritis and IgG4-related diseases APRIL [26,27]. It is also consistent with the blood steady state situation wherein all neutrophils and a only subset of monocytes produced

APRIL [11]. The liver also contains resident macrophages, called Kupffer cells, of different origin than macrophages differentiating from extravasated blood monocytes [28]. Kupffer cells did not produce APRIL. Hence, a healthy liver will be devoid of APRIL, and it is the density of infiltrating myeloid cells that will dictate APRIL expression in AIH livers.

PC-rich interface is one histological hallmark of AIH [6]. In AIH, the density of PC infiltration is much more important than in other autoimmune liver pathologies [29]. Despite this, studies on these PC remain scarce. A previous study already reported that PC infiltration increased with AIH activity, but this correlation was not seen in the hepatic lobules containing fewer cells [30]. We fully confirmed these statements with our retrospective study. Notably, we identified the same correlations with APRIL expression both at the level of production and tissue retention of the secreted product. In addition, the number of infiltrating PC in portal spaces positively correlated with APRIL expression at diagnosis but also after treatment. We did not observe APRIL expression in ectopic GC-like structures that may form in highly inflamed portal spaces. This absence of APRIL expression was already observed in ectopic GC present in joints of rheumatoid arthritis and salivary glands of Sjogren disease [26,31]. In fact, orthotopic GC developing in secondary lymphoid organs are also devoid of APRIL expression [12,32]. Studies using sensitive RT-PCR confirmed the absence of APRIL production inside GC [33,34]. Hence, APRIL may not participate in the generation of T-dependent PC in secondary lymphoid organs and markedly inflamed autoimmune lesions. At variance with that, we demonstrated a role of APRIL at the level of extra-GC PC present in portal spaces. Indeed, secreted APRIL bound *in situ* to these PC, and we confirmed this binding *in vitro*. Portal PC expressed one APRIL signaling receptor, BCMA, and recombinant APRIL increased their *in vitro* survival. These demonstrate that APRIL provides a survival signal to portal PC in AIH.

AIH is currently treated with corticoid and azathioprine [35]. These two agents are known to reduce liver inflammation by acting on lymphocyte proliferation and leukocyte infiltration [36–38]. They are not thought to directly act on PC. This was coined very early with the observation that some liver functions are regained without any action on

hypergammaglobulinemia [39]. Our present study indicates that the decrease of myeloid-cell infiltration achieved by AIH treatment will reduce APRIL supply to PC, explaining, at least in part, the disappearance of these PC, known to be short-lived cells when not present in a supportive environment [40].

5-Conclusions

Response to corticotherapy is part of the extended criteria for definitive AIH diagnosis. Despite this AIH remains a clinical challenge, since in half of the cases the disease is relapsing. This may imply that some effector pathogenic cells escape to treatment. Along the line, it is interesting to note that portal PC have been defined as the best histological sign for relapse, at least in type 1 AIH [41]. Hence, treatment-resistant PC might be at the origin of relapse. Here, we demonstrated that APRIL is a survival factor for AIH-infiltrating PC. Hence, targeting a PC survival factor such as APRIL might be of value for the prevention of relapse in AIH.

Figure 1

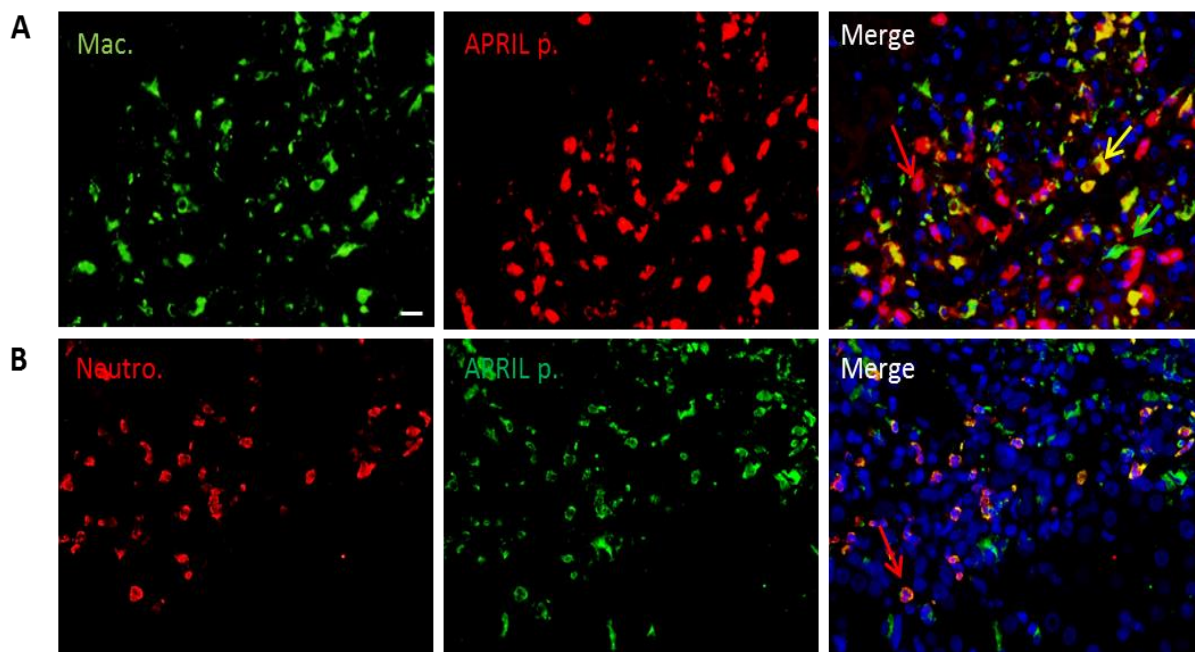


Figure 1: APRIL is produced by neutrophils and a subset of macrophages in AIH livers.

AIH biopsies were stained for APRIL-producing cells (APRIL p., stalk-1 staining) and macrophages (Mac., CD68 staining) (A) or for neutrophils (Neutro, elastase staining) (B). The merge figures contain DAPI nuclear staining. The green, yellow and red arrows show a macrophage negative for APRIL production, a macrophage positive for APRIL production and a neutrophil positive for APRIL production, respectively. Figures are from portal spaces. They are representative of four patients with a high activity (A3). Scale bar = 15 μ m.

Figure 2

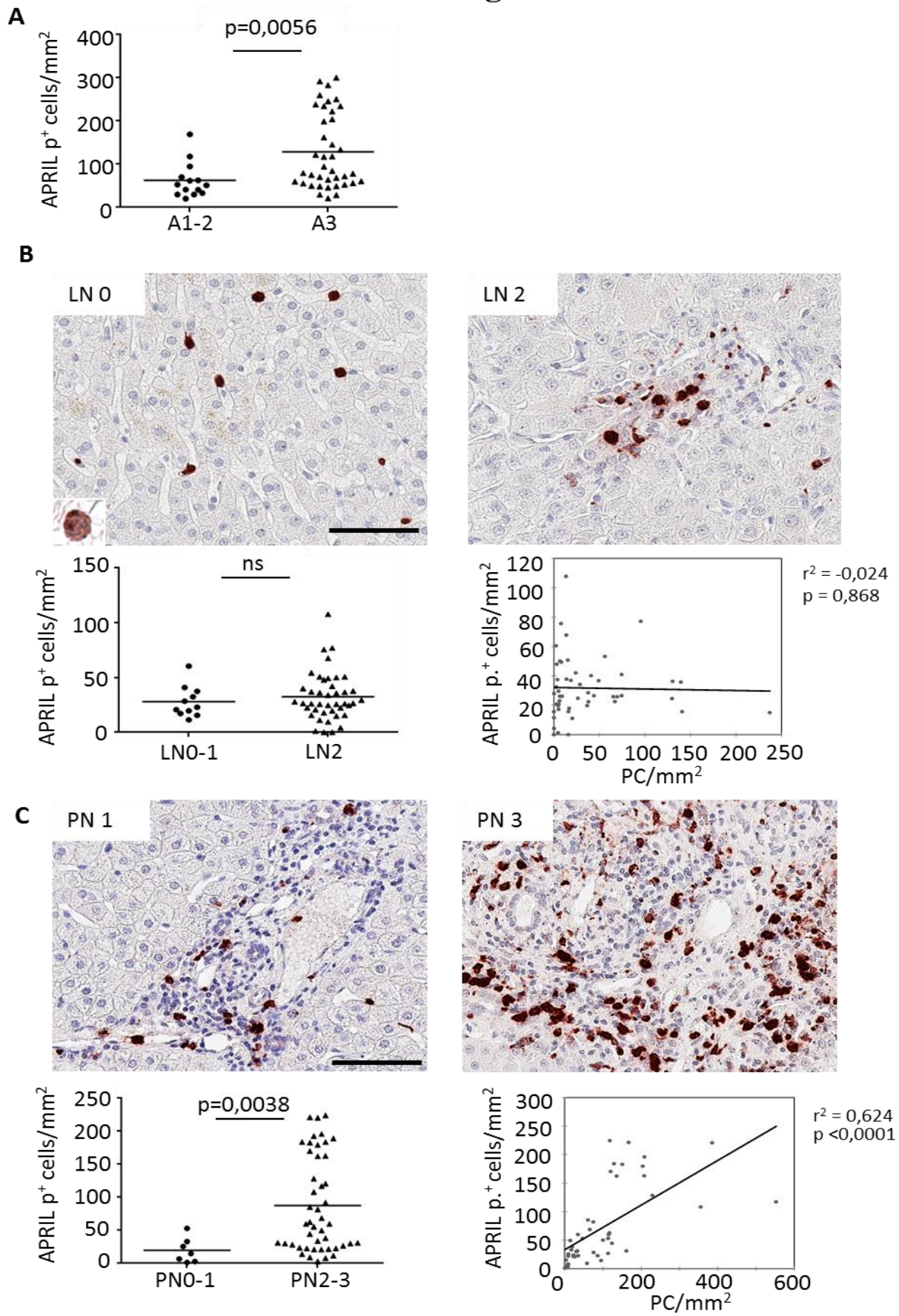


Figure 2: APRIL-producing cells at AIH diagnosis

AIH liver sections were stained for APRIL p. A) Numbers of APRIL-p⁺ cells numerated in the entire section were plotted according to disease activity. B) Stainings obtained in lobules from low and high LN representative AIH patients are shown (upper panel). Numbers of APRIL-p⁺ cells numerated in lobules were plotted according to LN activity (bottom left panel). Ns = non significant. The correlation between number of PC and APRIL-producing

Figure 3

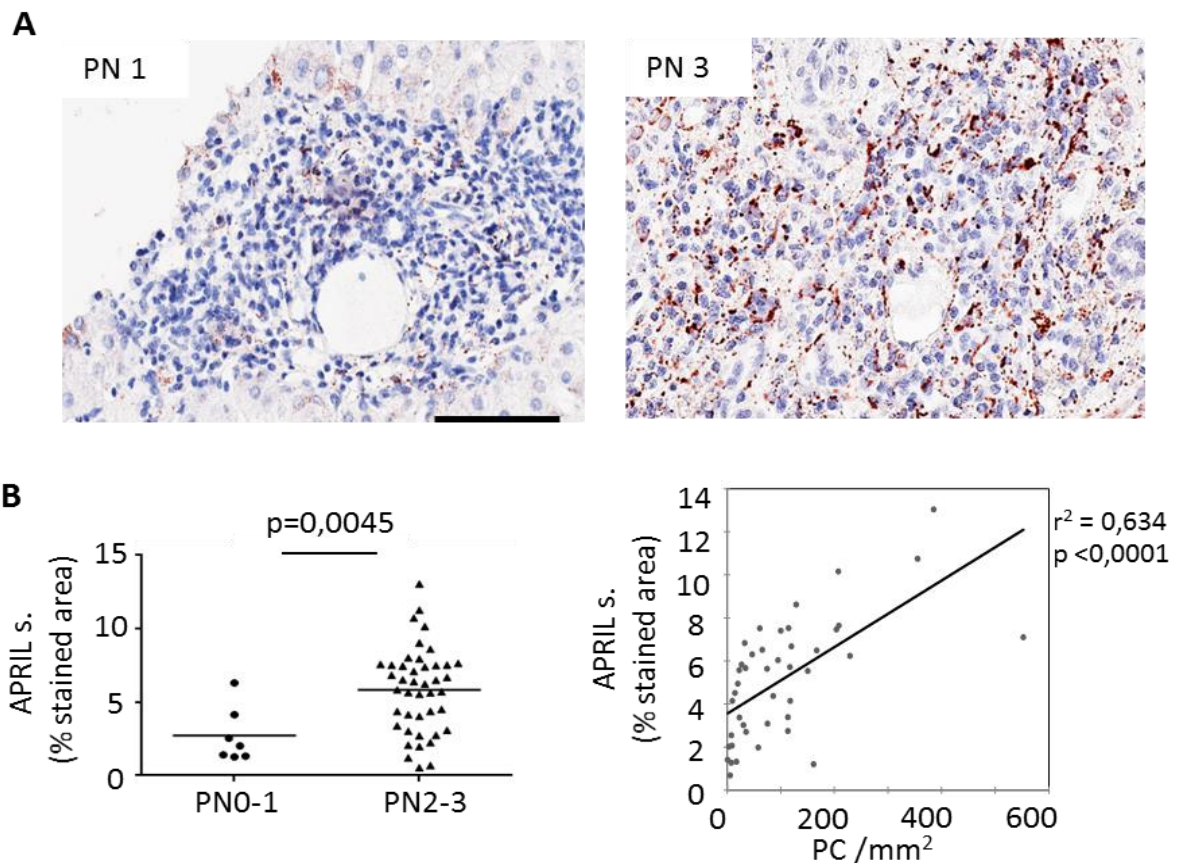


Figure 3: Secreted APRIL at AIH diagnosis

AIH biopsies were stained for secreted APRIL (APRIL s., Ap-2 staining). A) Stainings obtained in portal spaces from low and high PN representative AIH patients are shown. Scale bar = 100 μ m. B) Level of APRIL s. quantified in portal spaces was plotted according to PN activity (left panel). The correlation between number of PC and APRIL s. in portal spaces is shown (right panel).

Figure 4

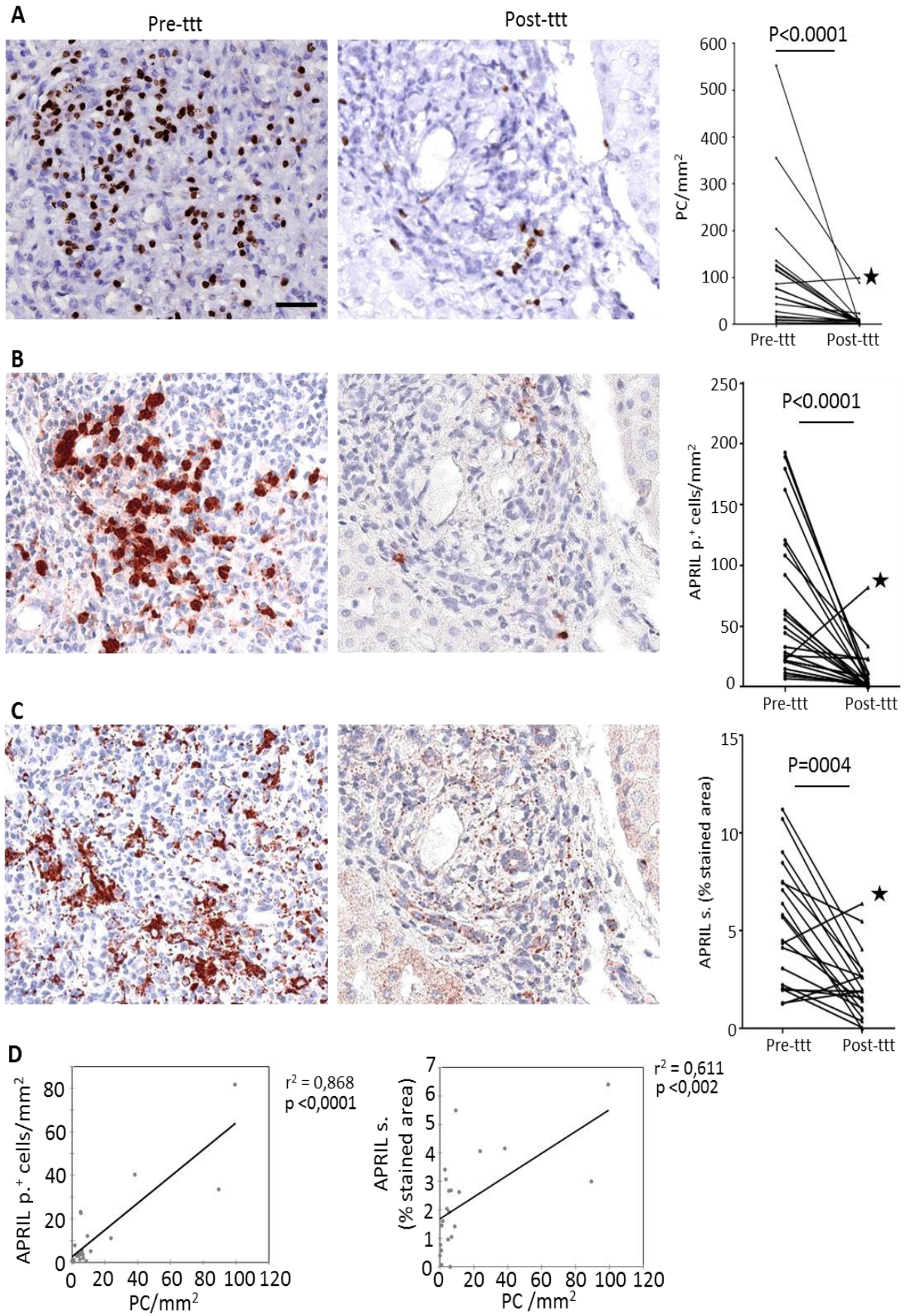


Figure 4: APRIL expression after AIH treatment

Serial sections from diagnostic and post-treatment paired AIH biopsies were stained for PC (mum-1 staining, A), APRIL p. (B) and APRIL s. (C). Scale bar =100µm. Right panels show staining quantification and statistical analyses. D) Correlation between PC density and APRILp./APRILs. is shown as in figure 2/3.

Figure 5

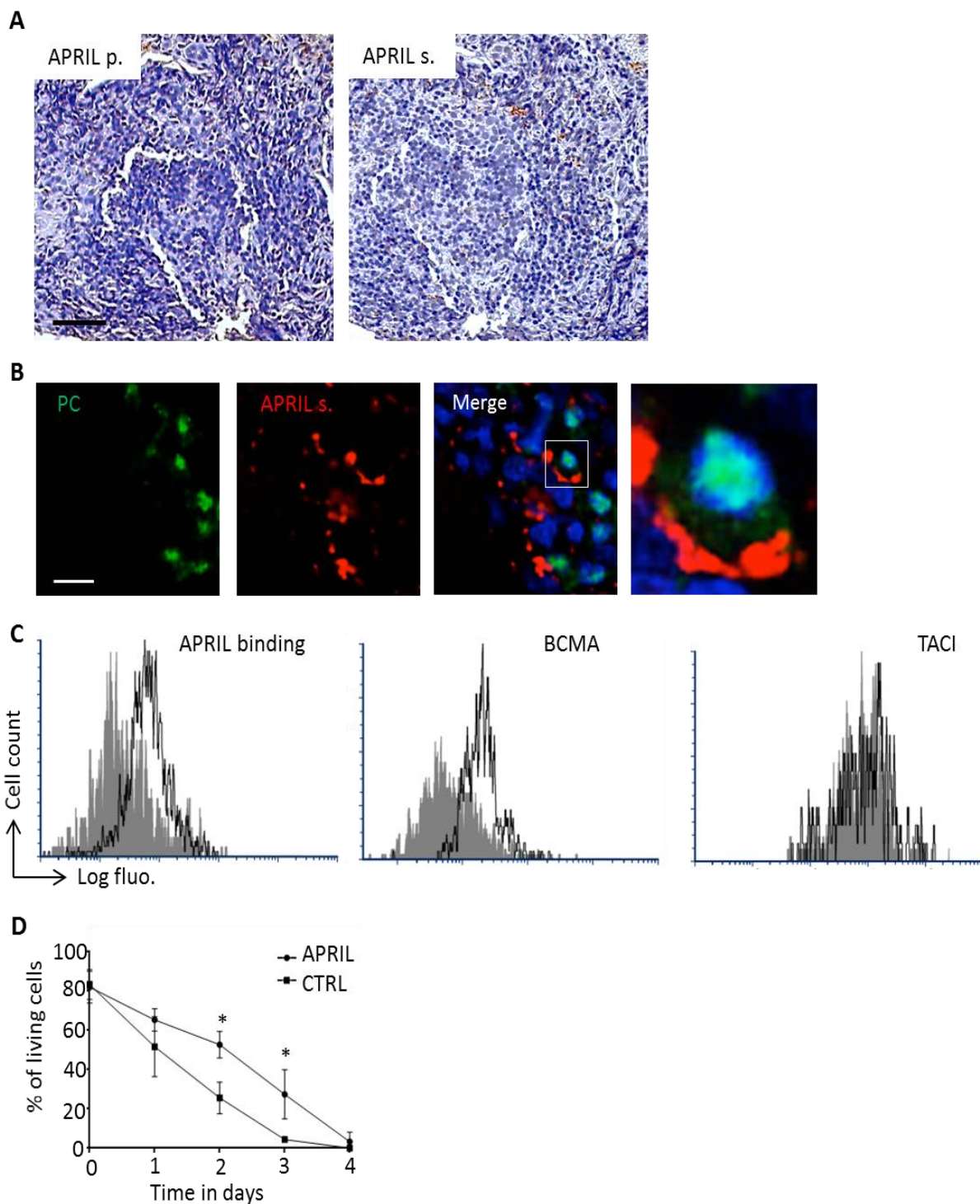


Figure 5: secreted APRIL binds and improves the survival of portal plasma cells

A) Serial sections from AIH biopsies with GC were stained for APRIL p. and APRIL s. . The figure is representative of 7 cases. Scale bar = 300 μ m. B) AIH biopsies were stained for PC (left panel) and APRIL s. (middle panel). The merge picture is also shown (right panel). Scale bar = 15 μ m. High magnification of the boxed cell is shown (far right). Merge figures contain nuclear DAPI staining. C) APRIL binding and expression of BCMA/TACI on gated CD45⁺CD138⁺ liver PC. Overlaid histogram plots are shown. Grey histograms correspond to control staining. D) FACS-sorted CD45⁺CD138⁺ plasma cells were stimulated with 10 μ g/ml of Fc-APRILA88 and control Fc-EDA. The percentage of living cells over time is shown. Means +/- SD from three independent experiments are shown. * p<0.05

Table 1

Gender				
	male			22
	female			30
Age at diagnosis (min-max)		50,9 (10-85)		
AIH type				
	I			24
	II			1
	undefined/seroneg			27
Activity grade at diagnosis		Piecemeal Necrosis	PN0-1	7
	A1		PN2-3	45
	A2	Lobular Necrosis	LN0-1	11
	A3		LN2	41
Fibrosis stage at diagnosis				
	F1			27
	F2			9
	F3			5
	F4			11
Treatment				
	corticoids + azathioprine			20
	corticoids + mycophenolate mofetil			2
	transplantation			1
Treatment duration (in months, min-max)		38 (11-103)		
Residual activity after treatment				
	A0			10
	A1			10
	A2			2

Results are shown as mean (range)

Figure 1 sup

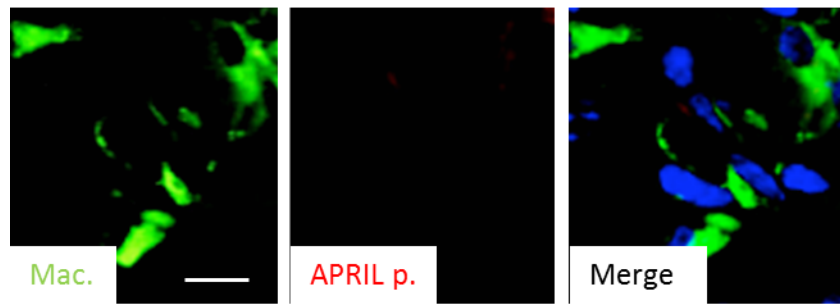


Figure 1sup: Kupffer cells do not produce APRIL

AIH biopsies were stained for macrophages (left) and APRIL-producing cells (middle). The merge picture is shown with DAPI nuclear staining (right). Scale bar = 15 μ m.

Figure 2 sup

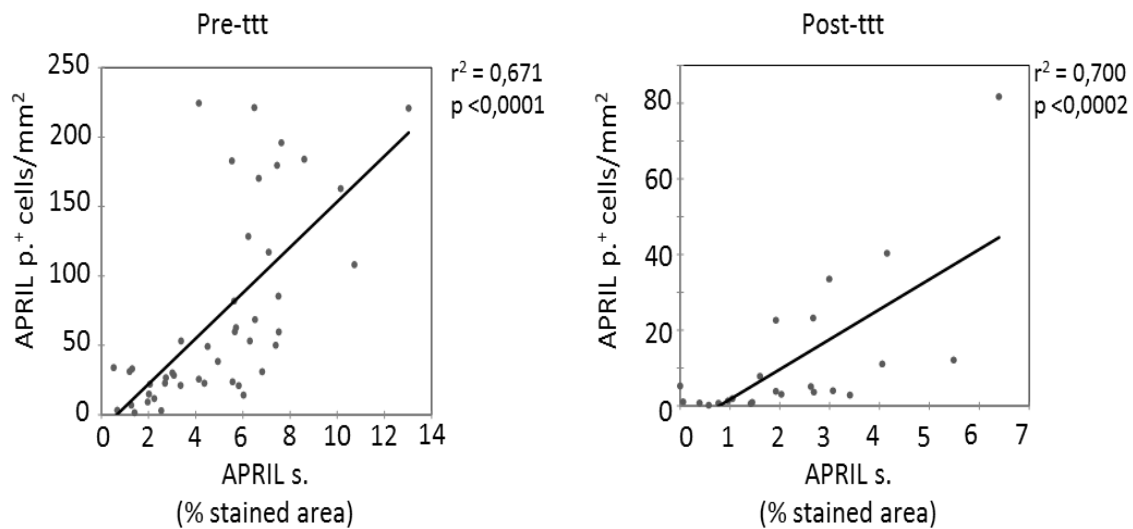


Figure 2sup: APRIL-producing cells and secreted APRIL in portal spaces of AIH pre and post treatment

Pre and post-treatment AIH liver sections were stained for APRIL-producing cells and secreted APRIL. Stainings were quantified in the portal spaces. The correlation between APRILp. and APRILs. is shown.

Acknowledgments:

This work is funded by the University Grenoble Alpes (BH), the “institut de la santé et de la recherche médicale” (BH), and the French society of hepatology (AFEF) (NS).

Author contributions:

LB, SDA, BM, LDB, EC, TA, KY performed experiments and analyzed data. KH, VL, NS provided human samples and analyzed data. LB, BH, NS wrote the manuscript. BH, NS designed the study.

Competing interests/potential conflicts of interest:

The authors declare no competing and conflict of interest.

References

- [1] M.P. Manns, A.J. Czaja, J.D. Gorham, E.L. Krawitt, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, J.M. Vierling, American Association for the Study of Liver Diseases, Diagnosis and management of autoimmune hepatitis, *Hepatology*. Baltimore, Md. 51 (2010) 2193–2213. doi:10.1002/hep.23584.
- [2] C. Jiménez-Rivera, S.C. Ling, N. Ahmed, J. Yap, M. Aglipay, N. Barrowman, S. Graitson, J. Critch, M. Rashid, V.L. Ng, E.A. Roberts, H. Brill, J.K. Dowhaniuk, G. Bruce, K. Bax, M. Deneau, O.R. Guttman, R.A. Schreiber, S. Martin, F. Alvarez, Incidence and Characteristics of Autoimmune Hepatitis, *Pediatrics*. 136 (2015) e1237-1248. doi:10.1542/peds.2015-0578.
- [3] E.L. Krawitt, Autoimmune hepatitis, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 54–66. doi:10.1056/NEJMra050408.
- [4] F. Alvarez, K. Schwarz, Immune diseases of the liver and biliary tract, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35 Suppl 1 (2002) S39-43.
- [5] C. Corpechot, O. Chazouillères, Autoimmune hepatitis: diagnostic and therapeutic up-to-date, *Rev. Med. Interne*. 31 (2010) 606–614. doi:10.1016/j.revmed.2009.05.015.
- [6] M. Sebode, J. Hartl, D. Vergani, A.W. Lohse, International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG), Autoimmune hepatitis: From current knowledge and clinical practice to future research agenda, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver*. 38 (2018) 15–22. doi:10.1111/liv.13458.
- [7] B. Terziroli Beretta-Piccoli, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach, *Eur. J. Intern. Med.* 48 (2018) 35–43. doi:10.1016/j.ejim.2017.10.006.
- [8] A.J. Czaja, Autoantibody-Negative Autoimmune Hepatitis, *Dig. Dis. Sci.* 57 (2012) 610–624. doi:10.1007/s10620-011-2017-z.
- [9] D.-P. Bogdanos, P. Invernizzi, I.-R. Mackay, D. Vergani, Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges, *World J. Gastroenterol.* 14 (2008) 3374–3387.
- [10] F. Mackay, P. Schneider, P. Rennert, J. Browning, BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 231–264. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141152.
- [11] T. Matthes, I. Dunand-Sauthier, M.-L. Santiago-Raber, K.-H. Krause, O. Donze, J. Passweg, T. McKee, B. Huard, Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow, *Blood*. 118 (2011) 1838–1844. doi:10.1182/blood-2011-01-332940.
- [12] B. Huard, T. McKee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zubler, J.P. Guyot, P. Schneider, E. Roosnek, APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma

- cell niches in human mucosa, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 2887–2895. doi:10.1172/JCI33760.
- [13] B. He, W. Xu, P.A. Santini, A.D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D.M. Knowles, M. Rescigno, A. Cerutti, Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL, *Immunity*. 26 (2007) 812–826. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.014.
- [14] M.J. Benson, S.R. Dillon, E. Castigli, R.S. Geha, S. Xu, K.-P. Lam, R.J. Noelle, Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 180 (2008) 3655–3659.
- [15] E. Belnoue, M. Pihlgren, T.L. McGaha, C. Tougne, A.-F. Rochat, C. Bossen, P. Schneider, B. Huard, P.-H. Lambert, C.-A. Siegrist, APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells, *Blood*. 111 (2008) 2755–2764. doi:10.1182/blood-2007-09-110858.
- [16] M. López-Fraga, R. Fernández, J.P. Albar, M. Hahne, Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase, *EMBO Rep.* 2 (2001) 945–951. doi:10.1093/embo-reports/kve198.
- [17] J. Schwaller, P. Schneider, P. Mhawech-Fauceglia, T. McKee, S. Myit, T. Matthes, J. Tschopp, O. Donze, F.-A. Le Gal, B. Huard, Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness, *Blood*. 109 (2007) 331–338. doi:10.1073/blood-2006-02-001800.
- [18] C. Bossen, P. Schneider, BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling, *Semin. Immunol.* 18 (2006) 263–275. doi:10.1016/j.smim.2006.04.006.
- [19] F. Alvarez, P.A. Berg, F.B. Bianchi, L. Bianchi, A.K. Burroughs, E.L. Cancado, R.W. Chapman, W.G. Cooksley, A.J. Czaja, V.J. Desmet, P.T. Donaldson, A.L. Eddleston, L. Fainboim, J. Heathcote, J.C. Homberg, J.H. Hoofnagle, S. Kakumu, E.L. Krawitt, I.R. Mackay, R.N. MacSween, W.C. Maddrey, M.P. Manns, I.G. McFarlane, K.H. Meyer zum Büschenfelde, M. Zeniya, International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis, *J. Hepatol.* 31 (1999) 929–938.
- [20] P. Bedossa, T. Poynard, An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group, *Hepatol. Baltim. Md.* 24 (1996) 289–293. doi:10.1002/hep.510240201.
- [21] K. Ingold, A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q.-G. Steiner, T.G. Cachero, F. Qiang, L. Gorelik, S.L. Kalled, H. Acha-Orbea, P.D. Rennert, J. Tschopp, P. Schneider, Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1375–1383. doi:10.1084/jem.20042309.
- [22] O. Gaide, P. Schneider, Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA, *Nat. Med.* 9 (2003) 614–618. doi:10.1038/nm861.
- [23] K. Harada, N.C. Hiep, H. Ohira, Challenges and difficulties in pathological diagnosis of autoimmune hepatitis, *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 47 (2017) 963–971. doi:10.1111/hepr.12931.
- [24] G. Senaldi, B. Portmann, A.P. Mowat, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis, *Arch. Dis. Child.* 67 (1992) 1447–1453.
- [25] A. Suzuki, E.M. Brunt, D.E. Kleiner, R. Miquel, T.C. Smyrk, R.J. Andrade, M.I. Lucena, A. Castiella, K. Lindor, E. Björnsson, The use of liver biopsy evaluation in discrimination of idiopathic autoimmune hepatitis versus drug-induced liver injury, *Hepatol. Baltim. Md.* 54 (2011) 931–939. doi:10.1002/hep.24481.
- [26] C. Gabay, V. Krenn, C. Bosshard, C.A. Seemayer, C. Chizzolini, B. Huard, Synovial tissues concentrate secreted APRIL, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R144. doi:10.1186/ar2817.
- [27] T. Kawakami, I. Mizushima, K. Yamada, H. Fujii, K. Ito, T. Yasuno, S. Izui, M. Yamagishi, B. Huard, M. Kawano, Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-

- producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* (2018). doi:10.1093/ndt/gfy296.
- [28] G. Hoeffel, F. Ginhoux, Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages, *Front. Immunol.* 6 (2015) 486. doi:10.3389/fimmu.2015.00486.
- [29] M. Kobayashi, Y. Kakuda, K. Harada, Y. Sato, M. Sasaki, H. Ikeda, M. Terada, M. Mukai, S. Kaneko, Y. Nakanuma, Clinicopathological study of primary biliary cirrhosis with interface hepatitis compared to autoimmune hepatitis, *World J. Gastroenterol. WJG.* 20 (2014) 3597–3608. doi:10.3748/wjg.v20.i13.3597.
- [30] D. Balitzer, N. Shafizadeh, M.G. Peters, L.D. Ferrell, N. Alshak, S. Kakar, Autoimmune hepatitis: review of histologic features included in the simplified criteria proposed by the international autoimmune hepatitis group and proposal for new histologic criteria, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 30 (2017) 773–783. doi:10.1038/modpathol.2016.267.
- [31] T. Lombardi, S. Moll, P. Youinou, J.-O. Pers, A. Tzankov, C. Gabay, M.-L. Santiago-Raber, C. Chizzolini, B. Huard, Absence of up-regulation for a proliferation-inducing ligand in Sjögren’s sialadenitis lesions, *Rheumatol. Oxf. Engl.* 50 (2011) 1211–1215. doi:10.1093/rheumatology/ker016.
- [32] M. Muto, B. Manfroi, H. Suzuki, K. Joh, M. Nagai, S. Wakai, C. Righini, M. Maiguma, S. Izui, Y. Tomino, B. Huard, Y. Suzuki, Toll-Like Receptor 9 Stimulation Induces Aberrant Expression of a Proliferation-Inducing Ligand by Tonsillar Germinal Center B Cells in IgA Nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 28 (2017) 1227–1238. doi:10.1681/ASN.2016050496.
- [33] E. Mohr, K. Serre, R.A. Manz, A.F. Cunningham, M. Khan, D.L. Hardie, R. Bird, I.C.M. MacLennan, Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 182 (2009) 2113–2123. doi:10.4049/jimmunol.0802771.
- [34] Y. Zhang, L. Tech, L.A. George, A. Acs, R.E. Durrett, H. Hess, L.S.K. Walker, D.M. Tarlinton, A.L. Fletcher, A.E. Hauser, K.-M. Toellner, Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells, *J. Exp. Med.* 215 (2018) 1227–1243. doi:10.1084/jem.20160832.
- [35] M.P. Manns, A.W. Lohse, D. Vergani, Autoimmune hepatitis--Update 2015, *J. Hepatol.* 62 (2015) S100–111. doi:10.1016/j.jhep.2015.03.005.
- [36] P.J. Johnson, I.G. McFarlane, R. Williams, Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 958–963. doi:10.1056/NEJM199510123331502.
- [37] T.R. Cupps, L.C. Edgar, C.A. Thomas, A.S. Fauci, Multiple mechanisms of B cell immunoregulation in man after administration of in vivo corticosteroids, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 132 (1984) 170–175.
- [38] U. Baschant, J. Tuckermann, The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 120 (2010) 69–75. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.
- [39] A.R. Page, R.M. Condie, R.A. Good, SUPPRESSION OF PLASMA CELL HEPATITIS WITH 6-MERCAPTOPYRIMIDINE, *Am. J. Med.* 36 (1964) 200–213.
- [40] V.T. Chu, C. Berek, The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow, *Immunol. Rev.* 251 (2013) 177–188. doi:10.1111/imr.12011.
- [41] A.J. Czaja, H.A. Carpenter, Histological features associated with relapse after corticosteroid withdrawal in type 1 autoimmune hepatitis, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 23 (2003) 116–123.

Chapitre 2 :

APRIL et SEP

I. Contexte et objectif de l'étude

La SEP est une maladie neurodégénérative où la destruction de la myéline est médiée par les LT auto-réactifs et de plus en plus, des évidences démontrent que les auto-anticorps produits par les PC sont également impliqués. Ceci faisant des LB et PC des cibles privilégiées en thérapeutique. Le rituximab est un anticorps monoclonal anti-CD20 largement utilisé en thérapie pour dépléter les LB CD20⁺ et a ainsi été utilisé dans un essai clinique chez des patients atteints de SEP (Cross et al, 2006). Globalement, après traitement avec le rituximab, le nombre de lésions par IRM et de rechutes a été significativement réduit, et la réduction de LB dans le LCR a été associée à une modeste réduction du nombre de LT et de la quantité de MOG et MBP dans le sérum des patients SEP. La déplétion des LB étant associée à la réduction de l'activité inflammatoire, un autre essai clinique a évalué l'efficacité d'une protéine recombinante qui supprime la fonction des LB et production des anticorps. Cette molécule nommée atacicept est une Ig fusionnée avec le récepteur TACI membre de la TNFRSF et ligand de BAFF et APRIL (Kappos et al, 2014). De manière inattendue, les résultats ont malheureusement conduit à un taux annuel de rechutes augmenté avec atacicept et une exacerbation de la maladie. Ces résultats ont clairement mis en évidence un rôle complexe des LB et de l'immunité humorale.

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes demandé pourquoi atacicept avait engendré une réponse péjorative. Ce dernier essai clinique nous a permis de spéculer sur le fait que l'axe APRIL/BAFF pouvait avoir un rôle neuroprotecteur dans l'évolution de la SEP. Nous avons donc choisi d'étudier particulièrement APRIL dans les lésions SEP de patients ainsi que dans un modèle murin et de rechercher le mécanisme d'action permettant de comprendre l'échec de l'essai clinique atacicept.


Références

- Cross, Anne H., Jennifer L. Stark, Joanne Lauber, Michael J. Ramsbottom, et Jeri-Anne Lyons. 2006. « Rituximab Reduces B Cells and T Cells in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients ». *Journal of Neuroimmunology* 180 (1-2): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.029>.
- Kappos, Ludwig, Hans-Peter Hartung, Mark S. Freedman, Alexey Boyko, Ernst Wilhelm Radü, Daniel D. Mikol, Marc Lamarine, et al. 2014. « Atacicept in Multiple Sclerosis (ATAMS): A Randomised, Placebo-Controlled, Double-Blind, Phase 2 Trial ». *The Lancet. Neurology* 13 (4): 353-63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70028-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70028-6).

II. Manuscrit

Cette étude a permis la rédaction d'un article publié dans *Annals of Neurology*

A Proliferation-Inducing Ligand–Mediated Anti-Inflammatory Response of Astrocytes in Multiple Sclerosis

Laurie Baert,^{1*} Mahdia Benkhoucha,^{2*} Natalia Popa,³ Mashal C. Ahmed,¹ Benoit Manfroi,¹ Jean Boutonnat,⁴ Nathalie Sturm,⁴ Gilda Raguenez,³ Marine Tessier,³ Olivier Casez,⁵ Romain Marignier,⁶ Mitra Ahmadi,⁷ Alexis Broisat,⁷ Catherine Ghezzi,⁷ Cyril Rivat,⁸ Corinne Sonrier,⁸ Michael Hahne,⁹ Dominique Baeten,^{10,11} Romain R. Vives,¹² Hugues Lortat-Jacob,¹² Patrice N. Marche ,¹ Pascal Schneider,¹³ Hans P. Lassmann,¹⁴ Jose Boucraut,³ Patrice H. Lalive,^{2,15*} and Bertrand Huard^{1*}

Objective: The two related tumor necrosis factor members a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B-cell activation factor (BAFF) are currently targeted in autoimmune diseases as B-cell regulators. In multiple sclerosis (MS), combined APRIL/BAFF blockade led to unexpected exacerbated inflammation in the central nervous system (CNS) of patients. Here, we investigate the role of the APRIL/BAFF axis in the CNS.

Methods: APRIL expression was analyzed in MS lesions by immunohistochemistry. The *in vivo* role of APRIL was assessed in the murine MS model, experimental autoimmune encephalitis (EAE). Functional *in vitro* studies were performed with human and mouse astrocytes.

Results: APRIL was expressed in lesions from EAE. In its absence, the disease was worst. Lesions from MS patients also showed APRIL expression upon infiltration of macrophages. Notably, all the APRIL secreted by these macrophages specifically targeted astrocytes. The upregulation of chondroitin sulfate proteoglycan, sometimes bearing chondroitin sulfate of type E sugar moieties, binding APRIL, in reactive astrocytes explained the latter selectivity. Astrocytes responded to APRIL by producing a sufficient amount of IL-10 to dampen antigen-specific T-cell proliferation and pathogenic cytokine secretion. Finally, an intraspinal delivery of recombinant APRIL before disease onset, shortly reduced EAE symptoms. Repeated intravenous injections of recombinant APRIL before and even at disease onset also had an effect.

Interpretation: Our data show that APRIL mediates an anti-inflammatory response from astrocytes in MS lesions. This protective activity is not shared with BAFF.

ANN NEUROL 2019;9999:1–15

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.25415

Received Apr 5, 2018, and in revised form Jan 9, 2019. Accepted for publication Jan 9, 2019.

Address correspondence to

Dr Huard, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble Alpes University/INSERM U1209/CNRS UMR5309, La Tronche, France.

Email: bertrand.huard@univ-grenoble-alpes.fr

*L.B., M.B., P.L., and B.H. contributed equally.

From the ¹Institute for Advanced Biosciences, Grenoble Alpes University/National Institute of Health and Medical Research U1209/National Center for Scientific Research UMR5309, La Tronche, France; ²Department of Pathology and Immunology, School of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland; ³CRN2M, National Center for Scientific Research UMR6231, Medicine Faculty, Mediterranean University, Marseille, France; ⁴Department of Anatomopathology and Cytology, University Hospital, Grenoble, France; ⁵Department of Neurology, University Hospital, Grenoble, France; ⁶Neuroinflammation and Neuro-Oncology Team, Faculty of Medicine Laennec, Lyon Neurosciences Research Center, Lyon, France; ⁷Bioclinical Radiopharmaceuticals, National Institute of Health and Medical Research U1309, Grenoble, France; ⁸Neurosciences Institute, National Institute of Health and Medical Research U1051, Montpellier, France; ⁹Institute for Molecular Genetics, National Center for Scientific Research UMR5535, Montpellier, France; ¹⁰Department of Clinical Immunology and Rheumatology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, the Netherlands; ¹¹Department of Experimental Immunology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands; ¹²Institute of Structural Biology, Grenoble Alpes University, UMR5075, National Center for Scientific Research, Grenoble, France; ¹³Department of Biochemistry, University of Lausanne, Épalinges, Switzerland; ¹⁴Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; and ¹⁵Department of Neurosciences, Division of Neurology, Geneva University Hospital, Switzerland

B Cells are currently targeted in autoimmune diseases, and atacept is one drug targeting B cells.¹ The clinical trial testing atacept in multiple sclerosis (ATAMS) provoked an unexpected exacerbation of inflammation in the central nervous system (CNS) of treated patients, halting the trial.² Atacept is an immunoglobulin-fused soluble form of the transmembrane activator and CAML interactor (TACI, TNFRSF13b), a receptor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. TACI binds 2 related members of the TNF ligand superfamily, the B-cell activation factor from the TNF family (BAFF; TNFSF13b) and a proliferation-inducing ligand (APRIL; TNFSF13).³ Atacept-mediated progression of a neurodegenerative disease has been reproduced with the ATON trial, testing atacept in optic neuritis (ON).⁴ Concurrently, atacept-mediated worsening was also reported in a variant of experimental autoimmune encephalitis (EAE) resulting in ON in rat.⁵ These results may mean that antagonism of the APRIL/BAFF axis accelerates autoimmune neurodegeneration.

BAFF and APRIL play a nonredundant role in humoral immunity.⁶ APRIL mainly acts on antibody-producing plasma cells by driving isotype switch and survival. In addition to TACI, BAFF and APRIL also share the B-cell maturation antigen (BCMA) as a receptor.³ To efficiently signal in TACI/BCMA-expressing target cells, APRIL needs heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) as coreceptors.^{7,8} BAFF does not share this coreceptor binding activity, but has a specific receptor, BAFF-R.⁹ In the present study, we are showing that APRIL, but not BAFF, may have a protective role in the CNS by acting on astrocytes.

Material and Methods

Human Samples and Mouse Preclinical Model

The human autopsies from multiple sclerosis (MS) patients have been previously described.¹⁰ Control brain autopsies were obtained in healthy white matter area from a patient suffering from lateral amyotrophic sclerosis, and 3 patients deceased from non-neurodegenerative disorders. The *APRIL* knockout (KO) mice used were as originally described by Varfolomeev et al.¹¹ Controls were wild-type (WT) mice housed in the same conditions. EAE was induced in female mice with a commercial emulsion with 30 μ g of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55 peptide in complete Freund adjuvant, followed 24 hours later by an intravenous injection of 100 ng of pertussis toxin (Hooke Laboratories, Lawrence, MA). Mice were scored as follows: 0, no symptoms; 1, decreased tail tone; 2, mild monoparesis or paraparesis; 3, severe paraparesis; 4, paraplegia and/or quadriparesis; and 5, moribund condition or death. Intraspinal injections were performed into the spinal subarachnoidal space at the

L5–L6 level using a 30-gauge needle (MicroFine; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). The correct delivery was systematically checked by the mouse tail flick reflex. Intravenous injections were performed in the tail vein. Disease scoring was conducted in a randomized manner by 2 independent investigators masked to the mouse genotype and experimental group. All experimentation was prepared in concordance with the ARRIVE guidelines, and was approved by the Grenoble ethical committee.

Immunohistochemistry

Luxol fast blue (Sigma, St Louis, MO) was used to stain myelin. Formalin-fixed paraffin-embedded biopsies were stained with Stalk-1 (rabbit polyclonal) and Aprily-8 (mouse IgG1) detecting APRIL-producing cells and secreted APRIL, respectively, as previously described.¹² Anti-CD68 (clone PGM1, IgG3; Dako, Carpinteria, CA) was used at 10 μ g/ml after heat-induced epitope retrieval (HIER) in Tris 10 mM, ethylenediaminetetraacetic acid 1 mM, pH 9. The polyclonal anti-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase has been described elsewhere.¹⁰ Anti-chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG; CS-56, IgM) was from Sigma and was used at 10 μ g/ml without HIER. Anti-HSPG 3g10 (IgG2b) and 10e4 (IgM) were from Euromedex (Souffelweyersheim, France) and were used at 10 μ g/ml. 10e4 recognizes native HSPG, whereas 3g10 recognizes HSPG after heparinase digestion.¹³ The ScFv anti-CSE, GD3G7, was a kind gift of Dr Th. van Kuppevelt (Nijmegen, the Netherlands). GD3G7 binding was revealed by a polyclonal anti-vesicular stomatitis virus (VSV) tag (Abcam, Cambridge, MA). Detection was based on a horseradish peroxidase (HRP)-labeled polymer conjugated with secondary antibodies (Dako, EnVision+ System-HRP kit). Development was made using 3-amino-9-ethyl-carbazol substrate (Sigma-Aldrich) and counterstain with Mayer hematoxylin (Dako). For multicolor immunofluorescence stainings, the following primary antibodies were used: Stalk-1, Aprily-8, 3g10, 10e4, CS-56, GD3G7, anti-CD68, anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP; polyclonal rabbit IgG, 1/500, Dako). Detection was performed with anti-VSV-fluorescein isothiocyanate (FITC), and Alexa Fluor 488, phycoerythrin (PE), Alexa Fluor 350-conjugated anti-Ig secondary reagents. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Dako) was used for nucleus staining. Stainings were visualized with an Olympus (Tokyo, Japan) BX-41 microscope.

Recombinant Protein Production

Expression constructs for Fc-tagged muAPRIL_{A88} (88-233), muAPRIL_{H98} (98-233), and muBAFF (134-285) have been described elsewhere.⁸ Fc-tagged human glucocorticoid-induced TNF-related ligand (Fc-hGITRL [47-177]) was

used as negative control. Due to the T-cell activation property of GITRL, Fc-tagged human ectodysplasin A (245-391) was used in the T-cell *in vitro* stimulation assay and in the *in vivo* treatment assay. Recombinant proteins were transiently produced in 293 T HEK cells with serum-free Optimem 1 medium. Purification was performed with Protein-A Sepharose (GE Healthcare, Chicago, IL). The absence of endotoxin contamination was assessed with the limulus amoebocyte lysate kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY).

Radioimaging

Proteins were radiolabeled with iodogen and injected intravenously (3.7 MBq/mouse, 6 mice/group). Forty-eight hours later, the animals were euthanized and perfused with saline, and the activity in the spinal cord was expressed as percentage injected dose per gram.

Brain Cell Culture

Human astrocytes were purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA). The astrocytoma cell line CRT was purchased from American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Primary mixed glial cultures were established from the forebrains of C57Bl/6J newborn mice. Amoeboid microglia floating cells were detached from the astroglial monolayer by manual shaking. The remaining adherent monolayer contained astrocytes and adherent microglia. The cells were detached with trypsin. The microglia were removed by adhesion on plastic over a period of 30 minutes. Lipopolysaccharide (LPS) and Poly-IC were from Sigma. For the endocytosis experiment, the CRT cell line was incubated with 1 µg/ml of human FLAG-tagged APRIL for 30 minutes at 4°C, washed, and further incubated at either 4°C or 37°C for 45 minutes. Cells were then fixed in paraformaldehyde 4% followed by quenching in phosphate-buffered saline (PBS) glycine 0.1 M. Astrocyte-bound APRIL was detected with a biotinylated anti-FLAG antibody (1 µg/ml, Sigma) and PE-conjugated streptavidin (BD Biosciences) in PBS 2% bovine serum albumin 0.2% saponin. Cholera toxin B subunit FITC (10 µg/ml, Sigma) and DAPI (5 µg/ml) were used to label plasma membrane and nucleus, respectively. Cells were analyzed on an LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss) with a plan-Apochromat ×63/1.4 oil objective.

Flow Cytometry

Cells were incubated for 30 minutes on ice with Fc-APRIL_{A88}, Fc-APRIL_{H98}, or Fc-GITRL, each at 10 µg/ml. PE-conjugated anti-IgG secondary antibody was used to detect the binding. The 10e4 and CS-56 monoclonal antibodies (mAbs) were also used at 10 µg/ml, followed by FITC-conjugated goat antimouse IgM. Heparinase, chondroitinase, and NaClO₃ treatments were performed as previously described.¹⁴ 7AAD (BD Biosciences) was used at 50 µg/ml to exclude dead cells.

Cytometry bead arrays (CBA) for mouse cytokines were from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). Fluorescence was analyzed by flow cytometry on an Accuri C6 apparatus (BD Biosciences).

For the analysis of spinal cord cells, mice were first perfused with saline and infiltrating cells, and microglia were obtained at the interphase between the 75% and 35% Percoll fractions and washed with Hank balanced salt solution 3% fetal calf serum. Cells were stained with fluorochrome-conjugated CD45, CD11b, MHC-II (I-Ab), CX3CR-1, and Ly6C from BD Biosciences, and sorted on a FACSARIA III cell sorter (BD Biosciences).

Surface Plasmon Resonance

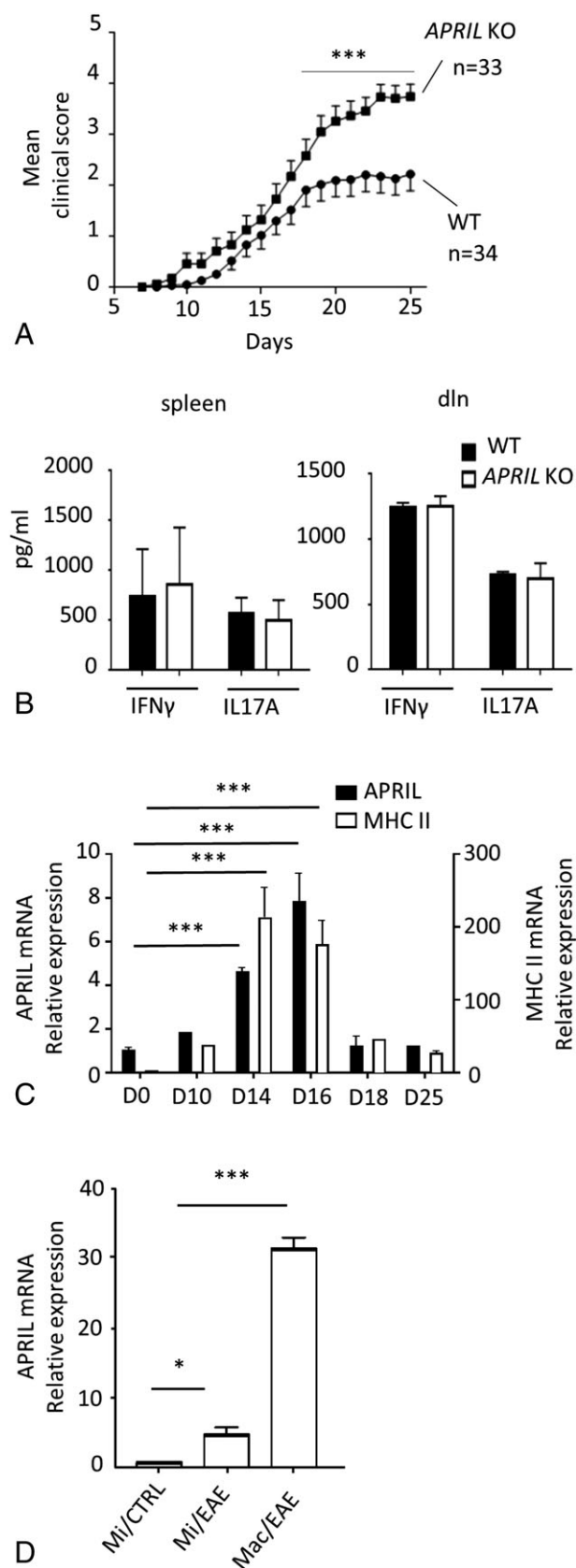
SPR analyses were performed on a BIAcore 3000 (GE Medical Systems, Milwaukee, WI). Binding assays on glycosaminoglycan surfaces were performed as previously described.¹⁵ Trimeric human FLAG-tagged APRIL_{A88} was used.⁸ Data were analyzed using BIAeval 3.1 software.

In Vitro T-Cell Activation Assays

2D2 TCR transgenic mice were obtained from Charles River (Wilmington, MA). After red blood cell lysis, spleen cells from 2D2 mice were stimulated with the MOG 35-55 peptide (3 µg/ml, polypeptide). Semiconfluent mouse primary astrocytes were prestimulated for 48 hours with Fc-APRIL_{A88} at 10 µg/ml. T-Cell proliferation was assessed after standard carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling and flow cytometry analysis (LSR-II, Becton Dickinson). Cytokine secretion was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatant 3 days after stimulation. Rat antimouse IL-10 (clone JES5-2a5; BioLegend, San Diego, CA) was used at 10 µg/ml.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNA extractions were performed with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The reverse transcription was performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and random primers. Primers were 5' to 3' forward GTGAATATTTTGACAGTCTGCT and reverse ATCTAGTGTGAGTTGGCTTC for muBCMA, forward CCAAAGATCAGTACTGGGAC and reverse AAGCTACACGTTTCCACAG for muTACI, and forward GGGCAGTGCTCCCAAAT and reverse TCGTTTTTCG TGGTGACAAGA for huBCMA. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Taq Platinum polymerase kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The amplification procedure included a 3-minute step at 94°C followed by 35 cycles with 30 seconds at 94°C as a denaturation step, 30 seconds at 55°C as a hybridization step, and 1 minute at 72°C as an elongation step. A final 4-minute, 72°C step was



used for final elongation. PCR products were visualized on 1% agarose gel using Gelgreen (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) dye under ultraviolet illumination. Quantitative PCR (qPCR) was performed on a 7500 Real Time PCR System with Power Syber Green (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers forward CTGGAGGC-CAGGGAGACAT and reverse GCACGGTCAGGATCA-GAAGG for muAPRIL, forward GTGCGGCGGAGAGTT GAG and reverse ACCGTCTCCAGCATCACCAG for the muMHC class II I-Ab, forward AGCATGGCCCAGAAA TCAAGGA and reverse GCCTTGTAGACACCTTGGTC TTG for muIL-10, and forward TTGTCAAGCTCATTTTCTGGTATG and reverse GGATAGGGCCTCTCTTG CTCA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (muGAPDH) were used.

Statistics

EAE was analyzed by using a Mann-Whitney *U* test either day by day or for the entire course of the experiment. qPCR results were analyzed by an analysis of variance-based test with a Tukey multiple comparison. Probability values <0.05 were considered statistically significant. ELISA and proliferation were analyzed by parametric unpaired *t* test.

Results

Exacerbated EAE in the Absence of APRIL

To unveil the putative role of APRIL in MS, we first compared EAE in WT and *APRIL* KO mice. Figure 1 shows an exacerbated EAE starting around disease peak. In the periphery of EAE mice, we did not detect any difference in the level of disease-inducing IFN- γ and IL-17A cytokines measured after *in vitro* restimulation of spleen and draining of lymph node cells with the MOG priming peptide. Regarding APRIL

FIGURE 1: A proliferation-inducing ligand (APRIL) modulates the severity of experimental autoimmune encephalitis (EAE). (A) EAE induced in wild-type (WT) and *APRIL* knockout (KO) mice was monitored over time. The mean \pm standard deviation for the clinical score from a pool of 3 independent experiments is shown. Total number of mice is also shown. (B) Seven days postimmunization, total cells from spleen and lymph nodes draining (dln) the priming site were restimulated *ex vivo* with the MOG peptide. IFN- γ and IL-17A secretions are shown. (C) The relative expression to GAPDH of APRIL (left axis, solid bars) and MHC II (right axis, open bars) mRNA is shown for the spinal cord of EAE mice at different time points of disease evolution. A score of 1 was given to the spinal cord of healthy mice. (D) APRIL mRNA expression was determined by quantitative polymerase chain reaction on the indicated cells sorted by flow-activated cell sorting (Mac = macrophages; Mi = microglia). Results are presented as the mean of 4 mice. Microglia from naive mice were given a value of 1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

TABLE. Pattern of APRIL Production and Secreted APRIL Observed in All MS Patients Analyzed

Age, yr	Gender	Lesion	MS	APRILp				APRILs	
				NAWM	PPWM	Edge	Center	NAWM	Center
35	M	Ac	AMS	No	MM	Mod G, MM	Mod MM, G	No	Astro
51	F	Ac	AMS	No	Few MM	MM, G	MM	No	Astro
40	F	Ac	RRMS	No	No	Few G, MM	Few G, MM	No	Astro
52	M	Chr Act	AMS	No	Few MM, G	MM	Few MM	No	Astro
49	F	Chr Act	RRMS	No	Few G, MM	MM	Few MM	No	Astro
41	M	Chr Act	SPMS	No	Few MM, G	Weak MM	Few MM	No	Astro
46	F	Chr Act	SPMS	No	Mod G, MM	Mod G, MM	Few MM	No	Astro
61	F	SE	SPMS	No	Few G, MM	Few G, MM	Few MM	No	Astro
67	M	SE	PPMS	No	Few G, MM	Mod MM	Few MM	No	Astro
56	M	SE	SPMS	No	Few G, MM	Few G, MM	MM	No	Astro
53	M	Inact	PPMS	No	MM	MM	MM	No	Astro
71	F	Inact	PPMS	No	MM	MM	MM	No	Astro
34	M	Inact	PPMS	No	Few G, MM	Few MM	MM	No	Astro
62	F	Inact	SPMS	No	MM	MM	MM	No	Astro
77	F	Inact	PPMS	No	No	Few G, MM	Few MM	No	Astro

Ac = acute; AMS = active MS; APRIL = a proliferation-inducing ligand; APRIL-producing cells (APRILp); secreted APRIL (APRILs); Astro = astrocytes; Chr Act = chronic active; F = female; G = granulocyte; Inact = inactive; M = male; MM = monocyte/macrophage; Mod = moderate; MS = multiple sclerosis; NAWM = normal-appearing white matter; PPMS = primary progressive MS; PPWM = periplaque white matter; RRMS = relapsing-remitting MS; SE = slowly expanding; SPMS = secondary progressive MS.

expression in mouse spinal cord, we observed a strong upregulation of APRIL transcripts, also around disease peak, that went back down to control levels afterward. The expression profile of APRIL mRNA was highly similar to that of major histocompatibility complex (MHC) class II, a marker of CNS inflammation commonly used in EAE. The myeloid lineage is the major source of APRIL.¹⁶ In EAE, infiltrating macrophages join the pool of brain-resident myeloid microglial cells. We examined APRIL expression in these 2 myeloid subsets. APRIL mRNA was barely detectable in Ly6C⁻CX3CR1⁺CD11b⁺CD45^{int} microglial cells from naive mice. During EAE, activated microglia cells defined by MHC class II expression slightly upregulated APRIL expression, whereas Ly6C⁺CX3CR1^{int}CD11b⁺CD45^{high} CNS-infiltrating macrophages were an abundant source of APRIL. These results demonstrated that upregulation of APRIL occurs during EAE in mouse CNS, and identified infiltrating macrophages as the major source of APRIL in EAE. In the absence of APRIL, the disease is exacerbated. We observed this exacerbation without a concomitant enhanced T-cell priming in the periphery, strongly suggesting a local role for APRIL in the CNS.

APRIL Expression in MS Lesions

We next studied APRIL expression in MS patients, and also observed a strong expression of APRIL *in situ*. In chronic active lesions, which are characterized by a dense rim of activated macrophages at the active lesion edge and a diffuse infiltration of macrophages with late myelin degradation products in the lesion center, immunohistochemical studies revealed a subset of macrophages producing APRIL at the active edge (Fig 2). There, we did not detect full-length APRIL, theoretically detectable with our pair of antibodies by a colocalization of APRIL production and secreted APRIL in producing cells, as in all the other human tissues analyzed so far. Rather, most if not all of the secreted APRIL localized throughout the entire lesion and in part also in the surrounding periplaque white matter. APRIL production was different according to disease stages and lesion types as defined previously.¹⁷ Fulminant acute lesions are present in patients with acute MS and relapse/remitting MS.¹⁸ In these lesions, active demyelination is predominantly associated with microglia activation, expressing high levels of NADPH oxidase, and macrophages in the lesions, which contain myelin degradation products.¹⁹ There,

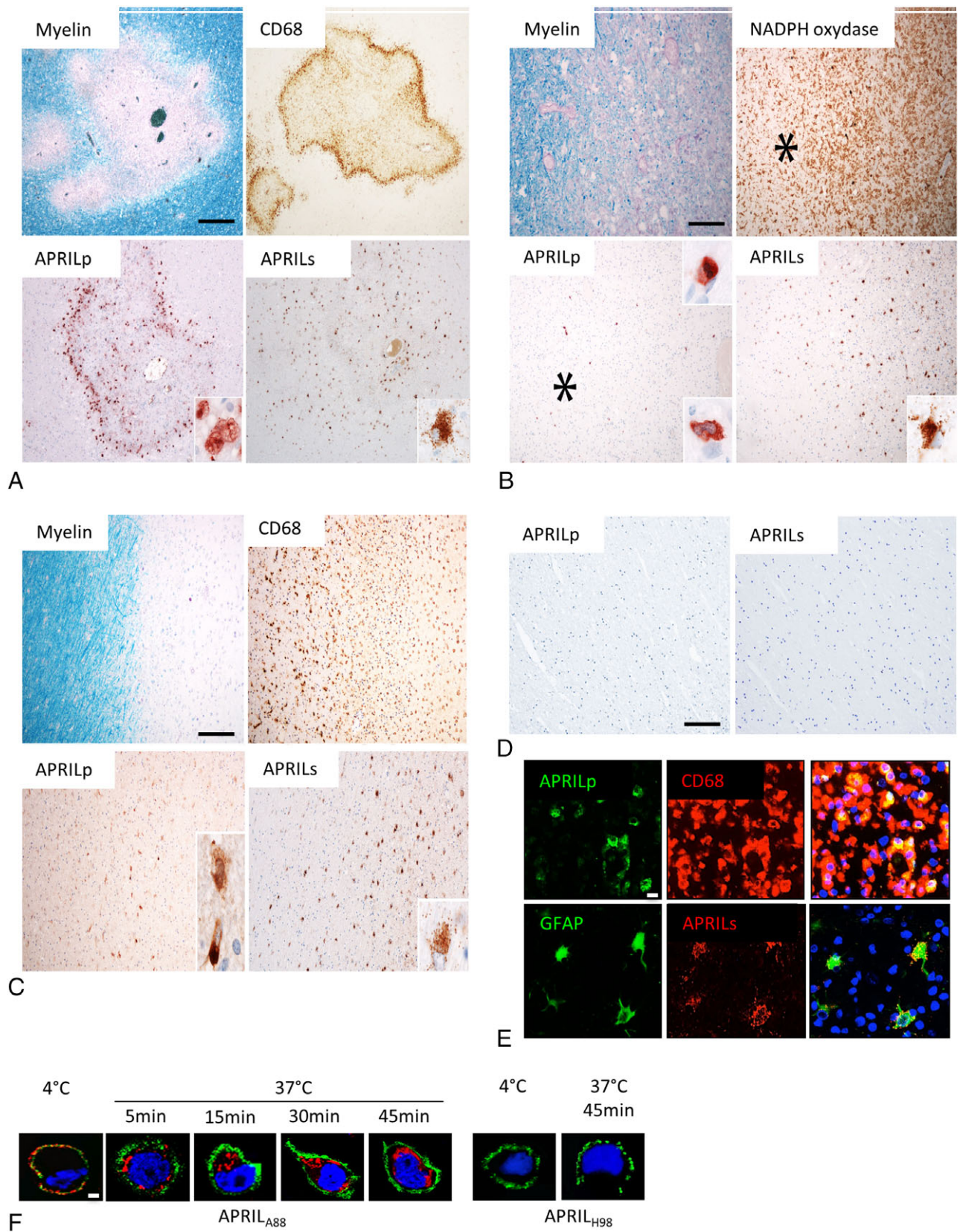


FIGURE 2. Legend on next page.

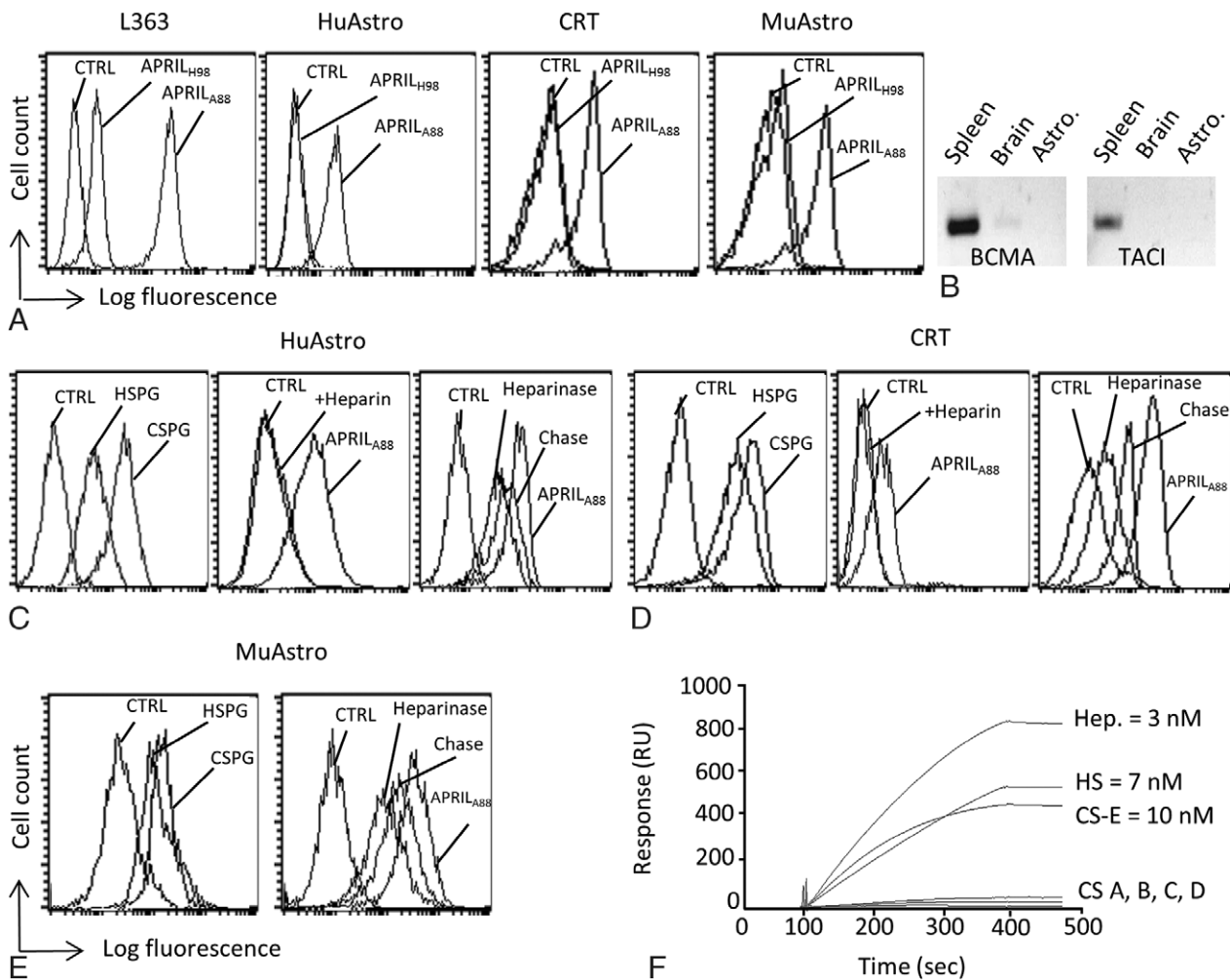


FIGURE 3: Chondroitin sulfate (CS) type E expressed on astrocytes is a new binding partner for a proliferation-inducing ligand (APRIL). (A) Binding of Fc-APRIL_{A88}, Fc-APRIL_{H98}, and control Fc-tagged glucocorticoid-induced TNF-related ligand (CTRL) was assessed by flow cytometry on control L363 cells, and human primary (huAstro), CRT astrocytoma, and mouse primary (muAstro) astrocytes. (B) Expression of B-cell maturation antigen (BCMA) and transmembrane activator and CAML interactor (TACI) mRNA was determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction in adult mouse spleen, brain, and primary astrocytes. (C, D) Human primary astrocytes (C) and the CRT astrocytoma (D) were tested by flow cytometry for their reactivity with control IgM (CTRL), anti-heparan sulfate proteoglycan (HSPG; 10e4), and anti-chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG; CS-56; left panel), for the binding of Fc-APRIL_{A88} in the presence of heparin (middle panel), and after heparinase/chondroitinase (Chase) treatment (right panel). (E) Mouse primary astrocytes were tested as in C for HSPG/CSPG reactivity and heparinase/chondroitinase treatment. Data are representative of at least 4 experiments. (F) Surface plasmon resonance analysis for the binding of trimeric APRIL_{A88} to the indicated coated heparin (Hep.) heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS). Measured affinities are indicated. Results are representative of at least 3 independent experiments. RU = resonance units.

FIGURE 2: A proliferation-inducing ligand (APRIL) secreted by a subset of macrophages is internalized by reactive astrocytes in multiple sclerosis (MS) lesions. Immunohistochemical analysis of different types of MS lesions from patients' autopsies is shown. (A) Chronic active lesion. Scale bar = 1 mm. (B) Acute lesion. Asterisks label an area of profound microglia activation at the edge of the active lesion. Scale bar = 400 μ m. (C) Slowly expanding lesion. Scale bar = 400 μ m. Inserts in A–C show high magnification of APRIL-producing cells APRIL_p and cells positive for secreted APRILs. Note that we did not always use strictly serial sections for the sake of saving material. (D) Serial sections from a brain control autopsy were immunostained for APRIL_p and APRILs. Scale bar = 300 μ m. Pictures are representative of 4 cases. (E) Sections from MS biopsies were costained for APRIL_p/CD68 (upper panel), and APRILs/glia fibrillary acidic protein (GFAP; bottom panel). The costainings shown are representative of 3 chronic active and 2 slowly expanding lesions. Scale bar = 5 μ m. (F) APRIL_{A88}-binding astrocytoma CRT cells were incubated at 4°C or 37°C for the indicated times (left panel). The figures show costaining for APRIL (red) and the plasma membrane (CTxB staining, green). Nuclear 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (blue) is shown on the merged pictures. An experiment with APRIL_{H98} is also shown (right panel). Scale bar = 2 μ m. The results are representative of 4 experiments. NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

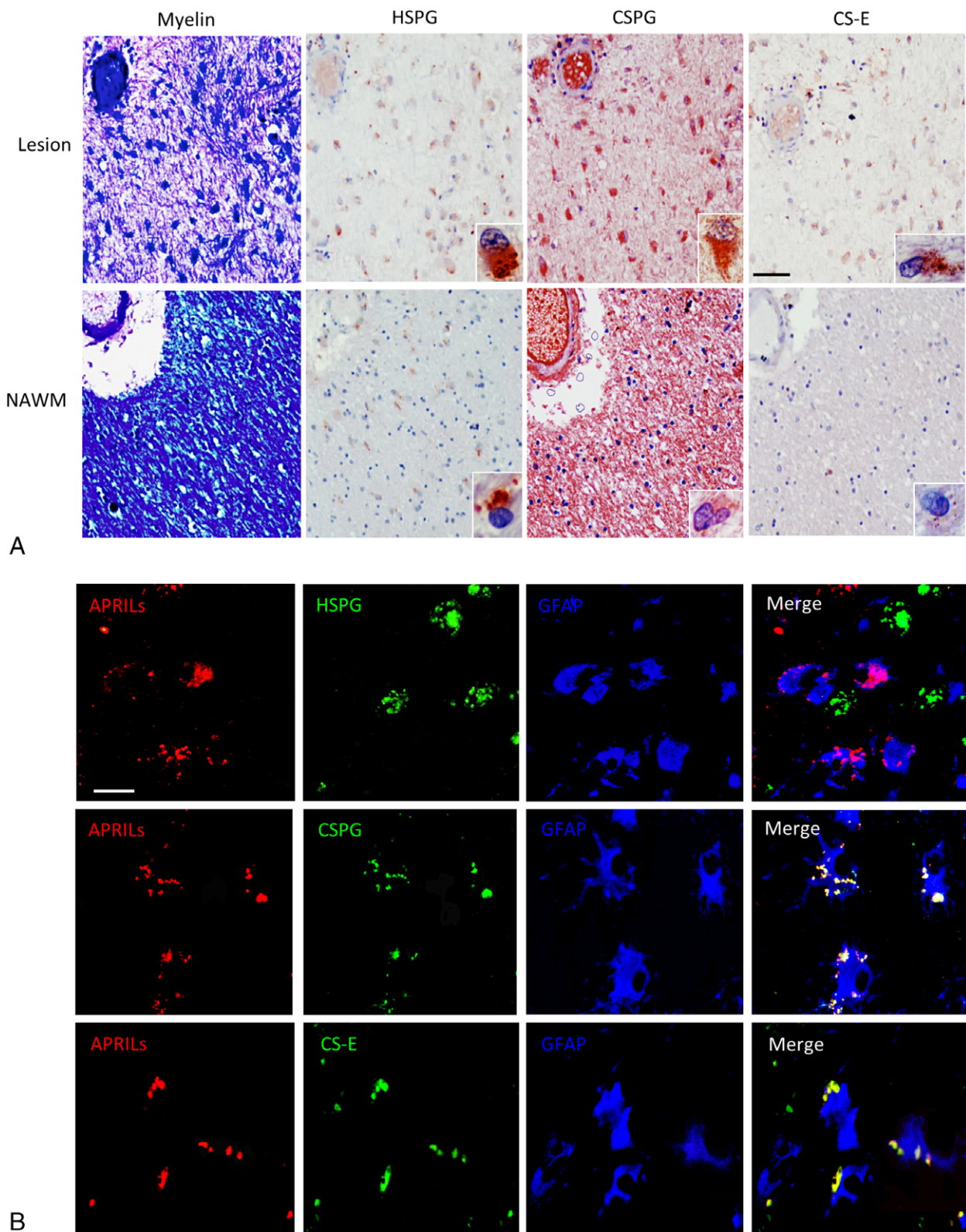


FIGURE 4. Legend on next page.

APRIL production was low and restricted to some scattered macrophages in the lesions and in the perivascular space. There was no evidence for APRIL production by activated microglial cells dominating such lesions. The typical feature

of slowly expanding lesions from patients with primary or secondary progressive MS is the presence of a rim of CD68⁺ activated microglia with some scattered macrophages, which contain early myelin degradation products. In these lesions,

the APRIL-producing cells concerned only a subset of the total CD68⁺ population. In inactive lesions, APRIL production was sparse or absent (data not shown). In most cases, we also observed APRIL production in granulocytes within blood vessel lumina, and it was occasionally present within the pathological tissue. Regarding secreted APRIL, it was found in every active plaque (acute/chronic active plaques and slowly expanding lesions), accumulating in cells with a morphology reminiscent of astrocytes, but only rarely in astrocytes from inactive lesions. No reactivity for APRIL production and secreted APRIL was detected in the normal-appearing white matter (NAWM) of these patients, defined as a zone at least 1 cm distal from the lesion edge. We did not detect APRIL production and secreted APRIL in the white matter from control brain autopsies. The Table summarizes the pattern of APRIL production and secreted APRIL observed in all MS patients analyzed. Costaining experiments confirmed that a subset of CD68⁺ myeloid cells produced APRIL, and that secreted APRIL bound to GFAP⁺ astrocytes. The apparent intracellular localization of APRIL in astrocytes indicated a potential *in situ* internalization of APRIL that we demonstrated *in vitro* upon incubation of astrocytes with recombinant soluble APRIL at 37°C. We used 2 recombinant soluble forms of APRIL, APRIL_{A88} and APRIL_{H98}. APRIL_{A88} has the potential to bind the signaling receptors TACI and BCMA and the coreceptor HSPG. In contrast, APRIL_{H98} binds only TACI and BCMA because of the deletion of the HSPG-binding site. In this experiment, APRIL_{A88} internalization was a rapid process, detectable as early as 5 minutes after incubation at 37°C, and internalized APRIL was quite stable, as we did not detect degradation within a time frame of 45 minutes at 37°C. By contrast, APRIL_{H98} did not become internalized. We did not detect APRIL mRNA by qPCR in resting mouse primary astrocytes, even upon activation by the Toll-like receptor ligands LPS and Poly-IC (data not shown). Taken together, our *in situ* analysis shows that a subset of macrophages infiltrating lesions from MS patients produces APRIL, and the secreted product accumulates into astrocytes.

CS Type E from Astrocytes Is a New Binding Partner for APRIL in MS Lesions

We next analyzed expression of APRIL receptors on astrocytes. APRIL_{A88} and to a lesser extent APRIL_{H98} bound to the control multiple myeloma cell line L363, expressing

the HSPG CD138 (also known as syndecan-1) as well as TACI and BCMA (Fig 3). Human/mouse primary astrocytes and the astrocytoma cell line CRT bound only APRIL_{A88}, excluding surface expression of TACI and BCMA on primary astrocytes. As another control, BAFF did not bind to these astrocytes (data not shown). Reverse transcriptase PCR analysis for TACI and BCMA mRNA further excluded a putative intracellular location of these 2 receptors. Human primary astrocytes and the CRT astrocytoma cell line expressed the known coreceptor for APRIL, HSPG, as revealed by 10e4 mAb reactivity. Additionally, they expressed another sulfated receptor, CSPG, as revealed by CS-56 mAb reactivity. The presence of heparin, a low molecular weight HSPG, fully inhibited APRIL_{A88} binding to these astrocytes, confirming that APRIL binding was strictly dependent on a sulfated receptor. Finally, heparinase and chondroitinase treatment inhibited APRIL_{A88} binding. Similar results were obtained with mouse primary astrocytes. Taken together, these show that APRIL is also interacting with CSPG, in addition to HSPG. The CS chain of CSPG is heterogeneous regarding the sulfation level and position on the disaccharide core unit. This is the case in the CNS, and that alters CSPG ligand binding properties.²⁰ In surface plasmon resonance analysis, APRIL showed a strict specificity to disulfated CS type E but neither to disulfated type D nor to the monosulfated types A, B, and C. The affinity of interaction of trimeric APRIL to CS type E was similar to the one measured with heparin or HSPG, in the nanomolar range.

In MS lesions, there was no reactivity with 10e4, recognizing native HSPG (data not shown). 3g10, recognizing HSPG after heparinase digestion, is believed to be of wider reactivity than 10e4. 3g10 staining revealed a similar expression of HSPG in the NAWM and inside lesions (Fig 4). CSPG as defined by CS-56 reactivity was highly present in the NAWM in cells and the extracellular matrix. In lesions, CSPG expression was less abundant, mostly confined to cells. On the contrary, CS type E was barely present in the NAWM, but highly upregulated in cells from lesions. Costaining experiments revealed that GFAP⁺ astrocytes from active (n = 3), slowly expanding (n = 2), and inactive (n = 2) lesions did not express HSPG (3g10 reactivity). The nonastrocytic HSPG found in the extracellular matrix did not colocalize with secreted

FIGURE 4: Chondroitin sulfate (CS) type E expressed by reactive astrocytes is the unique binding partner for a proliferation-inducing ligand (APRIL) in multiple sclerosis (MS) lesions. (A) A biopsy from an MS patient was stained for myelin (Luxol fast blue), heparan sulfate proteoglycan (HSPG; 3g10), chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG; CS-56), and CS type E. Pictures representative of a demyelinated lesion and the normal-appearing white matter (NAWM) are shown. Scale bar = 100 μm. (B) The MS biopsy was also costained for secreted APRIL (APRILs) (red)/HSPG (3g10, green)/glial fibrillary acidic protein (GFAP; blue; upper panel), APRILs (red)/CSPG (CS-56, green)/GFAP (blue; middle panel), and APRILs (red)/CS-E (green)/GFAP (blue; lower panel). Right panels show the merged staining. Scale bar = 10 μm. The results are representative of 7 MS patients.

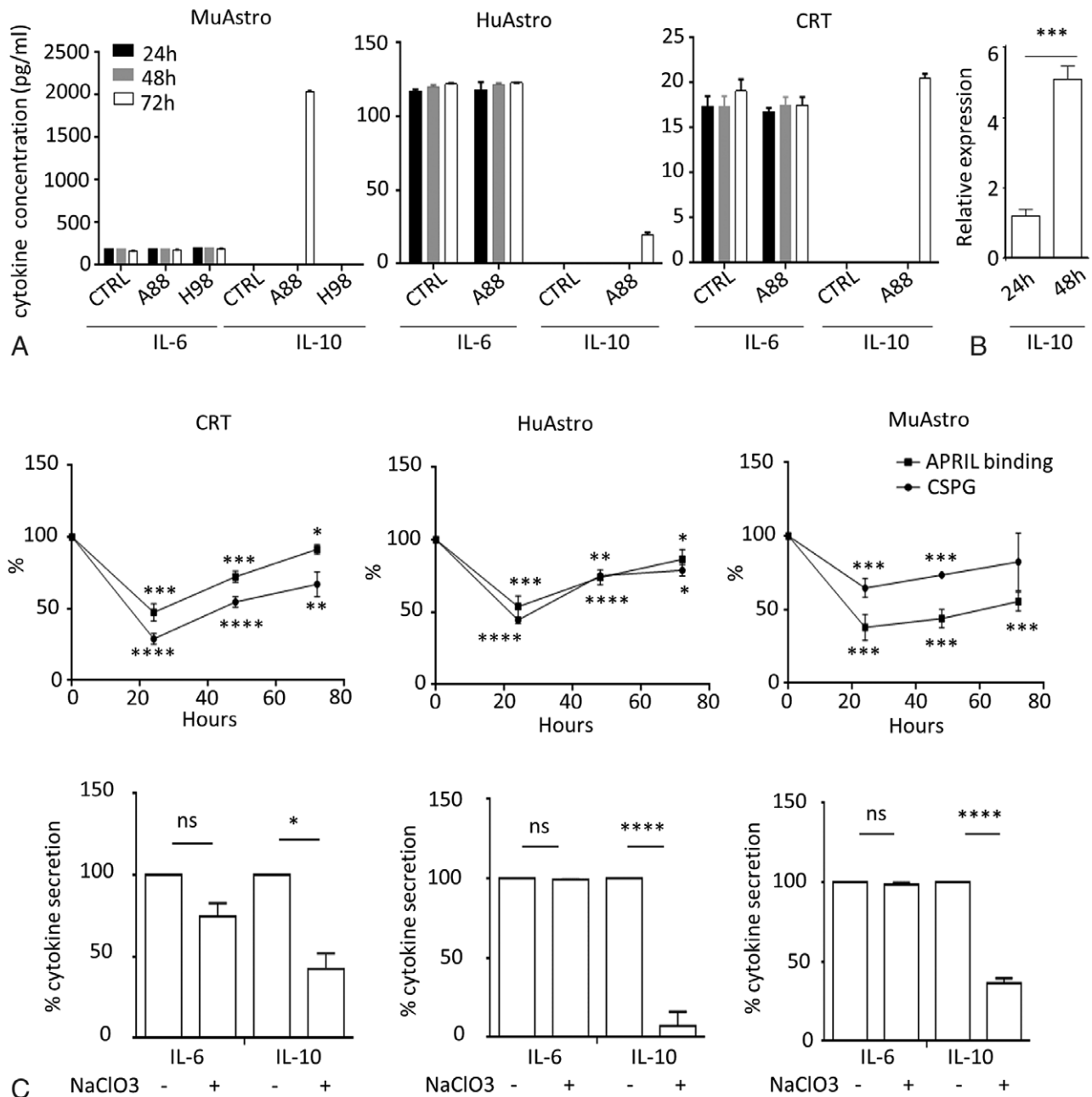


FIGURE 5: A proliferation-inducing ligand (APRIL) induces IL-10 secretion by astrocytes. (A) Enzyme-linked immunosorbent assay analysis of cytokines in supernatants of mouse and human primary astrocytes and CRT astrocytoma treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of control Fc-tagged glucocorticoid-induced TNF-related ligand (Fc-GITRL; CTRL), Fc-APRIL_{A88}, and Fc-APRIL_{H98}. IL-6 and IL-10 productions are shown. The mean of a duplicate test with minimum–maximum values is shown. **(B)** Transcript expression of IL-10 in mouse primary astrocytes was measured by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. The results are expressed as the fold change relative to the expression in presence of Fc-GITRL. **(C)** Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG; CS-56 reactivity) and APRIL_{A88} binding on NaClO₃-treated CRT astrocytoma and human and mouse primary astrocytes is shown (upper panels). IL-6 and IL-10 production by NaClO₃-treated cells in the presence of Fc-APRIL_{A88} stimulation is shown (bottom panels). One hundred percent represents untreated cells. Means \pm standard deviation from 3 independent experiments are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns = not significant.

APRIL. In all cases, including active (n = 3), slowly expanding (n = 2), and inactive (n = 2) lesions, CSPG (CS-56 reactivity) was expressed within GFAP⁺ astrocytes and colocalized with secreted APRIL for active and slowly

expanding lesions. We further observed expression of CS type E within astrocytes in 2 of 3 active, 1 of 2 slowly expanding, and 0 of 2 inactive lesions. When expressed, CS type E colocalized with secreted APRIL in astrocytes.

Taken together, our data show a selective binding of APRIL to CSPG. This binding occurs *in situ* in MS lesions at the level of reactive astrocytes. In some lesions,

but not all, we identified CS type E as the APRIL binder. In MS lesions, APRIL does not bind to HSPG.

APRIL Induces an IL-10-Dependent Anti-Inflammatory Response in Astrocytes

Astrocytes secrete a wide array of cytokines acting on T-cell-mediated autoimmune responses in the CNS.²¹ We screened several of these cytokines by ELISA and CBA after stimulation of murine primary astrocytes with APRIL. *in vitro* cultured primary astrocytes are considered to be non-fully resting astrocytes as judged by their constitutive expression of proinflammatory cytokines.²² APRIL stimulation did not change the expression of the proinflammatory IL-6 by these *in vitro* expanded astrocytes, whereas it induced them to produce the anti-inflammatory IL-10 72 hours after stimulation (Fig 5). APRIL_{H98} had no effect in this experiment. We also observed a late induction of IL-10 with no change in IL-6 by APRIL_{A88} in human primary astrocytes and the human astrocytoma cell line CRT. Other cytokines reported to be produced by astrocytes, including IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ , and TNF, were not detectable at any time point over the course of the experiment. Quantitative reverse transcriptase PCR analysis confirmed the late upregulation of IL-10 mRNA in mouse primary astrocytes 48 hours after stimulation with APRIL. CRT astrocytoma treatment with 25 mM NaClO₃, a transient inhibitor of sulfation, reduced CSPG surface expression and APRIL binding. HSPG decrease on CRT cells required a higher NaClO₃ concentration (75 mM, data not shown). With 25 mM NaClO₃, CRT cell mortality never reached more than 15%. In this condition, IL-10 induction decreased by more than 50% after APRIL stimulation, while IL-6 was not significantly modulated. We observed a similar

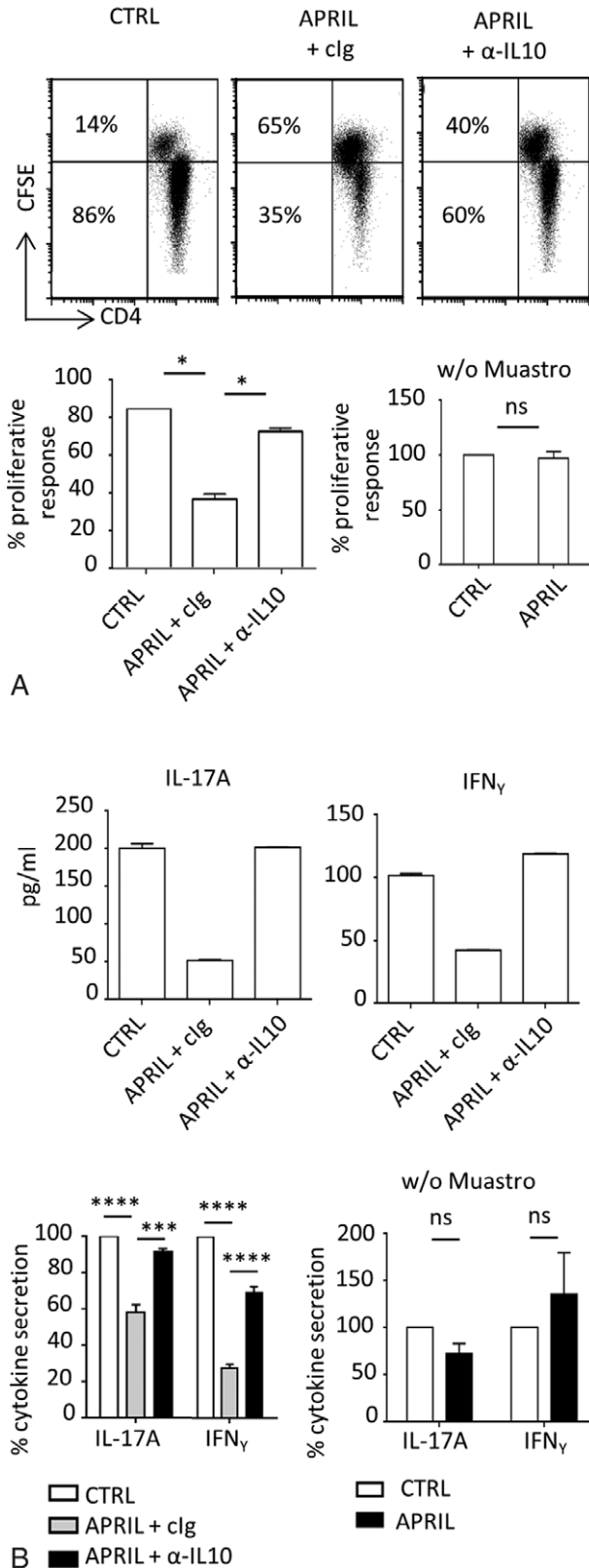
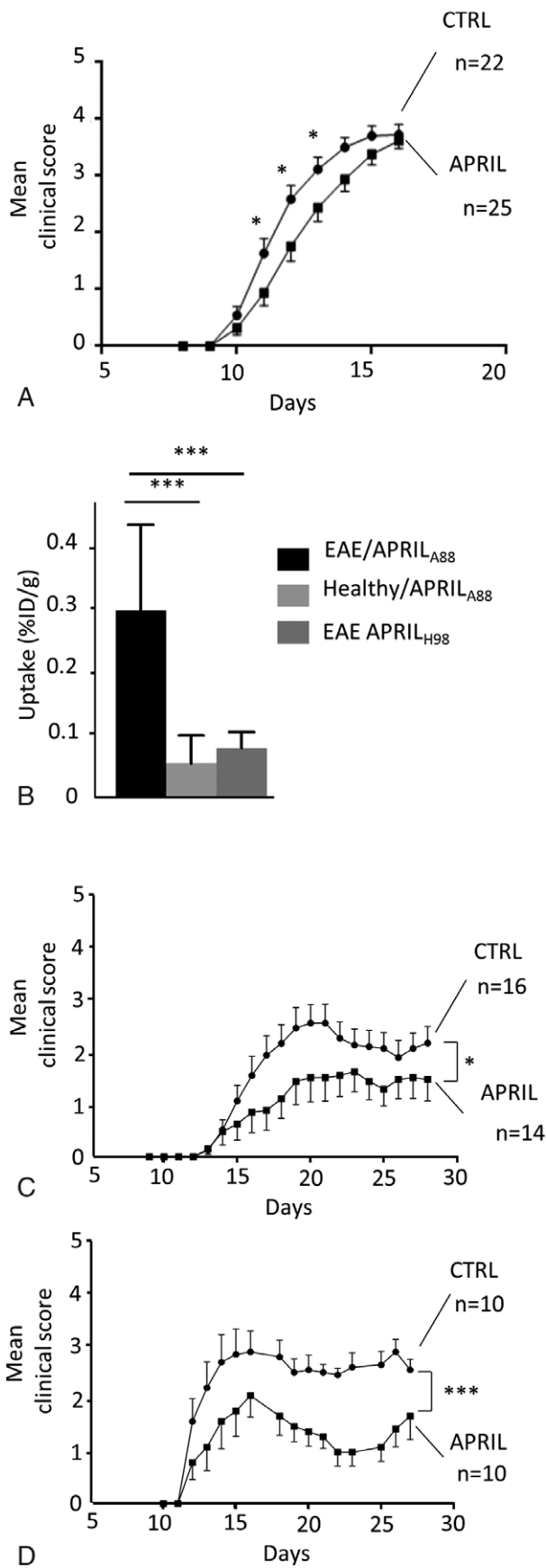


FIGURE 6: IL-10 produced by a proliferation-inducing ligand (APRIL)-stimulated astrocytes inhibits MOG-specific responses. Total splenocytes from 2D2 TCR transgenic mice were stimulated with the MOG peptide (3 μ g/ml) in the presence of control Fc (Fc-ectodysplasin A) and Fc-APRIL_{A88}-treated mouse primary astrocytes. The Fc-APRIL-treated conditions were performed in the presence of a control monoclonal antibody (clg) and antimouse IL-10. In some conditions, the stimulation was performed in the absence of astrocytes. (A) 2D2 T-cell proliferation based on Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining is shown (upper panel). The percentages of nondividing/dividing CD4⁺ T cells are indicated. Mean percentage \pm standard deviation (SD) of the proliferative response obtained in 3 independent experiments is also shown (bottom panel). (B) IL-17A and IFN- γ production is shown (upper panel). The mean of a duplicate test with minimum-maximum values is shown. Mean percentage \pm SD obtained in 3 independent experiments is also shown (bottom panel). One hundred percent represents the response obtained in the presence of control-treated astrocytes. * p < 0.05; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. ns = not significant.



inhibition of CSPG expression associated with reduced APRIL binding with 25 mM NaClO₃ treatment in human and mouse primary astrocytes. NaClO₃ treatment also reduced by >50% the production of IL-10 in APRIL-treated human and mouse primary astrocytes, while leaving IL-6 secretion unchanged.

We next performed *in vitro* peptide stimulation assays with MOG-specific TCR transgenic 2D2 CD4⁺ T cells. In the presence of primary astrocytes treated with APRIL, 2D2 T-cell proliferation was significantly inhibited (Fig 6). Notably, IL-10 antagonism in this assay partially reversed the APRIL-mediated inhibition. Regarding IL-17A and IFN-γ, the presence of APRIL-treated primary astrocytes also inhibited their production by 2D2 T cells. As for proliferation, addition of a blocking anti-IL-10 partially reversed the APRIL-mediated inhibition. In these experiments, the effect of APRIL_{A88} stimulation vanished in the absence of astrocytes. Hence, APRIL induces an anti-inflammatory response in astrocytes with the production of IL-10 that may protect from an autoimmune neurodegenerative insult.

EAE Treatment with Recombinant APRIL

We next sought to assess the effect of recombinant APRIL injection in EAE mice. We first performed a local intraspinal delivery of APRIL twice in the presymptomatic phase. APRIL injections significantly lowered disease severity for 3 consecutive days (Fig 7). This route did not allow us to perform injections in the symptomatic phase due to tail paralysis in EAE mice. We then switched to the intravenous route. Nuclear imaging with iodine-labeled recombinant APRIL showed that APRIL_{A88} accumulated compared to APRIL_{H98} in the spinal cord of EAE mice. No such level of detection was achieved in the spinal cord of healthy mice. This result may reflect leakage of the blood-brain barrier and specific retention of APRIL_{A88} by CSPG upregulation in EAE lesions. Figure 7C shows that repeated intravenous injections of APRIL_{A88} before and during disease significantly reduced disease severity. We

FIGURE 7: Recombinant a proliferation-inducing ligand (APRIL) injection lowers experimental autoimmune encephalitis (EAE). (A) Recombinant APRIL_{A88} and control ectodysplasin A (EDA) were injected intraspinally at day 7 and 9 postimmunization. The clinical score was monitored as in Figure 1A. (B) The biodistribution of the indicated radiolabeled molecules is shown for the spinal cord. (C, D) Fifty micrograms of recombinant Fc-APRIL_{A88} and control Fc-EDA were injected intravenously every 3 days for 10 days starting on day 2 before disease onset (C) and at disease onset (D). Results are shown as in A. Results shown are a pool of 3 independent experiments. Total number of mice is shown. **p* < 0.05, ****p* < 0.001. % ID/g = percentage injected dose per gram.

observed similar reduction when APRIL_{A88} treatment was started at disease onset (see Fig 7D). Taken together, these data show that injection of recombinant APRIL may constitute a valuable treatment for MS.

Discussion

Antagonism of BAFF and/or APRIL with a soluble form of one of their common receptors, TACI, exacerbates neuroinflammatory diseases such as MS and ON. It could be postulated that BAFF and/or APRIL positively regulate the subset of B cells producing IL-10 and IL-35 that was shown to dampen EAE.^{23,24} However, a protective role for BAFF and/or APRIL on nonimmune cells present in the CNS cannot be excluded. BAFF production by astrocytes is upregulated in MS lesions, and EAE is exacerbated in *BAFF-R* KO mice.^{25,26} However, a role for CNS BAFF on CNS-resident cells appears unlikely, as BAFF-R expression was only reported in infiltrating immune cells.²⁵ We confirmed that result with the MS patients analyzed here, and extended it by showing the absence of BAFF binding and BAFF-R expression on primary astrocytes (data not shown). Hence, CNS BAFF produced by astrocytes may exert a local role, but on immune infiltrating cells. Less is known regarding APRIL in MS. In the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients, APRIL is either slightly upregulated or unmodulated compared to control CSF from patients suffering from noninflammatory neurodegenerative disorders.^{27,28} Thangarajh et al reported that reactive astrocytes produced APRIL.²⁹ The authors used the same tissue-reactive antihuman APRIL antibody, Aprily-8. However, Aprily-8 is directed against the secreted part of APRIL, whereas Stalk-1 (used here) reacts with the part of the molecule that remains anchored in producing cells after processing. Hence, Stalk-1 reactivity clearly detects APRIL-producing cells, whereas Aprily-8 reactivity may detect either APRIL-producing cells before APRIL processing or the secreted product. Our combination of Stalk-1 and Aprily-8 reactivity indicates that in MS lesions it is a subset of macrophages that secretes APRIL, and reactive astrocytes selectively bind paracrine APRIL. The absence of APRIL mRNA detection in resting and activated primary astrocytes is also evidence arguing against production of APRIL by astrocytes. Our study also revealed that APRIL expression is variable according to the type of lesions. This is true for APRIL-producing cells. Only very few APRIL-producing macrophages were seen in initial demyelinating lesions of acute MS. APRIL-producing macrophages were also in low numbers in slowly expanding lesions. In contrast, APRIL-producing macrophages were numerous in chronic active lesions. Despite variation in the number of producing cells, reactive astrocytes

homogeneously contained a high concentration of secreted APRIL. APRIL present in reactive astrocytes may originate from infiltrating macrophages but also from the blood. The blood–brain barrier is permeable to serum components in MS,³⁰ and myeloid cells constitutively secrete APRIL in the blood.^{12,16,31} These analyses demonstrate that APRIL acts locally on CNS-resident astrocytes.

We did not find evidence for expression of TACI and BCMA in *in vitro* expanded astrocytes. We only found expression of the APRIL coreceptor, HSPG, and identify CSPG, a related sulfated proteoglycan, as a new APRIL binding partner in the CNS. The dual expression of HSPG and CSPG in *in vitro* cultured astrocytes is consistent with the previous study from Johnson-Green et al.³² *In situ* expression of proteoglycans by astrocytes is different. HSPG is not detected, whereas CSPG is present in reactive astrocytes. We identified CS type E, upregulated following different kinds of brain injury,^{33–35} as one of the binding partners of APRIL in reactive astrocytes. Astrocytes internalized paracrine APRIL. The reason for this internalization process is presently not known, warranting further investigation, but this process is likely due to the ligand internalization property described for proteoglycans.³⁶

Astrocyte function in MS has long been a matter of debate.^{37,38} This might be due to the important plasticity of these cells.³⁹ Nevertheless, astrocyte depletion has been shown by 3 independent research groups to exacerbate EAE, strongly arguing for a dominant protective function, at least in EAE.^{40–42} We are showing here that APRIL induces the production of IL-10 by astrocytes. Our data complement the signaling property of APRIL in astrocytes reported by others.⁴³ This IL-10 induction fits well with a protective function for APRIL and astrocytes in autoimmune MS, owing to the anti-inflammatory activity of this cytokine.⁴⁴ This is a likely explanation for the failure of clinical trials assessing the BAFF/APRIL antagonist, atacicept, in the autoimmune neurodegenerative disorders, MS and ON. To our knowledge, there is currently no trial in MS with an APRIL-specific antagonist, and such a trial may be unwanted. By contrast, exogenous APRIL lowered severity in a mouse model of MS. Taken together, the present bed- to benchside translation leads to the identification of APRIL as a potential new therapeutic compound for autoimmune neurodegenerative disorders.

Acknowledgment

This work was supported by Grenoble Alpes University (B.H.), the National Institute of Health and Medical Research (B.H.), the Association for Aid to Multiple

Sclerosis Research (B.H.), the National Agency for Research (program center of excellence in neurodegeneration obtained within the Grenoble excellence in neurodegeneration network; B.H.), the Swiss National Science Foundation (310030_156961/310030_176256 to PS and 310030_153164/310030_176678 to PL), and the Swiss Multiple Sclerosis Society (P.L.).

Author Contributions

All authors contributed to acquisition and analysis of the data and performed research. P.L. and B.H. contributed to the conception and design of the study. L.B., P.L., and B.H. contributed to drafting the text or preparing the figures.

Potential Conflicts of Interest

P.S. and B.H. report receiving a commercial research grant and speaker bureau honoraria, respectively, from Merck Serono, which is developing atacept. The other authors have nothing to report.

References

- Townsend MJ, Monroe JG, Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev* 2010;237:264–283.
- Kappos L, Hartung HP, Freedman MS, et al. Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2014;13:353–363.
- Yu G, Boone T, Delaney J, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol* 2000;1:252–256.
- Sergott RC, Bennett JL, Rieckmann P, et al. ATON: results from a phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacept in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci* 2015;351:174–178.
- Kretschmar B, Hein K, Moinfar Z, et al. Treatment with atacept enhances neuronal cell death in a rat model of optic neuritis. *J Neuroimmunol* 2014;268:58–63.
- Mackay F, Schneider P, Rennett P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003;21:231–264.
- Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ* 2005;12:637–648.
- Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* 2005;201:1375–1383.
- Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001;293:2108–2111.
- Licht-Mayer S, Wimmer I, Traffehn S, et al. Cell type-specific Nrf2 expression in multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* 2015;130:263–277.
- Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, et al. APRIL-deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol* 2004;24:997–1006.
- Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, et al. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 2007;109:331–338.
- David G, Bai XM, Van der Schueren B, et al. Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *J Cell Biol* 1992;119:961–975.
- Matthes T, McKee T, Dunand-Sauthier I, et al. Myelopoiesis dysregulation associated to sustained APRIL production in multiple myeloma-infiltrated bone marrow. *Leukemia* 2015;29:1901–1908.
- Vives RR, Lortat-Jacob H, Chroboczek J, Fender P. Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* 2004;321:332–340.
- Matthes T, Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber ML, et al. Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* 2011;118:1838–1844.
- Lassmann H. Review: The architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:698–710.
- Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol* 2015;78:710–721.
- Mahad DJ, Trebst C, Kivisakk P, et al. Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:262–273.
- Properzi F, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* 2003;31:335–336.
- Rothhammer V, Quintana FJ. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol* 2015;37:625–638.
- Van Wagoner. Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* 1999;19:5236–5244.
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, et al. B Cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;3:944–950.
- Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014;507:366–370.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 2005;201:195–200.
- Kim SS, Richman DP, Zamvil SS, Agius MA. Accelerated central nervous system autoimmunity in BAFF-receptor-deficient mice. *J Neurol Sci* 2011;306:9–15.
- Piazza F, DiFrancesco JC, Fusco ML, et al. Cerebrospinal fluid levels of BAFF and APRIL in untreated multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;220:104–107.
- Wang H, Wang K, Zhong X, et al. Cerebrospinal fluid BAFF and APRIL levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients during relapse. *J Clin Immunol* 2012;32:1007–1011.
- Thangaraj M, Masterman T, Hillert J, et al. A proliferation-inducing ligand (APRIL) is expressed by astrocytes and is increased in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2007;65:92–98.
- Levine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol* 2016;16:47.
- Manfroi B, McKee T, Mayol JF, et al. CXCL-8/IL-8 produced by diffuse large B-cell lymphomas recruits neutrophils expressing a proliferation-inducing ligand APRIL. *Cancer Res* 2017;77:1097–1107.
- Johnson-Green PC, Dow KE, Riopelle RJ. Characterization of glycosaminoglycans produced by primary astrocytes in vitro. *Glia* 1991;4:314–321.

33. Brown JM, Xia J, Zhuang B, et al. A sulfated carbohydrate epitope inhibits axon regeneration after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:4768–4773.
34. Gilbert RJ, McKeon RJ, Darr A, et al. CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:545–558.
35. Properzi F, Carulli D, Asher RA, et al. Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur J Neurosci* 2005;21:378–390.
36. Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci* 2003;28:145–151.
37. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2702–2720.
38. Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes—friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* 2007;55:1300–1312.
39. Ludwin SK, Rao VT, Moore CS, et al. Astrocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2016;22:1114–1124.
40. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, et al. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 2009;29:11511–11522.
41. Toft-Hansen H, Fuchtbauer L, Owens T. Inhibition of reactive astrogliosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease. *Glia* 2011;59:166–176.
42. Mayo L, Trauger SA, Blain M, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med* 2014;20:1147–1156.
43. Deshayes F, Lapree G, Portier A, et al. Abnormal production of the TNF-homologue APRIL increases the proliferation of human malignant glioblastoma cell lines via a specific receptor. *Oncogene* 2004;23:3005–3012.
44. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–190.

PARTIE 3 :
DISCUSSION,
CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES

I. APRIL et hépatite auto-immune

Notre étude rétrospective a montré que les cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et une sous-population de macrophages originaires du sang étaient la source cellulaire d'APRIL dans le foie de patients atteints d'HAI. Ce résultat est consistant avec la précédente étude du groupe sur la PR, dans laquelle nous avons observé la même source cellulaire pour APRIL (Gabay et al, 2009). Ce résultat est également compatible avec le fait que tous les neutrophiles et un sous-ensemble de monocytes produisent APRIL (Matthes et al, 2011 ; Munari et al, 2011 ; Manfroi et al, 2017). Par contre, les macrophages résidents du foie appelés cellules de Kupffer ne produisent pas APRIL. Ainsi, cela démontre que les foies sains seraient dépourvus d'APRIL, et que c'est le niveau d'infiltration par les cellules myéloïdes qui dicteraient l'expression d'APRIL dans les foies atteints d'HAI.

Concernant les facteurs déclenchant le processus auto-immun dans les HAI, le mécanisme pathogénique menant aux dommages du foie est un scénario complexe, encore mal connu, dans lequel l'intervention des réponses immunes innées et adaptatives a lieu. Les lymphocytes, PC et monocytes/macrophages sont proposés pour participer à l'attaque cellulaire (Longhi et al, 2010). En effet, l'initiation commence avec la présentation d'un peptide antigénique du soi par les CPA tel que les macrophages, CD et LB aux LT naïfs (Th0). Une fois exposé à l'antigène, les LT Th0 s'activent et se différencient en Th1 ou Th2. Les Th1 stimulent les cellules cytotoxiques (LT CD8⁺) responsables des dommages tissulaires et des lésions inflammatoires nécrotiques. Cette fonction est contrebalancée par les Th2 qui induisent la maturation des LB en PC, conduisant à la production des autoanticorps. Cependant, la pertinence fonctionnelle des différents autoanticorps dans la pathogénèse est très peu comprise. Malgré leur importance dans le diagnostic, le rôle pathogénique des PC avec leur autoanticorps et le mécanisme par lequel ils peuvent potentiellement participer aux dommages hépatocellulaires ont besoin davantage d'investigations.

Les patients avec une HAI classique présentent une infiltration mononucléaire riche en PC principalement dans les régions portales, péri-portales et péri-veinulaires. Très peu d'études ont étudié les PC. C'est pourquoi notre étude s'est focalisée sur les PC et la présence de cellules produisant APRIL. Nous avons trouvé que leur densité et leur localisation dans les espaces portes corrélaient à la sévérité de la maladie. Une précédente étude avait déjà reporté que les PC étaient fréquemment observés à l'hépatite d'interface et que l'infiltration augmentait avec la sévérité de l'HAI, contrairement aux lobules (Kobayashi et al, 2014). Par

immunofluorescence et tests *in vitro*, nous avons révélé que l'APRIL sécrétée était en contact direct avec les PC et augmentait leur survie *in vitro*, laissant penser qu'APRIL crée potentiellement *in vivo* un environnement propice à leur survie et rétention comme vu dans d'autres tissus (Belnoue et al, 2008 ; Huard et al, 2008 ; Gabay et al, 2009).

Néanmoins, on peut s'interroger sur l'expression d'APRIL dans le tiers des HAI qui n'ont pas d'infiltration de PC, car une pauvreté en PC n'exclue pas un diagnostic HAI. De plus, le foie est également la cible d'autres maladies auto-immunes comme la CBP et la CSP. Basé sur le niveau de production d'anticorps spécifiques, un chevauchement peut avoir lieu avec l'HAI, ce qui rend confus parfois le diagnostic (Manns, 1997). Des études précédentes ont démontrées que le niveau d'APRIL dans le sérum de patients atteints de CBP ne change pas comparé aux sujets sains (Migita et al, 2010). Donc, l'évaluation de l'expression d'APRIL dans les foies atteints de CBP et CSP ainsi que le niveau d'APRIL dans le sérum des patients HAI pourrait être crucial pour déterminer si APRIL serait décisif dans le diagnostic et/ou faciliterait davantage la distinction entre HAI et CBP/CSP.

La corticothérapie combinée à l'azathioprine est connue pour réduire la réponse inflammatoire en agissant directement sur la prolifération/infiltration des leucocytes et infiltration des macrophages (Baschant et Tuckermann, 2010). Dans notre étude, nous avons démontré l'impact indirect de ce traitement sur la réduction de l'expression d'APRIL au niveau du nombre de cellules produisant APRIL et de sa sécrétion en corrélation avec le nombre de PC, suggérant bien qu'APRIL contribue à l'accumulation et la survie des PC. Dans notre cohorte de patients, un seul cas a montré un effet inverse avec une stabilité dans le nombre de PC et aucun changement dans l'expression d'APRIL après traitement. Il s'avère que ce patient montre une inflammation persistante lors de sa seconde biopsie, particulièrement riche en lymphocytes et PC mais avec une nécrose parcellaire modérée, suggérant que d'autres mécanismes maintenant l'inflammation peuvent rentrer en jeu. Nous avons également noté que quelques patients en échec thérapeutique voyaient l'expression de l'APRIL sécrétée légèrement augmentée. Ces patients ont besoin d'une amélioration du protocole de traitement par augmentation de la posologie et/ou addition ou changement par un autre composé immunosuppresseur. On spéculé sur le fait que le traitement peut agir indirectement sur les PC en réduisant l'infiltration des macrophages et neutrophiles, réduisant par conséquent le nombre de cellules produisant APRIL et le produit sécrété. La persistance du produit sécrété pendant le traitement pourrait prédire l'échec thérapeutique et/ou la

rechute. Une autre étude a reporté que la persistance des PC dans les espaces portes est indicateur de rechutes (Czaja et al, 2003).

APRIL est déjà connue pour être impliquée dans l'exacerbation de maladies associées aux auto-anticorps comme le LES, la PR et la néphropathie à IgA (Samy et al, 2017). Cette molécule est de manière rationnelle ciblée en tant que nouvelle thérapie dans les maladies auto-immunes médiées par les LB, et atacicept a bien entendu été investigué. Les résultats obtenus sont encourageants pour l'utilisation de thérapie visant à bloquer APRIL/BAFF (Ramanujam et al, 2006 ; O'Connor et al, 2004). Notre étude indique que le ciblage d'APRIL avec un anticorps bloquant spécifique serait peut-être apprécié comme futur traitement des HAI. L'utilisation de modèles animaux pourrait permettre de progresser sur la fonction d'APRIL dans la pathologie et de déterminer si l'antagonisme d'APRIL peut être utilisé comme nouveau traitement curatif et translaté aux patients (Christen et al, 2007).

L'extension de cette étude pourrait donc avoir un impact sur les valeurs diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques chez les patients atteints d'HAI.

Références

- Baschant, Ulrike, et Jan Tuckermann. 2010. « The Role of the Glucocorticoid Receptor in Inflammation and Immunity ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 120 (2-3): 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.058>.
- Belnoue, Elodie, Maria Pihlgren, Tracy L. McGaha, Chantal Tougne, Anne-Françoise Rochat, Claudia Bossen, Pascal Schneider, Bertrand Huard, Paul-Henri Lambert, et Claire-Anne Siegrist. 2008. « APRIL Is Critical for Plasmablast Survival in the Bone Marrow and Poorly Expressed by Early-Life Bone Marrow Stromal Cells ». *Blood* 111 (5): 2755-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110858>.
- Christen, Urs, Martin Holdener, et Edith Hintermann. 2007. « Animal models for autoimmune hepatitis ». *Autoimmunity Reviews, Vaccination Infection & Autoimmunity: Myth & Reality*, 6 (5): 306-11. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.04.001>.
- Czaja, Albert J., et Herschel A. Carpenter. 2003. « Histological Features Associated with Relapse after Corticosteroid Withdrawal in Type 1 Autoimmune Hepatitis ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 23 (2): 116-23.
- Gabay, Cem, Veit Krenn, Carine Bosshard, Christian Alexander Seemayer, Carlo Chizzolini, et Bertrand Huard. 2009. « Synovial Tissues Concentrate Secreted APRIL ». *Arthritis Research & Therapy* 11 (5): R144. <https://doi.org/10.1186/ar2817>.
- Huard, Bertrand, Thomas McKee, Carine Bosshard, Stéphane Durual, Thomas Matthes, Samir Myit, Olivier Donze, et al. 2008. « APRIL Secreted by Neutrophils Binds to Heparan Sulfate Proteoglycans to Create Plasma Cell Niches in Human Mucosa ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (8): 2887-95. <https://doi.org/10.1172/JCI33760>.
- Kobayashi, Mio, Yuko Kakuda, Kenichi Harada, Yasunori Sato, Motoko Sasaki, Hiroko Ikeda, Mitsuhiro Terada, Munenori Mukai, Shuichi Kaneko, et Yasuni Nakanuma. 2014. « Clinicopathological study of primary biliary cirrhosis with interface hepatitis compared

- to autoimmune hepatitis ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (13): 3597-3608. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3597>.
- Longhi, Maria Serena, Yun Ma, Giorgina Mieli-Vergani, et Diego Vergani. 2010. « Aetiopathogenesis of Autoimmune Hepatitis ». *Journal of Autoimmunity* 34 (1): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.08.010>.
- Manfroi, Benoit, Thomas McKee, Jean Francois Mayol, Sebastien Tabruyn, Sebastien Moret, Christian Villiers, Christian Righini, et al. 2017. « CXCL-8/IL8 Produced by Diffuse Large B-Cell Lymphomas Recruits Neutrophils Expressing a Proliferation-Inducing Ligand APRIL ». *Cancer Research* 77 (5): 1097-1107. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0786>.
- Manns, M. P. 1997. « Recent Developments in Autoimmune Liver Diseases ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 12 (9-10): S256-271.
- Matthes, Thomas, Isabelle Dunand-Sauthier, Marie-Laure Santiago-Raber, Karl-Heinz Krause, Olivier Donze, Jakob Passweg, Tomas McKee, et Bertrand Huard. 2011. « Production of the Plasma-Cell Survival Factor a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) Peaks in Myeloid Precursor Cells from Human Bone Marrow ». *Blood* 118 (7): 1838-44. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332940>.
- Migita, Kiyoshi, Bibigul Ilyassova, Elena F. Kovzel, Alexander Nersesov, Seigo Abiru, Yumi Maeda, Atsumasa Komori, et al. 2010. « Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC ». *Clinical Immunology* 134 (2): 217-25. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.09.007>.
- Munari, Fabio, Silvia Lonardi, Marco A. Cassatella, Claudio Doglioni, Maria Giulia Cangì, Amedeo Amedei, Fabio Facchetti, et al. 2011. « Tumor-Associated Macrophages as Major Source of APRIL in Gastric MALT Lymphoma ». *Blood* 117 (24): 6612-16. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-293266>.
- O'Connor, Brian P., Vanitha S. Raman, Loren D. Erickson, W. James Cook, Lehn K. Weaver, Cory Ahonen, Ling-Li Lin, George T. Mantchev, Richard J. Bram, et Randolph J. Noelle. 2004. « BCMA Is Essential for the Survival of Long-Lived Bone Marrow Plasma Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (1): 91-98. <https://doi.org/10.1084/jem.20031330>.
- Ramanujam, Meera, Xiaobo Wang, Weiqing Huang, Zheng Liu, Lena Schiffer, Haiou Tao, Daniel Frank, et al. 2006. « Similarities and Differences between Selective and Nonselective BAFF Blockade in Murine SLE ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (3): 724-34. <https://doi.org/10.1172/JCI26385>.
- Samy, Eileen, Stephen Wax, Bertrand Huard, Henry Hess, et Pascal Schneider. 2017. « Targeting BAFF and APRIL in Systemic Lupus Erythematosus and Other Antibody-Associated Diseases ». *International Reviews of Immunology* 36 (1): 3-19. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1276903>.

II. APRIL et sclérose en plaques

Ces travaux de thèse se sont d'abord intéressés au rôle de la molécule APRIL dans la pathogénèse de la SEP. Nous avons pu observer la présence de cellules productrices d'APRIL autour des lésions de patients SEP et la partie sécrétée d'APRIL se concentrant de manière privilégiée à l'intérieur des lésions. Nous avons identifié les astrocytes comme nouvelle cellule cible d'APRIL et démontré la production de l'IL-10 via un nouveau partenaire de liaison d'APRIL, exprimé par les astrocytes : les CSPG. Le rôle anti-inflammatoire de l'IL-10 a inhibé la prolifération des LT auto-réactifs dirigés contre le peptide MOG et aussi réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. A partir des données précliniques obtenues avec le modèle murin, nous avons pu démontrer que l'injection d'APRIL permettait la réduction des symptômes de la maladie, nous permettant de l'envisager comme moyen thérapeutique.

Le blocage de l'axe APRIL/BAFF dans la SEP a été investigué avec l'utilisation du récepteur soluble TACI-Ig nommé ataccept (Kappos et al, 2014). Les résultats obtenus ont malheureusement conduit à l'arrêt précoce du traitement en raison d'une inflammation accrue et de rechutes plus importantes chez les patients SEP. Ces mêmes résultats ont également été observés chez les patients atteints de NO (Sergott et al, 2015). De toute évidence, le blocage d'APRIL et/ou BAFF joue un rôle prédominant dans le développement de la SEP et certainement plus généralement dans les maladies neurodégénératives et explique ainsi l'échec rencontré face à cet essai thérapeutique. La compréhension du mécanisme sous-jacent permettrait d'expliquer pourquoi l'échec a eu lieu. Au cours de ces travaux nous avons pu répondre à cette question.

Le recrutement des macrophages lors de blessures entraîne la libération du domaine actif d'APRIL dans le microenvironnement du SNC. On pourrait penser qu'une fois APRIL arrivé à cet endroit, il se fixerait aux PC infiltrants et exercerait son rôle de facteur de survie. Or, nous avons découvert que dans cet environnement unique, APRIL a la possibilité de se lier à un autre type de cellules, résidentes du SNC, les astrocytes. Cette nouvelle cellule cible a retenue toute notre attention. En effet, les astrocytes sont reconnus pour être la cellule mobilisée lors de blessures du tissu neural. La production et présence continue de cytokines inflammatoires, de radicaux libres et de débris axonaux libérés, entraînent l'activation des astrocytes. Lors de cette activation, le processus d'astrogliose se met en place afin de cicatrifier les tissus touchés et sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Hostenbach et al, 2014). Cette cicatrice astrogliale est bien sûre bénéfique mais constitue également un obstacle à la

croissance axonale et à la (re)myélinisation dans les lésions du cerveau (Williams et al, 2007 ; Fawcett and Asher, 1999). Notre hypothèse est donc qu'APRIL exerce son rôle neuroprotecteur en orientant davantage la fonction des astrocytes vers une cicatrisation des tissus plus rapide et efficace étant donné que nos résultats montrent la production d'IL-10, suite à l'interaction astrocytes-APRIL.

Cependant, il se trouve que les astrocytes n'expriment ni TACI, ni BCMA, les récepteurs d'APRIL. Il était donc important de focaliser la suite de notre recherche sur le mécanisme d'interaction entre les deux partenaires. Lors du processus de réparation par les astrocytes, ceux-ci expriment et sécrètent fortement les CSPG. Cette molécule représente l'obstacle majeur à la régénération des axones (Smith and Strunz, 2005). Nos expériences de résonance plasmonique de surface ont permis d'identifier clairement et de manière intéressante une forte interaction avec uniquement les CS de type E. Dans une précédente étude (Brown et al, 2012), il a été démontré la capacité des CS-E à inhiber la croissance axonale comparé aux autres types de CS. De plus, les CS-E interagissent avec des récepteurs tels que la protéine tyrosine phosphatase (PTP σ) (Ohtake et al, 2016), NogoR1 (Dickendeshner et al, 2012) ou encore les molécules sécrétées sémaphorines de type 3 (Dick et al, 2013) exprimés dans le SNC, qui déclenchent les voies inhibant la croissance des axones. Avec un anticorps bloquant les CS-E, ils ont montré la réversion de cet effet et observé une régénération *in vivo* des axones. Ces résultats démontrent que les CSPG et plus particulièrement les CS-E agissent comme répulsifs à la régénération. Cette nouvelle interaction CS-E-APRIL ne paraît donc pas être un évènement hasardeux mais plutôt établi dans un but précis. En effet, APRIL agirait comme un antagoniste et bloquerait l'action des CS-E, par conséquent empêchant ceux-ci d'interagir avec les molécules décrites précédemment. Cette inhibition d'interaction favoriserait la repousse axonale et la croissance des neurones au niveau du site des lésions. L'hypothèse est qu'APRIL pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique dans la régénération axonale, mais ce point reste encore à être évalué.

Nos résultats précliniques nous ont permis d'observer une réduction de la sévérité de la maladie après injection de la molécule APRIL. Plusieurs tests d'injections ont été faits avant et après l'apparition des premiers symptômes par voie intra-spinale ou intraveineuse, respectivement. Le traitement par voie intra-spinale, trois jours avant l'apparition des symptômes a donné des résultats encourageants avec un retard sur l'apparition des symptômes perceptibles pendant 3 jours. Or cette méthode reste limitée de par la complexité

du geste technique, également par la validation de la délivrance du produit qui est impossible après l'apparition des symptômes mais aussi de la difficulté de la translation de cette méthode chez l'homme. Le côté invasive de la méthode et évidemment l'impossibilité de traiter les patients avant leur diagnostic SEP nous a conduits à abandonner cette méthode. Il a été décidé pour la suite de nos expériences d'utiliser la voie intraveineuse. Encore une fois nous avons observé une réduction des symptômes mais cette fois-ci tout au long de l'expérience, indiquant qu'un traitement avec une injection régulière est plus bénéfique et indispensable. Malgré des résultats significatifs et une évolution de l'EAE réduite, le développement de la maladie se fait toujours. Il serait donc possible d'envisager une amélioration du traitement avec soit l'augmentation de la dose par injection (précédemment dans nos expériences de 50µg/injection de 100µl) et/ou du nombre d'injection par jour, tout en respectant les volumes maximums d'injections (Diehl et al, 2001).

L'injection par voie intraveineuse de la molécule APRIL entraîne sa libération dans toute la circulation. Sa présence en quantité supérieure et le rôle qu'elle pourrait avoir dans cette condition non physiologique reste une question importante. Cette question a été en partie investiguée chez des souris transgéniques pour *APRIL* (stein et al, 2002). La surexpression d'APRIL a entraîné quelques changements immunologiques mais aucun signe d'hyperplasie lymphoïde ou de développement de maladies. Un autre effet pourrait avoir lieu au niveau de l'interaction avec le co-récepteur HSPG. Effectivement leur expression est ubiquitaire et sur toutes les cellules adhérentes. La capacité de signalisation des HSPG n'est pas à négliger (Rapraeger, 2000). Leur rôle déterminant dans l'adhésion cellulaire, la régulation de la signalisation par les facteurs de croissances et l'organisation de l'adhésion cellule-matrice pourraient être altérés, il serait donc important d'étudier ces paramètres en vue d'utiliser APRIL comme thérapeutique.

Références

- Brown, Joshua M., Jiang Xia, BinQuan Zhuang, Kin-Sang Cho, Claude J. Rogers, Cristal I. Gama, Manish Rawat, et al. 2012. « A Sulfated Carbohydrate Epitope Inhibits Axon Regeneration after Injury ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (13): 4768-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121318109>.
- Dick, Gunnar, Chin Lik Tan, Joao Nuno Alves, Erich M. E. Ehlert, Gregory M. Miller, Linda C. Hsieh-Wilson, Kazuyuki Sugahara, et al. 2013. « Semaphorin 3A Binds to the Perineuronal Nets via Chondroitin Sulfate Type E Motifs in Rodent Brains ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (38): 27384-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310029>.
- Dickendesher, Travis L., Katherine T. Baldwin, Yevgeniya A. Mironova, Yoshiki Koriyama, Stephen J. Raiker, Kim L. Askew, Andrew Wood, et al. 2012. « NgR1 and NgR3 Are

- Receptors for Chondroitin Sulfate Proteoglycans ». *Nature Neuroscience* 15 (5): 703-12. <https://doi.org/10.1038/nn.3070>.
- Diehl, Karl-Heinz, Robin Hull, David Morton, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal, et Cor Van De Vorstenbosch. 2001. « A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes ». *Journal of Applied Toxicology* 21 (1): 15-23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>.
- Fawcett, J. W., et R. A. Asher. 1999. « The Glial Scar and Central Nervous System Repair ». *Brain Research Bulletin* 49 (6): 377-91.
- Hostenbach, Stephanie, Melissa Cambron, Miguel D'haeseleer, Ron Kooijman, et Jacques De Keyser. 2014. « Astrocyte Loss and Astrogliosis in Neuroinflammatory Disorders ». *Neuroscience Letters* 565 (avril): 39-41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.012>.
- Kappos, Ludwig, Hans-Peter Hartung, Mark S. Freedman, Alexey Boyko, Ernst Wilhelm Radü, Daniel D. Mikol, Marc Lamarine, et al. 2014. « Atacicept in Multiple Sclerosis (ATAMS): A Randomised, Placebo-Controlled, Double-Blind, Phase 2 Trial ». *The Lancet. Neurology* 13 (4): 353-63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70028-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70028-6).
- Ohtake, Yosuke, Daniella Wong, P. M. Abdul-Muneer, Michael E. Selzer, et Shuxin Li. 2016. « Two PTP Receptors Mediate CSPG Inhibition by Convergent and Divergent Signaling Pathways in Neurons ». *Scientific Reports* 6: 37152. <https://doi.org/10.1038/srep37152>.
- Rapraeger, Alan C. 2000. « Syndecan-Regulated Receptor Signaling ». *The Journal of Cell Biology* 149 (5): 995-98.
- Sergott, Robert C., Jeffrey L. Bennett, Peter Rieckmann, Xavier Montalban, Daniel Mikol, Ulrich Freudensprung, Thomas Plitz, Johan van Beek, et ATON Trial Group. 2015. « ATON: Results from a Phase II Randomized Trial of the B-Cell-Targeting Agent Atacicept in Patients with Optic Neuritis ». *Journal of the Neurological Sciences* 351 (1-2): 174-78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.019>.
- Smith, George M., et Celia Strunz. 2005. « Growth Factor and Cytokine Regulation of Chondroitin Sulfate Proteoglycans by Astrocytes ». *Glia* 52 (3): 209-18. <https://doi.org/10.1002/glia.20236>.
- Stein, Jens V., Marta López-Fraga, Fernando A. Elustondo, Carla E. Carvalho-Pinto, Dolores Rodríguez, Ruth Gómez-Caro, Joan De Jong, Carlos Martínez-A, Jan Paul Medema, et Michael Hahne. 2002. « APRIL Modulates B and T Cell Immunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (12): 1587-98. <https://doi.org/10.1172/JCI15034>.
- Williams, Anna, Gabrièle Piaton, et Catherine Lubetzki. 2007. « Astrocytes--Friends or Foes in Multiple Sclerosis? ». *Glia* 55 (13): 1300-1312. <https://doi.org/10.1002/glia.20546>.

III. Conclusion générale

Les travaux de cette thèse ont mis en évidence une production d'APRIL par les macrophages infiltrants dans le foie et le CNS comme déjà décrit précédemment dans plusieurs autres tissus. De plus, on a permis d'étendre le rôle d'APRIL comme facteur de survie aux PC infiltrants du foie dans l'HAI, soulignant le rôle promoteur d'APRIL dans cette maladie auto-immune tout comme dans le LES ou encore la PR.

De manière très inattendue et à partir des résultats venant de l'échec d'un essai clinique, cette thèse rapporte les évènements qui expliquent cet échec sous-jacent. La découverte d'une nouvelle cellule cible pour APRIL dans le CNS, les astrocytes, et d'un nouveau partenaire de liaison exprimé par ceux-ci, les CSPG, dévoilent un rôle inédit d'APRIL dans le CNS comme molécule neuro-protectrice.

Sa fonction promotrice dans l'HAI et anti-inflammatoire dans la SEP fait d'APRIL une molécule originale et versatile. Selon le tissu où elle est exprimée elle peut exercer des fonctions opposées faisant d'elle une molécule de choix dans les thérapies ciblées.

Références bibliographiques:

- [1] M. Croft, C.A. Benedict, C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 147–168. doi:10.1038/nrd3930.
- [2] J.-L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp, The molecular architecture of the TNF superfamily, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 19–26.
- [3] J.L. Browning, A. Ngam-ek, P. Lawton, J. DeMarinis, R. Tizard, E.P. Chow, C. Hession, B. O’Brine-Greco, S.F. Foley, C.F. Ware, Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface, *Cell.* 72 (1993) 847–856.
- [4] V. Roschke, S. Sosnovtseva, C.D. Ward, J.S. Hong, R. Smith, V. Albert, W. Stohl, K.P. Baker, S. Ullrich, B. Nardelli, D.M. Hilbert, T.-S. Migone, BLYS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 169 (2002) 4314–4321.
- [5] R.H. Arch, R.W. Gedrich, C.B. Thompson, Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death, *Genes Dev.* 12 (1998) 2821–2830.
- [6] M. Hahne, T. Kataoka, M. Schröter, K. Hofmann, M. Irmeler, J.L. Bodmer, P. Schneider, T. Bornand, N. Holler, L.E. French, B. Sordat, D. Rimoldi, J. Tschopp, APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1185–1190.
- [7] M. López-Fraga, R. Fernández, J.P. Albar, M. Hahne, Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase, *EMBO Rep.* 2 (2001) 945–951. doi:10.1093/embo-reports/kve198.
- [8] C. Bossen, P. Schneider, BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling, *Semin. Immunol.* 18 (2006) 263–275. doi:10.1016/j.smim.2006.04.006.
- [9] B. Pradet-Balade, J.P. Medema, M. López-Fraga, J.C. Lozano, G.M. Kolfschoten, A. Picard, C. Martínez-A, J.A. Garcia-Sanz, M. Hahne, An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein, *EMBO J.* 21 (2002) 5711–5720.
- [10] S.R. Dillon, B. Harder, K.B. Lewis, M.D. Moore, H. Liu, T.R. Bukowski, N.B. Hamacher, M.M. Lantry, M. Maurer, C.M. Krejsa, J.L. Ellsworth, S. Pederson, K.B. Elkon, M.H. Wener, M. Dall’Era, J.A. Gross, B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by ataccept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R48. doi:10.1186/ar2959.
- [11] M. Yan, S.A. Marsters, I.S. Grewal, H. Wang, A. Ashkenazi, V.M. Dixit, Identification of a receptor for BLYS demonstrates a crucial role in humoral immunity, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 37–41. doi:10.1038/76889.
- [12] J.A. Gross, J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S.R. Dillon, K. Madden, W. Xu, J. Parrish-Novak, D. Foster, C. Lofton-Day, M. Moore, A. Littau, A. Grossman, H. Haugen, K. Foley, H. Blumberg, K. Harrison, W. Kindsvogel, C.H. Clegg, TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease, *Nature.* 404 (2000) 995–999. doi:10.1038/35010115.

- [13] S.A. Marsters, M. Yan, R.M. Pitti, P.E. Haas, V.M. Dixit, A. Ashkenazi, Interaction of the TNF homologues BlyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI, *Curr. Biol. CB.* 10 (2000) 785–788.
- [14] J.S. Thompson, S.A. Bixler, F. Qian, K. Vora, M.L. Scott, T.G. Cachero, C. Hession, P. Schneider, I.D. Sizing, C. Mullen, K. Strauch, M. Zafari, C.D. Benjamin, J. Tschopp, J.L. Browning, C. Ambrose, BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF, *Science.* 293 (2001) 2108–2111. doi:10.1126/science.1061965.
- [15] S.G. Hymowitz, D.R. Patel, H.J.A. Wallweber, S. Runyon, M. Yan, J. Yin, S.K. Shriver, N.C. Gordon, B. Pan, N.J. Skelton, R.F. Kelley, M.A. Starovasnik, Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7218–7227. doi:10.1074/jbc.M411714200.
- [16] P. Rennert, P. Schneider, T.G. Cachero, J. Thompson, L. Trabach, S. Hertig, N. Holler, F. Qian, C. Mullen, K. Strauch, J.L. Browning, C. Ambrose, J. Tschopp, A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1677–1684.
- [17] J. Hendriks, L. Planelles, J. de Jong-Odding, G. Hardenberg, S.T. Pals, M. Hahne, M. Spaargaren, J.P. Medema, Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 637–648. doi:10.1038/sj.cdd.4401647.
- [18] K. Ingold, A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q.-G. Steiner, T.G. Cachero, F. Qiang, L. Gorelik, S.L. Kalled, H. Acha-Orbea, P.D. Rennert, J. Tschopp, P. Schneider, Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1375–1383. doi:10.1084/jem.20042309.
- [19] S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko, Heparan Sulfate Proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011). doi:10.1101/cshperspect.a004952.
- [20] J. Silver, J.H. Miller, Regeneration beyond the glial scar, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 146–156. doi:10.1038/nrn1326.
- [21] R.A. Sobel, A.S. Ahmed, White matter extracellular matrix chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans in multiple sclerosis, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 (2001) 1198–1207.
- [22] D.R. Patel, H.J.A. Wallweber, J. Yin, S.K. Shriver, S.A. Marsters, N.C. Gordon, M.A. Starovasnik, R.F. Kelley, Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16727–16735. doi:10.1074/jbc.M312316200.
- [23] M. Pelletier, J.S. Thompson, F. Qian, S.A. Bixler, D. Gong, T. Cachero, K. Gilbride, E. Day, M. Zafari, C. Benjamin, L. Gorelik, A. Whitty, S.L. Kalled, C. Ambrose, Y.-M. Hsu, Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33127–33133. doi:10.1074/jbc.M305754200.
- [24] T. Matthes, I. Dunand-Sauthier, M.-L. Santiago-Raber, K.-H. Krause, O. Donze, J. Passweg, T. McKee, B. Huard, Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow, *Blood.* 118 (2011) 1838–1844. doi:10.1182/blood-2011-01-332940.

- [25] B.P. O'Connor, V.S. Raman, L.D. Erickson, W.J. Cook, L.K. Weaver, C. Ahonen, L.-L. Lin, G.T. Mantchev, R.J. Bram, R.J. Noelle, BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 91–98. doi:10.1084/jem.20031330.
- [26] K. Kelly, E. Manos, G. Jensen, L. Nadauld, D.A. Jones, APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death, *Cancer Res.* 60 (2000) 1021–1027.
- [27] H.B. Shu, W.H. Hu, H. Johnson, TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens, *J. Leukoc. Biol.* 65 (1999) 680–683.
- [28] B. Nardelli, O. Belvedere, V. Roschke, P.A. Moore, H.S. Olsen, T.S. Migone, S. Sosnovtseva, J.A. Carrell, P. Feng, J.G. Giri, D.M. Hilbert, Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells, *Blood.* 97 (2001) 198–204.
- [29] P. Schneider, F. MacKay, V. Steiner, K. Hofmann, J.L. Bodmer, N. Holler, C. Ambrose, P. Lawton, S. Bixler, H. Acha-Orbea, D. Valmori, P. Romero, C. Werner-Favre, R.H. Zubler, J.L. Browning, J. Tschopp, BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1747–1756.
- [30] C. Kern, J.-F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P.-Y. Simonin, S. Feldblum, J.-P. Kolb, Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway, *Blood.* 103 (2004) 679–688. doi:10.1182/blood-2003-02-0540.
- [31] J. Moreaux, F.W. Cremer, T. Reme, M. Raab, K. Mahtouk, P. Kaukel, V. Pantesco, J. De Vos, E. Jourdan, A. Jauch, E. Legouffe, M. Moos, G. Fiol, H. Goldschmidt, J.F. Rossi, D. Hose, B. Klein, The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature, *Blood.* 106 (2005) 1021–1030. doi:10.1182/blood-2004-11-4512.
- [32] A.J. Novak, R.J. Bram, N.E. Kay, D.F. Jelinek, Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival, *Blood.* 100 (2002) 2973–2979. doi:10.1182/blood-2002-02-0558.
- [33] L.G. Ng, A.P.R. Sutherland, R. Newton, F. Qian, T.G. Cachero, M.L. Scott, J.S. Thompson, J. Wheway, T. Chtanova, J. Groom, I.J. Sutton, C. Xin, S.G. Tangye, S.L. Kalled, F. Mackay, C.R. Mackay, B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 173 (2004) 807–817.
- [34] Y. Laabi, M.P. Gras, J.C. Brouet, R. Berger, C.J. Larsen, A. Tsapis, The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1147–1154.
- [35] J. Moreaux, E. Legouffe, E. Jourdan, P. Quittet, T. Rème, C. Lugagne, P. Moine, J.-F. Rossi, B. Klein, K. Tarte, BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone, *Blood.* 103 (2004) 3148–3157. doi:10.1182/blood-2003-06-1984.
- [36] S.L. Kalled, C. Ambrose, Y.-M. Hsu, The Biochemistry and Biology of BAFF, APRIL and Their Receptors, in: W. Stohl (Ed.), *Curr. Dir. Autoimmun.*, KARGER, Basel, 2004: pp. 206–242. doi:10.1159/000082105.
- [37] M. Yang, H. Hase, D. Legarda-Addison, L. Varughese, B. Seed, A.T. Ting, B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the

- TNF family, induces antigen presentation in B cells, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 175 (2005) 2814–2824.
- [38] G. Yu, T. Boone, J. Delaney, N. Hawkins, M. Kelley, M. Ramakrishnan, S. McCabe, W.R. Qiu, M. Kornuc, X.Z. Xia, J. Guo, M. Stolina, W.J. Boyle, I. Sarosi, H. Hsu, G. Senaldi, L.E. Theill, APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 252–256. doi:10.1038/79802.
- [39] J.V. Stein, M. López-Fraga, F.A. Elustondo, C.E. Carvalho-Pinto, D. Rodríguez, R. Gómez-Caro, J. De Jong, C. Martínez-A, J.P. Medema, M. Hahne, APRIL modulates B and T cell immunity, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1587–1598. doi:10.1172/JCI15034.
- [40] L. Planelles, C.E. Carvalho-Pinto, G. Hardenberg, S. Smaniotto, W. Savino, R. Gómez-Caro, M. Alvarez-Mon, J. de Jong, E. Eldering, C. Martínez-A, J.P. Medema, M. Hahne, APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm, *Cancer Cell.* 6 (2004) 399–408. doi:10.1016/j.ccr.2004.08.033.
- [41] E. Varfolomeev, F. Kischkel, F. Martin, D. Seshasayee, H. Wang, D. Lawrence, C. Olsson, L. Tom, S. Erickson, D. French, P. Schow, I.S. Grewal, A. Ashkenazi, APRIL-deficient mice have normal immune system development, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 997–1006.
- [42] E. Castigli, S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A.K. Bhan, E. Mizoguchi, R.S. Geha, Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3903–3908. doi:10.1073/pnas.0307348101.
- [43] L. Baert, B. Manfroi, O. Casez, N. Sturm, B. Huard, The role of APRIL - A proliferation inducing ligand - In autoimmune diseases and expectations from its targeting, *J. Autoimmun.* (2018). doi:10.1016/j.jaut.2018.10.016.
- [44] T. Koyama, H. Tsukamoto, Y. Miyagi, D. Himeji, J. Otsuka, H. Miyagawa, M. Harada, T. Horiuchi, Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 64 (2005) 1065–1067. doi:10.1136/ard.2004.022491.
- [45] M. Hegazy, H. Darwish, H. Darweesh, A. El-Shehaby, Y. Emad, Raised serum level of APRIL in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with disease activity indices, *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 135 (2010) 118–124. doi:10.1016/j.clim.2009.12.012.
- [46] J. Morel, C. Roubille, L. Planelles, C. Rocha, L. Fernandez, C. Lukas, M. Hahne, B. Combe, Serum levels of tumour necrosis factor family members a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B lymphocyte stimulator (BLyS) are inversely correlated in systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 68 (2009) 997–1002. doi:10.1136/ard.2008.090928.
- [47] W. Stohl, S. Metyas, S.-M. Tan, G.S. Cheema, B. Omar, V. Roschke, Y. Wu, K.P. Baker, D.M. Hilbert, Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004) 1096–1103. doi:10.1136/ard.2003.018663.
- [48] V.T. Chu, P. Enghard, S. Schürer, G. Steinhauser, B. Rudolph, G. Riemekasten, C. Berek, Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 2083–2093. doi:10.1002/art.24628.
- [49] M.A. Neusser, M.T. Lindenmeyer, I. Edenhofer, S. Gaiser, M. Kretzler, H. Regele, S. Segerer, C.D. Cohen, Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus

- nephritis, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 24 (2011) 98–107. doi:10.1038/modpathol.2010.184.
- [50] W. Treamtrakanpon, P. Tantivitayakul, T. Benjachat, P. Somparn, W. Kittikowit, S. Eiamong, A. Leelahavanichkul, N. Hirankarn, Y. Avihingsanon, APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis, *Arthritis Res. Ther.* 14 (2012) R252. doi:10.1186/ar4095.
- [51] M. Dall’Era, E. Chakravarty, D. Wallace, M. Genovese, M. Weisman, A. Kavanaugh, K. Kalunian, P. Dhar, E. Vincent, C. Pena-Rossi, D. Wofsy, Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacicept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 4142–4150. doi:10.1002/art.23047.
- [52] C. Pena-Rossi, E. Nasonov, M. Stanislav, V. Yakusevich, O. Ershova, N. Lomareva, H. Saunders, J. Hill, I. Nestorov, An exploratory dose-escalating study investigating the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous atacicept in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus.* 18 (2009) 547–555. doi:10.1177/0961203309102803.
- [53] E.M. Ginzler, S. Wax, A. Rajeswaran, S. Copt, J. Hillson, E. Ramos, N.G. Singer, Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial, *Arthritis Res. Ther.* 14 (2012) R33. doi:10.1186/ar3738.
- [54] E. Samy, S. Wax, B. Huard, H. Hess, P. Schneider, Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases, *Int. Rev. Immunol.* 36 (2017) 3–19. doi:10.1080/08830185.2016.1276903.
- [55] J.T. Merrill, D.J. Wallace, S. Wax, A. Kao, P.A. Fraser, P. Chang, D. Isenberg, ADDRESS II Investigators, Efficacy and Safety of Atacicept in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: Results of a Twenty-Four-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Arm, Phase IIb Study, *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ.* 70 (2018) 266–276. doi:10.1002/art.40360.
- [56] M. Ramanujam, X. Wang, W. Huang, L. Schiffer, C. Grimaldi, A. Akkerman, B. Diamond, M.P. Madaio, A. Davidson, Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 173 (2004) 3524–3534.
- [57] B. Huard, N.L. Tran, M. Benkhoucha, C. Manzin-Lorenzi, M.-L. Santiago-Raber, Selective APRIL blockade delays systemic lupus erythematosus in mouse, *PLoS One.* 7 (2012) e31837. doi:10.1371/journal.pone.0031837.
- [58] S.-M. Tan, D. Xu, V. Roschke, J.W. Perry, D.G. Arkfeld, G.R. Ehresmann, T.-S. Migone, D.M. Hilbert, W. Stohl, Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 982–992. doi:10.1002/art.10860.
- [59] M.C. Genovese, N. Kinnman, G. de La Bourdonnaye, C. Pena Rossi, P.P. Tak, Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumor necrosis factor antagonist therapy: results of a phase II, randomized, placebo-controlled, dose-finding trial, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1793–1803. doi:10.1002/art.30373.

- [60] R.F. van Vollenhoven, N. Kinnman, E. Vincent, S. Wax, J. Bathon, Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 1782–1792. doi:10.1002/art.30372.
- [61] J.A. Gross, S.R. Dillon, S. Mudri, J. Johnston, A. Littau, R. Roque, M. Rixon, O. Schou, K.P. Foley, H. Haugen, S. McMillen, K. Waggle, R.W. Schreckhise, K. Shoemaker, T. Vu, M. Moore, A. Grossman, C.H. Clegg, TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS, *Immunity.* 15 (2001) 289–302.
- [62] H. Wang, S.A. Marsters, T. Baker, B. Chan, W.P. Lee, L. Fu, D. Tumas, M. Yan, V.M. Dixit, A. Ashkenazi, I.S. Grewal, TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 632–637. doi:10.1038/89782.
- [63] Y. Xiao, S. Motomura, E.R. Podack, APRIL (TNFSF13) regulates collagen-induced arthritis, IL-17 production and Th2 response, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 3450–3458. doi:10.1002/eji.200838640.
- [64] C. Hua, R. Audo, N. Yeremenko, D. Baeten, M. Hahne, B. Combe, J. Morel, C. Daïen, A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells, *J. Autoimmun.* 73 (2016) 64–72. doi:10.1016/j.jaut.2016.06.002.
- [65] L. Fernandez, G.F. Salinas, C. Rocha, C.E. Carvalho-Pinto, N. Yeremenko, L. Papon, J.P. Medema, B. Combe, J. Morel, D. Baeten, M. Hahne, The TNF family member APRIL dampens collagen-induced arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 72 (2013) 1367–1374. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202382.
- [66] Y.-L. Zhai, L. Zhu, S.-F. Shi, L.-J. Liu, J.-C. Lv, H. Zhang, Increased APRIL Expression Induces IgA1 Aberrant Glycosylation in IgA Nephropathy, *Medicine (Baltimore).* 95 (2016) e3099. doi:10.1097/MD.0000000000003099.
- [67] Y.G. Kim, M. Alvarez, H. Suzuki, S. Hirose, S. Izui, Y. Tomino, B. Huard, Y. Suzuki, Pathogenic Role of a Proliferation-Inducing Ligand (APRIL) in Murine IgA Nephropathy, *PloS One.* 10 (2015) e0137044. doi:10.1371/journal.pone.0137044.
- [68] Y. Kuwano, M. Fujimoto, R. Watanabe, N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Ohno, S. Yano, N. Yazawa, H. Okochi, K. Tamaki, Serum BAFF and APRIL levels in patients with alopecia areata, *J. Dermatol. Sci.* 50 (2008) 236–239. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.01.004.
- [69] M. Thangarajh, T. Masterman, L. Helgeland, U. Rot, M.V. Jonsson, G.E. Eide, R. Pirskanen, J. Hillert, R. Jonsson, The thymus is a source of B-cell-survival factors-APRIL and BAFF-in myasthenia gravis, *J. Neuroimmunol.* 178 (2006) 161–166. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.05.023.
- [70] R. Watanabe, M. Fujimoto, N. Yazawa, H. Nakashima, N. Asashima, Y. Kuwano, Y. Tada, N. Maruyama, H. Okochi, K. Tamaki, Increased serum levels of a proliferation-inducing ligand in patients with bullous pemphigoid, *J. Dermatol. Sci.* 46 (2007) 53–60. doi:10.1016/j.jdermsci.2006.12.008.
- [71] T. Kawakami, I. Mizushima, K. Yamada, H. Fujii, K. Ito, T. Yasuno, S. Izui, M. Yamagishi, B. Huard, M. Kawano, Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related

- disease, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* (2018). doi:10.1093/ndt/gfy296.
- [72] K. Migita, B. Ilyassova, E.F. Kovzel, A. Nersesov, S. Abiru, Y. Maeda, A. Komori, M. Ito, K. Yano, H. Yatsushashi, S. Shimoda, H. Ishibashi, M. Nakamura, Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC, *Clin. Immunol.* 134 (2010) 217–225. doi:10.1016/j.clim.2009.09.007.
- [73] L. Kappos, H.-P. Hartung, M.S. Freedman, A. Boyko, E.W. Radü, D.D. Mikol, M. Lamarine, Y. Hyvert, U. Freudensprung, T. Plitz, J. van Beek, ATAMS Study Group, Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 353–363. doi:10.1016/S1474-4422(14)70028-6.
- [74] R.C. Sergott, J.L. Bennett, P. Rieckmann, X. Montalban, D. Mikol, U. Freudensprung, T. Plitz, J. van Beek, ATON Trial Group, ATON: results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacept in patients with optic neuritis, *J. Neurol. Sci.* 351 (2015) 174–178. doi:10.1016/j.jns.2015.02.019.
- [75] V.A. Lennon, T.J. Kryzer, S.J. Pittock, A.S. Verkman, S.R. Hinson, IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 473–477. doi:10.1084/jem.20050304.
- [76] F. Paul, S. Jarius, O. Aktas, M. Bluthner, O. Bauer, H. Appelhans, D. Franciotta, R. Bergamaschi, E. Littleton, J. Palace, H.-P. Seelig, R. Hohlfeld, A. Vincent, F. Zipp, Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica, *PLoS Med.* 4 (2007) e133. doi:10.1371/journal.pmed.0040133.
- [77] H. Wang, K. Wang, X. Zhong, W. Qiu, Y. Dai, A. Wu, X. Hu, Cerebrospinal fluid BAFF and APRIL levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients during relapse, *J. Clin. Immunol.* 32 (2012) 1007–1011. doi:10.1007/s10875-012-9709-9.
- [78] S.N. Liossis, B. Kovacs, G. Dennis, G.M. Kammer, G.C. Tsokos, B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 2549–2557. doi:10.1172/JCI119073.
- [79] T.F. Tedder, J.C. Poe, M. Fujimoto, K.M. Haas, S. Sato, The CD19-CD21 signal transduction complex of B lymphocytes regulates the balance between health and autoimmune disease: systemic sclerosis as a model system, *Curr. Dir. Autoimmun.* 8 (2005) 55–90. doi:10.1159/000082087.
- [80] S. Bolland, J.V. Ravetch, Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis, *Immunity.* 13 (2000) 277–285.
- [81] F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, Fc gamma receptors as regulators of immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 34–47. doi:10.1038/nri2206.
- [82] P. Boross, V.L. Arandhara, J. Martin-Ramirez, M.-L. Santiago-Raber, F. Carlucci, R. Flierman, J. van der Kaa, C. Breukel, J.W.C. Claassens, M. Camps, E. Lubberts, D. Salvatori, M.P. Rastaldi, F. Ossendorp, M.R. Daha, H.T. Cook, S. Izui, M. Botto, J.S. Verbeek, The inhibiting Fc receptor for IgG, FcγRIIB, is a modifier of autoimmune susceptibility, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 187 (2011) 1304–1313. doi:10.4049/jimmunol.1101194.
- [83] M.C. Blank, R.N. Stefanescu, E. Masuda, F. Marti, P.D. King, P.B. Redecha, R.J. Wurzbürger, M.G.E. Peterson, S. Tanaka, L. Pricop, Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with

- systemic lupus erythematosus, *Hum. Genet.* 117 (2005) 220–227. doi:10.1007/s00439-005-1302-3.
- [84] F.B. Karassa, T.A. Trikalinos, J.P.A. Ioannidis, Fc gamma RIIIA-SLE meta-analysis investigators, The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis, *Kidney Int.* 63 (2003) 1475–1482. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00873.x.
- [85] F. Manca, D. Fenoglio, G. Li Pira, A. Kunkl, F. Celada, Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 37–48.
- [86] C. Rochas, S. Hillion, A. Saraux, R.A. Mageed, P. Youinou, C. Jamin, V. Devauchelle, Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-activating gene in B lymphocytes, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 1261–1271. doi:10.1002/art.24498.
- [87] J.-O. Pers, C. Daridon, V. Devauchelle, S. Jousse, A. Saraux, C. Jamin, P. Youinou, BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1050 (2005) 34–39. doi:10.1196/annals.1313.004.
- [88] P. Youinou, A. Saraux, J.-O. Pers, B-lymphocytes govern the pathogenesis of Sjögren's syndrome, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 2071–2077.
- [89] M.M. Griffiths, J.A. Encinas, E.F. Remmers, V.K. Kuchroo, R.L. Wilder, Mapping autoimmunity genes, *Curr. Opin. Immunol.* 11 (1999) 689–700.
- [90] T. Ando, R. Latif, T.F. Davies, Thyrotropin receptor antibodies: new insights into their actions and clinical relevance, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19 (2005) 33–52. doi:10.1016/j.beem.2004.11.005.
- [91] K. Michalek, S.A. Morshed, R. Latif, T.F. Davies, TSH receptor autoantibodies, *Autoimmun. Rev.* 9 (2009) 113–116. doi:10.1016/j.autrev.2009.03.012.
- [92] F.M. Howard, V.A. Lennon, J. Finley, J. Matsumoto, L.R. Elveback, Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 505 (1987) 526–538.
- [93] K. Susuki, N. Yuki, D.P. Schafer, K. Hirata, G. Zhang, K. Funakoshi, M.N. Rasband, Dysfunction of nodes of Ranvier: a mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies, *Exp. Neurol.* 233 (2012) 534–542. doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.039.
- [94] Y. Ochi, M. Hamazu, Y. Kajita, A. Nagata, Demonstration of anti-TSH antibody in TSH binding inhibitory immunoglobulin-positive sera of patients with Graves' disease, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 56 (2002) 405–412.
- [95] S. Amigorena, C. Bonnerot, Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing, *Immunol. Rev.* 172 (1999) 279–284.
- [96] S. Amigorena, J. Salamero, J. Davoust, W.H. Fridman, C. Bonnerot, Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG, *Nature*. 358 (1992) 337–341. doi:10.1038/358337a0.
- [97] K.-B. Abdul-Majid, A. Stefferl, C. Bourquin, H. Lassmann, C. Linington, T. Olsson, S. Kleinau, R.A. Harris, Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to

- the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Scand. J. Immunol.* 55 (2002) 70–81.
- [98] S.K. O'Neill, M.J. Shlomchik, T.T. Glant, Y. Cao, P.D. Doodles, A. Finnegan, Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 174 (2005) 3781–3788.
- [99] F.S. Wong, L. Wen, M. Tang, M. Ramanathan, I. Visintin, J. Daugherty, L.G. Hannum, C.A. Janeway, M.J. Shlomchik, Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse, *Diabetes.* 53 (2004) 2581–2587.
- [100] F.E. Lund, B.A. Garvy, T.D. Randall, D.P. Harris, Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease, *Curr. Dir. Autoimmun.* 8 (2005) 25–54. doi:10.1159/000082086.
- [101] M.E. Duddy, A. Alter, A. Bar-Or, Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172 (2004) 3422–3427.
- [102] M.J. Mamula, Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes, *Immunol. Rev.* 164 (1998) 231–239.
- [103] S. Amigorena, C. Bonnerot, Role of B-cell and Fc receptors in the selection of T-cell epitopes, *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1998) 88–92.
- [104] C. Watts, Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 821–850. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.821.
- [105] C. Watts, A. Lanzavecchia, Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 1459–1463.
- [106] A. Lanzavecchia, Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 8 (1990) 773–793. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.004013.
- [107] P.D. Simitsek, D.G. Campbell, A. Lanzavecchia, N. Fairweather, C. Watts, Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1957–1963.
- [108] H.W. Davidson, C. Watts, Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 85–92.
- [109] Y. Dai, K.A. Carayanniotis, P. Eliades, P. Lymberi, P. Shepherd, Y. c Kong, G. Carayanniotis, Enhancing or suppressive effects of antibodies on processing of a pathogenic T cell epitope in thyroglobulin, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 162 (1999) 6987–6992.
- [110] F. Martin, A.C. Chan, B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic, *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006) 467–496. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090517.
- [111] A. Hutloff, K. Büchner, K. Reiter, H.J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Dörner, R.A. Kroczeck, Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 3211–3220. doi:10.1002/art.20519.

- [112] D.L. Drayton, S. Liao, R.H. Mounzer, N.H. Ruddle, Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 344–353. doi:10.1038/ni1330.
- [113] F. Aloisi, R. Pujol-Borrell, Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 205–217. doi:10.1038/nri1786.
- [114] A. Manzo, S. Paoletti, M. Carulli, M.C. Blades, F. Barone, G. Yanni, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, R. Caporali, C. Montecucco, M. Ugucioni, C. Pitzalis, Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 1347–1359. doi:10.1002/eji.200425830.
- [115] D.C. Nacionales, J.S. Weinstein, X.-J. Yan, E. Albesiano, P.Y. Lee, K.M. Kelly-Scumpia, R. Lyons, M. Satoh, N. Chiorazzi, W.H. Reeves, B cell proliferation, somatic hypermutation, class switch recombination, and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in murine lupus, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 182 (2009) 4226–4236. doi:10.4049/jimmunol.0800771.
- [116] E. Astorri, M. Bombardieri, S. Gabba, M. Peakman, P. Pozzilli, C. Pitzalis, Evolution of ectopic lymphoid neogenesis and in situ autoantibody production in autoimmune nonobese diabetic mice: cellular and molecular characterization of tertiary lymphoid structures in pancreatic islets, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 185 (2010) 3359–3368. doi:10.4049/jimmunol.1001836.
- [117] A. Kratz, A. Campos-Neto, M.S. Hanson, N.H. Ruddle, Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1461–1472.
- [118] D.L. Drayton, X. Ying, J. Lee, W. Lesslauer, N.H. Ruddle, Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1153–1163. doi:10.1084/jem.20021761.
- [119] R.J. Looney, J. Anolik, I. Sanz, B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases, *Curr. Opin. Rheumatol.* 16 (2004) 180–185.
- [120] I. Sanz, Systemic lupus erythematosus: Extent and patterns of off-label use of rituximab for SLE, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2016) 700–702. doi:10.1038/nrrheum.2016.191.
- [121] G.M. Verstappen, J.F. van Nimwegen, A. Vissink, F.G.M. Kroese, H. Bootsma, The value of rituximab treatment in primary Sjögren’s syndrome, *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 182 (2017) 62–71. doi:10.1016/j.clim.2017.05.002.
- [122] M.J. Glennie, R.R. French, M.S. Cragg, R.P. Taylor, Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 3823–3837. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.151.
- [123] C. Díaz-Lagares, R. Pérez-Alvarez, F.J. García-Hernández, M.M. Ayala-Gutiérrez, J.L. Callejas, A. Martínez-Berriotxo, J. Rascón, L. Caminal-Montero, A. Selva-O’Callaghan, J. Oristrell, C. Hidalgo, R. Gómez-de-la-Torre, L. Sáez, J. Canora-Lebrato, M.-T. Camps, N. Ortego-Centeno, M.-J. Castillo-Palma, M. Ramos-Casals, BIOGEAS Study Group, Rates of, and risk factors for, severe infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving biological agents off-label, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) R112. doi:10.1186/ar3397.

- [124] M. Ramos-Casals, M.J. Soto, M.J. Cuadrado, M.A. Khamashta, Rituximab in systemic lupus erythematosus: A systematic review of off-label use in 188 cases, *Lupus*. 18 (2009) 767–776. doi:10.1177/0961203309106174.
- [125] D.J. DiLillo, Y. Hamaguchi, Y. Ueda, K. Yang, J. Uchida, K.M. Haas, G. Kelsoe, T.F. Tedder, Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 180 (2008) 361–371.
- [126] M. Jourdan, A. Caraux, G. Caron, N. Robert, G. Fiol, T. Rème, K. Bolloré, J.-P. Vendrell, S. Le Gallou, F. Mourcin, J. De Vos, A. Kassambara, C. Duperray, D. Hose, T. Fest, K. Tarte, B. Klein, Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 187 (2011) 3931–3941. doi:10.4049/jimmunol.1101230.
- [127] W. Chatham, A. Chadha, J. Fettiplace, C. Kleoudis, D. Bass, D. Roth, D. Gordon, A randomized, open-label study to investigate the effect of belimumab on pneumococcal vaccination in patients with active, autoantibody-positive systemic lupus erythematosus, *Lupus*. 26 (2017) 1483–1490. doi:10.1177/0961203317703495.
- [128] A.M. Jacobi, W. Huang, T. Wang, W. Freimuth, I. Sanz, R. Furie, M. Mackay, C. Aranow, B. Diamond, A. Davidson, Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study, *Arthritis Rheum*. 62 (2010) 201–210. doi:10.1002/art.27189.
- [129] H.E. Mei, D. Frölich, C. Giesecke, C. Loddenkemper, K. Reiter, S. Schmidt, E. Feist, C. Daridon, H.-P. Tony, A. Radbruch, T. Dörner, Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab, *Blood*. 116 (2010) 5181–5190. doi:10.1182/blood-2010-01-266536.
- [130] S. Amberg, Hyperproteinemia associated with severe liver damage, *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 17, pp. 360–362, 1942.
- [131] A. Reuben, A sheep in wolf's clothing, *Hepatology*. 38 (2003) 1596–1601. doi:10.1002/hep.510380643.
- [132] I.R. Mackay, L.I. Taft, D.C. Cowling, Lupoid hepatitis and the hepatic lesions of systemic lupus erythematosus, *Lancet Lond. Engl.* 1 (1959) 65–69.
- [133] P.J. Johnson, I.G. McFarlane, Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group, *Hepatology*. 18 (1993) 998–1005.
- [134] D. Gleeson, M.A. Heneghan, British Society of Gastroenterology, British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis, *Gut*. 60 (2011) 1611–1629. doi:10.1136/gut.2010.235259.
- [135] M.P. Manns, A.J. Czaja, J.D. Gorham, E.L. Krawitt, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, J.M. Vierling, American Association for the Study of Liver Diseases, Diagnosis and management of autoimmune hepatitis, *Hepatology*. 51 (2010) 2193–2213. doi:10.1002/hep.23584.
- [136] N.M. van Gerven, Y.S. de Boer, C.J. Mulder, C.M. van Nieuwkerk, G. Bouma, Auto immune hepatitis, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 4651–4661. doi:10.3748/wjg.v22.i19.4651.

- [137] K. Agarwal, A.J. Czaja, D.E. Jones, P.T. Donaldson, Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis, *Hepatology*. Baltim. Md. 31 (2000) 49–53. doi:10.1002/hep.510310110.
- [138] Y.S. de Boer, N.M.F. van Gerven, A. Zwijs, B.J. Verwer, B. van Hoek, K.J. van Erpecum, U. Beuers, H.R. van Buuren, J.P.H. Drenth, J.W. den Ouden, R.C. Verdonk, G.H. Koek, J.T. Brouwer, M.M.J. Guichelaar, J.M. Vrolijk, G. Kraal, C.J.J. Mulder, C.M.J. van Nieuwkerk, J. Fischer, T. Berg, F. Stickel, C. Sarrazin, C. Schramm, A.W. Lohse, C. Weiler-Normann, M.M. Lerch, M. Nauck, H. Völzke, G. Homuth, E. Bloemena, H.W. Verspaget, V. Kumar, A. Zhernakova, C. Wijmenga, L. Franke, G. Bouma, Dutch Autoimmune Hepatitis Study Group, LifeLines Cohort Study, Study of Health in Pomerania, Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1, *Gastroenterology*. 147 (2014) 443-452.e5. doi:10.1053/j.gastro.2014.04.022.
- [139] U. Christen, E. Hintermann, Pathogens and autoimmune hepatitis, *Clin. Exp. Immunol.* (2018). doi:10.1111/cei.13203.
- [140] I.N. Crispe, Liver antigen-presenting cells, *J. Hepatol.* 54 (2011) 357–365. doi:10.1016/j.jhep.2010.10.005.
- [141] M.R. Ebrahimkhani, I. Mohar, I.N. Crispe, Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells, *Hepatology*. Baltim. Md. 54 (2011) 1379–1387. doi:10.1002/hep.24508.
- [142] G. Senaldi, A. Lobo-Yeo, A.P. Mowat, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, Class I and class II major histocompatibility complex antigens on hepatocytes: importance of the method of detection and expression in histologically normal and diseased livers, *J. Clin. Pathol.* 44 (1991) 107–114.
- [143] K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, D.A. Hume, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.
- [144] M.S. Longhi, Y. Ma, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis, *J. Autoimmun.* 34 (2010) 7–14. doi:10.1016/j.jaut.2009.08.010.
- [145] A. Floreani, P. Restrepo-Jiménez, M.F. Secchi, S. De Martin, P.S.C. Leung, E. Krawitt, C.L. Bowlus, M.E. Gershwin, J.-M. Anaya, Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis, *J. Autoimmun.* 95 (2018) 133–143. doi:10.1016/j.jaut.2018.10.020.
- [146] L. Zhao, Y. Tang, Z. You, Q. Wang, S. Liang, X. Han, D. Qiu, J. Wei, Y. Liu, L. Shen, X. Chen, Y. Peng, Z. Li, X. Ma, Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression, *PLoS One*. 6 (2011) e18909. doi:10.1371/journal.pone.0018909.
- [147] S. Sakaguchi, M. Miyara, C.M. Costantino, D.A. Hafler, FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 490–500. doi:10.1038/nri2785.
- [148] S. Ferri, M.S. Longhi, C. De Molo, C. Lalanne, P. Muratori, A. Granito, M.J. Hussain, Y. Ma, M. Lenzi, G. Mieli-Vergani, F.B. Bianchi, D. Vergani, L. Muratori, A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis, *Hepatology*. Baltim. Md. 52 (2010) 999–1007. doi:10.1002/hep.23792.
- [149] A. Teufel, A. Weinmann, G.J. Kahaly, C. Centner, A. Piendl, M. Wörns, A.W. Lohse, P.R. Galle, S. Kanzler, Concurrent autoimmune diseases in patients with autoimmune

- hepatitis, *J. Clin. Gastroenterol.* 44 (2010) 208–213. doi:10.1097/MCG.0b013e3181c74e0d.
- [150] European Association for the Study of the Liver, *EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis*, *J. Hepatol.* 63 (2015) 971–1004. doi:10.1016/j.jhep.2015.06.030.
- [151] A.J. Czaja, Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease, *Dig. Dis. Sci.* 55 (2010) 2144–2161. doi:10.1007/s10620-010-1268-4.
- [152] D.J. Gassert, H. Garcia, K. Tanaka, J.F. Reinus, Corticosteroid-responsive cryptogenic chronic hepatitis: evidence for seronegative autoimmune hepatitis, *Dig. Dis. Sci.* 52 (2007) 2433–2437. doi:10.1007/s10620-006-9665-4.
- [153] S. Sundaram, K. S. S. Mazumdar, A. Shukla, Overlap Syndrome between Primary Biliary Cholangitis and Primary Sclerosing Cholangitis, *ACG Case Rep. J.* 5 (2018) e54. doi:10.14309/crj.2018.54.
- [154] R.C. Verdonk, M.F. Lozano, A.P. van den Berg, A.S.H. Gouw, Bile ductal injury and ductular reaction are frequent phenomena with different significance in autoimmune hepatitis, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 36 (2016) 1362–1369. doi:10.1111/liv.13083.
- [155] G.C. Cook, R. Mulligan, S. Sherlock, Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis, *Q. J. Med.* 40 (1971) 159–185.
- [156] I.M. Murray-Lyon, R.B. Stern, R. Williams, Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis, *Lancet Lond. Engl.* 1 (1973) 735–737.
- [157] V. Selvarajah, A.J. Montano-Loza, A.J. Czaja, Systematic review: managing suboptimal treatment responses in autoimmune hepatitis with conventional and nonstandard drugs, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36 (2012) 691–707. doi:10.1111/apt.12042.
- [158] R.A. Bhanji, A.L. Mason, S. Girgis, A.J. Montano-Loza, Liver transplantation for overlap syndromes of autoimmune liver diseases, *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 33 (2013) 210–219. doi:10.1111/liv.12027.
- [159] P. Lapierre, I. Djilali-Saiah, S. Vitozzi, F. Alvarez, A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens, *Hepatology. Baltim. Md.* 39 (2004) 1066–1074. doi:10.1002/hep.20109.
- [160] M. Holdener, E. Hintermann, M. Bayer, A. Rhode, E. Rodrigo, G. Hintereder, E.F. Johnson, F.J. Gonzalez, J. Pfeilschifter, M.P. Manns, M. von G. Herrath, U. Christen, Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1409–1422. doi:10.1084/jem.20071859.
- [161] G.G. Somjen, *Nervenkrankheiten: notes on the history of the concept of neuroglia*, *Glia.* 1 (1988) 2–9. doi:10.1002/glia.440010103.
- [162] A. Fromont, C. Binquet, E.A. Sauleau, I. Fournel, A. Bellisario, J. Adnet, A. Weill, S. Vukusic, C. Confavreux, M. Debouverie, L. Clerc, C. Bonithon-Kopp, T. Moreau, Geographic variations of multiple sclerosis in France, *Brain J. Neurol.* 133 (2010) 1889–1899. doi:10.1093/brain/awq134.
- [163] A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. - PubMed - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1114878> (accessed November 16, 2018).
- [164] B. Runmarker, O. Andersen, Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis, *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 1) (1995) 253–261.

- [165] C. Confavreux, M. Hutchinson, M.M. Hours, P. Cortinovis-Tourniaire, T. Moreau, Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 285–291. doi:10.1056/NEJM199807303390501.
- [166] G.C. Ebers, A.D. Sadovnick, N.J. Risch, A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Canadian Collaborative Study Group*, *Nature*. 377 (1995) 150–151. doi:10.1038/377150a0.
- [167] L.F. Barcellos, S. Sawcer, P.P. Ramsay, S.E. Baranzini, G. Thomson, F. Briggs, B.C.A. Cree, A.B. Begovich, P. Villoslada, X. Montalban, A. Uccelli, G. Savettieri, R.R. Lincoln, C. DeLoa, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, A. Compston, S.L. Hauser, J.R. Oksenberg, Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2813–2824. doi:10.1093/hmg/ddl223.
- [168] J.R. Oksenberg, S.E. Baranzini, S. Sawcer, S.L. Hauser, The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 516–526. doi:10.1038/nrg2395.
- [169] D.A. Dymant, G.C. Ebers, A.D. Sadovnick, Genetics of multiple sclerosis, *Lancet Neurol.* 3 (2004) 104–110.
- [170] J.L. Haines, H.A. Terwedow, K. Burgess, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmler, E.R. Martin, J.R. Oksenberg, R. Lincoln, D.Y. Zhang, D.R. Banatao, N. Gatto, D.E. Goodkin, S.L. Hauser, Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *The Multiple Sclerosis Genetics Group*, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1229–1234.
- [171] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, D.A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E.S. Lander, M.J. Daly, P.L. De Jager, P.I.W. de Bakker, S.B. Gabriel, D.B. Mirel, A.J. Ivinson, M.A. Pericak-Vance, S.G. Gregory, J.D. Rioux, J.L. McCauley, J.L. Haines, L.F. Barcellos, B. Cree, J.R. Oksenberg, S.L. Hauser, Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 851–862. doi:10.1056/NEJMoa073493.
- [172] R.M. Lucas, A.-L. Ponsonby, K. Dear, P.C. Valery, M.P. Pender, B.V. Taylor, T.J. Kilpatrick, T. Dwyer, A. Coulthard, C. Chapman, I. van der Mei, D. Williams, A.J. McMichael, Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination, *Neurology*. 76 (2011) 540–548. doi:10.1212/WNL.0b013e31820af93d.
- [173] I. a. F. van der Mei, A.-L. Ponsonby, T. Dwyer, L. Blizzard, R. Simmons, B.V. Taylor, H. Butzkueven, T. Kilpatrick, Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study, *BMJ*. 327 (2003) 316. doi:10.1136/bmj.327.7410.316.
- [174] A. Ascherio, R.A. Marrie, Vitamin D in MS: a vitamin for 4 seasons, *Neurology*. 79 (2012) 208–210. doi:10.1212/WNL.0b013e31825fe131.
- [175] M. Cortese, T. Riise, K. Bjørnevik, T. Holmøy, M.T. Kampman, S. Magalhaes, M. Pugliatti, C. Wolfson, K.-M. Myhr, Timing of use of cod liver oil, a vitamin D source, and multiple sclerosis risk: The EnvIMS study, *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 21 (2015) 1856–1864. doi:10.1177/1352458515578770.
- [176] S.M. Kimball, M.R. Ursell, P. O’Connor, R. Vieth, Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis, *Am. J. Clin. Nutr.* 86 (2007) 645–651. doi:10.1093/ajcn/86.3.645.

- [177] D.M. Wingerchuk, J. Lesaux, G.P.A. Rice, M. Kremenchutzky, G.C. Ebers, A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 76 (2005) 1294–1296. doi:10.1136/jnnp.2004.056499.
- [178] W. Royal, Y. Mia, H. Li, K. Naunton, Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol*. 213 (2009) 135–141. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.05.012.
- [179] J. Smolders, M. Thewissen, E. Peelen, P. Menheere, J.W.C. Tervaert, J. Damoiseaux, R. Hupperts, Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis, *PloS One*. 4 (2009) e6635. doi:10.1371/journal.pone.0006635.
- [180] S.S. Soldan, S. Jacobson, Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis, *Adv. Virus Res.* 56 (2001) 517–555.
- [181] L.I. Levin, K.L. Munger, M.V. Rubertone, C.A. Peck, E.T. Lennette, D. Spiegelman, A. Ascherio, Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis, *JAMA*. 293 (2005) 2496–2500. doi:10.1001/jama.293.20.2496.
- [182] M.P. Pender, Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases, *Trends Immunol*. 24 (2003) 584–588.
- [183] M.P. Pender, The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis, *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry*. 17 (2011) 351–367. doi:10.1177/1073858410381531.
- [184] L. Villard-Mackintosh, M.P. Vessey, Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence, *Contraception*. 47 (1993) 161–168.
- [185] M. Thorogood, P.C. Hannaford, The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis, *Br. J. Obstet. Gynaecol*. 105 (1998) 1296–1299.
- [186] C. Carlens, M.-P. Hergens, J. Grunewald, A. Ekbom, A. Eklund, C.O. Höglund, J. Askling, Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 181 (2010) 1217–1222. doi:10.1164/rccm.200909-1338OC.
- [187] F. Di Pauli, M. Reindl, R. Ehling, F. Schautzer, C. Gneiss, A. Lutterotti, E. O’Reilly, K. Munger, F. Deisenhammer, A. Ascherio, T. Berger, Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis, *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl*. 14 (2008) 1026–1030. doi:10.1177/1352458508093679.
- [188] B.C. Healy, E.N. Ali, C.R.G. Guttman, T. Chitnis, B.I. Glanz, G. Buckle, M. Houtchens, L. Stazzone, J. Moodie, A.M. Berger, Y. Duan, R. Bakshi, S. Khoury, H. Weiner, A. Ascherio, Smoking and disease progression in multiple sclerosis, *Arch. Neurol*. 66 (2009) 858–864. doi:10.1001/archneurol.2009.122.
- [189] D.D. Bode, The Uhthoff phenomenon, *Am. J. Ophthalmol*. 85 (1978) 721–722.
- [190] C. Confavreux, S. Vukusic, T. Moreau, P. Adeleine, Relapses and progression of disability in multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med*. 343 (2000) 1430–1438. doi:10.1056/NEJM200011163432001.
- [191] F.D. Lublin, S.C. Reingold, J.A. Cohen, G.R. Cutter, P.S. Sørensen, A.J. Thompson, J.S. Wolinsky, L.J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, P.A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R.J. Fox, M.S. Freedman, A.D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B.C. Kieseier, J.A. Lincoln,

- C. Lubetzki, A.E. Miller, X. Montalban, P.W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R.A. Rudick, M.P. Sormani, O. Stüve, E. Waubant, C.H. Polman, Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions, *Neurology*. 83 (2014) 278–286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560.
- [192] F.D. Lublin, S.C. Reingold, Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, *Neurology*. 46 (1996) 907–911.
- [193] M. Kremenchutzky, G.P.A. Rice, J. Baskerville, D.M. Wingerchuk, G.C. Ebers, The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease, *Brain J. Neurol.* 129 (2006) 584–594. doi:10.1093/brain/awh721.
- [194] S. Vukusic, C. Confavreux, Primary and secondary progressive multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 206 (2003) 153–155.
- [195] M. Trojano, D. Paolicelli, The differential diagnosis of multiple sclerosis: classification and clinical features of relapsing and progressive neurological syndromes, *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 22 Suppl 2 (2001) S98-102.
- [196] V.V. Brinar, M. Habek, Rare infections mimicking MS, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 112 (2010) 625–628. doi:10.1016/j.clineuro.2010.04.011.
- [197] A. Pietruczuk, A. Zsybska, K. Rejdak, E. Papuć, [Review of diagnostic criteria for multiple sclerosis], *Wiadomosci Lek. Wars. Pol.* 1960. 71 (2018) 1365–1371.
- [198] H. Babbe, A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schröder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid, K. Rajewsky, Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 393–404.
- [199] J. Booss, M.M. Esiri, W.W. Tourtellotte, D.Y. Mason, Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 62 (1983) 219–232.
- [200] J.W. Prineas, R.G. Wright, Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 38 (1978) 409–421.
- [201] C.F. Lucchinetti, W. Brück, M. Rodriguez, H. Lassmann, Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis, *Brain Pathol. Zurich Switz.* 6 (1996) 259–274.
- [202] M. Sospedra, R. Martin, Immunology of multiple sclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 683–747. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
- [203] A. Nylander, D.A. Hafler, Multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1180–1188. doi:10.1172/JCI58649.
- [204] M.H. Barnett, J.W. Prineas, Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 458–468. doi:10.1002/ana.20016.
- [205] J.-P. Soulillou, Missing links in multiple sclerosis etiology. A working connecting hypothesis, *Med. Hypotheses.* 80 (2013) 509–516. doi:10.1016/j.mehy.2013.01.036.

- [206] J. Van Weyenbergh, P. Lipinski, A. Abadie, D. Chabas, U. Blank, R. Liblau, J. Wietzerbin, Antagonistic action of IFN-beta and IFN-gamma on high affinity Fc gamma receptor expression in healthy controls and multiple sclerosis patients, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 161 (1998) 1568–1574.
- [207] E.J. Bartholomé, F. Willems, A. Crusiaux, K. Thielemans, L. Schandené, M. Goldman, Interferon-beta inhibits Th1 responses at the dendritic cell level. Relevance to multiple sclerosis, *Acta Neurol. Belg.* 99 (1999) 44–52.
- [208] P.A. Calabresi, C.M. Pelfrey, L.R. Tranquill, H. Maloni, H.F. McFarland, VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta, *Neurology.* 49 (1997) 1111–1116.
- [209] H.S. Panitch, C.T. Bever, Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned?, *J. Neuroimmunol.* 46 (1993) 155–164.
- [210] K.P. Johnson, B.R. Brooks, C.C. Ford, A. Goodman, J. Guarnaccia, R.P. Lisak, L.W. Myers, H.S. Panitch, A. Pruitt, J.W. Rose, N. Kachuck, J.S. Wolinsky, Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group, *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 6 (2000) 255–266. doi:10.1177/135245850000600407.
- [211] O. Neuhaus, C. Farina, H. Wekerle, R. Hohlfeld, Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis, *Neurology.* 56 (2001) 702–708.
- [212] J. Chun, H.-P. Hartung, Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis, *Clin. Neuropharmacol.* 33 (2010) 91–101. doi:10.1097/WNF.0b013e3181cbf825.
- [213] L. Kappos, E.-W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson, P. Burtin, FREEDOMS Study Group, A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 387–401. doi:10.1056/NEJMoa0909494.
- [214] T.A. Yednock, C. Cannon, L.C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, N. Karin, Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin, *Nature.* 356 (1992) 63–66. doi:10.1038/356063a0.
- [215] B. Bielekova, B.L. Becker, Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action, *Neurology.* 74 Suppl 1 (2010) S31-40. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97ed3.
- [216] R.M. Ransohoff, Natalizumab for multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 2622–2629. doi:10.1056/NEJMct071462.
- [217] A.H. Cross, J.L. Stark, J. Lauber, M.J. Ramsbottom, J.-A. Lyons, Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *J. Neuroimmunol.* 180 (2006) 63–70. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.06.029.
- [218] S.L. Hauser, E. Waubant, D.L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R.J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C.H. Smith, HERMES Trial Group, B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 676–688. doi:10.1056/NEJMoa0706383.
- [219] A.G. Baxter, The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 904–912. doi:10.1038/nri2190.

- [220] S.D. Miller, W.J. Karpus, T.S. Davidson, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse, *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan Al. CHAPTER (2007) Unit-15.1. doi:10.1002/0471142735.im1501s77.
- [221] A.M. Carrizosa, L.B. Nicholson, M. Farzan, S. Southwood, A. Sette, R.A. Sobel, V.K. Kuchroo, Expansion by self antigen is necessary for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells primed with a cross-reactive environmental antigen, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 161 (1998) 3307–3314.
- [222] M. Khare, A. Mangalam, M. Rodriguez, C.S. David, HLA DR and DQ interaction in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA class II transgenic mice, *J. Neuroimmunol.* 169 (2005) 1–12. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.07.023.
- [223] M. Sundvall, J. Jirholt, H.T. Yang, L. Jansson, A. Engström, U. Pettersson, R. Holmdahl, Identification of murine loci associated with susceptibility to chronic experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Genet.* 10 (1995) 313–317. doi:10.1038/ng0795-313.
- [224] H. Wekerle, Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations, *Ann. Rheum. Dis.* 67 Suppl 3 (2008) iii56-60. doi:10.1136/ard.2008.098020.

Résumé/Abstract

Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire. L'étiologie de la pathologie reste souvent inconnue, compliquant la conception de traitements adaptés. Ce projet de thèse s'est focalisé sur la molécule « *a proliferation inducing ligand* » (APRIL), facteur de survie des plasmocytes (PC) produisant les anticorps, dans l'hépatite auto-immune (HAI) et la sclérose en plaques (SEP). Dans l'HAI, une principale caractéristique histologique est la présence d'un infiltrat lymphoplasmocytaire formant une hépatite d'interface dommageable. Dans cette maladie, nous avons d'abord pu mettre en évidence une corrélation positive entre l'expression d'APRIL et l'infiltration des PC dans les espaces portes. *In vitro*, nous avons observé une survie augmentée des PC du foie en présence d'APRIL. La corticothérapie communément prise par les patients HAI ne cible pas directement les PC. Cependant, nous avons remarqué une réduction simultanée de la densité de PC et de l'expression d'APRIL. Ainsi, cette étude étend le rôle de facteur de survie d'APRIL aux PC du foie dans l'HAI. Les rechutes sont fréquentes après arrêt du traitement, nous indiquant que les cellules pathogènes sont épargnées par la thérapie. Nos résultats montrent que le ciblage d'APRIL pourrait être précieux dans l'HAI. Propre de son rôle sur les PC, APRIL a été ciblée avec succès dans plusieurs maladies auto-immunes. Outre ces succès, un essai clinique visant à bloquer APRIL dans la SEP à malheureusement conduit à une exacerbation inattendue de la maladie. Nous avons été capables de montrer qu'APRIL cible un nouveau type cellulaire dans le système nerveux central, les astrocytes. La fixation d'APRIL à la surface des astrocytes dépend d'un nouveau partenaire de liaison, exprimé par ces derniers, les chondroïtines sulfates protéoglycans. Cette interaction induit la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, conduisant à l'inhibition de, la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de souris déficientes pour *APRIL* dans le modèle standard de la SEP nous a permis de confirmer le rôle neuro-protecteur d'APRIL. Finalement, après injection d'APRIL recombinante dans ce modèle murin, une réduction de la sévérité de la maladie a été observée. Globalement, nous avons identifié APRIL comme une molécule à double rôle dans les maladies auto-immunes.

Mots-clés : A proliferation inducing ligand (APRIL), Auto-immunité, Sclérose en plaques (SEP), hépatite auto-immune (HAI), Inflammation.

Autoimmune diseases result from a dysfunction of the immune system. The disease etiology is often unknown, complicating the design of appropriate treatments. This thesis project focused on the molecule "a proliferation inducing ligand" (APRIL), a survival factor for antibody-producing plasma cells (PC), in autoimmune hepatitis (AIH) and multiple sclerosis (MS). In AIH, one main histological feature is the presence of a lymphoplasmacytic infiltration forming a damaging interface hepatitis. In this disease, we first noticed a positive correlation between APRIL expression and PC infiltration in portal spaces. *In vitro*, we further observed an extended survival of liver PC in the presence of APRIL. The corticosteroid therapy commonly applied to AIH patients does not directly target PC. However, we noticed a concomitant reduction in portal PC density and APRIL expression. Hence, this study is extending the survival role of APRIL to liver PC in AIH. Relapses are frequent after treatment withdrawal, telling us that pathogenic cells are spared by the therapy. Our results indicate that APRIL targeting might also be valuable in AIH. Own to its role on PC, APRIL has been successfully targeted in several autoimmune diseases. Besides successes, a clinical trial aiming at APRIL blockade in MS has unfortunately led to an unexpected disease exacerbation. We have been able to show that APRIL targets a new cell type in the central nervous system, the astrocyte. The APRIL binding to astrocyte surface depends on a new binding partner, expressed by the latter, the chondroitin sulfate proteoglycans. This binding induces the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, leading to the inhibition of, self-reactive T-cell proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion. Use of *APRIL*-deficient mice in the standard model of MS allowed us to confirm the neuroprotective role of APRIL. Finally, after recombinant APRIL injection in this model, a lowered disease severity was observed. Overall, we identified APRIL as a dual role molecule in autoimmune diseases.

Keywords: A proliferation inducing ligand (APRIL), Autoimmunity, Multiple sclerosis, Autoimmune hepatitis, Inflammation.