

Evaluation des effets des traitements par Rituximab versus corticothérapie seule sur la réponse auto-réactive des patients atteints de pemphigus.

Maud Maho

► To cite this version:

Maud Maho. Evaluation des effets des traitements par Rituximab versus corticothérapie seule sur la réponse auto-réactive des patients atteints de pemphigus.. Immunothérapie. Normandie Université, 2019. Français. NNT: 2019NORMR132. tel-03029249

HAL Id: tel-03029249 https://theses.hal.science/tel-03029249v1

Submitted on 28 Nov 2020

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 diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de « Université de Rouen Normandie »

Evaluation des effets des traitements par Rituximab versus corticothérapie seule sur la réponse auto-réactive des patients atteints de pemphigus

Présentée et soutenue par Maud Maho-Vaillant

	Thèse soutenue publiquement le 27 novembre 2019 devant le jury composé de	
Pr Guislaine Carcelain	PU-PH/Chef de service du laboratoire d'immunologie AP-HP Hôpital Robert-Debré, Cimi-Paris, Inserm U1135, Université Paris Diderot	Rapporteur
Pr Isabelle Bourgault Villada	PU-PH/Chef de services de dermatologie AP-HP -Hôpital Ambroise Paré, Inserm U1016, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines	Rapporteur
Pr Jean-François Nicolas	PU-PH/Chef de service adjoint de dermatologie CHU Lyon-Sud et directeur de recherche CIRI UMR Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Dr Béhazine Combadière	Directrice de recherche Inserm U1135, CIMI-Paris, Université Paris- Sorbonne	Examinateur
Pr Sophie Candon	PU-PH/Directrice adjointe UMR Inserm U1234, CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Dr Sébastien Calbo	Ingénieur de recherche /UMR Inserm U1234, Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse
Pr Pascal Joly	PU-PH/Chef de service de dermatologie et du centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes CHU de Rouen, UMR Inserm U1234, Université de Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr Pascal Joly, laboratoire INSERM U1234 « PANTHER »







ÉVALUATION DES EFFETS DES TRAITEMENTS PAR RITUXIMAB VERSUS CORTICOTHERAPIE SEULE SUR LA REPONSE AUTO-REACTIVE DES PATIENTS ATTEINTS DE PEMPHIGUS

27 novembre 2019 Par Maud Maho-Vaillant CHU Charles Nicolle de Rouen, Département de dermatologie, Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, INSERM U1234 « PANTHER »

A cœur vaillant rien d'impossible

(Jacques cœur)

A ma famille de sang et de cœur

REMERCIEMENTS

« C'est au contact d'autrui que l'homme apprend ce qu'il sait » (Euripide), et j'ai beaucoup appris !

Je souhaite remercier le Pr. Olivier Boyer pour m'avoir accueillie au sein de son équipe puis de son unité. Je vous remercie pour votre confiance ainsi que pour m'avoir proposé mon premier poste d'ingénieur dans le cadre d'un protocole de recherche clinique sur les myopathies auto-immunes. Merci, de m'avoir soutenue lors de ma réorientation thématique vers « les maladies bulleuses auto-immunes » et dans ce projet de thèse tardif. Enfin, merci pour votre dévouement envers l'unité.

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse, le Pr. Pascal Joly, pour la confiance et la liberté d'action qu'il m'accorde. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de ses grandes compétences, de sa rigueur intellectuelle, de son efficacité ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré lors de la rédaction des articles et de ce manuscrit. Merci d'ancrer notre travail dans la réalité de la médecine en gardant toujours l'objectif d'améliorer la prise en charge des patients. C'est pour moi, une grande richesse.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant de thèse, le Dr Sébastien Calbo, pour son attention de tous les instants sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été déterminants pour la bonne réussite de cette thèse. Merci, de m'avoir soutenue depuis mes débuts et permis de progresser dans le domaine complexe de l'immunologie.

Je souhaite également remercier le Pr Sophie Candon d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse ainsi que pour les judicieux conseils notamment sur le Rituximab et sur les HACA, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je tiens à remercier le Pr. Isabelle Bourgault Villada et le Pr. Guislaine Carcelain d'avoir gentiment accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie sincèrement de consacrer une partie de votre temps précieux à examiner mon manuscrit ainsi que pour l'intérêt que vous portez à ces travaux. Je vous adresse ma profonde gratitude.

J'adresse également mes remerciements au Pr. Jean-François Nicolas pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Madame le Dr Béhazine Combadière, c'est grâce à vous et votre équipe si j'en suis là aujourd'hui. Vous m'avez fait découvrir et aimer la recherche. Je vous en remercie sincèrement et je suis honorée que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Monsieur le Dr Nicolas Fazilleau, je tiens à souligner l'importance de votre aide pour mener à bien ces travaux collaboratifs sur les TFH. Merci pour tous les échanges passés et à venir.

Mes remerciements s'adressent également au Pr Philippe Musette qui a été le premier à me soutenir dans ce projet de thèse.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel (CSI), le Dr Hugo Mouquet, le Dr Christophe Jamin, le Dr Alain Rincé, le Dr Alexandre Couture pour notre rendez-vous annuel riche en conseils scientifiques tout au long de ces quatre années. Vous m'avez aidée à faire le point et parfois à réorienter ce projet. Je remercie également, le Dr. Serge Jacquot et le Dr Fabienne Jouen de partager leurs expertises en immunopathologie et de m'aider à faire avancer les différents projets. Je vous remercie également d'avoir relu ce manuscrit. Merci pour votre bienveillance et votre disponibilité à mon égard.

Je tiens particulièrement à remercier tous mes collègues actuels ou passés pour leurs aides tout au long de ma carrière. Je remercie tout particulièrement Laurent pour son encadrement à mes débuts. Tu es ma référence alliant l'humour, la gentillesse, à un haut niveau de compétence technique et scientifique. Merci pour tes précieux conseils et pour ta disponibilité. Fred, mon amie, simplement merci pour tout. Tu n'imagines pas à quel point ta présence au labo me manque. Un énorme merci à Marie-Laure, mon œil de lynx, pour ton aide au quotidien au laboratoire, pour ta bonne humeur et ton rire si communicatif. Merci également pour le temps que tu as consacré à la correction au peigne fin de ce travail et pour tous tes commentaires m'ayant permis de l'améliorer. Merci à vous, Vivien, Claire, Marie : notre fine équipe dermato est riche de cette association de médecins et de scientifiques alliant les compétences de chacun. J'apprends beaucoup et j'apprécie nos échanges. Merci Céline et Laetitia d'avoir été des relectrices et des conseillères éclairées de mon manuscrit mais également des amies et des soutiens d'un grand réconfort lors de pause-café-bavardage. Gaëtan, merci pour ton aide précieuse avec les FACS ainsi que pour ta disponibilité. Chantal, merci pour ton soutien logistique. Merci à tous ceux de l'unité : Christophe, Manu, Audrey, Mélanie, Baptiste, Romain, Rachid, Léa, Laurine, Var, Catalina, Henri, Sarah, Isabelle, Sahil et les autres qui ont partagé conseils et connaissances et qui contribuent à l'ambiance et au dynamisme du laboratoire. Je n'oublie pas certains de mes anciens collègues : Reynald, Catherine, Natacha, Baptiste, Céline, Sandra, Virginie, Florence et ma première padawan Claire dont l'amitié compte. Mes remerciements vont également aux personnels de la direction de la recherche clinique et du service de dermatologie. Je remercie tout particulièrement Vincent pour sa disponibilité et sa bonne humeur, Lamia, Céline et Orlane pour leur aide sur les PHRC ainsi qu'Estelle pour les statistiques et Jessica pour les commandes. J'adresse également un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'immunologie : Sabine, Lucille, Laetitia, Julie, Arnaud, Justine, Aurélie, Edwige, Florence, Marlène, Florence, Camille et Isabelle pour tous les petits coups de pouce techniques ou administratifs qui m'ont aidé à faire avancer ce projet.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de ma famille et à mes amis. Merci de votre patience pour tous les « je ne peux pas, je bosse ». Tout d'abord, un grand merci à mes parents pour leur soutien sans faille depuis toujours. Je vous exprime toute ma reconnaissance et mon amour. Je remercie également ma sœur Marine, ma cousine Balou ainsi que ma belle-famille Bernard, Joëlle, Anthony, Émilie, Stéphane qui m'ont donné leur appui tout au long du doctorat. Mes filleuls et mes neveux, merci pour vos tendres messages. Mes amis Fafoune, Mathilde, Vincent, Mél, Chris, Raynald, Cyril, Laurence, Philippe, Mario, Amélie, Ambrina, Micka, Corinne et tant d'autres, merci pour tous les moments d'évasion, vos encouragements, votre présence et parce que vous êtes ma famille de cœur. Enfin, ma petite famille qui est et restera ma plus belle réussite et ma plus grande fierté. Je remercie profondément mon mari Jérôme d'être à mes côtés depuis plus de 20 ans. Merci d'avoir géré notre quotidien, nos enfants et d'avoir compris que j'avais besoin de ce défi. Thibault et Manon, mes amours, merci de m'avoir donné du temps pour ce projet. Vous m'avez tous énormément soutenue et encouragée. Je vous aime.

RESUME

Le pemphigus est une maladie auto-immune spécifique de la peau et des muqueuses provoqué par des auto-anticorps (Ac) spécifiques des desmogléines (Dsg) 1 ou 3. Ces Ac pathogéniques inhibent l'adhésion cellulaire des kératinocytes. Le pemphigus se déclenche par la conjonction d'événements rares impliquant l'émergence puis la coopération de lymphocytes B (LB) et de lymphocytes LT auto-réactifs dans un contexte génétique et environnemental particulier. Jusqu'à présent, la première ligne de traitement du pemphigus était constituée de fortes doses de corticoïdes, qui sont de puissants immunosupresseurs systèmiques. Le Rituximab (RTX), un Ac monoclonal chimérique anti-CD20, constitue une thérapeutique innovante aboutissant à l'élimination des LB. L'étude clinique RITUX 3 a été conçue pour évaluer l'efficacité et l'innocuité du traitement utilisant le RTX associé à une courte corticothérapie dans le traitement de première intention du pemphigus par rapport au traitement de référence par la corticothérapie standard (CS).

Dans un premier temps, notre analyse clinico-biologique des patients après 24 mois a démontré que l'utilisation du RTX associé à de la prednisone à court terme en traitement de première intention chez les patients atteints de pemphigus foliacé et vulgaire modéré à sévère est à la fois plus efficace et mieux toléré que le traitement de référence par la prednisone seule (89% de patients *versus* 34%). Cette efficacité a été confortée à plus long terme après la reconstitution du répertoire lymphocytaire B avec un risque de rechute de 2% à 36 mois. La présence d'une forme sévère de pemphigus au diagnostic (PDAI \ge 45) et d'un taux d'Ac anti-Dsg à 3 mois supérieur aux valeurs seuils (anti-Dsg1 \ge 20 ou anti-Dsg3 \ge 120) sont associés à un risque de rechute précoce de 50%. Ces deux facteurs prédictifs permettent d'identifier un sous-groupe de patients présentant un risque élevé de rechute nécessitant une perfusion d'entretien de RTX au 6^{ème} mois.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact des traitements par RTX et par CS chez les patients atteints de pemphigus afin de mieux appréhender la réponse auto-immune. La caractérisation phénotypique des LB auto-réactifs et l'analyse de la fréquence des LB capables de sécréter des immunoglobulines (Ig)G anti-Dsg par une approche ELISPOT a permis d'établir que l'efficacité du traitement par RTX dans le pemphigus semble liée à l'élimination des LB mémoires CD27+IgG+ spécifiques des Dsg. Des LB auto-réactifs Dsg restent détectables après RTX suite à la reconstitution lymphocytaire B, mais ces LB ont un phénotype naïf et non commuté (IgM) et ne secrètent plus d'IgG. En revanche, la persistance des LB auto-réactifs capables de sécréter des IgG anti-Dsg après traitement par CS est certainement à l'origine des rechutes fréquentes. L'analyse de l'expression génique ciblée à l'échelle unicellulaire a démontré qu'initialement, les LB spécifiques des Dsg ont un profil pro-inflammatoire avec l'expression de trois gènes codant pour les interleukines (IL)-1 β , IL-12p35 et IL-23p19 et pour le gène de l'IRF5 (Interferon regulatory factor 5) par rapport aux LB non auto-réactifs. Le RTX et la CS ont des effets différents sur l'expression de ces gènes mais les deux réduisent l'expression génique d'IL-1ß qui semble jouer un rôle important dans la physiopathologie du pemphigus. Parallèlement, l'analyse transcriptomique puis protéique des LB isolés des patients en rémission complète ou incomplète 6 ans après l'étude RITUX 1 a mis en évidence une augmentation d'expression de KCNN4 (Potassium calciumactivated channel subfamily N member 4) à la surface des LB chez les patients atteints de pemphigus en rémission complète pouvant influencer la maturation des LB. L'efficacité à long terme du RTX dans le pemphigus semble résulter d'effets plus complexes que la simple délétion initiale des LB auto-réactifs pathogènes en jouant également sur la coopération cellulaire entre LB et lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) auto-réactifs. Nous avons observé une interdépendance les LB et de Tfh conduisant à une diminution des Tfh et de la cytokine IL-21 suite à la déplétion des LB par le RTX qui n'est pas observée chez les patients du groupe CS. L'analyse post-traitement des patients ayant un HLA de susceptibilité a permis de mettre en évidence l'existence de Tfh spécifiques de la Dsg3 dans le sang avec une fréquence significativement plus faible chez les patients ayant reçu le RTX comparé à ceux traités uniquement par la prednisone ce qui explique probablement le blocage de la maturation des LB et la réapparition retardée des LB mémoires spécifiques de la Dsg prolongeant ainsi la rémission malgré le retour des LB autoréactifs dans le sang des patients.

En conclusion, cet essai clinique a concrètement amélioré la vie des patients atteints de Pemphigus car le schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention est maintenant recommandé aux Etats-Unis et en Europe. Mes travaux de thèse confirment que les LB sont des acteurs majeurs dans la physiopathologie du pemphigus mais souligne également le rôle clé des Tfh dans les mécanismes de maturation des LB auto-immuns.

<u>Mots clés</u>: Pemphigus, Rituximab, Corticothérapie, Desmogléine, Lymphocytes B, Lymphocytes T folliculaires *helper* et Auto-immunité.

ABSTRACT

Pemphigus is an autoimmune disease of the skin and mucous membranes caused by autoantibodies (Ab) specific to desmoglein (Dsg) 1 or 3. These pathogenic Ab inhibit cell adhesion of keratinocytes. The development of pemphigus is associated with the conjunction of many uncommon events involving the emergence and then the cooperation of auto-reactive B cells and T cells link to genetic and environmental factors. Until now, the first line of treatment consisted of high doses of corticosteroids. Rituximab (RTX), an anti-CD20 chimeric monoclonal antibody, is an innovative therapy that results in B cells depletion. The RITUX 3 clinical trial was designed to evaluate the efficacy and safety of RTX combined with a short-course glucocorticoid therapy as a first-line treatment of pemphigus versus the standard treatment with standard corticosteroids (CS).

As a first step, our clinico-biological analysis of patients after 24 months has shown that the use of RTX combined with short-term prednisone as a first-line treatment in patients with moderate to severe pemphigus is both more effective and better tolerated than the reference treatment with prednisone alone. Respectively, 89% of patients versus 34% in each group and both pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris patients responded. This efficacy was confirmed in the longer term after reconstitution of the B lymphocyte repertoire with a risk of relapse of only 2% at 36 months. The presence of a severe form of pemphigus at diagnosis (PDAI \geq 45) and an anti-Dsg Ab level at 3 months above threshold values (anti-DSG1 \geq 20 or anti-DSG3 \geq 120) are associated with 50% risk of early relapse. These two predictive factors make it possible to identify a subgroup of patients at high risk of relapse requiring a maintenance infusion of RTX at the 6th month.

In a second step, we studied the impact of RTX and CS treatments in patients with pemphigus in order to better understand the autoimmune response. The phenotypic characterization of auto-reactive B cells and the analysis of the frequency of B cells able of secreting anti-Dsg immunoglobulin (Ig) G by an ELISPOT approach demonstrated that the efficacy of RTX treatment in pemphigus seems related to the elimination of IgG-switched Dsg memory B-cells. Dsg specific B cells remain detectable after RTX when B cells return, but these B cells have a naïve and non-switched (IgM) phenotype and no longer secrete IgG. On the other hand, the persistence of self-reactive Dsg B cells capable of secreting IgG anti-Dsg after treatment with CS is certainly at the origin of the frequency of relapses. The unicellular targeted gene expression analysis demonstrated that initially, Dsg-specific B cells have a pro-inflammatory profile with the overexpression of three genes encoding Interleukin (IL) -1β , IL-12p35 and IL-23p19 and for the IRF5 gene (Interferon regulatory factor 5) compared to non-self-reactive B cells. RTX and CS have different effects on the expression of these genes, but both reduce the gene expression of IL-1 β , which seems to play an important role in the pathophysiology of pemphigus. At the same time, transcriptomic and proteomic analysis of isolated whole B cells from patients in complete or incomplete remission 6 years after the RITUX1 study revealed an increase in the expression of KCNN4 (Potassium calcium-activated channel subfamily N member 4) on the surface B cells in patients with pemphigus in complete remission which may influence B cells maturation. The long-term efficacy of RTX in pemphigus appears to be more complex than the initial depletion of pathogenic auto-reactive B cells by acting as well on cell cooperation between B cells and auto-reactive T follicular helper cells (Tfh). We observed an interdependence of B cells and Tfh leading to a decrease in Tfh and cytokine IL-21 following the B cells depletion by RTX, which is not observed in patients in the CS group. The post-treatment analysis of patients with HLA of susceptibility made it possible to demonstrate the existence of Dsg3 specific Tfh in the blood with a significantly lower frequency in patients who received RTX compared with those treated only with prednisone, which probably explains the blocking of B cells maturation and the delayed reappearance of Dsg-specific memory B cells, which maintain the long term.

In conclusion, this work has concretely improved the lives of patients with pemphigus because the therapeutic regimen using RTX in first intention is now recommended in the US and Europe. My thesis results confirm that B cells are major players in the pathophysiology of pemphigus but also highlights the key role of Tfh in autoimmune B cells maturation mechanisms.

Key words: Pemphigus, Rituximab, Corticotherapy, Desmoglein, B-cell, T follicular cell helper (Tfh) and Autoimmunity.

ABRÉVIATIONS

A

Ac : Anticorps ABC : Age-Associated B cells Ach : Acétylcholine Acm : Anticorps monoclonaux ADCC : Antibody-dependent cell cytotoxicity ADN : Acide désoxyribonucléique ADNc : ADN complémentaire AE : Ancrage extracellulaire AI : Ancrage intracellulaire AID : Activation-induced deaminase APE : Apuric-apyrmidic endonuclease APRIL : A proliferation-inducing ligand AP-1 : Activator protein 1 ARN : Acide ribonucléique ASC : Antibody secreting cell A2ML1 : α-2-macroglobuline-like-1

Β

BAFF : *B-cell activating factor* BAFF-R : *B-cell activating factor receptor* BAX : *Bcl2-associated X* Bcl-6 : *B-cell lymphoma 6 protein* BCMA : *B cell maturation antigen* BCR : *B cell receptor* BER : *Base excision repair* Blimp-1 : *B Lymphocyte-induced maturation protein 1* Breg : Lymphocyte B régulateur BTK : Tyrosine kinase de Bruton

C

Ca²⁺ : Calcium CAAR-T : Chimeric autoantibody receptor T cell CAM : Complexe d'attaque membranaire CAR-T : Chimeric antigen receptor T cell CCR : C-C chemokine receptor CD : Cluster de différenciation CDC : Complement-dependent cytotoxicity CDR : Complementary determining region CD40L : CD40 ligand CG : Centre germinatif CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité COL4A3 : Collagen type IV Alpha 3 COL4A4 : Collagen Type IV Alpha 4 CPA : Cellule présentatrice d'antigène CS : Corticothérapie standard cTfh : Circulating follicular helper cells CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 CVID : Common variable immune deficiency CXCR : C-X-C chemokine receptor

D

D : Diversité DAMP : Damage associated molecular pattern DBAI : Dermatose bulleuse auto-immune DC : Cellules dentritique DCF : Cellules dendritique folliculaire Dp : Desmoplakine Dsc : Desmocolline Dsg : Desmogléine

E

E-cadhérine : *Epithelial-cadherin* EBI3 : *Epstein-Barr virus-induced gene 3* EBV : Virus Eptsein-Barr EC : Domaine extracellulaire EGFR : *Epidermal growth factor receptor* ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* ELISPOT : *Enzyme-linked immunospot* Evpl : Envoplakine

F

Fab : Fragment antigen binding FAE : Fab-arm exchange FasL : Fas ligand Fc : Fragment cristallisable FcR : Récepteur aux immunoglobulines Foxp3 : Forkhead boîte P3

G

GATA3 : *GATA binding protein 3* GC : Glucocorticoïde GR : Récepteur de glucocorticoïde

Η

H : Heavy chain HACA: Human anti-chimeric antibodie) HHV-8 : Herpès virus humain type 8 HLA : Human leucocyte antigen Hsp27 : Heat shock protein 27 HSV : Herpes virus simplex

Ι

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1 ICOS : Inducible T-cell costimulator ICOSL : Inducible T-cell costimulator Ligand IFD : Immunofluorescence directe IFI : Immunofluorescence indirecte IFN : Interféron Ig : Immunoglobuline IL : Interleukine IRF5: Interferon regulatory factor 5 iSALT : Inducible skin-associated lymphoid tissues^{9,10} iTreg : Lymphocyte T régulateur induit

J : Jonction JDE : Jonction dermo-epidermique

K

KCNN4 : Potassium calcium-activated channel subfamily N Member 4 kDa : Kilodalton KO : Knockout

L

L : *Light chain* LB : Lymphocyte B LPS : Lipopolysaccharide LT : Lymphocyte T LT α1β2 : Lymphotoxine α1β2

Μ

mAchR : Récepteur muscarinique de l'acétylcholine MAI : Maladie auto-immune MAPKAP2 : *MAP kinase activated protein kinase 2* MASP1 : *Mannan-binding lectin serine protease 1* MEC : Matrice extracellulaire MFI : *Mean fluorescence intensity* MMR : *Mismatch repair* MTX : Methotrexate

Ν

nAchR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine NF-kB : *Nuclear factor-kappa B* NK: *Natural killer* NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain like receptor* nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

0

OX40L : OX-40 Ligand

Р

PAMP: Pathogen associated molecule pattern PAMS : Paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome PB : Pemphigoïde bulleuse PBMC : Peripheral blood mononuclear cell PDGF : Platelet-derived growth factor PD-1 : Programmed cell death 1 PD-L1 : Programmed death-ligand 1 PF : Pemphigus foliacé Pg : Plakoglobine PKC : Protéine kinase C Pkp : Plakophiline Ppl : Périplakine PPN : Pemphigus paranéoplasique PRR : Pattern-recognition receptor PV : Pemphigus vulgaire PX : Pemphaxine P38-MAPK : Mitogen-activated protein kinases P38

qRT-PCR : Quantitative real-time polymerase chain reaction

R

RAG : Recombination-ativating genes RhoA : Rho-GTPase A ROR γ t : Retinoic acid-related orphan receptor γ t RTX : Rituximab

S

S : Switch region SAP : SLAM-associating protein scFc : Single-chain variable fragment SCI : Séquence cadhérine intracellulaire Scr : Tyrosine kinase Scr SDF-1: Stromal cell-derived factor-1 SIC : Systeme immunitaire cutané SLAM : Signaling lymphocytic activation molecule SNP : Single-nucleotide polymorphism SSR : Séquence signal de recombinaison STAT : Signal transducer and activator of transcription ST18 : Suppression of tumorigenicity 18

Т

TACI : Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilinligand interactor T-bet : T-box transcription factor TCR : T cell receptor Tfh : Lymphocyte T folliculaire helper Tfr : Lymphocyte T régulateur folliculaire TGF β : Transforming growth factor beta Th : Lymphocyte T helper TLR : Toll-like receptor TM : Domaine transmembranaire TNF : Tumor necrosis factor TP53 : Tumor protein 53 Treg : Lymphocyte T régulateur Trp² : Résidus de tryptophane (position 2) Tr1 : Lymphocyte T régulateur de type 1

U

UNG : Uracil DNA glycosylase UV : Ultra-Violet

V

V : Gène de la Variabilité VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

X

XBP-1 : X-box-binding protein 1

Ζ

ZBTB20 : Zinc finger and BTB domain containing 20

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la peau	3
Figure 2 : Cellules de l'épiderme	4
Figure 3 : Stratification de l'épiderme	5
Figure 4: Jonctions cellulaires de l'épiderme	7
Figure 5 : Structure moléculaire du desmosome	.11
Figure 6 : Expression des protéines desmosomales dans l'épiderme	.15
Figure 7 : Structure moléculaire de l'hémidesmosome	.18
Figure 8 : Structure du derme	.19
Figure 9 : Barrière immunologique de la peau	.24
Figure 10 : Diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes	.33
Figure 11 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus vulgaire	.35
Figure 12 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus foliacé	.36
Figure 13 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus paranéoplasique	.38
Figure 14 : Les gènes HLA de susceptibilité au pemphigus	.42
Figure 15 : Présentation antigénique de la desmogléine 3 par le CMH de classe II	.45
Figure 16 : Modèle étiopathogénique du fogo selvagem	.51
Figure 17 : Modèles murins de pemphigus	.54
Figure 18 : Profils des anticorps anti-desmogléines corrélés au phénotype clinique	.59
Figure 19 : Structure et fonctions des anticorps	.60
Figure 20 : Régions antigéniques ciblées par les anticorps anti-desmogléines	.63
Figure 21 : Modélisation de l'interface d'adhésion des domaines extracellulaires des cadhérines et o épitopes ciblés par des anticorps pathogènes anti-desmogléine 3	des .65
Figure 22 : Mécanismes moléculaires de l'acantholyse dans le pemphigus	.71
Figure 23 : Mécanismes cellulaires auto-immuns impliqués dans la physiopathologie du pemphigus	.74
Figure 24 : Différenciation des lymphocytes CD4+ naïfs	.78
Figure 25 : Différenciation des lymphocytes T folliculaires helper	.83
Figure 26 : Différenciation des Lymphocytes B.	.86

Figure 27 : Réponse des lymphocytes B à des antigènes T dépendants	90
Figure 28 : Mécanismes impliqués dans la génération du répertoire lymphocytaire B	
Figure 29 : Stratégies thérapeutiques actuelles ou futures du pemphigus	
Figure 30 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes	
Figure 31 : Structure et mécanismes d'action du Rituximab	

LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et antigéniques des principales dermatoses bulleuses auto-immunes

	32
Tableau 2 : Les allèles HLA de classe II de susceptibilité aux pemphigus	43
Tableau 3 : Propriétés des isotypes et des sous-classes des immunoglobulines	61
Tableau 4 : Antigènes non classiques cibles des auto-anticorps du pemphigus	67

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : La Peau	3
1. La structure de la peau	
1.1. L'épiderme	
1.1.1. Les cellules de l'épiderme	
1.1.2. La stratification épidermique	
1.1.3. La cohésion épidermique	
1.1.3.1. Les jonctions communicantes	
1.1.3.2. Les jonctions serrées	
1.1.3.3. Les jonctions adhérentes	
1.1.3.4. Les desmosomes	
Les cadhérines desmosmales	
Les protéines de la famille Armadillo	
Les desmoplakines	
L'organisation des protéines desmosomales	
1.1.4. La jonction dermo-épidermique : les hémidesmosomes	
1.2. Le derme	19
1.3. L'hypoderme	20
2. Les fonctions de la peau	21
2.1. La fonction de régulation thermique	21
2.2. La fonction de préperception	21
2.3. La fonction de protection	22
3. La peau et le système immunitaire	24
3.1. L'immunité innée	25
3.2. L'immunité adaptative	26
3.3. La tolérance immunologique	27
 Chapitre 2 : Les pemphigus 	
1. Les dermatoses bulleuses auto-immunes	
1.1. Les différents formes de dermatoses bulleuses auto-immunes	
1.2. Le diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes	
2. Les différentes formes de pemphigus	
2.1. Le pemphigus vulgaire	
2.2. Le pemphigus superficiel ou foliacé	
2.3. Le pemphigus paranéoplasique	

2.4. Les autres types de pemphigus	
2.4.1. Le pemphigus herpétiforme	
2.4.2. Le pemphigus à IgA	
2.4.3. Les pemphigus médicamenteux	40
3. les facteurs de susceptibilités	40
3.1. Les aspect génétiques	40
3.1.1. Les gènes du HLA	41
3.1.2. Les gènes non HLA	45
3.1.2.1. Les gènes des desmogleines	46
3.1.2.2. Les gènes de l'apoptose	47
3.1.2.3. Les gènes du système immunitaire	47
3.2. Les facteurs environnementaux	49
3.2.1. Les médicaments	49
3.2.2. Les infections virales	49
3.2.3. Les autres facteurs	50
3.3. Le fogo selvagem	50
4. La physiopathologie du pemphigus	52
4.1. Les modèles expérimentaux de pemphigus	52
4.1.1. In vitro : le test d'acantholyse	52
4.1.2. In vivo : les modèles murins de pemphigus	53
4.1.2.1. Le modèle murin par transfert passif	53
4.1.2.2. Le modèle murin de pemphigus	55
4.1.2.3. Les modèles murins « humanisés » de pemphigus	56
L'humanisation de l'auto-antigène	56
L'humanisation des molécules du HLA	56
4.2. La physiopathologie des auto-anticorps du pemphigus	57
4.2.1. Les auto-anticorps anti-desmogleines	57
4.2.1.1. La théorie de la compensation des desmogléines	58
4.2.1.2. Les caractéristiques des anticorps anti-desmogleines	59
Les spécificités isotypiques	60
Les spécificités antigéniques	63
4.2.2. Les auto-anticorps non classiques	66
4.2.2.1. Les desmocollines	68
4.2.2.2. Les récepteurs muscariniques et nicotiniques de l'acétylcholine	68
4.2.2.3. La pemphaxine	69
4.2.2.4. Les protéines mitochondriales	69
4.2.3. Les mécanismes moléculaires de l'acantholyse	70

4.3. La réponse cellulaire au cours du pemphigus	73
4.3.1. Les cellules du système immunitaire inné	75
4.3.1.1. Les kératinocytes	75
4.3.1.2. Les cellules présentatrices d'antigènes	75
4.3.1. Les cellules du système immunitaire adaptatif	76
4.3.1.1. Les lymphocytes T	76
Les lymphocytes T helper Th1 et Th2	78
 Les lymphocytes T régulateurs 	80
 Les lymphocytes T helper 17 	81
Les lymphocytes T folliculaires helper	82
4.3.1.2. Les lymphocytes B	85
L'ontologie des lymphocytes B	85
Les sous-populations de lymphocytes B	91
L'homéostasie des lymphocytes B	96
Le répertoire antigénique et isotypique	97
Les fonctions effectrices des lymphocytes B	
Les lymphocytes B régulateurs	107
5. Les traitements du pemphigus	110
5.1. Panorama des traitements actuels et futurs du pemphigus	111
5.1.1. Les traitements actuels	111
5.1.1. Les traitements potentiels	113
5.2. La corticothérapie	115
5.3. Le rituximab (Mabthera®)	119
OBJECTIFS DE THÈSE	125
RÉSULTATS	127
Article n°1 : First-line Rituximab combined with short-term prednisone	versus
prednisone alone for the treatment of pemphigus (RITUX 3): a prospect	zive,
multicentre, parallel-group, open-label randomised trial	127
 Article n°2 : Risk factors for short-term relapse in patients with pemphi 	gus
treated by Rituximab as first line therapy	155
Article n°3 : Rituximab and corticosteroid effect on Desmoglein specific	B cells
and T Follicular Helper Cells in natients with Pemphigus	177
	-lati -
Donnees complementaires : Analyse phenotypique des sous-popi	liations
de lymphocytes T Folliculaires Helper	203

Article n°4 : Modifications of the transcriptomic profile of autoreactive B cells
from pemphigus patients after treatment with rituximab or standard
corticosteroid regimen205
Article n°5 : Long-term increase of KCNN4 potassium channel surface
expression on B cells in pemphigus patients after Rituximab treatment
Prolongation à 90 mois de l'étude RITUX 3 : Données préliminaires 223
DISCUSSION ET PERSPECTIVES
1. Evaluation clinico-biologique de l'étude RITUX 3 229
2. Evaluation de la réponse auto-immune chez les patients
de l'étude RITUX 3 238
CONCLUSION251
CONCLUSION251 RÉFÉRENCES
CONCLUSION
CONCLUSION251RÉFÉRENCES253ANNEXES287& Annexe n°1 : Cursus et publications287
CONCLUSION251RÉFÉRENCES253ANNEXES287< Annexe n°1 : Cursus et publications
CONCLUSION251RÉFÉRENCES253ANNEXES287< Annexe n°1 : Cursus et publications
CONCLUSION251RÉFÉRENCES253ANNEXES287< Annexe n°1 : Cursus et publications
CONCLUSION251RÉFÉRENCES253ANNEXES287< Annexe n°1 : Cursus et publications
 CONCLUSION

INTRODUCTION

Le pemphigus est caractérisé cliniquement par l'apparition de bulles cutanées et d'érosion sur la peau et/ou les muqueuses. Il tire son nom du mot grec *pemphix* qui signifie bulle. Hippocrate le désignait sous le nom *«Pyretos pemphigodes»* (Ozanam, 1823). En 1760, le terme « pemphigus » a été utilisé pour la première fois par De Sauvages dans sa classification des maladies de la peau. Wichman (1791) a été le premier à décrire le pemphigus comme une maladie bulleuse chronique. Les principales formes de pemphigus ont été décrites cliniquement par Willan (1808) et Hebra (1960) pour le pemphigus vulgaire (PV) et par Cazenave (1844) pour le pemphigus foliacé (PF). Neumann (1886) a décrit le pemphigus végétant et Senear et Usher (1926) le pemphigus érythémateux (Thivolet, 1994).

Les caractérisations histologiques des lésions ont permis de différencier le pemphigus des autres maladies cutanées bulleuses. C'est en 1881 qu'Auspitz décrit la perturbation des cellules épidermiques chez les patients atteints de pemphigus. En 1943, Civatte décrit le phénomène d'acantholyse (perte de la cohésion cellulaire entre les kératinocytes) et l'image histologique spécifique de bulle intra-épidermique. Ces résultats ont clairement distingué le pemphigus de la pemphigoïde bulleuse (PB) qui est définie cliniquement et histopathologiquement par la présence des bulles sous-épidermiques par Lever (Lever, 1951; Lever and Talbott, 1942).

La découverte de Beutner et Jordon en 1965 représente une étape clé dans la compréhension des mécanismes physiopathologique du pemphigus. En effet, ils ont mis en évidence la présence d'auto-anticorps (Ac), dans les sérums de patients atteints de pemphigus, dirigés contre la surface cellulaire des kératinocytes par immunofluorescence (IF) indirecte (Beutner et al., 1965). En 1967, ils ont également mis en évidence la présence d'auto-Ac dans des sérums de patients atteints de PB mais réagissant avec la jonction dermo-épidermique (JDE) (Jordon et al., 1967). Les découvertes de ces auto-Ac ont permis de comprendre que le pemphigus et la PB sont des maladies cutanées bulleuses distinctes d'origine auto-immune classifiées en dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI).

-1-

A la fin des années 1970, la pathogénicité des auto-Ac du pemphigus a été démontré in vitro par l'induction de l'acantholyse dans des cultures de peau humaine (Schiltz and Michel, 1976) puis *in vivo* par la formation de bulles induites suite au transfert passif d' immunoglobuline G (IgG) de patients atteints de PV à des souris néonatales (Anhalt et al., 1982). A la fin des années 1980, les méthodes d'immuno-chimie ont permis de caractériser les antigènes cibles du pemphigus comme étant des glycoprotéines de 160 kDa (Kilodalton) pour le PF et de 130 kDa pour le PV (Koulu et al., 1984; Stanley et al., 1982, 1984). Au début des années 1990, les technologies de biologie moléculaire ont permis d'identifier les antigènes de 160 et 130 kDa comme étant respectivement la desmogléine (Dsg) 1 et la Dsg3. Ces deux protéines sont des molécules d'adhésion cellulaire calcium (Ca²⁺) dépendante, appartenant à la famille des cadhérines, exprimées dans la peau et les muqueuses (Amagai et al., 1991; Koch et al., 1990). Ces découvertes ont permis, à la fois d'identifier les molécules et les structures impliquées dans l'adhésion cellulaire de la peau (desmosome/hémidesmosome), d'améliorer le diagnostic des DBAI avec de nouvelles méthodes (Ishii et al., 1997) et d'ouvrir la voie à de nouvelles thérapies de ces affections sévères (Stanley and Amagai, 2008).

Ce propos introductif débutera par une description de la structure et des fonctions de la peau pour souligner l'importance des structures jonctionnelles en particulier celle du desmosome dans la cohésion cellulaire. La peau est une barrière protectrice mais aussi un organe clé du système immunitaire jouant un rôle crucial pour l'intégrité de l'organisme. Après un bref rappel des mécanismes immunologiques du système inné et adaptatif, nous reviendrons sur les connaissances actuelles sur le pemphigus. Nous détaillerons sa pathogenèse considérée comme multifactorielle, impliquant à la fois des facteurs de susceptibilités génétiques et environnementaux. Finalement, nous entrerons dans les détails des mécanismes immunologiques impliqués dans la physiopathologie du pemphigus dont la compréhension permet de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que le Rituximab (RTX).

-2-

CHAPITRE 1 : LA PEAU

La peau, en continuité avec les muqueuses, a pour rôle essentiel l'équilibre corporel. C'est l'organe le plus visible et le plus étendu: sa surface représente presque 2 m² et pèse de 4 à 5 kg, soit environ 6% du poids total du corps (Tobin, 2006).

1. LA STRUCTURE DE LA PEAU

Organe dynamique en perpétuelle évolution, la peau est constituée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).



Figure 1 : Structure de la peau

Représentation schématique et coupe histologique colorée par l'hématoxyline éosine (HE) des différentes couches de la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

1.1. *L'epiderme*

L'épiderme est la couche superficielle de la peau. Elle provient de l'ectoderme au cours du développement embryonnaire. C'est un épithélium stratifié, squameux et kératinisé. Il est recouvert de sébum, film hydrolipidique produit par les glandes sébacées du derme. L'épiderme ne contient ni vaisseau sanguin, ni vaisseau lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres.

1.1.1. Les cellules de l'epiderme

Quatre types de cellules sont présents au sein de l'épiderme (Figure 2) : les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les kératinocytes.



Figure 2 : Cellules de l'épiderme

Organisation cellulaire de l'épiderme en représentation schématique et coupe histologique transversale après coloration au trichrome de Masson.

Les mélanocytes, exclusivement situés dans la couche basale de l'épiderme, synthétisent les mélanines (les phéomélanines et les eumélanines) dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes. Ces pigments sont responsables de la coloration de la peau et jouent un rôle majeur dans la protection de la peau contre les effets néfastes des rayons ultra-violets (UV)(Cichorek et al., 2013 ; Wang et al., 2016).

Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui sont capables de capter des antigènes cutanés, de les apprêter et de les transporter de la peau jusqu'aux ganglions lymphatiques régionaux puis de les présenter aux lymphocytes. Ces cellules ont un rôle essentiel au cours des réactions immunitaires de la peau (Langerhans, 1868; Le Borgne et al., 2007; Valladeau, 2006).

Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs qui participent à la sensation tactile fine. Elles détectent, par leurs microvillosités les déformations à proximité d'eux et libèrent des neuromédiateurs vers les fibres nerveuses (Boulais and Misery, 2007; Keymeulen et al., 2009; Moll et al., 2005).

Les kératinocytes constituent 80 à 90% des cellules épidermiques. Comme leur nom l'indique, leur principale caractéristique est de synthétiser les kératines, protéines hétérogènes de structure fibreuse qui s'assemblent en faisceaux pour former les filaments intermédiaires. Les kératines, organisées en tonofilaments, vont former le cytosquelette intracellulaire en s'associant aux microfilaments d'actine et aux microtubules. Les kératinocytes forment, par leurs fortes cohésions intercellulaires, la barrière physique de l'épiderme.

1.1.2. LA STRATIFICATION EPIDERMIQUE

Les kératinocytes se répartissent dans quatre couches bien distinctes, visible par microscopie optique et dénommées (Figure 2) : la couche basale (*Stratum basale*), la couche épineuse (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*) compacte (*stratum compactum*), puis desquamante (*stratum disjonctum*). Cette stratification correspond aux changements de forme et d'aspects des kératinocytes lorsqu'ils migrent en se différenciant de la couche basale germinative vers la couche superficielle de l'épiderme (Figure 3).





Représentation schématique des principales étapes de la stratification épidermique (d'après Eckhart et al., 2013)

La couche basale est le compartiment germinatif riche en cellules souches. Les kératinocytes basaux sont de forme cubique et possèdent un noyau volumineux et d'abondants mélanosomes. Ils ont la capacité de proliférer et de donner naissance aux kératinocytes des couches plus superficielles. Les cellules basales sont attachées par des hémidesmosomes à la membrane basale acellulaire qui sépare l'épiderme du derme et forment la jonction dermo-épidermique. Elles sont ancrées aux kératinocytes voisins par des jonctions adhérentes et des desmosomes.

Une fois que les kératinocytes se sont détachés de la membrane basale de l'épithélium, ils perdent leur potentiel prolifératif. Leurs profils d'expression génique sont modifiés sous le contrôle de facteurs de transcription. Lorsque les cellules atteignent la couche épineuse, elles deviennent polygonales tandis que leurs noyaux s'arrondissent et leurs cytoplasmes deviennent plus foncés. Elles sont caractérisées par un changement d'expression des kératines K5 et K14 présentes chez les progéniteurs basaux vers les kératines supra-basales K1 et K10. Ces cellules présentent de nombreux desmosomes qui renforcent les contacts intercellulaires.

Dans la couche granuleuse, le cytoplasme et le noyau des kératinocytes s'aplatissent. Ces cellules sont caractérisées par l'apparition de granules de kératohyaline et de kératinosomes ou granules lamellaires. Les kératohyalines sont riches en profilaggrine à l'origine de la filaggrine, composant principal de la matrice fibreuse intra-cornéocytaire. Les kératinosomes, vacuoles cytoplasmiques, jouent un rôle majeur dans l'établissement de la fonction de barrière épidermique en déversant leurs contenus protéiques et lipidiques par exocytose à l'interface de la couche granuleuse/couche cornée conduisant à la formation d'un ciment intercornéocytaire.

Les kératinocytes de la couche cornée sont appelés cornéocytes. Ce sont des cellules mortes et anucléées mais fonctionnelles. Les organelles cellulaires et le noyau de ces cellules sont dégradés durant la phase de cornification. C'est l'étape finale de transformation des kératinocytes. Les protéines du cytoplasme forment une matrice fibreuse de kératines et de filaggrines. La membrane plasmique est remplacée par une coque protéique rigide formant l'enveloppe cornée. Les cornéocytes sont réunies entre eux par des jonctions serrées *via* les cornéodesmosomes et du ciment lipidique apportant ainsi à l'épiderme sa fonction de barrière.

Finalement, les cornéodesmosomes sont progressivement dégradés par des enzymes extracellulaires et les cornéocytes finissent par se détacher de l'épithélium, c'est le processus de desquamation. L'épithélium se renouvelle donc continuellement. La migration d'un kératinocyte à travers l'épiderme se fait en 3 semaines (Blanpain and Fuchs, 2009; Eckhart et al., 2013; Fuchs, 2016).

-6-

1.1.3. LA COHESION EPIDERMIQUE

L'architecture de l'épiderme repose sur la cohésion interkératinocytaire. Les structures jonctionnelles responsables de l'adhésion intercellulaire sont des régions différenciées de la membrane plasmique. Elles sont constituées de complexes multiprotéiques visibles en microscopie électronique. Ces jonctions participent, à des degrés divers, à la fonction de barrière de la peau (Figure 4).

On distingue différents types de jonctions : les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes. Ces différents types de jonctions assurent une solidité mécanique par contact entre les cellules ou à la matrice extracellulaire. Elles permettent aussi la transmission de signaux de communication nécessaires dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarisation cellulaire. Ces jonctions participent, à des degrés divers, à la fonction de barrière de la peau.



Figure 4: Jonctions cellulaires de l'épiderme

Représentation schématique des différents types de jonctions cellulaires présentes dans l'épiderme et photographie de leurs structures prise en microscopie électronique : les jonctions communicantes (de type nexus ou jonctions gap), les jonctions serrées (Zonula occludens), les jonctions adhérentes (Zonula adherens), et les desmosomes (Macula ahderens).

1.1.3.1. <u>Les jonctions communicantes</u>

Les jonctions communicantes, aussi appelées jonctions *gap* ou nexus, font référence à des régions contenant de multiples canaux intercellulaires mettant en relation le cytoplasme de deux cellules voisines (Figure 4 C)

Le canal transmembranaire est composé de protéines transmembranaires, les connexines, qui s'assemblent en complexes hexamèriques pour former un connexon. Quand deux cellules adjacentes se rapprochent, les connexons se trouvent face à face et forment un pore intercellulaire de 2 nm de diamètre.

Les jonctions communicantes permettent la propagation intercellulaire des signaux électriques et la coopérativité métabolique par le passage sélectif entre cellules d'ions (Ca²⁺, potassium, ...) et de petites molécules (vitamines, acides aminés, nucléotides, ...). Ces structures ne sont pas figées et peuvent s'établir dynamiquement selon l'activité cellulaire. Elles jouent un rôle crucial dans la croissance et la différenciation des kératinocytes (Meşe et al., 2007; Sosinsky and Nicholson, 2005).

1.1.3.2. <u>Les jonctions serrees</u>

Les « *zonula-occludens* » sont des jonctions étanches qui ceinturent la cellule au niveau du pôle apical, d'où le terme de « *zonula* ». Visible en microscopie électronique, elles sont caractérisées par une série de points de fusion des feuillets externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes (Figure 4 A)

Elles sont formées d'un polymère de protéines membranaires composé principalement des claudines et d'occludines. Ces dernières constituent le noyau d'un échafaudage moléculaire relié à une multitude de protéines cytoplasmiques appelées protéines ZO. Ces protéines permettent l'ancrage aux microfilaments d'actine du cytosquelette et séparent physiquement la région apicale du reste de la cellule. L'espace intercellulaire est ainsi compartimenté.

Le rôle de cet anneau de jonction est d'empêcher la diffusion des phospholipides et des protéines entre les domaines apicaux et basolatéraux. Il permet également d'édifier une barrière contre le passage d'eau et de solutés entre la lumière et les faces internes de l'épithélium. Ce contrôle est plus ou moins sélectif selon les épithéliums de revêtement concernés (Tsukita and Furuse, 1999; Zahraoui, 2004).

-8-

1.1.3.3. <u>Les jonctions adherentes</u>

Les « *zonula-adherens* » sont également des jonctions qui ceinturent la cellule au niveau du pôle apical et sont situées juste en dessous des « *zonula-occludens*» (Figure 4A).

Elles sont composées de deux unités adhésives avec le complexe cadhérine/caténine associé au système jonctionnel nectine/afadine. Les E-cadhérines sont des protéines d'adhésion Ca²⁺-dépendantes pouvant effectuer une liaison homophilique stricte (Koch et al., 1997). Elles sont reliées aux caténines cytoplasmiques qui se fixent aux filaments d'actine du cytosquelette. Les nectines sont des molécules d'adhésion de la famille des immunoglobulines (Ig). L'afadine et la ponsine permettent la jonction entre les microfilaments d'actines et les nectines. Cette ceinture renforce l'intégrité tissulaire (Takai and Nakanishi, 2003).

1.1.3.4. <u>Les desmosomes</u>

Les « *macula-adherens* » sont des zones d'ancrage des filaments intermédiaires avec des structures discoïdes de 0,1 à 0,5 µm de diamètre d'où le terme de « *macula* ». Ces desmosomes forment la structure d'adhésion majeure des kératinocytes. Ils ancrent le réseau de filaments intermédiaires à la membrane plasmique, fournissant une résilience mécanique à l'épiderme. Ils sont présents dans toutes les couches épidermiques, notamment dans les couches épineuses et granuleuses et prennent le nom de cornéodesmosome dans la couche cornée.

La microscopie électronique permet de distinguer les différentes structures du desmosome correspondant à l'espace extracellulaire entre les membranes plasmiques des kératinocytes (desmoglie) et aux plaques denses desmosomales cytoplasmiques permettant l'insertion des filaments intermédiaires (Figure 4B).

Les desmosomes sont des structures moléculaires complexes organisées autour de cadhérines desmosomales : les desmogléines (Dsg) et les desmocollines (Dsc) (Figure 5). Ces glycoprotéines transmembranaires possèdent des domaines extracellulaires situés dans la desmoglie. Ils permettent d'assurer l'adhésion entre cellules voisines en formant des interactions Ca²⁺ dépendantes homophiles et hétérophiles. La partie intracellulaire de ces protéines est associée aux plaques desmosomales où s'insèrent les filaments intermédiaires de kératines. Les protéines composant la plaque desmosomale comprennent la plakoglobine (Pg) et les plakophilines (Pkp), membres de la famille des protéines *Armadillo*. La liaison au cytosquelette est médiée par des protéines de la famille

-9-

des plakines, les desmoplakines (Dp). Elles permettent la liaison entre les protéines *Armadillo* et les filaments intermédiaires de kératine. Les desmosomes modifiés des couches cornées appelés cornéodesmosomes contiennent une glycoprotéine spécifique sécrétée par les kératinosome appelée cornéodesmosine qui a été décrite comme ayant des propriétés adhésives homophiles (Jonca et al., 2002). Les desmosomes ne sont pas des structures statiques. Ce sont des unités dynamiques qui subissent un remodelage régulier.

Le rôle crucial du desmosome dans le maintien de l'intégrité épidermique a été largement démontré par un grand nombre d'études sur les maladies qui surviennent lorsque la fonction d'un ou plusieurs constituants desmosomaux est altérée. Les études sur la physiopathologie de ces maladies génétiques ou auto-immunes ont permis de mieux comprendre les éléments fondamentaux de la structure et de la fonction des desmosomes (Cirillo, 2016; Johnson et al., 2014). Ces observations suggèrent que les desmosomes ne sont pas seulement essentiels au maintien de l'intégrité, mais participent également à l'embryogenèse et à la morphogenèse des structures adultes par des mécanismes qui ne dépendent pas strictement de leurs fonctions adhésives.

Le pemphigus a comme caractéristique la production d'Ac pathogènes ciblant les Dsg qui sont des protéines essentielles au desmosome (Amagai et al., 1991). Nous détaillerons plus spécifiquement les protéines composant le desmosome et reviendrons plus en détail sur les mécanismes moléculaires de l'acantholyse dans le paragraphe n°4.2.3. du chapitre 2 intitulé «les mécanismes moléculaires de l'acantholyse ».



Figure 5 : Structure moléculaire du desmosome

Micrographie électronique d'un desmosome associée à la représentation schématique des principaux constituants protéiques desmosomaux. Les desmogléines (Dsg) et les desmocollines (Dsc), membres de la famille des cadhérines, interagissent entre elles dans la desmoglie pour adhérer aux cellules voisines. Les queues cytoplasmiques des cadhérines s'associent aux protéines cytoplasmiques qui forment la plaque desmosomale. Elle est composée des protéines Armadillo : la Plakoglobine (Pg) et la Plakophiline (Pkp) et d'une plakine, la Desmoplakine (Dp). Ces protéines ancrent le desmosome aux filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette.

Les cadhérines desmosmales sont composées de 4 domaines extracellulaires (EC), d'un domaine d'ancrage extracellulaire (AE), d'un motif transmembranaire (TM) suivi d'un ancrage intracellulaire
(AI) et d'un segment cadhérine intracellulaire (SCI). Les Dsc existent sous deux produits d'épissage alternatif avec le domaine C-terminal « a » ou « b » plus court. Les Dsg possèdent, en plus, un domaine de liaison intracellulaire riche en proline (LIP), un domaine unité répétée (DUR) et un domaine terminal des Dsg (DTD). Les protéines Armidallo ont des domaines N- et C- terminaux séparés par motifs répétés Armadillo (arm) avec 12 arm pour la Pg et 9 arm pour les Pkp. La Dp possède un domaine plakine N- terminal, un domaine central hélicoïdale (Rod), un domaine C- terminal de répétition de type plakine (A, B, C) et un domaine riche en glycine-sérine-arginine (GSR) (d'après Johnson et al., 2014; Nekrasova and Green, 2013).

Les cadherines desmosmales

Les cadhérines desmosomales, regroupant les Dsg et les Dsc, sont des glycoprotéines transmembranaires Ca²⁺-dépendantes. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs avec des proséquences qui, une fois clivées par des protéines convertases, vont donner des molécules d'ahésion matures. Les domaines extracellulaires assurent l'adhésion, tandis que les queues cytoplasmiques de ces cadhérines s'associent aux protéines de la plaque desmosomale (Figure 5)

Les cadhérines desmosomales forment une sous-famille distincte des cadhérines classiques mais gardent des caractéristiques communes comme l'architecture des domaines extracellulaire (EC). Ces derniers comprennent une répétition de plusieurs «motifs cadhérines» d'environ 110 acides aminés avec des motifs conservés de fixation des ions Ca²⁺: LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu), DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn) et DxD (Asp-x-Asp) (Nollet et al., 2000). Le Ca²⁺extracellulaire permet aux EC de la cadhérine d'adopter une conformation rigidifiée et fonctionnelle favorisant les interactions trans-jonctionnelles. Les cadhérines desmosomales ont également conservé un résidu de tryptophane en position 2 (Trp²) à l'extrémité N-terminale de l'EC1 qui a été décrit comme étant un site de liaison dans le processus d'adhésion (Kitajima, 2013; Koch et al., 1997a; Nollet et al., 2000).

Il existe, chez l'homme, trois isoformes de *Dsc* et quatre isoformes de *Dsg* regroupées sur le chromosome 18q12.1 (Green and Simpson, 2007). Les Dsg et les Dsc contiennent quatre EC hautement conservés, un domaine d'ancrage extracellulaire (AE) plus variable, un domaine transmembranaire (TM) et un domaine d'ancrage intracellulaire (AI), suivi par des domaines cytoplasmiques supplémentaires spécifiques. Les trois produits géniques de la Dsc subissent un épissage alternatif, entraînant la génération d'une forme Dsc "a" et une forme Dsc "b" caractérisée par un domaine C-terminal plus court. Seule la forme longue de la queue cytoplasmique de Dsc « a » possède les séquences cadhérines intracellulaires (SCI) nécessaires aux interactions avec les protéines *Armadillo*. Les domaines intracellulaires des Dsg contiennent également les SCI ainsi que des séquences uniques supplémentaires comprenant une région de liaison riche en proline (LIP), un nombre variable de domaines unitaires répétitifs (DUR) et un domaine terminal des Dsg (DTD). Le nombre des DUR contenus dans chaque isoforme des Dsg sont les suivants : 5 pour la Dsg1, 6 pour la Dsg2, 2 pour la Dsg3 et 3 pour la Dsg4 (Al-Jassar et al., 2013; Cirillo, 2016; Delva et al., 2009; Nekrasova and Green, 2013).

Ces cadhérines sont liées entre-elles dans l'espace interkératinocytaire. L'adhésion peut se produire par des interactions *cis* et/ou *trans* homophiles ou hétérophiles entre les domaines extracellulaires des Dsg et des Dsc pour former un pont entre deux cellules au niveau du desmosome. Le mécanisme par lequel les cadhérines desmosomales interagissent n'est pas encore clair. Récemment, deux états d'adhésions cellulaires entre les cadhérines desmosomales ont été décrits avec des comportements distincts vis-à-vis du Ca²⁺: une adhésion indépendante du Ca²⁺, dite « hyper-adhésive » (Garrod et al., 2005) et une adhésion dépendante du Ca²⁺et du résidu Trp² via leurs domaines EC1.

Les proteines de la famille Armadillo

Les protéines de cette famille *Armadillo* représentent les partenaires de liaison cytoplasmique des cadhérines. Dans le desmosome, elles participent à l'attachement des Dp aux filaments intermédiaires de kératine. En plus de ce rôle structurel, les protéines *Armadillo* régulent le regroupement des composants desmosomaux et interviennent également dans la transduction de signaux cellulaires.

Les protéines présentes dans les desmosomes sont la Pg, les Pkp 1, 2 et 3. Les protéines de la famille *Armadillo* se composent d'un domaine N-terminal, un domaine central avec un nombre variable de motifs répétés *Armadillo* de 42 acides aminés (*arm*) et une queue C-terminale (Figure 5).

La Pg contient 12 répétitions *arm* qui se lient aux domaines SIC des cadhérines classiques et desmosomales. Ses domaines N- et C-terminaux présentent des fonctions régulatrices. L'extrémité C-terminale semble, en particulier, contrôler, la taille des desmosomes et contient également un certain nombre de sites de phosphorylation qui régissent les interactions protéiques. La Pg est présente à la fois dans les desmosomes et dans les jonctions adhérentes où elle est interchangeable avec une autre protéine de la famille *Armadillo*, la β -caténine. Elle joue un rôle structurel important dans les deux types de jonctions cellulaires permettant la régulation de l'adhésion et de la motilité cellulaire.

La Pg agit aussi comme une molécule de signalisation dans plusieurs cascades de signalisation au cours des processus de prolifération cellulaire et d'apoptose (Zhurinsky et al., 2000).

Les Pkp contiennent 9 répétitions *arm* avec un insert entre les répétitions 5 et 6 introduisant une flexion dans la structure globale (Figure 5). Les Pkp interagissent avec les protéines desmosomales et les stabilisent au niveau de la membrane plasmique. Chez l'homme, il existe 3 Pkp qui sont exprimées différemment dans les épithéliums simples et stratifiés. La Pkp1 et la Pkp2 existent sous deux isoformes, chacune générant une forme courte "a" et une forme "b" plus longue. Les Pkp 1, 2 et 3 sont également présentes en dehors du desmosome dans le cytoplasme ou le noyau où elles participent à des activité de signalisation cellulaire telles que la régulation de l'organisation de l'actine, la synthèse des protéines et le contrôle de la croissance (Hatzfeld et al., 2014).

Les desmoplakines

Plusieurs protéines de la famille des plakines, comprenant la Dp, la plectine, l'envoplakine (Evpl) et la périplakine (Ppl), sont localisées dans les desmosomes. Les plakines relient les réseaux du cytosquelette à la membrane plasmique. Seule la Dp est indispensable pour l'adhésion desmosomale. L'Evpl et la Ppl sont plutôt impliquées dans les cornéodesmosomes de la couche cornée.

Les plakines possèdent une structure commune organisée en 3 domaines : (i) un domaine N-terminal globulaire dénommé domaine plakine et composé de 6 hélices α arrangées de manière antiparallèle, (ii) un domaine central hélicoïdal (*Rod*) assurant l'homodimérisation des plakines et (iii) un domaine C-terminal globulaire composé d'un nombre variable de répétitions de type plakine A, B et C (Figure 5).

La Dp est la composante la plus abondante du desmosome et sert de lien principal entre les filaments intermédiaires et la membrane plasmique. Il existe deux isoformes de la Dp générées par épissage alternatif. Les isoformes DpI et DpII diffèrent dans la longueur du domaine *Rod* avec l'absence d'une région de 599 résidus dans la Dp II dont les conséquences fonctionnelles sont inconnues. Les Dp s'associent généralement en dimère. Elles interagissent par leur domaine plakine N-terminal avec les protéines *Armadillo* (la Pg et les Pkp) et avec les régions cytoplasmiques des cadhérines desmosomales. La queue C-terminale contient trois domaines répétés de plakine (A, B, C), ainsi qu'un domaine riche en glycine-sérine-arginine (GSR) impliqués dans la liaison avec les filaments intermédiaires. Les DP sont exprimées dans tous les types d'épithélium et sont aussi présentes dans certaines jonctions cellulaires autres que le desmosome (Getsios et al., 2004; Leung et al., 2002).

L'ORGANISATION DES PROTEINES DESMOSOMALES

La composition et la structure des desmosomes varient au cours du processus de différenciation de l'épiderme (Figure 6). La stabilité des desmosomes et leur durée de vie sont contrôlées par des voies spécifiques qui ajustent rapidement l'adhésion desmosomale en fonction des besoins spécifiques de la cellule.



Figure 6 : Expression des protéines desmosomales dans l'épiderme

Représentation schématique des niveaux d'expressions protéiques de chaque molécule du desmosome dans les quatre couches principales de l'épiderme. Par exemple : la Dsg1, la Dsc1 et la Pkp1 sont concentrées dans les desmosomes des couches épidermiques superficielles, alors que la Dsg3 et la Dsc3 sont plus abondantes dans les desmosomes des couches basales. Dsc : Desmocolline; Dsg : Desmogléine; Dp : Desmoplakine; Evpl : Envoplakine; Pg : Plakoglobine; Pkp : Plakophiline et Ppl : Periplakin (d'après Johnson et al., 2014).

La différenciation épidermique induit des changements dans l'expression des cadhérines desmosomales et dans la répartition des Pkp entre le noyau et les jonctions cellulaires. Les constituants des desmosomes vont être exprimés de manière séquentielle. La Dsg2 est présente exclusivement dans la couche basale. Les Dsc2, Dsc3, et Dsg3 sont très fortement exprimées dans la couche basale et sont progressivement remplacées par les Dsc1, Dsg1 et Dsg4 lors du déplacement des kératinocytes vers les couches supérieures. De façon similaire, la Pkp2 est graduellement remplacée par la Pkp1.

L'expression de la Pkp3 et de la Dp reste constante dans toutes les couches de l'épiderme. L'Evlp et la Ppl sont concentrées dans les couches supérieures de l'épiderme.

En plus de leurs fonctions adhésives, les composants desmosomaux régulent la signalisation intracellulaire. Les protéines desmosomales sont à la fois des participants actifs dans la morphogenèse épithéliale mais également des cibles d'enzymes spécifiques de la différenciation qui remodèlent les kératinocytes au cours des stades de stratification de desquamation. Les événements post-traductionnels comme l'activité et kinase/phosphatase et les traitements protéolytiques, mais également le taux de Ca²⁺et la liaison croisée avec les jonctions adhérentes sont impliqués dans l'assemblage et le désassemblage des desmosomes. La modification des composants dans chacune des couches épidermiques contribue à la plasticité cellulaire dans les couches proliférantes inférieures et à l'augmentation de la résistance nécessaire à la fonction de barrière dans les couches supérieures (Johnson et al., 2014; Yin and Green, 2004). Le remodelage régulé des desmosomes par l'expression différentielle et les modifications post-synthétiques des composants des desmosomes sont critiques pour l'intégrité structurale épidermique.

1.1.4. LA JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE : LES HEMIDESMOSOMES

La jonction dermo-épidermique (JDE), également appelée membrane basale, est une zone importante de transition entre l'épiderme et le derme. Elle est composée de plusieurs protéines bien structurées formant un système d'accroche entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elle apparaît entre les kératinocytes basaux et le derme papillaire comme une ligne ondulée, fine et homogène, où alternent les saillies de l'épiderme dans le derme dites "crêtes épidermiques", et les saillies du derme dans l'épiderme dites "papilles dermiques". Cette structure permet d'augmenter considérablement la surface d'échange dermo-épidermique et de s'adapter à ses étirements.

La JDE est une structure en perpétuel remaniement qui possède des fonctions de supports mécaniques et d'adhésion cellulaire. Elle joue un rôle important dans les voies de signalisation impliquées dans la différenciation et la migration des cellules épithéliales contribuant à l'intégrité architecturale de l'épiderme notamment pendant la cicatrisation. La JDE est une barrière sélective permettant de contrôler les échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments.

-16-

En microcopie électronique, on distingue 4 sous-régions majeures de la JDE : (i) les membranes plasmiques des kératinocytes basaux avec les plaques hémidesmosomales, (ii) la *lamina lucida*, (iii) la *lamina densa* et (iv) la *sub-lamina densa*. Les kératinocytes de la couche basale sont ancrés à la membrane basale par une structure jonctionnelle spécialisée, nommée hémidesmosome. Cette structure multiprotéique peut être considérée comme la principale unité d'adhésion dans la JDE. Les adhérences focales sont des structures d'attachements spécialisées supplémentaires situées entre les hémidesmosomes (Figure 7).

Les hémidesmosomes sont parfaitement identifiables en microscopie électronique par leurs structures denses de moins de 0,5 µm de diamètre. Les filaments intermédiaires, assemblés à partir des kératines K5 et K14 des cellules basales s'associent aux protéines de la plaque cytoplasmique hémidesmosomale. Celle-ci est composée de protéines de la famille des plakines telles que la plectine mais aussi de la BP230, antigène de la PB de 230 kDa également appelé BPAG1. Elles interagissent avec l'intégrine α 6 β 4 et le collagène de type XVII également connu sous le nom de BPAG2 ou BP180. Ces protéines transmembranaires forment la plaque externe hémidesmosomale et se connectent *via* leurs domaines extracellulaires à la laminine 332 (laminine 5), principale composante des filaments d'ancrage. Ces filaments d'ancrage partent de la plaque sous-basale, traversent la *lamina lucida* pour se connecter aux fibrilles d'ancrage au sein de la *lamina densa*. La *sub-lamina densa* correspond à la partie la plus superficielle du derme dans laquelle sont situées des fibrilles d'ancrage semi-circulaires, constituées de collagène de type VII. Ces protéines assurent la liaison mécanique entre les plaques d'ancrage dans le derme papillaire et la membrane basale (Borradori and Sonnenberg, 1999; Tsuruta et al., 2011)



Figure 7 : Structure moléculaire de l'hémidesmosome

Micrographie électronique d'un hémidesmosome associée à la représentation schématique de ses principaux constituants protéiques. Les protéines intracellulaires BP230 (ou BPAG1) et la plectine interviennent dans la fixation des filaments intermédiaires de kératine au niveau de la plaque hémidesmosomales. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ avec la protéine BP180 (ou BPAG2) forment la partie externe de la plaque. Ces protéines transmembranaires réalisent ainsi l'ancrage via leurs interactions avec la laminine 332, principale composante des filaments d'ancrage de la lamina lucida (LL). Cette dernière interagit dans la lamina densa (LD) avec le collagène de type VII, constituant majeur des fibrilles d'ancrage, permettant ainsi la fixation de la membrane basale au derme sous-jacent (d'après Schmidt and Zillikens, 2013).

Les affections bulleuses dévastatrices de la peau et des muqueuses traduisent l'importance de l'attachement des kératinocytes à la membrane basale. Des mutations dans des gènes codant pour des protéines de l'hémidesmosome ou de ses filaments provoquent certaines épidermolyses bulleuses, maladies bulleuses héréditaires (McGrath, 2015).

Dans les DBAI sous épidermiques ou groupe des pemphigoïdes, plusieurs molécules de la JDE ont été identifiées comme cibles d'auto-Ac conduisant à la formation de bulles par décollement du derme et de l'épiderme (Kridin, 2018a). La PB est caractérisée par la présence d'auto-Ac dirigés contre la BP180 et la BP230 (Stanley et al., 1988). La BP180 est également l'antigène cible chez les patients atteints de pemphigoïde gestationnelle et chez des patients atteints de dermatose bulleuse à IgA linéaire. Dans la pemphigoïde des muqueuses, les auto-Ac peuvent se lier à différents auto-antigènes : la BP180, la laminine-332, l'intégrine α 6 β 4 et le collagène de type VII. Ce dernier est également l'auto-antigène cible dans l'épidermolyse bulleuse acquise.

1.2. *Le derme*

Le derme, couche sous-jacente à l'épiderme, est un tissu conjonctif innervé et très vascularisé qui renferme les glandes annexes (glandes sudoripares, glandes sébacées) et les follicules pileux (Figure 8).



Figure 8 : Structure du derme

Représentation schématique du derme, de ses récepteurs nerveux sensitifs (les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Pacini et les corpuscules de Ruffini) et de ses glandes annexes (glandes sudoripares, glandes sébacées et des follicules pileux).

Les fibroblastes sont les principales cellules du derme. Ils sont spécialisés dans la synthèse de plusieurs types de fibres protéiques : les fibres de collagène, les fibres du système élastique telles que l'élastine, les glycoprotéines et les protéoglycanes. Toutes ces protéines forment un réseau fibreux macromoléculaire appelé matrice extracellulaire (MEC). Le derme est particulièrement constitué de fibres de collagène (>90%), de type I et de type III (fibres de réticuline). Ces fibres confèrent au derme sa résistance aux tractions. Les fibres d'élastine lui donnent ses propriétés élastiques et les protéoglycanes sont responsables de sa résistance à la compression. Le derme est divisé en deux parties qui diffèrent par la composition et l'organisation de leur MEC : (i) le derme papillaire (ou superficiel) formé de fibres lâches et fines et (ii) le derme réticulaire (ou profond)

composé d'un tissu conjonctif plus dense dans lequel les fibres sont mieux organisées (Tissot et al., 2016).

De nombreuses terminaisons nerveuses sensitives se trouvent dans le derme où les terminaisons libres se fraient un chemin jusque dans l'épiderme. C'est dans le derme que se trouvent les récepteurs sensitifs de Merkel, les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Pacini et les corpuscules de Ruffini permettant de discerner diverses sensations : le toucher, le chaud, le froid ou la pression.

À la différence de l'épiderme, le derme est très vascularisé ce qui lui permet non seulement d'apporter à l'épiderme énergie et nutriments, mais aussi de jouer un rôle primordial dans la thermorégulation, la cicatrisation et la migration cellulaire.

Le derme est riche en cellules du système immunitaire telles que des cellules dendritiques (DC) dermiques, des macrophages, des mastocytes et des lymphocytes. Ces cellules sont des sentinelles qui assurent l'immuno-surveillance cutanée (Matejuk, 2018).

1.3. *L'hypoderme*

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il s'invagine dans le derme et est attaché au derme sous-jacent par des fibres de collagène et d'élastine. Il est essentiellement constitué d'adipocytes. Ces cellules sont spécialisées dans l'accumulation et le stockage des graisses et sont regroupées en lobules séparés par du tissu conjonctif.

L'hypoderme joue le rôle de réserve énergétique. Les graisses contenues dans les adipocytes peuvent être remises en circulation lors d'un effort intense ou lors d'une déficience en apport énergétique, et seront transformées en énergie. L'hypoderme assure certaines fonctions de protection mécanique (amortissement des chocs) et participe à la thermorégulation, la graisse étant un isolant thermique.

-20-

2. Les fonctions de la peau

Organe multitâche par excellence, la peau a pour rôle essentiel l'équilibre corporel. Elle intervient dans la thermorégulation *via* la dilatation des vaisseaux sanguins cutanés et l'évaporation de la sueur. Elle joue un rôle sensoriel grâce à ses récepteurs nerveux, sensibles au toucher, à la douleur et à la température. La peau assure également un rôle de protection : elle agit comme une barrière entre le monde extérieur et l'intérieur de notre corps. C'est notre première et meilleure défense contre les agressions mécaniques, chimiques et physiques (chocs, pollution, micro-organismes, ultraviolets, …). C'est un organe clé du système immunitaire dans la défense contre les micro-organismes pathogènes.

2.1. LA FONCTION DE REGULATION THERMIQUE

La thermorégulation représente l'ensemble des processus permettant à l'homme de maintenir sa température interne dans des limites adaptée à sa physiologie , c'est-à-dire entre 36°C et 37,5°C quelle que soit l' activité métabolique ou la température du milieu ambiant (Tansey and Johnson, 2015). Elle repose sur un équilibre constant entre les apports (la thermogénèse) et les pertes (la thermolyse) de chaleur. C'est l'hypothalamus qui est le centre de contrôle de la thermorégulation. Il reçoit des influx nerveux permettant de détecter toute modification de la température par le biais des thermorécepteurs centraux et périphériques dermiques et épidermiques. (Morrison, 2016; Schepers and Ringkamp, 2010). Il existe quatre modalités d'échange de chaleur entre la peau et le milieu environnant : l'évaporation, la radiation, la convection et la conduction. Ses échanges sont modulés par l'intermédiaire du système vasculaire du derme et la fonction sudorale de la peau mettant en jeu les glandes sudoripares (Hu et al., 2017).

2.2. LA FONCTION DE PREPERCEPTION

La peau a un rôle sensoriel par la richesse de son innervation. Chaque sensation est transmise grâce à des récepteurs spécifiques relayés par un réseau de fibres sensorielles myélinisées et non myélinisées. La peau possède une batterie de récepteurs sensoriels (Figure 8). -Les mécanorécepteurs perçoivent des sensations telles que la pression, les vibrations et la texture. Il existe quatre types connus de mécanorécepteurs : les disques de Merkel, les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Ruffini et les corpuscules de Pacini (Zimmerman et al., 2014).

-Les thermorécepteurs perçoivent des sensations liées à la température (Schepers and Ringkamp, 2010). Il existe deux types : les récepteurs chauds sensibles lorsque la surface de la peau augmente à partir de 30°C à 45°C et les récepteurs sensibles au froid de 35 à 10°C. Ils se trouvent dans le derme de la peau.

-Les nocirécepteurs détectent la douleur. Ce sont des terminaisons libres de fibres amyéliniques qui ne répondent qu'à des stimulations dommageables à la peau causée par des stimuli mécaniques (coupure ou éraflure), des stimuli thermiques élevés (> 45° C) ou bas (< 10° C), ou des stimuli chimiques (piqûre d'insecte). La densité de ces récepteurs varie beaucoup d'un territoire à l'autre. Le visage et les extrémités sont très richement innervés (Tracey, 2017).

2.3. LA FONCTION DE PROTECTION

Le tissu cutané est quotidiennement soumis à de multiples agressions d'ordre mécaniques, physiques, chimiques, ou biologiques. L'ensemble des cellules et des structures de la peau, précédemment décrites, contribuent à la fonction protectrice, vis à vis de toutes ces agressions en formant une véritable barrière multifonctionnelle. L'intégrité structurale de la peau est indispensable pour assurer l'efficacité de cette barrière. De nombreux mécanismes régulent cette structure pour contribuer à son renouvèlement ou à sa réparation lors des processus de cicatrisation.

La barrière mécanique dépend de l'élasticité du collagène du derme et du tissu graisseux de l'hypoderme. Elle permet à notre peau de protéger les muscles et les os sousjacents contre les chocs et les pressions. Dans les zones de frottements répétés, la couche cornée s'épaissit pour amortir la pression.

La barrière physique et hydrique dépend essentiellement de la cohésion intercellulaire dans l'épiderme et plus particulièrement dans la couche cornée. Sa résistance mécanique est médiée par les structures jonctionnelles comme les desmosomes. Les cornéocytes sont principalement composés d'une matrice fibreuse intra-cornéocytaire, d'un réseau dense de kératine et d'une enveloppe cornée rigide. Ils sont réunis entre eux *via* les cornéodesmosomes et le ciment lipidique. Par sa composition, la couche cornée forme un manteau presque imperméable qui empêche la pénétration des substances extérieures dans l'organisme mais qui prévient également la perte d'eau et de nutriments (Matsui and Amagai, 2015).

La barrière photo-protectrice dépend de la sécrétion de mélanine par les mélanocytes. En absorbant les pigments bruns de mélanine *via* leurs dendrites, les kératinocytes vont se colorer. Cette pigmentation de l'épiderme est responsable de la protection contre les effets néfastes des rayons UV. L'action protectrice des pigments de mélanine est complétée par celle de l'acide urocanique, un dérivé de l'histidine libre retrouvé en forte concentration dans la couche cornée. Cette dernière absorbe 70% des UVB. Lorsque la peau est exposée au soleil, les mélanocytes augmentent leur production de mélanine et l'épaississement de l'épiderme permet de limiter la pénétration des rayonnements. (Cichorek et al., 2013 ; Wang et al., 2016). Le rayonnement UVB permet également la synthèse de vitamine D3 par les kératinocytes épidermiques, qui sera convertie en calcitriol (vitamine D), hormone biologiquement active. Elle contribue à l'absorption intestinale du Ca²⁺et du phosphore. Elle permet ensuite la fixation du Ca²⁺sur les os et la régulation de la minéralisation osseuse (Wolpowitz and Gilchrest, 2006).

La barrière biochimique dépend des sécrétions des cellules de la peau. Le film hydrolipidique est composé de sueur, de sébum, d'eau et de protéines dégradées issues de la cornification. Il forme un film protecteur recouvrant l'épiderme contribuant à son hydratation. Il joue un rôle dans la régulation des protéases impliquées dans la desquamation. Son pH acide (situé entre 4,5 et 5,5) favorise le développement de la microflore commensale cutanée (plus de 1000 par m²) tout en inhibant la croissance des bactéries pathogènes. Les peptides anti-microbiens sont produits par les kératinocytes, les sébocytes et les cellules des glandes sudorales. Ils présentent une activité antimicrobienne avec un spectre d'action très large comprenant les bactéries, les champignons et les virus. L'ensemble de ces mécanismes entrant en jeu dans la défense de l'organisme compose l'anté-immunologie (Figure 9).

La barrière immunologique repose sur les cellules effectrices et les médiateurs moléculaires du système immunitaire inné et adaptif qui protège des agents pathogènes provenant de l'environnement externe et assure l'immuno-surveillance interne (Figure 9) (Eyerich et al., 2018).

-23-



Figure 9 : Barrière immunologique de la peau

Représentation schématique du système immunitaire cutané. L'anté-immunité désigne des éléments qui entrent en jeu dans la défense de l'organisme avant la mise en place des mécanismes de défenses spécifiques de l'immunité comme la flore commensale, les peptides et les enzymes anti-microbiens, ... La réponse immunitaire repose sur un réseau de cellules effectrices (lymphocytes, monocytes, polynucléaires...) et de médiateurs moléculaires (chimiokines, cytokines, compléments, anticorps, ..) . La première ligne de défense est assurée par le système immunitaire inné, barrière efficace contre une très grande variété de pathogènes. Cette première forme d'immunité est renforcée par l'immunité adaptative qui est spécifique des micro-organismes ou de molécules étrangères. CRP : Creactive protein ; ILC : Cellule lymphoïde innée ; NK : Natural Killer.

3. LA PEAU ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme dans le but de maintenir son intégrité. La peau joue un rôle immunologique crucial, étant non seulement une barrière protectrice passive, mais aussi un réseau de cellules effectrices et de médiateurs moléculaires constituant un système hautement sophistiqué appelé « le système immunitaire cutané » (SIC) (Abdallah et al., 2017). Il est chargé à la fois de tolérer les cellules du soi ainsi que les organismes commensaux de l'épiderme, tout en étant capable de réagir contre les agents pathogènes. Il s'intègre dans un réseau dense et structuré de vaisseaux lymphatiques et sanguins, établissant une connexion avec les organes lymphoïdes ainsi qu'avec le reste de l'organisme (Chaplin, 2010). Deux systèmes de défense se dinguent : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 9).

3.1. *L'IMMUNITE INNEE*

L'immunité innée repose sur un arsenal de cellules et de molécules (cytokines, le système du complément...) capables d'opposer une réponse rapide aux agressions (Figure 9). Les cellules de l'immunité innée, comme les DC, les macrophages, les lymphocytes NK (Natural Killer), les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles possèdent des récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptor). Les PRR sont capables de reconnaître un grand nombre de molécules exprimées par les agents pathogènes appelées PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) ou des molécules endogènes libérées par des cellules endommagées appelées DAMP (Damage Associated Molecular Pattern). Les PAMP sont principalement des structures conservées de différents pathogènes viraux, bactériens ou fongiques tels que le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, la flagelline ou les acides nucléiques... Les PRR sont des protéines solubles, transmembranaires ou cytoplasmiques tels que les récepteurs de la famille des lectines, les TLR (Toll-like receptor) ou les récepteurs de type NOD (NLR : Nucleotid-binding Oligomerization Domain-like Receptors) (Akira et al., 2006; Takeuchi and Akira, 2010). La stimulation des PRR déclenche l'activation et la maturation des cellules de l'immunité innée qui sécrètent alors des médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires ou des chimiokines. Ces médiateurs sont responsables de l'activation des cellules endothéliales et de l'initiation de la phase vasculaire de la réponse inflammatoire conduisant à la migration cellulaire. Ces cellules sont capables de détruire directement les agents pathogènes par phagocytose. Lorsque ces mécanismes sont insuffisants pour éliminer ou résoudre l'invasion, le système immunitaire adaptatif entre en jeu. La coordination entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est assurée par les CPA. Elles assurent la capture des pathogènes, l'apprêtement de la molécule étrangère appelée « antigène » et sa présentation aux lymphocytes T (LT) via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi que la spécialisation de l'immunité adaptative.

Le SIC présente certaines spécificités comme les cellules de Langerhans, qui constituent un sous-ensemble unique de CPA professionnelles et qui résident entre les kératinocytes. Les cellules de Langerhans sont caractérisées par l'expression du CD1a et de la langérine (CD207), un récepteur appartenant à la famille des lectines (Hunger et al., 2004; Valladeau et al., 2000). Les kératinocytes ont également un rôle immunologique important dans le SIC. Ils expriment différents PRR et des récepteurs à de nombreuses

-25-

cytokines. Ils produisent diverses cytokines (Lymphopoïétine stromale thymique /TSLP), interleukines (IL) (IL-1, IL-6, IL-10, ...) et chimiokines (CCL20, CXCL9, CCL10, CCL11) qui jouent un rôle prépondérant dans le trafic lymphocytaire (Olaru and Jensen, 2010). De plus, les kératinocytes sécrètent des peptides anti-microbiens qui contribuent directement à l'élimination des agents pathogènes (de Jongh et al., 2005). Dans le derme, le SIC est constitué des cellules lymphoïdes innées tels que les NK, des macrophages résidents et des DC dermiques. Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui sont essentielles pour l'élimination des déchets, tels que les débris cellulaires et les agents pathogènes. Ils produisent également les facteurs de croissance nécessaire à la réparation tissulaire tels que le PDGF (Platelet-derived growth factor), le VEGF (Vascular endothelial *growth factor*) ou le TGF-β1 (*Transforming growth factor beta*) (Krzyszczyk et al., 2018; Ono and Kabashima, 2015). Les DC constituent une population hétérogène différenciés par des marqueurs de surface spécifiques et par leurs fonctions. Les DC dermiques aussi appelées DC conventionnelles ou myéloïdes sont caractérisées par l'expression de CD11c (intégrine α X) et des molécules du CMH de classe II mais également par l'absence d'expression des molécules CD14 et CD16. L'expression des molécules CD1c et CD141 permet de distinguer respectivement les DC myéloïdes de type 1 et 2 (Haniffa et al., 2015). Les DC dermiques et les cellules de Langerhans sont des sentinelles cruciales qui évoluent d'une cellule immature à une cellule mature capable de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces CPA professionnelles activent les LT naïfs et coordonnent la tolérance ou l'immunité.

3.2. L'IMMUNITE ADAPTATIVE

Contrairement à l'immunité innée, le système immunitaire adaptatif fournit une réponse plus lente mais plus spécifique et plus durable. Cette réponse nécessite des signaux d'activation transmis par l'immunité innée ainsi qu'une collaboration entre les acteurs majeurs de l'immunité adaptative que sont les LT et les lymphocytes B (LB) (Figure 9). Ces lymphocytes ont la capacité d'orchestrer une réponse immunitaire complexe de type cellulaire ou humorale dirigée spécifiquement grâce à un récepteur capable de reconnaître un épitope particulier d'un antigène (Cano and Lopera, 2013). Ce récepteur est appelé *T cell receptor* (TCR) pour les LT et *B cell receptor* (BCR) pour les LB. La reconnaissance de l'antigène par le TCR nécessite que celui-ci soit présenté par les molécules du CMH porté par une CPA alors que le BCR peut reconnaitre directement

l'antigène. La rencontre antigénique associée à des molécules de co-stimulation induit une prolifération et une différenciation en lymphocytes effecteurs ou mémoires. Il existe plusieurs sous-types de LT, dotés de modes d'actions différents pour lutter contre les pathogènes. Les LT CD8⁺ aussi appelés LT cytotoxiques sont capables de détruire les cellules infectées par la libération de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes ou par l'expression de ligands pour des récepteurs de mort tel que FasL (CD95L) (Lieberman, 2003). Les LT CD4+ aussi appelés LT auxiliaires ou helper participent à la régulation de la réponse immunitaire adaptative par l'activation des cellules immunitaires. Ils agissent par des interactions cellulaires et/ou par la production de cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, d'interféron IFN-γ, ...)(O'Shea and Paul, 2010). Les LB vont quant à eux se différencier en LB mémoire et en plasmocyte ayant la capacité de produire des Ig dont la structure est proche de celle du BCR du LB dont ils sont issus (Herzog et al., 2009). Les récepteurs des lymphocytes sont issus de la recombinaison aléatoire de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) de plusieurs segments de gènes appelés V (Variabilité), D (Diversité), J (Jonction) codant pour les domaines variables des chaînes polypeptidiques des TCR et des BCR (Jung and Alt, 2004). Ce système de recombinaison permet théoriquement la synthèse d'une infinité de récepteurs différents générés de façon stochastique. Le répertoire antigénique lymphocytaire peut donc s'adapter à tous types de structures antigéniques, y compris les antigènes du soi. Le système immunitaire est donc susceptible de générer des LT et des LB auto-réactifs, capables de déclencher une réponse auto-immune. Différents processus de contrôle et de sélection des LB et des LT sont établis afin d'assurer la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi (Goodnow et al., 2005).

3.3. *LA TOLERANCE IMMUNOLOGIQUE*

La tolérance centrale met en jeu des mécanismes ayant pour objectif l'élimination des LT et des LB auto-réactifs au cours de leur développement. Lors de leur maturation dans le thymus, les précurseurs des LT (thymocytes) subissent une sélection positive après interaction avec les molécules du CMH exprimées sur l'épithélium cortical du thymus. Les thymocytes ayant survécu vont migrer dans la médulla où les LT possédant des TCR de haute affinité pour un complexe CMH/peptide du soi subissent une délétion clonale aussi appelée sélection négative par apoptose. Les LT sélectionnés vont pouvoir se différencier progressivement pour devenir matures et migrer en périphérie (Klein et al., 2009). Les LB subissent également une sélection lorsqu'ils rencontrent des auto-antigènes solubles ou associés aux cellules au début de leur différenciation dans la moelle osseuse (Nemazee, 2017). En cas d'affinité forte pour des auto-antigènes, les signaux intracellulaires favorisent les mécanismes de réédition du BCR ou une délétion clonale par apoptose (Radic et al., 1993).

Les mécanismes de tolérance périphérique ont pour rôle, non seulement d'empêcher la réponse auto-immune, mais également de limiter les réponses immunitaires disproportionnées afin d'empêcher l'apparition de maladies auto immunes (MAI), d'allergies ou d'asthme.... Plusieurs mécanismes de tolérance ont été caractérisés tels que l'ignorance, l'anergie et l'immuno-régulation (Khan and Ghazanfar, 2018).

L'ignorance est la conséquence de la séquestration antigénique due à une localisation particulière comme dans des tissus immunologiquement privilégiés tels que le cerveau, l'œil, les testicules ou l'utérus. Les LT auto-réactifs vis-à-vis d'un antigène absent du thymus pourront être présents en périphérie, mais ils ne pourront pas rencontrer leur antigène et s'activer en raison de l'expression restreinte (Miller and Heath, 1993). Il en est de même pour les LB auto-réactifs qui finiront par être éliminés. L'ignorance est un mécanisme réversible. Lorsque la rencontre antigénique est possible, l'activation des LT peut être régulée par l'expression de la molécule Fas (CD95) dont l'interaction avec son ligand FasL présent à la surface des CPA entraîne la mort par apoptose (Suda et al., 1993).

L'anergie se définit comme l'inactivation fonctionnelle des lymphocytes. L'activation des lymphocytes T par les CPA nécessite non seulement la présentation antigénique *via* l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide mais également des signaux de costimulation. L'interaction du co-récepteur CD28 avec des ligands de la famille B7 (CD80 et CD86) des CPA est essentielle. Les LT deviennent anergiques lorsque l'antigène présenté par des CPA n'est pas associé à ces molécules de co-stimulation (Choi and Schwartz, 2007). D'autres molécules présentes à la surface cellulaire sont étroitement associées à l'anergie comme le co-récepteur CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*/CD152). Il se lie aux mêmes isoformes B7 que CD28 et agit comme un antagoniste contribuant ainsi à la tolérance périphérique (Walker and Sansom, 2011). Les LB peuvent également devenir anergiques et diminuer l'expression de leur BCR lorsqu'ils sont exposés à de fortes quantités d'antigènes solubles (Goodnow, 1996). Ils peuvent aussi augmenter l'expression des molécules Fas à leur surface et l'interaction avec des LT exprimant FasL entraîne leur mort par apoptose (Schattner and Friedman, 1996). La

survie des LB dépend du facteur BAFF (*B cell-activating factor* ou Blys : *B Lymphocyte Stimulator*) *via* son récepteur BAFF-R (*B cell-activating factor receptor/*CD268). L'homéostasie des LB semble être contrôlée par des quantités limitantes de BAFF et par un phénomène de compétition. Les LB auto-réactifs ne recevant pas suffisamment de BAFF sont éliminés (Mackay et al., 2003; Thien et al., 2004).

L'immuno-régulation implique différentes populations cellulaires ayant des capacités suppressives appelés lymphocytes régulateurs. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) comprennent plusieurs sous-populations distinctes qui contrôlent les réponses immunitaires par la production de cytokines comme l'IL-10 et par contacts cellulaires directs (Sakaguchi et al., 1995). Les Treg ont pour cibles les DC, les LT CD4⁺ et CD8⁺ mais aussi les LB (Vignali et al., 2008). Plus récemment décrits, les lymphocytes B régulateurs (Breg) peuvent réguler les différents phénomènes immuns et auto-immuns essentiellement attribués à la capacité de ces LB à produire de l'IL-10, du TGF- β ou du granzyme B (Mauri and Ehrenstein, 2008). D'abord décrits chez la souris (Fillatreau et al., 2002), les Breg ont également été identifiés chez l'homme comme des régulateurs des LT (Bouaziz et al., 2010) et des cellules du système immunitaire innée (monocytes, DC), tout en favorisant l'émergence des Treg (Jamin et al., 2014).

La défaillance de ces mécanismes peut conduire à une rupture de tolérance caractérisée par une activation et une multiplication de cellules auto-réactives, aboutissant à l'émergence de maladies auto-immunes (MAI) telle que le pemphigus. Nous reviendrons plus précisément sur les acteurs cellulaires et les mécanismes immunologiques impliqués dans la physiopathologique du pemphigus dans le paragraphe n°4.3 du chapitre 2 intitulé « la réponse cellulaire au cours du pemphigus ».

-29-

CHAPITRE 2 : LES PEMPHIGUS

Les Pemphigus appartiennent au groupe des DBAI. Elles sont caractérisées cliniquement par l'apparition de bulles cutanées et d'érosion de la peau et/ou des muqueuses.

1. Les dermatoses bulleuses auto-immunes

Les DBAI sont des MAI dites « spécifiques d'organes » sont associées à la production d'auto-Ac pathogènes dirigés contre des protéines structurales qui maintiennent les adhérences cellules-cellules et cellules-matrices dans la peau et les muqueuses.

1.1. Les differents formes de dermatoses bulleuses auto-immunes

Les DBAI sont distingués en deux sous-groupes en fonction des auto-antigènes impliqués et des structures d'adhésion ciblées :

Les DBAI intra-épidermiques ou groupe des pemphigus sont caractérisées par la production d'auto-Ac dirigés contre des protéines du desmosome (Figure 5) structures jonctionnelles responsables de la cohésion épidermique. Ces auto-Ac sont responsables de la perte d'adhésion des kératinocytes appelée acantholyse. Les principales formes cliniques de pemphigus sont le PV, le PF et le pemphigus paranéoplasique (PPN) (Tableau 1).

Les DBAI sous épidermiques ou groupe des pemphigoïdes, présentent divers auto-Ac principalement dirigés contre les antigènes hémidesmosomaux de la JDE conduisant à la formation de bulles par décollement de l'épiderme du derme (Figure 7). La PB est la forme clinique la plus fréquente. Les autres de dermatoses auto-immunes sous épidermiques sont la pemphigoïde gestationnelle, la pemphigoïde des muqueuses, la dermatose bulleuse à IgA linéaire et l'épidermolyse bulleuse acquise (Kridin, 2018a) (Tableau 1).

Dermatoses bulleuses auto-immunes	Maladies	Caractéristiques	Antigènes cibles (Poids moléculaires)
Intra-épidermique (Groupe des Pemphigus)	Pemphigus folliacé	Bulles dans les couches supérieures de l'épiderme de la peau sans atteinte des muqueuses	Desmogléine 1 (160 kDa)
	Pemphigus vulgaire	Bulles supra-basales dans la peau et les muqueuses	Desmogléine 1 (160 kDa) Desmogléine 3 (130 kDa)
	Pemphigus paranéoplasique	Bulles dans la peau et les muqueuses associées à différents types de proliférations malignes, notamment des hémopathies lymphoïdes	Desmogléine 1 (160 kDa) Desmogléine 3 (130kDa) Desmoplakine I (250 kDa) Envoplakine (210 kDa) Périplakine (190 kDa) BPAG1 (230 kDa) α -2 macroglobuline-like-1 (170 kDa) Plectine (500 kDA) Desmocollines 1-3 (105-111 kDa)
Sous épidermique (Groupe des Pemphigoïdes)	Pemphigoïde bulleuse	Bulles sous-épidermiques dans la peau, rarement dans les muqueuses, plus fréquemment chez les personnes âgées	BPAG1 (230 kDa) BPAG2 (180 kDa)
	Pemphigoïde gestationnelle	Bulles sous-épidermiques dans la peau survenant lors de la grossesse ou du post-partum	BPAG1 (230 kDa) BPAG2 (180 kDa)
	Pemphigoïde des muqueuses	Bulles sous-épidermiques principalement dans les muqueuses buccales et oculaires	BPAG1 (230 kDa) BPAG2 (180 kDa) Collagène VII (290 kDa) Laminine-332 Intégrine α6β4
	Dermatose bulleuse à IgA linéaire	Bulles sous-épidermiques caractérisées par des dépôts d'IgA linéaires le long de la membrane basale	BPAG2 (180 kDa) et ses fragments protéolytiques LABD-1et LABD-97
	Epidermolyse bulleuse acquise	Bulles sous-épidermiques dans la peau et les muqueuses	Collagène VII (290 kDa)

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et antigéniques des principales dermatoses bulleuses auto-immunes

1.2. LE DIAGNOSTIC DES DERMATOSES BULLEUSES AUTO-IMMUNES

Le diagnostic d'une DBAI repose sur un examen clinique incluant une évaluation minutieuse des surfaces de la peau et des muqueuses, un examen histologique effectué sur une biopsie d'une lésion permettant de révéler le site de formation des bulles ainsi que la présence et les caractéristiques de l'infiltrat inflammatoire (Mihai and Sitaru, 2007; Otten et al., 2014). Le diagnostic d'une DBAI nécessite la détection d'auto-Ac pour confirmer la nature auto-immune de la maladie. Au cours des dernières décennies, les avancées majeures concernant l'identification des auto-antigènes des DBAI ont permis de mettre au point des examens immuno-pathologiques de diagnostic rapides et spécifiques (Figure 10).

	Pemphigus vulgaire	Pemphigus foliacé	Pemphigoïde bulleuse	Dermatose à IgA linéaire	Epidermolyse bulleuse acquise
Caractéristiques cliniques			2		X
Histologie	1				
Immuno- fluorescence directe	all and		M	mand	
Immuno- fluorescence indirecte: œsophage de singe			Z	Ser.	AN
Immuno- fluorescence indirecte : SSS			C. S. B		30-5
Auto-antigènes	Dsg1 Dsg3	Dsg1	BP180 BP230	BP180 BP230	Collagène VII

Figure 10 : Diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes

Examens clinique, histologique et immuno-pathologique par immunofluorescence directe, indirecte et sur peau clivée par NaCl 1M (SSS : « salt split skin ») caractéristiques des principales dermatoses bulleuses auto-immunes (d'après Kneisel Hertl Michael, 2011).

La mise en évidence des dépôts d'Ig et/ou du fragment C3 du complément sur la peau péri-lésionnelle par immunofluorescence directe (IFD) reste le critère de référence pour le diagnostic d'une DBAI. L'IFD montre un marquage en résille au sein de l'épiderme dans le pemphigus et un marquage linéaire de la JDE dans les DBAI sous-épidermiques. Les Ac circulants sont détectés en immunofluorescence indirecte (IFI) en incubant les sérums des patients sur des substrats épithéliaux tels que la peau humaine, l'œsophage de singe ou la vessie de rat. L'IFI sur de la peau clivée, obtenue par incubation de peau humaine avec une solution de chlorure de sodium à 1M (clivage dans la *lamina lucida*), fournit des informations "semi-moléculaires" sur l'identité des auto-antigènes de la JDE en distinguant les Ac spécifiques des antigènes du versant dermique de ceux du versant épidermique. Les examens sérologiques par dosage immuno-enzymatique (ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou par *immuno-blot* en utilisant des protéines

recombinantes ou des extraits de tissulaires aident à la caractérisation de la spécificité des auto-Ac pour discriminer les différentes DBAI. Ces dosages sont un élément clé du diagnostique et permettent également de mesurer l'activité de la maladie tout au long du suivi du patient.

2. Les differentes formes de pemphigus

Différentes sous-formes de pemphigus ont été décrites en fonction des caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires des antigènes ciblés par les auto-Ac circulants. Le PV et le PF sont les formes les plus courantes. Au cours des dernières décennies, d'autres formes non classiques ont été identifiées notamment le PPN, le pemphigus herpétiforme et le pemphigus à IgA (Joly and Litrowski, 2011).

2.1. LE PEMPHIGUS VULGAIRE

Le PV (du latin *vulgus* qui signifie "commun") est la forme la plus répandue de pemphigus, représentant jusqu'à 70% de tous les cas de pemphigus. Son incidence en Europe et aux USA est estimée entre 1 et 5 cas par million d'habitants et par an. L'incidence du PV est beaucoup plus élevée dans certaines populations juives ashkénazes (16 à 32 cas par million d'habitants et par an) et au Japon. Il s'agit généralement d'hommes et de femmes d'âge moyen (entre 40 et 60 ans). Des formes pédiatriques ont été décrites chez l'enfant (Bastuji-Garin et al., 1995).

La présentation clinique initiale est caractérisée par des érosions extrêmement douloureuses sur les muqueuses. La muqueuse buccale est la plus fréquemment affectée, entraînant une dysphagie et une perte de poids. Des érosions des muqueuses pharyngolaryngées, œsophagiennes, génitales, anales et conjonctivales sont également possibles. L'atteinte cutanée survient généralement après l'atteinte des muqueuses. Elle se caractérise par des vésicules flasques et des érosions en croûte sur une peau saine ou érythémateuse localisées principalement dans les zones de flexion, le visage, le cuir chevelu et les extrémités. Le signe de Nikolsky mettant en évidence un décollement cutané déclanché par une pression ou un frottement de la peau entraîne, est habituellement observé dans la zone périlésionnelle (Duvert-Lehembre and Joly, 2014) (Figure 11).



Figure 11 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus vulgaire Aspects cliniques des lésions des muqueuses (A), cutanées (B) et aspects histologiques (C) et immunohistologiques par immunofluorescence directe (D) d'une biopsie de peau de patient atteint de pemphigus vulgaire. L'atteinte histologique est caractérisée par une perte d'adhérence cellulaire dans l'épiderme profond, juste au-dessus de la couche basale et par la présence d'IgG à la surface des kératinocytes (Stanley and Amagai, 2006).

Le diagnostic est confirmé par une histologie montrant un clivage intra-épidermique au-dessus de la couche basale de l'épiderme et par la détection d'IgG liée au tissu avec un schéma intercellulaire en « résille » en IFD. Les auto-Ac circulants se lient aux structures desmosomales des cellules épithéliales d'œsophage de singe en IFI. Des Ac anti-Dsg3 sont mis en évidence dans le sérum par ELISA. La présence simultanée d'Ac anti-Dsg3 et anti-Dsg1 est habituellement observée de la forme cutanéo-muqueuse du PV.

Le pemphigus végétant est une variante du pemphigus vulgaire dans laquelle la cicatrisation est associée à la prolifération végétante de l'épiderme. Les lésions apparaissent généralement dans les zones axillaire, ombilicale, péri-anale, inguinale et mammaire. On pense que ce type de maladie survient chez les patients présentant une forme moins agressive de pemphigus ou chez ceux pour qui l'intensité de la thérapie est suffisante pour prévenir de nouvelles lésions mais insuffisante pour guérir les lésions établies. En raison de leur localisation, les lésions sont généralement infectées secondairement, ralentissant ainsi la cicatrisation (Joly and Litrowski, 2011; Ruocco et al., 2015).

2.2. LE PEMPHIGUS SUPERFICIEL OU FOLIACE

Le PF (du mot latin *folium* signifiant « feuille ») est considéré comme une forme superficielle de pemphigus et représente environ 20% des cas de pemphigus. Il se présente sous une forme sporadique (type Cazenave) estimée aux USA et en Europe à moins de 1 cas par million d'habitants et sous une forme endémique apparentée qui se rencontre principalement au Brésil dans les zones rurales de la *Limao Verde* (pemphigus *braziliensis* ou *fogo selvagem*) et en Afrique du Nord (Tunisie) (Hans-Filho et al., 1999).

Cliniquement et histologiquement, la maladie est similaire à celle du pemphigus foliacé sporadique. Cependant, la forme endémique affecte généralement les adolescents et les jeunes adultes.

Les patients présentent des lésions cutanées avec des bulles flasques, qui évoluent en plaques érythémateuses hyperkératosiques et en croûtes squameuses, préférentiellement dans les zones cutanées séborrhéiques, c'est-à-dire le cuir chevelu, le visage, la poitrine et les épaules. Les vésicules étant superficielles et fragiles, seule l'érosion qui en résulte peut-être observée dans la plupart des cas (Figure 12). Le signe de Nikolsky est positif. Le PF, contrairement au PV, n'affecte pas les muqueuses.



Figure 12 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus foliacé Aspect clinique des lésions cutanées (A), aspect histologique (B) et immuno-histologique par immunofluorescence directe (C) d'une biopsie de peau de patient atteint de pemphigus foliacé. L'atteinte histologique est caractérisée par une perte d'adhérence cellulaire dans l'épiderme superficiel, juste en dessous de la couche cornée et par la présence d'IgG à la surface des kératinocytes (Stanley and Amagai, 2006).

L'aspect histopathologique du PF est caractérisé par une acantholyse dans l'épiderme supérieur, soit dans la couche granuleuse ou immédiatement au-dessous avec la formation d'un clivage superficiel subcornéal. Un léger infiltrat inflammatoire composé de polynucléaires éosinophiles peut être observé dans le derme. L'examen en IFD montre des dépôts d'IgG dans l'espace intercellulaire avec une présence accrue au niveau de l'épiderme sous-corné (Figure 12). Dans plus de 90% des cas, des Ac anti-Dsg1 sont détectés par ELISA dans le sérum des patients et sont étroitement corrélés à l'activité de la maladie.

Le pemphigus érythémateux (également appelé pemphigus Senear-Usher) est un variant clinique du PF. Les lésions sont localisées sur le visage et se caractérisent par une éruption érythémateuse squameuse à croûteuse présentant souvent une distribution en forme de papillon qui ressemble au lupus érythémateux systémique. En plus des dépôts intercellulaires d'Ac présents dans toutes les formes de pemphigus, on note la présence de dépôts granulaires d'IgG et/ou de C3 le long de la JDE (Joly and Litrowski, 2011).

2.3. LE PEMPHIGUS PARANEOPLASIQUE

Le PPN est une DBAI rare et souvent mortelle associée à des proliférations malignes voir à des syndromes prolifératifs bénins. Décrit pour la première fois par Anhalt en 1990 (Anhalt et al., 1990), il représente 3 à 5% de tous les cas de pemphigus. Il survient habituellement chez les patients âgés de 45 à 70 ans, sans différence significative entre les hommes et les femmes.

Le PPN présente des caractéristiques cliniques extrêmement polymorphes. Des lésions peuvent être détectées non seulement sur la peau, mais également dans différentes muqueuses (Figure 13). La présence de différents auto-Ac pourrait justifier cette hétérogénéité clinique. L'atteinte muqueuse est sévère, associée à une altération de l'état général du patient. L'atteinte du versant muqueux externe des lèvres est fréquemment retrouvée mais d'autres muqueuses telles que celles du nez, du pharynx, du larynx, de l'œsophage et des parties génitales peuvent également être touchées. Les lésions cutanées apparaissent généralement après l'apparition des lésions muqueuses. La plupart des patients atteints de PPN présente une atteinte cutanée généralisée en particulier sur le torse, la tête, le cou et la partie proximale des membres supérieurs et inférieurs. Le PPN se caractérise par son polymorphisme : érythème diffus, lésions vésiculo-bulleuses, éruptions lichénoïdes, papules, plaques squameuses, érosions ou ulcérations. En plus de l'atteinte cutanéo-muqueuse, le PPN affecte également l'épithélium respiratoire entraînant dyspnée, maladie pulmonaire obstructive potentiellement mortelle (Joly, 1997).

Les syndromes prolifératifs les plus fréquemment associées au PPN sont le lymphome non hodgkinien et la leucémie lymphocytaire chronique, suivie de la maladie de Castleman, du thymome, de la macroglobulinémie de Waldenström, des sarcomes et des carcinomes du pancréas, du côlon et de la prostate (Camisa and Helm, 1993). En se basant sur l'implication de plusieurs organes, Nguyen a proposé le terme PAMS pour « *Paraneoplastic Autoimmune Multiorgan Syndrome* » qui semble plus approprié puisqu'il englobe l'ensemble des signes et des symptômes associés à ce processus paranéoplasique (Nguyen et al., 2001).

-37-



Figure 13 : Aspects anatomo-immuno-cliniques du pemphigus paranéoplasique Aspects cliniques des lésions muqueuses (A), cutanées (B) et aspects histologique (C) et immunohistologique par immunofluorescence directe (D) d'une biopsie de peau de patient atteint de pemphigus paranéoplasique. L'atteinte histologique est caractérisée par une perte d'adhérence cellulaire dans l'épiderme profond, juste au-dessus de la couche basale et des dépôts d'IgG et de complément dans les espaces intercellulaires de l'épiderme ainsi que des dépôts linéaires le long de la membrane basale (Paolino et al., 2017; Yong and Tey, 2013).

Dans le cas particulier du PPN, l'histologie révèle souvent la présence de nécroses kératinocytaires associées aux signes histologiques commun du pemphigus. L'acantholyse est habituellement supra-basale et le derme est le siège d'un infiltrat cellulaire composé de polynucléaires éosinophiles et de lymphocytes. L'examen par IFD met en évidence un dépôt granuleux-linéaire d'IgG et de C3 dans les espaces intercellulaires épidermiques mais également le long de la JDE. L'IFI sur vessie de rat est positive dans le PPN et permet le diagnostic différentiel (Horn and Anhalt, 1992) (Figure 13).

Le PPN est caractérisé par la présence d'auto-Ac IgG dirigés contre de nombreuses protéines dont les Dsg1 et 3 (160 et 130 kDa) du desmosome mais également contre plusieurs membres de la famille des plakines tels que les DpI et II (250 et 210 kDa respectivement), l'Envl (210 kDa) et la Ppl (190 kDa). Les auto-antigènes peuvent être aussi des molécules d'adhésion hémidesmosomale comme l'antigène majeur de la PB BPAG1 (230 kDa) ou la plectine (500 kDa) (Anhalt et al., 1990; Joly et al., 1994; Oursler et al., 1992). L' α -2-macroglobuline-like-1(A2ML1) a récemment été identifiée comme l'autoantigène de 170 kD reconnu par la majorité des sérums de PPN. Cette protéine est un inhibiteur de protéases à large spectre, et est exprimée dans les épithéliums stratifiés ainsi que dans d'autres tissus endommagés chez les patients atteints de PPN (Schepens et al., 2010). Ces différentes auto-anticorps sont mis en évidence par des techinques de type ELISA et/ou par immunodot.

2.4. Les autres types de pemphigus

Depuis 1975, des formes rares de pemphigus ont été décrites, présentant des aspects cliniques, histologiques et immunopathologiques différents des variantes classiques de pemphigus que sont le PV et le PF (Pollmann et al., 2018).

2.4.1. LE PEMPHIGUS HERPETIFORME

Le pemphigus herpétiforme représente 6 à 7% des pemphigus affectant les hommes et les femmes âgés de 31 à 83 ans, avec de rares cas signalés pendant l'enfance. Décrit en 1975 par Jablonska, il associe les caractéristiques cliniques de la dermatite herpétiforme et les caractéristiques immunologiques du pemphigus (Jablonska et al., 1975). Les patients atteints de pemphigus herpétiforme présentent généralement des lésions cutanées érythémateuses, vésiculeuses, bulleuses, pustuleuses ou papuleuses, souvent de type herpétiforme associé à un prurit sévère principalement sur le tronc et les extrémités proximales. La principale caractéristique histopathologique du pemphigus herpétiforme est la spongiose à éosinophile, la plupart du temps, sans acantholyse. Les antigènes cibles identifiés dans le pemphigus herpétiforme sont généralement la Dsg1 et moins fréquemment la Dsg3. Récemment, plusieurs cas de pemphigus herpétiforme sans Ac anti-Dsg1 ou anti-Dsg3 ont été rapportés avec, parfois, une réactivité vis-à-vis d'autres antigènes tels que les Dsc (Karray and Badri, 2018; Porro et al., 2014).

2.4.2. LE PEMPHIGUS A IGA

Le pemphigus à IgA a été décrit pour la première fois par Wallach, Foldes et Cottenot en 1982. Il s'agit d'un pemphigus rare caractérisé par la présence d'IgA circulants qui ciblent les protéines desmosomales de l'épiderme, y compris la Dsc1, la Dsg1 et la Dsg3 (Wallach et al., 1982). Il se caractérise par la présence de bulles fragiles et de pustules sur une peau érythémateuse et squameuse avec une prédilection pour le tronc, les extrémités proximales et les régions intertrigineuses. L'atteinte de la muqueuse est rare. L'histopathologie montre une légère acantholyse sous-cornéenne et une infiltration de polynucléaires neutrophiles dans l'épiderme. Les dépôts d'auto-Ac de type IgA liés à la surface cellulaire épidermique sont détectables par l'IFD (Hashimoto, 2001). En fonction des caractéristiques immunologiques, le pemphigus à IgA est subdivisé en deux sousentités : la dermatose intra-épidermique neutrophilique associée aux IgA contre la Dsg1 ou la Dsg3 et la dermatose pustuleuse sous-cornée associée aux IgA contre la Dsc1 (Hashimoto et al., 1997; Kárpáti et al., 2000; Yasuda et al., 2000).

2.4.3. LES PEMPHIGUS MEDICAMENTEUX

Depuis les années 1950, des preuves ont montré que la prise de certains médicaments peut causer ou exacerber le pemphigus (Korman et al., 1991). L'aspect clinique est le plus souvent celui d'un pemphigus superficiel (érythémateux ou foliacé) et moins fréquemment celui d'un pemphigus vulgaire ou herpétiforme. L'atteinte des muqueuses est rare. En raison de cette hétérogénéité clinique, une étiologie médicamenteuse doit être évoquée devant tout cas de pemphigus. Les médicaments inducteurs peuvent être séparés en deux groupes : les médicaments thiolés d'une part (pénicillamine, captopril, thiopronine, pyrithioxine) et les médicaments non thiolés d'autre part (pénicilline, céphalosporine). Les médicaments en cause ont vraisemblablement à la fois des propriétés biochimiques toxiques intrinsèques directement responsables de l'acantholyse et une aptitude à modifier les caractéristiques antigéniques des molécules du desmosomes en les rendant plus immunogènes. Dans la majorité des cas, le pemphigus induit disparaît en quelques mois après l'arrêt du médicament et la mise en place d'une corticothérapie générale à doses modérées.

3. LES FACTEURS DE SUSCEPTIBILITES

Le développement des maladies auto-immunes est l'une des énigmes fondamentales de l'immunologie. Les éléments déclencheurs qui dirigent la réponse immunitaire contre les auto-antigènes sont considérés comme multifactoriels, impliquant à la fois des facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux. Différentes études épidémiologiques et génétiques sur les formes sporadiques ou endémiques du pemphigus ont été menées afin d'identifier ces facteurs et d'étudier leurs interactions possibles dans le développement des DBAI.

3.1. Les aspect genetiques

Comme dans la plupart des maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organes, de nombreux arguments plaident en faveur d'un fondement génétique du pemphigus. Il ne s'agit pas d'un modèle héréditaire mendélien mais d'un modèle «polygéniques» avec des effets additifs ou synergiques de plusieurs gènes différents (épistasie) (Tron et al., 2006).

3.1.1. Les genes du HLA

Les études épidémiologiques réalisées dans différentes populations ethniques ainsi que des études familiales ont démontré que les loci du CMH, en particulier les loci de classe II, sont associés au PV et au PF (Sinha, 2011).

Les molécules du CMH assurent la fonction de présentation de l'antigène ainsi que l'histocompatibilité. Elles sont codées par les gènes du HLA (Human Leukocyte Antigene) localisés sur le bras court du chromosome 6. Cette région comprend plus de 200 gènes hautement polymorphes qui codent pour les antigènes HLA de classe I et de classe II ainsi que de nombreux autres gènes avec ou sans fonction immunologique. Les deux classes de HLA possèdent des rôles importants dans la réponse immunitaire adaptative et sont essentielles pour réguler l'immunité. La région du CMH de classe I comprend 3 gènes HLA de classe I : HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les molécules du CMH de classe I sont exprimées à la surface des cellules nucléées et présentent des peptides dérivés de protéines intracellulaires (endogènes) principalement aux LT CD8+. La région du CMH de classe II comprend 3 paires de gènes HLA de classe II : HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). Les molécules du CMH de classe II sont exprimées à la surface des CPA professionnelles telles que les LB, les macrophages ou les cellules dendritiques, ainsi que des LT activés. Ces molécules présentent des peptides dérivés de protéines de l'espace extracellulaire (exogènes) aux LT CD4⁺ auxiliaires (Th :T *Helpers*) qui coordonneront la réponse immunitaire adaptative spécifique de l'antigène (Paolino et al., 2017) (Figure 14).



Figure 14 : Les gènes HLA de susceptibilité au pemphigus

Représentation de la region HLA (Human Leukocyte Antigene) située sur le bras court du chromosome 6. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité humain (CMH) sont répartis en trois classes : Les gènes de classe I codent pour les molécules du CMH de classe I qui permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD8⁺. Les gènes de classe II, à savoir HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR, codent pour les molécules du CMH de classe II et permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. Les gènes de classe III codent pour des molécules n'intervenant pas dans la présentation antigénique. Plusieurs associations de classe II, de classe I et de classe Ib non classique ont été rapportées dans le pemphigus vulgaire. Les associations les plus fortes sont avec les HLA de classe II DRB1 * 0402, DQB1 * 0503. Des travaux récents suggèrent une association avec le HLA-E * 0103 (d'après Sinha, 2011).

La répartition géographique inégale des cas de pemphigus et la prévalence accrue dans certains groupes ethniques s'expliquent par des polymorphismes HLA particuliers augmentant significativement la susceptibilité. Les premières associations entre pemphigus et HLA ont été rapportées dans les populations Juives et Japonaises avec le HLA-A10 (Hashimoto et al., 1977; Krain et al., 1973). Depuis, d'autres associations avec le PV et les gènes HLA de classe I ont été décrites telles que les HLA A26-B38 (Slomov et al., 2003). Plus récemment, les études portant sur les HLA de classe I non classique (HLA-E, --F et -G) ont cartographié 4 polymorphismes nucléotidique (SNP : *Single-Nucleotide Polymorphism*) ainsi qu'une augmentation de fréquence d'un variant de délétion du HLA-G qui pourrait être associée à l'efficacité de la transcription de ce gène (Gazit et al., 2004). Le HLA-E*0103 a également été associé au PV. Du fait de son rôle modulateur dans la discrimination du soi et du non soi à l'interface entre l'immunité innée et adaptative

(Sullivan et al., 2008), cet allèle pourrait contribuer au développement de l'auto-immunité (Sinha, 2011).

Cependant, des études ont montré que le PV, le PF et le PPN sont préférentiellement associés aux allèles HLA de classe II dans divers groupes ethniques (Tableau 2) : espagnol (Krain et al., 1973), italien (Carcassi et al., 1996; Lombardi et al., 1996), français (Loiseau et al., 2000; Martel et al., 2003), tunisien (Abida et al., 2009), pakistanais (Delgado et al., 1997), brésilien (Petzl-Erler and Santamaria, 1989) et japonais (Miyagawa et al., 1997 ; Scharf et al., 1989).

Pemphigus	Population	Allèles HLA de susceptibilité	Références	
Pemphigus Vulgaire	Juifs ashkénazes	DR4, DQw8	Ahmed et al., 1990	
	Français	DRB1*0402, 1401; DQB1*0302; 0503	Loiseau et al., 2000	
	Indiens	DRB1*1404; DRB1*0202; DQA1*0101; DQB1*0503	Delgado et al., 1997	
	Italiens	DRB1*0402, DRB1*1401; DQB1*0503	Carcassi et al., 1996; Lombardi et al., 1996	
	Sardes	DRB1*0402; DQA1*0301; DQB1*0302	Carcassi et al., 1996	
	Pakistanais	DRB1*1404; DQA1*0101; DQB1*0503	Delgado et al., 1997	
	Espagnols	DRB1*0402, 1401; DQB1*0503, 0302	González-Escribano et al., 1998	
	Américains	DR4	Scharf et al., 1989	
	Japonais	DRB1*0403, 0406; DRB1*1401, 1405, 1406	Miyagawa et al., 1997	
Pemphigus Foliacé sporadique	Français	DRB1*0404; DRB1*0102	Loiseau et al., 2000	
	Italiens	DRB1*04; DRB1*1404; DQB1*0503	Carcassier et al., 1996; Lombardi et al., 1996	
	Japonais	DRB1*04; DRB1*0403, 0406; DRB1*14; DRB1*1401, 1405, 1406	Miyagawa et al., 1997	
Pemphigus Foliacé endémique	Brésiliens	DRB1*0102, 0404, 0406; DRB1*1406, 1602	Petzl-Erler and Santamaria, 1989	
	Tunisiens	DRB1* 04, DRB1*0301, DQB1*0301	Abida et al., 2009	
Pemphigus Paranéoplasique	Français	DRB1*03	Martel et al., 2003	

Tableau 2 : Les allèles HLA de classe II de susceptibilité aux pemphigus (d'après Tron et al., 2005)

Le PV présente une forte association avec le HLA-DRB1*0402 prédominant chez les juifs ashkénazes (Ahmed et al., 1990) et avec les HLA-DRB1*1401, HLA-DRB1*1404 et HLA-DQB1*0503 prédominant chez les populations non juives d'origine européenne et asiatique (Ahmed et al., 1991). Plus de 95% des patients atteints de PV portent l'un des deux allèles DRB1*0402 et/ou DQB1*0503 comme facteur de risque.

Le PF est associé de manière similaire à certains polymorphismes HLA prédisposant, notamment le HLA-DRB1*04 et le HLA-DRB1*14 caractérisés à la fois dans les formes endémiques et sporadiques. Cependant, de nombreux polymorphismes n'apparaissent que dans certains groupes ethniques ou régions géographiques. Par exemple, dans le *Fogo selvagem* brésilien, la susceptibilité semble être principalement liée aux HLA-DRB1*0102, *0404, *0406, *1406, *1601 et DQB1*0302 (Petzl-Erler and Santamaria, 1989).

Des études génétiques sur le PPN ont révélé des associations avec le HLA DRB1*03 (Martel et al., 2003) en europe et le HLA Cw*14 dans la population chinoise (Liu et al.). Par conséquent, le fond génétique HLA du PPN diffère de celui des autres types de pemphigus (HLA DRB1*04 et DRB1*14), suggérant que des mécanismes distincts initient la réponse immunologique.

Les résultats obtenus dans ces études sur le PV suggèrent également que certains allèles HLA protecteurs sont présents dans les régions du HLA de classe II, tels que DRB1*13 et DRB1*07 dans la population espagnole (González-Escribano et al., 1998) et italienne (Lombardi et al., 1996). Les gènes DR7, DQw2 et DR3, DQw2 confèrent une résistance dans *le Fogo selvagem* (Petzl-Erler and Santamaria, 1989).

Au vu du rôle des gènes HLA de classe II dans la réponse immunitaire adaptative, l'explication la plus plausible de cette association est que les allèles associés au pemphigus confèrent aux molécules du CMH la capacité de lier plus efficacement les peptides dérivés des auto-antigènes et de les présenter aux LT auto-réactifs conduisant les LB auto-réactifs à produire des Ac pathogènes.



Figure 15 : Présentation antigénique de la desmogléine 3 par le CMH de classe II. Modélisation du sillon de présentation antigénique du peptide de la desmogleine 3 (Dsg3) par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) au TCR (T cell receptor) du lymphocyte T (LT) CD4+ par l'intermédiaire du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité humain) de classe II HLA-DRB1*04. Tous les peptides Dsg3 ont des acides aminés conservés aux positions relatives 1, 4 et 6. Les acides aminés chargés positivement en position 4 (cercle rouge) représentent vraisemblablement des motifs d'ancrage à la poche P4 chargée négativement formée par les résidus DR β 70 et DR β 71 de DR β 1*0402 (d'après Hertl et al., 1998, 2006).

Cette hypothèse selon laquelle des allèles HLA de classe II distincts influencent la réponse auto-immune a été confirmée dans plusieurs études sur la réponse proliférative lymphocytaire T vis-à-vis des peptides de la Dsg1 et de la Dsg3 obtenue chez des patients atteints de pemphigus mais également chez des donneurs sains présentant les même haplotypes HLA de susceptibilité (Gebhard et al., 2005; Hertl et al., 1998). Les analyses des séquences des sites de liaison peptidique des molécules HLA-DRB1 et DQB1 ont montré des caractéristiques structurales communes dans les poches P1, P4, P6, P7 et P9 (Wucherpfennig et al., 1995). De plus, tous les épitopes T de la Dsg3 identifiés présentent un acide aminé chargé positivement (principalement la lysine (K), ou l'arginine (R)) en position 4 qui sert de point d'ancrage dans la poche P4 chargée négativement et formée par les résidus DRβ70 et DRβ71 de DRB1*0402 (Figure 15). Ainsi, ces polymorphismes de susceptibilité au pemphigus conduisent à des molécules HLA dont conformation et les charges électriques augmentent leur avidité pour les peptides de la Dsg1 et 3.

3.1.2. Les genes non HLA

Les associations aux gènes HLA n'expliquent pas l'ensemble de la susceptibilité génétique aux pemphigus. Outre la propension ethnique, un certain nombre de faits supplémentaires plaident en faveur d'une contribution polygénique au développement de la maladie comprenant la présence d'Ac anti-Dsg circulants chez des parents sains du

premier degré (Kricheli et al., 2000) mais également l'observation de l'association aux cancers ou à d'autres MAI. L'association du pemphigus avec le cancer est surtout évoquée dans le cas du PPN mais certaines études ont mis en évidence une prévalence augmentée de tumeurs malignes associées au PV ou au PF comme l cancer du poumon , de la peau hors mélanome ou des hémopathies (Kridin et al., 2018a, 2018b; Ogawa et al., 1995). L'association du pemphigus à d'autres MAI comme les thyroïdites auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde, la myasthénie ou le lupus érythémateux systémique a été rapportée et peut toucher jusqu'à 25% des patients (Raboudi et al., 2017). Cette association à d'autres MAI est également observée chez les apparentés des patients atteints de PV (Firooz et al., 1994). Des gènes non-HLA pourraient très bien participer à ces prédispositions. Actuellement, seules quelques études ont été réalisées sur un nombre limité de gènes et principalement ceux ayant une implication possible dans la physiopathologie du pemphigus tels que les gènes des auto-antigènes ou les gènes impliqué dans les processus d'apoptose ou d'activation du système immunitaire.

3.1.2.1. <u>Les genes des desmogleines</u>

Dans la plupart des MAI, les auto-antigènes jouent un rôle majeur dans l'initiation et le développement de la réponse auto-immune. Des polymorphismes des auto-antigènes du PF et du PV ont donc été recherchés. Pour le gène de la Dsg1, un SNP est associé au PF sporadique (Martel et al., 2001) et endémique chez les patients tunisiens (Ayed et al., 2002). Ce SNP est une substitution silencieuse dont l'impact reste encore mal compris. Une analyse combinée avec les polymorphismes HLA de classe II a démontré que l'association entre le SNP Dsg1 809 C/C et l'allèle DRB1*04 confère un grand risque de développer le PF chez des patients caucasiens français (Martel et al., 2002). Le gène de la Dsg3 possède 46 SNP, tous localisés dans les introns du gène. Des haplotypes de susceptibilité de la Dsg3 associés avec au moins une copie d'un allèle HLA connu pour conférer une susceptibilité pour le PV ont été décrit dans la population britannique et indienne (Capon et al., 2006). Ces interactions épistatiques illustrent la complexité génétique de ces DBAI. L'impact des polymorphismes de la Dsg1 et de la Dsg3 dans le PF ou le PV ne peut donc pas s'expliquer par une modification directe des auto-antigènes. L'implication de ces SNP dans la synthèse de transcrits alternatifs des Dsg qui présenteraient des épitopes nouveaux pour lesquels les LB ou LT ne sont pas tolérants, constitue une hypothèse intéressante (Tron et al., 2006).

3.1.2.2. <u>Les genes de l'Apoptose</u>

Les études des variants génétiques des molécules impliquées dans l'apoptose n'ont fournis aucune preuve d'association pour les polymorphismes des gènes *TP53 (tumor protein 53)* et BAX (*Bcl-2–associated X*) dans le *fogo selvagem* (Köhler and Petzl-Erler, 2006). Cependant, un variant dans le promoteur du gène *ST18 (suppression of tumorigenicity 18)*, un régulateur de l'apoptose et de l'inflammation, a été associé au PV chez les patients Juifs et Égyptiens (Sarig et al., 2012). Ce variant fonctionnel conduit à une surexpression de la protéine ST18 dans la peau des patients atteints de PV par rapport aux individus sains. Ce variant pourrait contribuer à la pathogenèse du PV en stimulant la libération de cytokines dérivées des kératinocytes telles que le TNF- α , l'IL-1 α et l'IL-6 (Yang et al., 2008) et en augmentant la sensibilité des kératinocytes aux effets délétères des auto-Ac (Vodo et al., 2016).

3.1.2.3. Les genes du systeme immunitaire

Les cytokines sont impliquées dans la physiopathologie du pemphigus en tant que molécules régulatrices et effectrices. Des niveaux accrus d'IL-4, d'IL-10, d'IL-6 et du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) ont été détectés dans le sérum des patients atteints de PV comparés au sérum de témoins sains. Les taux de cytokines sont corrélés avec la sévérité de la maladie (Bhol et al., 2000; D'Auria et al., 1997). Plusieurs auteurs ont rapporté des fréquences différentes de polymorphismes de plusieurs cytokines, y compris l'IL-4 (Toumi et al., 2013), l'IL-6 (Haddy et al., 2005; Mosaad et al., 2012; Pereira et al., 2004), l'IL-10 (Eberhard et al., 2005; Javor et al., 2010) et le TNF- α (Eberhard et al., 2005; Javor et al., 2010; Mosaad et al., 2012) chez des patients atteints de pemphigus comparés à des témoins sains (Tavakolpour, 2018). L'analyse génétique de ces cytokines met en lumière de nombreuses contradictions concernant l'association entre leurs polymorphismes et le pemphigus pouvant être le résultat de la variabilité génétique au sein des différentes populations (Dar et al., 2016). Ces polymorphismes ne semblent pas être associés au risque de pemphigus dans la population en général, cependant, ils peuvent contribuer au phénomène auto-immun dans le pemphigus en faisant partie de son étiologie multifactorielle.

Les gènes codants pour des points de contrôle immunitaires de l'activation des LT tels que CTLA-4, CD86, ou ICOS (*Inducible T-cell costimulator*/CD278) ont également été étudiés. Pour rappel, l'activation des LT par les CPA nécessite non seulement la présentation antigénique *via* l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide mais
également des signaux de co-stimulation entre CD28 et les molécules CD80 et/ou CD86. Le co-récepteur CTLA-4 est un acteur-clé de l'anergie. Le récepteur ICOS est exprimé sur les LT activés et a plusieurs fonctions dans la régulation de la réponse immunitaire, y compris la formation du centre germinatif, la commutation isotypique des Ig et le développement des LB mémoires. Bien que généralement associés au MAI, l'analyse des polymorphismes du gène *CTLA4* n'a montré aucune différence statistique entre les patients atteints de pemphigus et les témoins sains (Narbutt et al., 2010; Pavoni et al., 2006; Pincerati et al., 2010). En revanche, des polymorphismes d'ICOS et de CD86 sont significativement différents entre les patients atteints de PV ou de PF et les témoins. (Dalla-Costa et al., 2010; Narbutt et al., 2010; Tanasilovic et al., 2017).

Suivant la même approche, les gènes de CD40L (*CD40 Ligand*/CD154), de CD40, de BAFF et de CD19 qui participent à la co-stimulation des LB ont été étudiés dans le *fogo selvagem.* Aucune association n'a été trouvée avec des variants du gène *CD19*. En revanche, les effets combinés des certains allèles de *CD40, BAFF* et de *CD40L* sont amplifiés par leur coexistence chez un même individu comparé à l'effet de l'un de ces variants individuellement. Considérant leurs rôles, cette interaction épistatique pourrait influencer la susceptibilité au PF, en contribuant à l'échappement des LB aux mécanismes régulateurs, en conduisant à la maturation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ac ou en favorisant ainsi le phénomène d'extension épitopique (Malheiros and Petzl-Erler, 2009).

Plus récemment, les polymorphismes des gènes liés au système du complément ont été étudiés dans le PF. Le système du complément comprend plus de 50 protéines. Il existe 3 voies d'activation différentes permettant le clivage du C3 induisant *in fine* la formation du C5b-9 appelé complexe d'attaque membranaire (CAM) : la voie alterne, la voie des lectines et la voie classique activée par le complexe antigène-Ac (IgM ou IgG). Des variants génétiques localisées dans des gènes impliqués dans la voie alterne et dans celle des lectines ont été associés au PF, mais curieusement pas dans celle de la voie classique. Les polymorphismes identifiés comprennent 11 gènes : le gène *MASP1 (Mannan-binding lectin serine protease 1)*, les gènes *C9, C8A, C5AR1* codant pour les protéines du CAM, les gènes régulateurs du complément *CD59, CFH*, le gène *C3* et les gènes *CR1,CR2, CR3* et *CR4* codants pour des récepteurs du C3 (Bumiller-Bini et al., 2018; Salviano-Silva et al., 2017). Ces résultats ouvrent de nouvelles voies cruciales pour comprendre l'étiologie de la maladie.

3.2. Les facteurs environnementaux

La prédisposition génétique seule n'est pas suffisante pour initier le mécanisme autoimmun menant à la maladie, comme le prouvent les observations réalisées dans les zones endémiques ou au sein des familles de patients. Par conséquent, l'intervention de facteurs environnementaux semble être cruciale pour déclencher la maladie mais également pour son maintien. Les facteurs inducteurs environnementaux suspectés sont nombreux et hétérogènes, englobant plusieurs médicaments, certains virus, des agents physiques, des allergènes de contact, des aliments, le microbiote (Scaglione et al., 2020) et même le stress émotionnel (Morell-Dubois et al., 2008). Dans la prise en charge des patients, éviter ou limiter ces facteurs environnementaux peut être une précaution utile et peut améliorer l'efficacité des traitements et réduire les risques de rechute (Tavakolpour, 2018).

3.2.1. LES MEDICAMENTS

Nous avons déjà évoqué les cas de pemphigus médicamenteux pour lesquels certains médicaments ont été identifiés comme facteur déclenchant (Ruocco et al., 2013). Ces cas de pemphigus induit soulignent le rôle de certains agents exogènes dans le développement de la maladie. Dans certains cas, la vaccination peut- être aussi considérée comme un facteur d'induction ou d'exacerbation du pemphigus chez les individus génétiquement prédisposés. Différents cas de pemphigus ont été rapportés à la suite de vaccination contre la grippe, l'hépatite B, la rage et le tétanos (Berkun et al., 2005; De Simone et al., 2008; Korang et al., 2002; Yalçin and Alli, 2007). Cependant à ce jour, aucune démonstration de lien entre le pemphigus et la vaccination n'est démontrée.

3.2.2. Les infections virales

Les infections virales, en particulier les infections herpétiques tels que le virus herpès simplex (HSV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou le virus de l'herpès (HHV-8), sont suspectées d'avoir un rôle dans pathogénèse du pemphigus sur des observations cliniques et expérimentales (Tufano et al., 1999). Plusieurs mécanismes sont envisagés pour expliquer ce lien (Ruocco et al., 2014). Les lésions du tissu épithélial par le HSV permettraient l'exposition subséquente d'auto-antigènes tel que la Dsg1 et la Dsg3 à l'origine de la production d'auto-Ac. Les interférons et d'autres cytokines, que l'hôte produit à la suite de l'infection virale, pourraient aussi conduire à une sur-activation du système immunitaire menant à la DBAI.

3.2.3. Les autres facteurs

Les facteurs nutritionnels sont rarement mentionnés comme étant des inducteurs du pemphigus cependant des plantes du groupe allium (oignon, ail, poireaux) possédant des groupes thiols et disulfures pourraient induire ou aggraver un pemphigus au même titre que les médicaments thiolés. Le tannin contenu dans plusieurs plantes comestibles, fruits, et leurs dérivés (poivre, cerise, canneberge, mûre, vin rouge et thé) est suspecté de favoriser l'apparition du PV. Il a été démontré que les tanins sont réactifs sur le plan immunologique et peuvent également provoquer une acantholyse *in vitro* (Brenner and Wohl, 2006; Brenner et al., 2003).

Différents produits chimiques (allergènes) tels que des teintures, des solvants industriels, des produits de jardinage, de nettoyage à sec, de développement photographique et des pesticides, sont suspect d'être associés au pemphigus (Brenner et al., 2001). Plusieurs agents physiques, tels que les coups de soleil, les rayonnements ionisants, les brûlures thermiques ou électriques sont également suspect d'être associés au déclenchement du pemphigus (Brenner and Wohl, 2006; Tan et al., 2006). Leur responsabilité réelle reste cependant hypothétique. Le contact ou l'exposition systémique à ces facteurs chimique et physique pourrait altérer la biochimie de l'épiderme et être à l'origine d'une stimulation du système immunitaire ou d'une perturbation des mécanismes régulateurs de l'auto-immunité. Le mécanisme pathologique pourrait dépendre de l'exposition d'auto-antigènes et éventuellement de peptides cryptiques générés par la lésion tissulaire. Ces mécanismes sont également envisagées dans les cas de pemphigus post-chirurgical (Ruocco et al., 2013).

3.3. *Le fogo selvagem*

Le PF endémique brésilien est un exemple qui illustre bien l'interaction entre les prédispositions génétiques, précédemment décrites, et les facteurs environnementaux. Les études épidémiologiques ont montré une association entre l'incidence du *fogo selvagem* et l'infestation avec certains insectes, dont le *Simulium* (également connu sous le nom de « mouche noire »). Ceci a conduit à l'hypothèse que ces insectes hématophages pourraient être le facteur déclencheur en sensibilisant les individus soit aux protéines salivaires de la mouche soit à des agents infectieux transmis (Eaton et al., 1998) (Figure 16).



Figure 16 : Modèle étiopathogénique du fogo selvagem

Représentation schématique des régions antigéniques reconnues par les auto-anticorps anti desmogléine 1 (Dsg1) chez les individus sains et les patients atteints de pemphigus foliacé vivant en zone endémique brésilienne. Le mimétisme antigénique avec un antigène environnemental (salive de simulium) aboutirait à une réaction croisée avec la Dsg1. Les individus sains des zones endémiques présentent des auto-anticorps IgG1 circulants non pathogènes qui reconnaissent les épitopes dans l'EC5 de la Dsg1. Les malades ont développé des anticorps IgG4 pathogènes spécifiques des domaines EC1 et EC2 de la Dsg1 par commutation de classe et par extension épitopique (Di Zenzo et al., 2012).

Les individus sains vivants dans les zones endémiques présentent des Ac anti-Dsg1 non pathogènes. Ce sont des IgM et IgG de la sous-classe IgG1 dirigés contre le domaine EC5 de la Dsg1. Les malades présentent des auto-Ac anti-Dsg1 pathogènes de sous-classe IgG4 et des IgE se liant aux domaines EC1 et EC2 de la Dsg1 impliqués dans la pathogénèse du pemphigus (Warren et al., 2003). La stimualtion antigénique, initié par ces stimuli environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés pourrait se diversifier par une extension épitopique intra-moléculaire et serait à l'origine du processus autoimmun (Aoki et al., 2015)

Ces études sur les interactions des facteurs génétiques et environnementaux fournissent des informations clés permettant de mieux appréhender, non seulement les mécanismes de déclenchement, mais également la pathogénèse du pemphigus.

4. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PEMPHIGUS

Les mécanismes conduisant aux pemphigus sont complexes et loin d'être tous compris. Les connaissances actuelles dans la pathogenèse du pemphigus orientent vers un modèle multi-étapes : i) un individu prédisposé génétiquement ii) associé à un contexte environnemental conduit iii) à l'activation du système immunitaire. iv) Les LT et LB autoréactifs activés conduisent à la production d'auto-Ac. (v) La liaison d'auto-Ac aux kératinocytes déclenchent une cascade d'événements apoptotiques conduisant à l'acantholyse et à la formation de bulles cutanées et d'érosion de la peau et/ou des muqueuses.

4.1. Les modeles experimentaux de pemphigus

Des recherches intensives menées au cours des dernières décennies à l'aide de différents modèles *in vitro* et *in vivo* ont permis de mieux comprendre les mécanismes auto-immuns sous-jacents, notamment l'activation des LT et LB auto-réactifs et la physiopathologie des auto-Ac dans le pemphigus.

4.1.1. *IN VITRO* : LE TEST D'ACANTHOLYSE

Le terme d'acantholyse a été inventé par Auspitz (Lever, 1951) pour désigner la perte de cohésion entre les cellules épidermiques observées dans l'histologie du pemphigus. Ce phénomène a été reproduit *in vitro* dans des cultures d'organe de peau humaine en présence d'IgG de patient atteint de PV et de PF démontrant de manière directe la pathogénicité des auto-Ac (Hu et al., 1978; Schiltz and Michel, 1976).

Un test quantitatif objectif permettant de mesurer l'acantholyse a été développé. Il est basé sur la mesure de fragments cellulaires obtenues après une dissociation par la dispase II et par l'action d'un stress mécanique sur une culture de kératinocytes en monocouche (HaCaT) mise en présence d'auto-Ac. Évalué sur des sérums de patients ayant des sévérités cliniques différentes mais présentant des titres d'Ac similaires par ELISA, le test a permis d'obtenir des scores de dissociation parfaitement corrélés à la sévérité de la maladie. Il s'agit d'un outil précieux pour disséquer les mécanismes moléculaires de l'hétérogénéité de la pathogénicité des auto-Ac du pemphigus (Ishii et al., 2005).

4.1.2. IN VIVO : LES MODELES MURINS DE PEMPHIGUS

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'étudier la physiopathologie du pemphigus et d'évaluer les stratégies thérapeutiques (Figure 17). A ce jour, il n'existe pas de modèle de pemphigus murin spontané. Les modèles murins existants sont induits par le transfert d'Ac ou par une immunisation active. Les études se sont concentrées essentiellement sur l'auto-immunité contre la Dsg3 en tant qu'auto-antigène principal du PV. Ces modèles *in vivo* ne peuvent pas reproduire la physiopathologie du pemphigus dans toute sa complexité qui associe des mécanismes multiples avec des effets synergiques et/ou cumulatifs de divers auto-Ac ciblant différents auto-antigènes des kératinocytes (Pollmann et al., 2018).

4.1.2.1. <u>LE MODELE MURIN PAR TRANSFERT PASSIF</u>

Dans un modèle de souris néonatales (Balb/c), Anhalt a reproduit la perte d'adhérence épidermique avec les caractéristiques histologiques du pemphigus par le transfert passif d'IgG purifiées à partir de sérums de patients atteints de PV (Figure 17 A). En utilisant ce modèle permettant la formation de bulles cutanées in vivo, il a démontré la pathogénicité de la liaison des auto-Ac du PV à leurs antigènes cibles sur les kératinocytes (Anhalt et al., 1982). Ce modèle a également permis de suivre les changements immunologiques et ultra-structuraux induits par les auto-Ac au cours du temps. Le décollement de l'épiderme est observé de manière précoce, seulement une heure après le transfert d'IgG et le détachement cellulaire complet est obtenu après six heures (Takahashi et al., 1985). Le transfert passif d'IgG de patients PV à des souris néonatales déficientes en protéine C5 du complément a provoqué, de la même manière l'apparition de cloques cutanées. L'activation du complément n'est donc pas essentielle dans le mécanisme d'acantholyse (Anhalt et al., 1986). De même, les IgG purifiées à partir de sérums issus de patients endémique du PF brésilien, en particulier les IgG4, sont capables d'induire des lésions cutanées semblables à celles observées dans la maladie (Rock et al., 1989; Roscoe et al., 1985). Il a été démontré que les effets des Ig sont dose-dépendants.

Une version modifiée du modèle passif de transfert a été développé par l'inoculation de cellules d'hybridome produisant des Ac monoclonaux (Acm) anti-Dsg à des souris adultes (Tsunoda et al., 2003). Ce modèle de transfert passif a permis de démontrer que les Acm possèdent des activités pathogènes distinctes.



Figure 17 : Modèles murins de pemphigus

Présentation des modèles murins du pemphigus. Le transfert passif d'Immunoglobuline G (IgG) de patients atteints de pemphigus à des souris néonatales provoque l'apparition de cloques avec les caractéristiques histologiques du pemphigus (A). Le transfert adoptif de splénocytes de souris déficientes en desmogléines 3 ($Dsg3^{-/-}$) à des souris receveuses immuno-déficientes ($Rag2^{-/-}$) exprimant la Dsg3 induit une production d'anticorps anti-Dsg3. Ce modèle actif murin présente les manifestations cliniques et histologiques de pemphigus de type muqueux (B). Le transfert adoptif de lymphocytes T (LT) spécifiques de la Dsg3 issus de souris transgéniques exprimant le récepteur des LT (TCR) spécifiques de la Dsg3 à des souris immuno-déficientes provoque une dermatite autoimmune expérimentale caractérisée par un infiltrat cellulaire T qui cible les kératinocytes exprimant la Dsg3 (C). Les souris transgéniques pour la Dsg3 humaine injectées avec des IgG provenant de sérums de patients atteints de pemphigus développent le phénotype clinique et les caractéristiques histologiques du pemphigus vulgaire (D). Après une immunisation par la Dsg3 recombinante humaine, les souris déficientes en CMH de classe II (CMH II) transgéniques pour le gène humain HLA-DRB1*0402 (HLA: Human Leukocyte Antigene) produisent des anticorps anti-Dsg3 humaine capables d'induire une acantholyse in vitro dans des échantillons de peau humaine (E) (d'après Kasperkiewicz et al., 2017).

4.1.2.2. <u>LE MODELE MURIN DE PEMPHIGUS</u>

Pour étudier les mécanismes conduisant à la génération d'auto-Ac pathogènes dans le PV, l'auto-tolérance a été une limite au développement d'un modèle de pemphigus par l'immunisation forcée avec de la Dsg3 murine. Des immunisations répétées et plusieurs adjuvants ont été testés pour rompre cette tolérance. Pour contourner ce problème, Amagaï a développé un modèle de maladie active en utilisant des souris déficientes en Dsg3 [Dsg3 *knock-out* (KO)/Dsg3^{-/-}] afin d'éliminer la tolérance immunologique établie contre la Dsg3. Les splénocytes (LT et LB) provenant de ces souris Dsg3^{-/-} immunisées avec de la Dsg3 recombinante ont été transférés à des souris immuno-déficientes Rag2-KO mais Dsg3 compétente pour induire une réponse auto-immune spécifique in vivo. Les souris receveuses ont développé des érosions orales autour du museau avec une acantholyse supra-basale induite par la production d'IgG spécifiques de la Dsg3 (Amagai et al., 2000; Koch et al., 1997b). L'immunisation préalable n'est pas essentielle car le transfert de splénocytes de souris Dsg3^{-/-} non immunisées chez des souris receveuses a prouvé que les lymphocytes peuvent être activés directement par la Dsg3 endogène et conduire ainsi à la production des IgG anti-Dsg3 pathogènes (Aoki-Ota et al., 2004) (Figure 17 B).

Ce modèle murin de pemphigus a permis d'isoler des LB et de générer des hybridomes permettant de caractériser les Acm anti-Dsg. De plus, des clones de LT réactifs à la Dsg3 ont été générés et caractérisés. Certains de ces clones de LT sont capables d'induire un phénotype clinique chez des souris receveuses en activant des LB naïfs pour produire des IgG anti-Dsg3 pathogènes (Takahashi et al., 2008; Tsunoda et al., 2002). La comparaison des caractéristiques entre les lignées de LT CD4⁺ réactifs à la Dsg3 pathogènes et non pathogènes a conduit à l'identification de l'IL-4 et de l'IL-10 en tant que médiateurs potentiels associés à la pathogénicité. L'inhibition du phénotype clinique par l'utilisation d'IL-4Rα soluble a confirmé l'implication de l'IL-4 comme étant un médiateur critique pour la production d'Ac (Takahashi et al., 2008, 2009). De même, l'interaction CD40/CD40L est essentielle pour l'induction d'Ac IgG anti-Dsg3 pathogènes puisque l'injection d'Ac anti-CD40L (CD154) à des souris receveuses avant le transfert adoptif induit une tolérance et empêche la formation de bulles (Aoki-Ota et al., 2006). Les tests de déplétion endogène et de transfert adoptif des LT régulateurs (Treg) CD4+ CD25+ ont respectivement augmenté ou supprimé la production d'Ac anti-Dsg3 dans ce modèle. Les Treg sont donc capables d'induire une tolérance périphérique vis-à-vis de la Dsg3 (Yokoyama et al., 2011). Pour mieux comprendre les mécanismes de la tolérance T et le rôle des LT dans la production d'Ac, un transfert de LT issus de souris transgéniques exprimant des TCR spécifiques de la Dsg3 a été développé. Ces LT CD4⁺ transgéniques provoquent un phénotype sévère de pemphigus lorsqu'ils sont transférés chez des souris immuno-déficientes (Figure 17 C). En plus de la production d'Ac, une infiltration de LT a été observée dans la peau, présentant ainsi les caractéristiques du phénotype histologique du PPN (Takahashi et al., 2011). Au-delà de la compréhension mécanistique de l'auto-immunité, ce modèle murin de pemphigus permet d'évaluer l'efficacité de réactifs pharmacologiques ainsi que des thérapies cellulaires pour bloquer la production d'Ac (Takae et al., 2009).

4.1.2.3. <u>Les modeles murins « humanises » de pemphigus</u>

Des modèles de souris récemment développés utilisent l'humanisation de l'autoantigène (Dsg3) ou des molécules HLA associées aux maladies (HLA-DRB1*0402) pour modéliser la réponse auto-immune humaine dans le pemphigus.

► L'HUMANISATION DE L'AUTO-ANTIGENE

L'homologie entre la protéine Dsg3 humaine et murine étant de 85,6%, les IgG humaines anti-Dsg3 ne sont pas capables d'induire un phénotype clinique par transfert passif dans une souris sauvage adulte (Ishikawa et al., 2000). Pour caractériser davantage la pathogénicité des IgG anti-Dsg3 humaines *in vivo*, un modèle murin transgénique a été généré en introduisant la Dsg3 humaine chez des souris Dsg3-/-. Dans ce modèle, le transfert passif d'IgG anti-Dsg3 provenant de patients atteints de PV conduit au développement des érosions muqueuses et de l'acantholyse (Culton et al., 2015) (Figure 17 D).

L'HUMANISATION DES MOLECULES DU HLA

L'association du pemphigus avec des allèles HLA de classe II distincts est un phénomène bien décrit comme le HLA-DRB1*0402 et le PV. Pour analyser les effets de l'interaction entre les peptides de la Dsg3 humaine et les molécules HLA de classe II de prédisposition au PV sur la production d'Ac in vivo, Eming a développé un modèle de souris transgénique pour le HLA de classe II humain (Eming et al., 2014). Des souris déficientes en CMH de classe II endogène murine (I-Aß-/-) ont été modifiées pour exprimer de manière transgénique différents gènes humains du HLA de classe II. Après une

-56-

immunisation avec la Dsg3 humaine recombinante, les souris transgéniques HLA-DRB1*0402 développent une réponse immunitaire dépendante des LT CD4+ conduisant à la production d'IgG anti-Dsg3. Ces Ac sont capables d'induire *in vitro* la perte d'adhésion cellulaire des kératinocytes et une acantholyse épidermique dans des biopsies cutanées humaines (Figure 17 E). Le blocage de l'interaction entre les LT et les LB avec un Ac anti-CD40L impacte la production d'IgG anti-Dsg3 démontrant ainsi que l'activation des LB est dépendante des LT. De plus, cette reconnaissance de la Dsg3 par les LT est spécifique des allèles HLA de classe II de prédisposition, puisque l'immunisation de la Dsg3 des souris transgéniques pour une molécule HLA non apparentée au PV ne conduit pas à la production d'IgG anti-Dsg3 pathogènes. En résumé, ce modèle est adapté pour étudier l'activation et l'interaction des LT avec des LB auto-réactifs restreint au HLA classe II. Il permet d'étudier des approches thérapeutiques potentielles comme les effets immunomodulateurs des Treg (Schmidt et al., 2016).

4.2. LA PHYSIOPATHOLOGIE DES AUTO-ANTICORPS DU PEMPHIGUS

Depuis les premières études de Beutner et Jordon, le pemphigus est associé à des auto-Ac ciblant les antigènes de surface des kératinocytes (Beutner et al., 1968). Les observations cliniques ont permis d'identifier un lien étroit entre les auto-Ac, le développement et l'évolution de la maladie (Abasq et al., 2009). La pathogénicité des auto-Ac a également été démontrée par des observations de pemphigus néonataux. Ces pemphigus sont causés par la transmission placentaire des auto-Ac (IgG) de la mère à l'enfant. La maladie est transitoire jusqu'à la dégradation des Ac de la mère entre deux semaines et deux mois après la naissance (Chowdhury and Natarajan, 1998). Le pemphigus représente une des rares MAI pour laquelle la pathogénicité des auto-Ac est clairement démontrée par des observations cliniques et par diverses études *in vitro* et *in vivo*, précédemment décrites. Les dernières avancées de la recherche se sont portées sur la compréhension des mécanismes pathologiques des Ac qui conduit à l'acantholyse épidermique.

4.2.1. Les auto-anticorps anti-desmogleines

L'analyse des profils des auto-Ac anti-Dsg sériques chez les patients atteints de pemphigus a permis de constater une corrélation entre le profil des auto-Ac et le phénotype clinique (Amagai et al., 1999). En effet, les sérums de patients atteints de PF

caractérisés par des lésions cutanées ont une réactivité contre la Dsg1. En revanche, les patients atteints de PV avec des atteintes localisées aux muqueuses présentes des auto-Ac dirigés contre la Dsg3. Alors que les patients atteints de PV avec des lésions de type cutanéomuqueux ont des Ac dirigés contre la Dsg3 et la Dsg1 (Ishii et al., 1997). Des patients de type PV, dont les lésions progressent des muqueuses vers les lésions de type cutanéomuqueux , développent des Ac anti-Dsg1 en plus des Ac anti-Dsg3 (Hashimoto et al., 1997). Dans de rares cas, des patients passent du PF au PV ou *vice versa*, leurs profils d'Ac devenant caractéristiques du type de maladie (Harman et al., 2002; Komai et al., 2001).

4.2.1.1. LA THEORIE DE LA COMPENSATION DES DESMOGLEINES

En 1999, Amagai propose une base logique pour comprendre comment les auto-Ac pathogènes induisent les phénotypes typiques du PF et du PV. La théorie de la compensation des Dsg est basée sur les profils d'auto-Ac combinés avec les profils d'expressions tissulaires de la Dsg1 et la Dsg3 pour expliquer les localisations histologiques distinctes des bulles dans la muqueuse et la peau entre le PF et le PV (Amagai, 1999) (Figure 18). Au cours du processus de différenciation de l'épiderme, la composition et la structure des desmosomes varient. Les constituants des desmosomes sont exprimés de manière séquentielle. La Dsg1 et la Dsg3 ont des profils d'expression inverse dans l'épiderme. La Dsg1 est prédominante dans l'épiderme superficiel alors que la Dsg3 n'est exprimée que dans les kératinocytes basaux (Figure 6). Dans les membranes muqueuses, la Dsg1 est exprimée dans l'épiderme superficiel avec peu ou pas d'expression dans les couches basales, alors que la Dsg3 est exprimée dans toutes les couches épidermiques. Cette expression différentielle des auto-antigènes explique pourquoi les IgG anti-Dsg1 du PF provoquent des bulles dans les couches superficielles de l'épiderme, mais pas dans l'épiderme profond ou la muqueuse, où l'expression de la Dsg3 compense la perte fonctionnelle induite par l'Ac anti-Dsg1. De même, dans le PV muqueux, l'IgG anti-Dsg3 provoque une acantholyse dans la couche la plus profonde des membranes muqueuses où l'expression de la Dsg1 est insuffisante pour compenser l'altération de l'adhérence de la Dsg3. Dans le cas du PV présentant des IgG anti-Dsg1 et anti-Dsg3, la perte d'adhérence épidermique se produit à la fois dans la peau et les muqueuses (Amagai et al., 1996; Mahoney et al., 1999; Stanley and Amagai, 2006). Cette théorie repose donc sur le postulat que la Dsg1 peut maintenir l'adhésion sans la Dsg3 et *vice versa*, et que les Ac anti-Dsg1 et Dsg3 inactivent uniquement la Dsg correspondante (Payne et al., 2004).



Figure 18 : Profils des anticorps anti-desmogléines corrélés au phénotype clinique Représentation schématique de la théorie de la compensation des desmogleines (Dsg) associée aux images histologiques (hématoxyline/éosine) de l'acantholyse supra-basale et subcornéale dans les biopsies de patients atteints de pemphigus vulgaire (PV) et de pemphigus foliacé (PF). Le développement de bulles dans la peau et/ou la muqueuse dépend du type de Dsg ciblée par les autoanticorps (Ac). Les Ac anti-Dsg1 dans le PF provoquent des bulles superficielles subcornéales dans la peau mais pas dans la muqueuse, car il existe une compensation par la Dsg3. De même, dans le PV de type muqueux, les Ac anti-Dsg3 provoquent l'acantholyse dans la muqueuse où la Dsg3 est abondante, mais n'induisent pas de cloques cutanées. Dans le PV de type cutanéomuqueux, la combinaison des IgG anti-Dsg3 et anti-Dsg1 induit un clivage intra-épidermique dans la couche basale de l'épiderme (d'après Stanley and Amagai, 2006).

4.2.1.2. Les caracteristiques des anticorps anti-desmogleines

Bien que les concentrations sériques d'IgG anti-Dsg soient généralement corrélées à l'activité du pemphigus, certains patients présentent une rémission clinique en gardant des titres d'IgG anti-Dsg élevés, ce qui reflète l'existence d'Ac anti-Dsg non pathogènes

(Abasq et al., 2009; Belloni-Fortina et al., 2009). Ces IgG anti-Dsg non pathogène ont été également détectés chez des parents du premier degré de patients PV (Kricheli et al., 2000). Les études sur le *fogo selvagem*, précédemment décrites, ont établi un lien entre la pathogénicité des Ac et leurs caractéristiques isotypiques et antigéniques. Les individus sains vivants en zone endémique présentent des IgG1 dirigées contre le domaine EC5 de la Dsg1 et les patients atteints de PF développent un changement de sous-classe et d'épitope en IgG4 réactives aux domaines EC1/EC2 de la Dsg1 (Culton et al., 2008).

► LES SPECIFICITES ISOTYPIQUES

Les Ig sont subdivisés par la structure de leurs chaînes lourdes en cinq isotypes : l'IgG, l'IgM, l'IgA, l'IgD et l'IgE. Les IgA peuvent être en divisées deux sous classes (IgA1 et IgA2) et les IgG en quatre sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) (Figure 19 et Tableau 3).



Figure 19 : Structure et fonctions des anticorps

(A)Structure schématique d'une Immunoglobuline (Ig). Toutes les Ig présentent une unité de base formée d'une structure comprenant quatre chaînes composées de deux chaînes légères (L) et de deux chaînes lourdes (H) identiques maintenues ensemble par des ponts disulfures inter et intra chaînes. Chaque chaîne légère est constituée d'une région constante (CL) et d'une région variable (VL). Les chaînes lourdes sont composées d'une région variable (VH) et de trois ou quatre régions constantes selon l'isotype (CH). Le clivage enzymatique permet d'isoler différents fragments : le fragment Fc cristallisable (Fc) et le Fragment antigen binding (Fab). Les régions variables VH et VL sont caractérisées par la présence de 3 régions hypervariables ou CDR (Complementary determining region) 1, 2 et 3 constituants le site de reconnaissance de l'antigène. (B) Représentation schématique des fonctions des Ig. Dans le fragment Fab, les CDR ont la capacité de se lier de manière spécifique à l'antigène cible et peuvent provoquer un antagonisme ou une signalisation. Le fragment Fc supporte les fonctions effectrices de l'anticorps comprenant : i) l'activation de la voie classique du complément par le C1q conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) (CDC : complement dependent cytotoxicity), ii) l'engagement des récepteurs au fragment Fc (FcR) exprimé par des cellules de l'immunité innée telles que les lymphocytes natural killer (NK) ou les macrophages *contribuant à la cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC : antibody dependant cell cytotoxicity)* ou la phagocytose.

Dans les MAI, les auto-Ac contribuent à la pathogénèse par de nombreux mécanismes comprenant : i) l'activation de la voie classique du complément aboutissant à la formation du CAM (CDC : *complement-dependent cytotoxicity*), ii) l'opsonisation et le recrutement de cellules immunitaires *via* les récepteurs Fc (FcR) permettant la phagocytose ou la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC : *antibody-dependent cell cytotoxicity*), iii) la liaison à l'antigène entraînant la formation de complexes immuns ou l'endocytose de l'antigène ou la modulation directe de la fonction antigénique (Figure 19 B). À l'exception de ce dernier point, ces mécanismes dépendent de l'isotype et de la sous-classe de l'Ac, en particulier des régions constantes (Koneczny, 2018)(Tableau 3).

		Sérum (%)	Structure		Fixation au Complément	Opsoniation	Passage placentaire	Autres fonctions	Récepteur Fc
IgG		75%	Monomère		Oui	Oui	Oui	Réponse secondaire/ Neutralisation des toxines et des virus	FcγR I, II, III
	IgG1	67% d'IgG	Monomère	V ^{ar}	Oui +	Oui +++	Oui ++		FcγR I, II, III
	IgG2	22% d'IgG	Monomère	V ²²	Oui +	Oui +/-	0ui +/-		FcγR II
	IgG3	7% d'IgG	Monomère	V ^a	Oui ++	Oui +++	Oui ++		FcγR I, II, III
	IgG4	4% d'IgG	Monomère	Vol	Non	Non	Oui ++		FcγR I, II
IgM		10%	Pentamère 🎝	X	Oui +++	Oui +	Non	Réponse primaire	
IgA	IgA1 IgA2	15%	Monomère/ Dimère		Non	Non	Non	Réponse muqueuse	FcαR (CD89)
IgD		<0.5%	Monomère		Non	Non	Non	Homéostasie	FcδR
IgE		<0,01%	Monomère		Non	Non	Non	Allergie/ Infections parasitaires	FcεR I, II

Tableau 3 : Propriétés des isotypes et des sous-classes des immunoglobulines (d'après Schroeder and Cavacini, 2010)

Dans le pemphigus, les modèles murins ont mis en évidence que le mode d'action des auto-Ac conduisant à l'acantholyse est indépendant de l'activation du complément (Anhalt et al., 1986). Les fragments d'Ac monovalents (Fab), bivalents (Fab'2) ou monocaténaires recombinants (scFV : *single chain variable fragment*) des IgG spécifiques des Dsg sont capables d'induire la dissociation des kératinocytes *in vitro* et *in vivo* (España et al., 1997; Payne et al., 2005; Rock et al., 1989). Par conséquent, le fragment Fc des Ac pathogènes du pemphigus n'a qu'une importance mineure. L'analyse des sérums de patients pendant la phase aiguë de la maladie a montré que les Ac anti-Dsg1 et 3 sont principalement des IgG de la sous classe IgG4 et IgG1 (96% et 76%, respectivement) et parfois des sous classes IgG2 et des IgG3 (Futei et al., 2001; Jones et al., 1988). Certains patients présentent également, dans de plus faible proportion, des auto-Ac de type IgE (Nagel et al., 2010) et/ou IgA (Spaeth et al., 2001).

La majorité des études ont démontré que les auto-Ac pathogènes appartiennent principalement à la sous-classe IgG4 (Allen et al., 1993; Futei et al., 2001). Cette dernière constitue la plus petite fraction (< 5%) des IgG. L'IgG4 présente de faibles propriétés d'activation du complément ou des leucocytes (Tao et al., 1993) (Tableau 3). Elle possède une caractéristique fonctionnelle appelée « Fab-arm exchange (FAE) » lui permettant d'échanger une chaîne lourde et une chaîne légère de façon aléatoire avec d'autres Ac de la même classe. En conséquence, une IgG4 présente deux bras (Fab) reconnaissant des antigènes différents, ce qui entraîne une bispécificité fonctionnellement monovalente (Aalberse and Schuurman, 2002; Vidarsson et al., 2014). Étant considéré comme immunologiquement inerte, l'IgG4 est plutôt associée à une fonction anti-inflammatoire et survient généralement après une exposition chronique à l'antigène (Lighaam and Rispens, 2016; Trampert et al., 2018). Sa production est stimulée par les cytokines Th2 telles que l'IL-4, l'IL-13 mais également par l'IL-21 ou la cytokine immuno-régulatrice IL-10 (Cho et al., 2014). Si l'IgG4 peut contribuer aux mécanismes de tolérance notamment dans l'allergie (Nakagawa and Miyamoto, 1985; Van der Zee and Aalberse, 1987), sa pathogénicité est associée au blocage des interactions protéine-protéine de l'antigène cible. L'effet pathogène de l'IgG4 dans le PV a été prouvé dans le modèle murin de transfert passif (Rock et al., 1989). In vitro, l'IgG4 est plus pathogène que les autres fractions d'IgG sériques et sa déplétion des sérums réduit leurs effets pathogénes (Funakoshi et al., 2012). Ainsi, la liaison des auto-Ac peut directement compromettre la fonction desmosomale. Néanmoins, cela ne signifie pas que l'IgG4 est l'entité pathogène exclusive. Les IgG1 dirigés contre la Dsg1 ou 3 peuvent également contribuer au mécanisme de blocage (Lo et al., 2016). Récemment, des études sur des d'hybridomes produits à partir de cellules de patients atteints de PV ont démontré que les Ac anti-Dsg3 pathogènes pouvaient dériver de la sous-classe des IgG4 mais également des IgG1 (Cho et al., 2014; Lo et al., 2016).

Concernant l'évolution des isotypes entre les patients en phase aiguë et ceux en rémission, il existe des résultats opposés dans la littérature. Certains groupes ont relevé une prédominance d'IgG1 en phase de rémission (Ayatollahi et al., 2004; Bhol et al., 1995; Spaeth et al., 2001). Les résultats d'autres équipes n'ont pas confirmé le changement d'isotype de l'IgG4 à l'IgG1, ou d'un changement majeur dans la composition globale du profil des sous-classes d'IgG des auto-Ac en relation avec l'activité de la maladie (Dhandha et al., 2012; Futei et al., 2001). En revanche, les isotypes IgE et IgA des Ac anti-Dsg sont associés uniquement à la phase aiguë du pemphigus (Nagel et al., 2010; Spaeth et al., 2001).

► LES SPECIFICITES ANTIGENIQUES

La caractérisation des Ac anti-Dsg du pemphigus a permis d'établir leurs propriétés pathogéniques (Amagai et al., 1995; Bhol et al., 1995). Ces études ont confirmé que la réponse anti-Dsg est polyclonale avec des Ac ayant des activités pathogènes distinctes. Une cartographie fine des épitopes avec des molécules chimériques de la Dsg1 et de la Dsg3 a montré que la majorité des Ac anti-Dsg de pemphigus se lient aux épitopes formés par les acides aminés N-terminaux des domaines EC1 et EC2 dont la conformation est dépendante du Ca²⁺ (Figure 20) (Didona and Di Zenzo, 2018).





Représentation schématique des régions antigéniques reconnues par les auto-anticorps sériques des patients atteints de pemphigus vulgaire (PV) (A) ou de pemphigus foliacé (PF) (B) au moment du diagnostic, avec un pourcentage relatif de réactivité. Dans la plupart des sérums de patients atteints de PV (53 patients) ou de PF (32 patients), les principaux épitopes de la desmogléine 3 (Dsg3) et de la desmogléine 1 (Dsg1) sont localisés dans les domaines extracellulaires 1 et 2 (EC1-2) (d'après (Didona and Di Zenzo, 2018; Ohyama et al., 2002).

La purification d'Acm issus des modèles murins puis de patients atteints de pemphigus, rendue possible grâce à l'essor des techniques de génie génétique, a permis d'établir leur pathogénicité en évaluant leur capacité à provoquer l'acantholyse dans les modèles expérimentaux in vitro et in vivo. En utilisant le modèle murin de PV, Tsunoda a cloné plusieurs Acm murins anti-Dsg3. Les IgG anti-Dsg3 pathogènes reconnaissent principalement l'extrémité N-terminale du domaine EC1 alors que les IgG anti-Dsg3 non pathogènes vont reconnaitre les parties médianes ou C-terminales des domaines EC de la Dsg3. Parmi eux, l'Acm murin AK23 présente une activité hautement pathogène (Tsunoda et al., 2003). Payne et ses collaborateurs ont rapporté les premières analyses du répertoire B auto-réactif de patients grâce à la production d'un certain nombre d'Acm pathogènes et non pathogènes humains anti-Dsg sous forme de fragment d'scFV. Ceux-ci sont obtenus par la méthode des « phage display », à partir de cellules mononuclées du sang périphérique isolés de patients atteints de PV ou de PF (Ishii et al., 2008; Payne et al., 2005). En utilisant des LB immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (EBV), l'équipe de Di Zenzo a caractérisé des Acm anti-Dsg3 pathogènes de patients atteints de pemphigus (Zenzo et al., 2012). Les épitopes pertinents identifiés dans les modèles murins ont été confirmés. De manière similaire, l'activité pathogène de ces Acm humains est liée à la reconnaissance de la région N-terminale du domaine EC1 (Yeh et al., 2006). La plupart des épitopes critiques ont été cartographiés sur les résidus 26-87 du domaine EC1 de la Dsg1 et sur les résidus 25-88 du domaine EC1 de la Dsg3 (Sekiguchi et al., 2001). Cette liaison est dépendante du degré de maturation des Dsg. En effet, cette région des Dsg est masquée par un pro-peptide situé en amont du résidu Trp² dans leurs stades de précurseurs inactifs. Certains des Acm non pathogènes ciblent vraisemblablement ces formes immatures de la Dsg1 dans le PF ou dans des donneurs sains (Yamagami et al., 2009) et de la Dsg 3 dans le PV (Sharma et al., 2009).

Les études cristallographiques et biochimiques des cadhérines classiques ont montré que les résidus dans les domaines EC1 et EC2 constituent l'interface adhésive assurant l'interaction en *trans* et en *cis* (Figure 21 A) (Boggon et al., 2002). La similarité structurale entre les cadhérines classiques et desmosomales soutien une organisation fonctionnelle conservée. En se basant sur ce modèle prédictif, les Acm anti-Dsg pathogènes de patients ou de l'hybridome AK23 se lient directement aux résidus qui interviennent dans l'interface adhésive (Figure 21 B). Cette reconnaissance antigénique conduit vraisemblablement à un encombrement stérique de l'interaction des cadhérines desmosomales. Cette interférence perturbe l'adhérence et déclenchent une signalisation intracellulaire aboutissant à la déstabilisation des kératinocytes (Zenzo et al., 2012).



Figure 21 : Modélisation de l'interface d'adhésion des domaines extracellulaires des cadhérines et des épitopes ciblés par des anticorps pathogènes anti-desmogléine 3.

Représentation de l'analyse cristallographique de l'interface d'adhésion entre les domaines extracellulaire (EC) N-terminaux des cadhérines classiques avec un agrandissement de l'interaction des domaines EC1-2. Ces partenaires interagissent via l'insertion réciproque des résidus tryptophane (Trp²) dans la poche hydrophobe de la protéine opposée. Les sphères vertes représentent les ions calcium (Ca²⁺) permettant aux domaines EC des cadhérines d'adopter une conformation rigidifiée et fonctionnelle (A). Représentation des peptides reconnus par les anticorps monoclonaux (Acm) pathogènes anti-desmogléines 3 clonés à partir de patients atteints de pemphigus vulgaire (PV) ou issus du modèle murin de pemphigus (AK23) sur les domaines EC de la cadhérine. Les peptides reconnus par les Acm PVA224 sont mis en évidence en bleu et en rose, ceux du patient PVB28 en vert et ceux du patient PVB124 en bleu clair, rouge et vert. Les résidus d'acides aminés ciblés par AK23 sont représentés en jaunes. L'interface trans-adhésive est indiquée par une double flèche grise et l'interface cis-adhésive par des doubles flèches orange. La majorité des Acm se lient a des peptides conformationnels N-terminaux des domaines EC1 et EC2 assurant l'adhésion en trans et en cis entre les cadhérines (B) (d'après Boggon et al., 2002; Katsamba et al., 2009; Zenzo et al., 2012)

Néanmoins, les Acm décrits comme non pathogènes peuvent contribuer à la pathogénicité par un effet synergique. En effet, lorsque des hybridomes d'Acm murins reconnaissant différents épitopes à l'extérieur de l'interface adhésive ont été inoculés en combinaison, les souris immunodéficientes Rag2-/- receveuses ont développé un phénotype pemphigus (Kawasaki et al., 2006). Ainsi, tous les Ac anti-Dsg ont un potentiel pathogène à travers la réticulation de l'antigène ou d'autres mécanismes induisant une signalisation (Saito et al., 2012; Yoshida et al., 2017).

Récemment, l'analyse directe des Ac de patients atteints de PV ou de PF par spectrométrie de masse a confirmé le caractère polyclonal de la réponse anti-Dsg. Le répertoire des auto-Ac sériques dans le pemphigus est beaucoup plus diversifié et dynamique que ce qui avait été précédemment décrit par les études génétiques des LB auto-réactifs. Des clones de LB dominants produisent la plus grande partie des Ac circulant chez chaque patient (Chen et al., 2017). Ces clones peuvent persister chez les patients pendant des années avec des variations dans leurs niveaux d'expression. Cette dernière découverte peut expliquer pourquoi les titres des Ac anti-Dsg dosé par ELISA ne sont pas toujours corrélés avec l'activité clinique. En effet, la distribution sérique entre les clones d'Ac pathogènes et non pathogènes peut être modulée pour un même titre d'Ac (Hammers et al., 2018).

4.2.2. LES AUTO-ANTICORPS NON CLASSIQUES

Des approches récentes utilisant les puces à protéines suggèrent fortement que la diversité des antigènes cibles au cours du pemphigus est plus hétérogène qu'attendue (Tableau 4) (Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013). Outre les cadhérines desmosomales (Ishii et al., 2015; Kljuic et al., 2003), plus de cinquante auto-antigènes ont été identifiés notamment des récepteurs muscariniques (mAchR) et nicotiniques (nAchR) de l'acétylcholine (Ach) (Nguyen et al., 2000), la pemphaxine (Px) (Nguyen et al., 2000b) et des protéines mitochondriales (Marchenko et al., 2010).

Bien que leurs rôles dans la pathogénèse du pemphigus soient encore à l'étude, ces auto-Ac non-Dsg pourraient agir en synergie avec les IgG anti-Dsg et contribuer ainsi au phénotype complexe du pemphigus. Certains peuvent n'être que des phénomènes de propagation épitopique induits par une perte générale de tolérance. Mais dans autres cas, ces auto-Ac non classiques pourraient avoir des rôles pathogènes suffisants pour induire l'acantholyse (Pollmann et al., 2018). En effet, il a été montré que des fractions d'auto-Ac appauvries en Ac anti-Dsg1 et Dsg3 pouvaient être pathogènes. Des fractions d'IgG incluant ces auto-Ac non classiques peuvent entraîner des signes cliniques de pemphigus chez des souris *Dsg3*-/- (Vu et al., 1998). Étant un sujet de controverse, seules les quelques antigènes ciblés par des auto-Ac, et dont la pathogénicité a été caractérisée à ce jour, seront brièvement décrits (Ahmed et al., 2016).

Introduction

	Antigènes non classiques	Symboles	Références	
Molécules d'adhésions	Desmocollines 1, 2 et 3	Dsc1/Dsc2/Dsc3	Ishii et al., 2015 ; Mao et al., 2010	
	Desmogléines 2 et 4	Dsg2/Dsg4	Kljuic et al., 2003	
	Desmoplakines I et II	DPI /DPII	Kim et al., 2001	
	E-cadhérine	ECAD	Evangelista et al., 2008	
	Plakoglobine	Pg	Korman et al., 1989	
	Plakopliline 3	Pkp3	Lambert et al., 2010	
	Collagène XVII (BPAG2)	COL17A1		
	Molécule d'adhésion intercellulaire 1	ICAM1	Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013	
	Molécule d'adhésion cellulaire endothéliale plaquettaire	PECAM1		
Récepteurs de l'acéthylcholine	Récepteur cholinergique muscarinique : M1, M2, M3, M4 et M5	mAChR	Vu et al., 1998	
	Récepteur cholinergique nicotinique : α3, α5, α7, α9, α10, β2, β6	nAChR	Nguyen et al., 2000a	
Annexine	Pemphaxine (annexine A9)	ANXA9	Nguyen et al., 2000b	
Protéines mitochondriales	Peptidases mitochondriales	PMPCB / PMPCA MIPEP		
	Protéine de découplage mitochondriale	UCP2		
	Cytochrome B5 type B	CYB5B		
	Protéines transporteuses de soluté (SLC : <i>solute-carrier</i>) mitochondriales	SLC25A5/ SLC25A17	Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013	
	Carnitine O-palmitoyltransférase I	CPT1A / CPT1B		
	Transporteur de la membrane interne mitochondriale 22/23	TIMM22 / TIMM23		
Antigènes neuronaux	Protéine de myéline périphérique 22	PMP22		
	Nicotinamide nucléotide adénylyltransférase 2	NMNAT2	Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013	
Antigènes thyroïdiens	Thyroïde peroxydase	TPO	Marchenko et al., 2010	
Antigènes Immunologiques	Antigène de surface des lymphocytes T CD2 (Récepteur d'érythrocytes de mouton)	CD2		
/hématologiques	Antigène de différenciation myéloïde CD33 (Lectine-3)	CD33		
	Antigène de différenciation leucocytaire CD36 (Récepteur de la thrombospondine)	CD36		
	Antigène de surface leucocytaire CD37 (Famille des tétraspanines)	CD37		
	Antigène CD40 membre de la superfamille des récepteurs du TNF 5 (<i>Tumor necrosis factor receptor 5</i> : TNFRSF5)	CD40	- Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013	
	Molécules d'activation des leucocytes CD84 (SLAM)	CD84		
	Hémoglobines sous-unité E1	HBE1		
	Facteur de régulation de l'Interféron (Interferon regulatory factor 8)	IRF8		
	Protéine accessoire du récepteur à l'Interleukine-1 (IL-1 R9)	IL-1 RAPL2		
	Récepteur au Fragment Fc des IgE	FceR1	Fiebiger et al., 1998	

Tableau 4 : Antigènes non classiques cibles des auto-anticorps du pemphigus Liste non exhaustive des antigènes non classiques identifiés comme cibles des immunoglobulines de patients atteints de pemphigus par une ou plusieurs études et par au moins deux méthodes indépendantes (d'après Amber et al., 2018; Grando, 2011; Sinha and Sajda, 2018).

4.2.2.1. <u>Les desmocollines</u>

Les Dsc, composant majeur des desmosomes, jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Les souris déficientes en Dsc3 épidermique développent un phénotype de type PV sévère (Chen et al., 2008). Diverses études ont rapporté la présence d'IgG ou d'IgA dirigées contre les trois isoformes de la Dsc dans le PPN (56% des patients), le PV (13% des patients), le PF (18% des patients) et les pemphigus végétant et herpétiforme (40% des patients) (Ishii et al., 2015; Mindorf et al., 2017). Les Ac ciblant la Dsc3 se sont révélés pathogènes *in vitro* et *in vivo* et ce même en l'absence d'Ac dirigés contre la Dsg1 ou la Dsg3 (Mao et al., 2010; Rafei et al., 2011; Spindler et al., 2009). La découverte de phénotypes cliniques et histologiques similaires dans le pemphigus anti-Dsc3 et anti-Dsg3 confirme le rôle de l'interaction biologique de ces deux cadhérines desmosomales dans l'épiderme.

4.2.2.2. <u>Les recepteurs muscariniques et nicotiniques de l'acetylcholine</u>

L'épiderme humain possède un système cholinergique élaboré qui comprend des enzymes kératinocytaires impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'Ach et des mAchR et des nAchR. Les voies de signalisation de ces récepteurs activent ou inhibent des cascades de kinases régulant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire telles que les cadhérines et les intégrines (Grando, 2006). Bien qu'un rôle pathologique direct reste à établir, l'importance de cette signalisation dans le pemphigus est confortée par la capacité des agonistes muscariniques et nicotiniques à abolir l'acantholyse induite par des IgG de patients atteints de PV in vitro et in vivo. A l'inverse, leurs antagonistes sont capables d'induire la dissociation des kératinocytes en culture (Grando et al., 1995). Des auto-Ac dirigés contre les mAchR ont été identifiés dans le sérum de 85 à 100% des patients atteints de pemphigus (Nguyen et al., 1998, 2000c). Une étude plus spécifique des Ac anti-mAchR de type M3 a établi qu'ils sont significativement associés au pemphigus (100% des patients PV et PF) et corrélés à l'activité de la maladie, leurs titres diminuant avec la thérapie (Lakshmi et al., 2017). Il a récemment été démontré qu'en plus de la surface cellulaire, les nAchR sont également exprimés sur la membrane externe des mitochondries et qu'ils contrôlent diverses voies induisant l'apoptose intrinsèque (Lykhmus et al., 2014). Les Ac de patients atteints de PV sont capables de se lier aux nAchR à la membrane cellulaire et mitochondriales et peuvent déclencher la voie apoptotique impliquée dans l'acantholyse (Chernyavsky et al., 2015).

4.2.2.3. <u>LA PEMPHAXINE</u>

La Px est une annexine qui agit comme un AchR. La pathogénicité des Ac anti-Px a été démontrée *in vitro* par la capacité à induire une acantholyse dans des cultures de kératinocytes. In vivo, dans des expériences de transfert passif de sérums de patients atteints de PV aux souris néonatales Balb/c, l'adsorption préalable des Ac anti-Px affecte l'apparition de lésions cutanées mais l'addition de cette fraction pré-adsorbée rétablie l'activité acantholytique. Les auto-Ac anti-Px seuls ne sont pas suffisants pour induire des lésions aux souris néonatales. L'action synergique des Ac dirigés contre différents auto-antigènes kératinocytaires, y compris les AChR et les cadhérines desmosomales est donc nécessaires pour rompre l'intégrité épidermique (Nguyen et al., 2000b).

4.2.2.4. <u>Les proteines mitochondriales</u>

Les protéines mitochondriales jouent des rôles essentiels dans la machinerie cellulaire tels que la production d'énergie, la régulation du métabolisme, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (McBride et al., 2006). Les patients atteints de pemphigus présentent des Ac qui pénètrent dans les kératinocytes via les FcR néonataux (Chen et al., 2015) et réagissent contre une grande variété de protéines mitochondriales (Tableau 4) (Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013). Le rôle pathogène de ces Ac anti-mitochondriaux dans le PV a été illustré par une réduction considérable de l'activité acantholytique in vitro et in vivo après leurs adsorptions des IgG de patients atteints de PV (Marchenko et al., 2010). Le dysfonctionnement mitochondrial induit par ces auto-Ac est également étayé par la diminution des lésions chez les souris traitées par des médicaments protecteurs des mitochondries (cyclosporine A, minocycline et nicotinamide) (Kalantari-Dehaghi et al., 2013b). De plus, il a été démontré que ces Ac anti-mitochondriaux perturbent la respiration mitochondriale, le potentiel membranaire et entraînent un stress oxydatif. Ils provoquent des événements pro-apoptotiques entrainant la libération du cytochrome C et l'activation de la caspase-9 (Kalantari-Dehaghi et al., 2013b; Marchenko et al., 2010). Ainsi, le déclenchement des voies intrinsèques de la mort cellulaire par les Ac antimitchondiaux peut compléter les actions pro-acantholytiques des autres auto-Ac concourant à l'apparition des lésions.

4.2.3. LES MECANISMES MOLECULAIRES DE L'ACANTHOLYSE

La réduction du nombre et de la taille des desmosomes ainsi que la rétraction de la kératine sont des caractéristiques ultra-structurales de la peau atteinte par le pemphigus. Le processus d'acantholyse est le résultat des effets simultanés et cumulatifs d'auto-Ac dirigés contre différents auto-antigènes des kératinocytes dont les mécanismes moléculaires détaillés restent débattus.

Les données disponibles suggèrent que deux mécanismes contribuent au processus d'acantholyse (Saito et al., 2012). Premièrement, il a été observé que la plupart des Ac pathogènes ciblent les domaines adhésifs des Dsg suggérant ainsi une interférence directe des interactions des Dsg par un encombrement stérique. Les desmosomes perdent leurs propriétés adhésives. Deuxièmement, les interférences entre les liaisons des cadhérines modifient les voies de signalisation intracellulaires dont certaines régulent la cohésion cellulaire et le renouvellement des composants desmosomales. L'altération de ces voies de transduction conduit à une endocytose et à une déplétion en Dsg entraînant la perte d'intégrité et d'adhésion desmosomale. De nombreuses études ont clairement montré une diminution des taux de Dsg après la liaison des auto-Ac. Ces internalisations semble être spécifique aux isoformes de la Dsg ciblées par les auto-Ac (Calkins et al., 2006; Cirillo, 2016; Yamamoto et al., 2007).

Les données expérimentales sur ces voies de signalisation induites par les auto-Ac permettent de proposer un modèle menant à l'acantholyse par les événements suivants : i) la liaison d'auto-Ac aux antigènes cibles induits : ii) la phosphorylation de molécules d'adhésion ou de non-adhésion provoquant la dissociation du desmosome ; iii) la rétraction des filaments de kératines des plaques desmosomales, ainsi que la réorganisation du cytosquelette qui provoquent iv) une altération de la formation de nouveaux desmosomes et/ou l'apoptose des kératinocytes conduisant à v) la déstabilisation des desmosomes et un affaiblissement de l'adhésion cellulaire (Cipolla et al., 2017; Sinha et Sajda, 2018) (Figure 22).



Figure 22 : Mécanismes moléculaires de l'acantholyse dans le pemphigus

Représentation simplifiée de la voie d'assemblage des desmosomes et schéma des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'acantholyse. Les desmogléines (Dsg), les desmocollines (Dsc), les composants de la plaque desmosmale ainsi que les kératines sont transportés vers la membrane plasmique par des voies distinctes impliquant notamment la signalisation de la Rho-GTPase A (RhoA). Les auto-anticorps (auto-Ac) de patients atteints de pemphigus interfèrent avec l'assemblage des desmosomes naissants et favorisent la dissociation des desmosomes existants. La liaison des Ac aux desmogléines (Dsg) entraine des cascades de signalisation intracellulaire conduisant à la phosphorylation ou au clivage des composants desmosomaux. Les IgG anti-Dsg liées sont rapidement internalisées avec la plakoglobine (Pg) dans des vésicules endocytaires au sein de radeaux lipidiques, conduisant à l'appauvrissement des Dsg de la surface des kératinocytes. L'activation de P38-MAPK (P38) et du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) favorise l'internalisation des Dsg et l'inhibition de RhoA provoquent la rétraction de la kératine. En parallèle, l'activation de la protéine kinase C (PKC) déstabilise la liaison des filaments intermédiaires aux desmoplakines (Dp) de la plaque desmosomale. L'activation de la voie de signalisation de la tyrosine kinase Scr (Scr) induit la phosphorylation de la plakophiline (Pkp) qui conduit à sa translocation vers le cytosol après son détachement de la Dsg. De plus, le clivage des queues cytoplasmiques des cadhérines transmembranaires par les caspases peut favoriser leurs internalisations et leurs dégradations et ainsi contribuer à la déstabilisation de l'adhérence desmosomale (d'après Spindler and Waschke, 2014, 2018).

Parmi la multitude de molécules de signalisation rapportées, les modifications d'activités de la P38-MAPK (*Mitogen-activated protein kinases* P38), de la protéine kinase C (PKC), de la tyrosine kinase Scr (Scr), de la Rho-GTPase A (RhoA) et du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) sont les plus pertinentes (Grando, 2011). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la P38-MAPK (Jolly et al., 2010; Lee et al., 2009), ou de la PKC (Cirillo et al., 2010), ou de la Scr (Cirillo et al., 2014) ou de l'EGFR (Saito et al., 2012) permet de prévenir l'endocytose et la modification des filaments de kératine, ainsi que la perte d'adhésion cellulaire. A l'inverse, c'est l'activation de la RhoA qui bloque la rétraction de la kératine et prévient l'acantholyse des kératinocytes *in vitro* (Waschke et al., 2006).

En effet, la PKC est liée aux filaments de kératines. Son activation via le Ca²⁺ entraîne la dissociation des filaments intermédiaires de kératine et la phosphorylation de la Dp, ce qui provoque une instabilité des desmosomes (Kröger et al., 2013). La phosphorylation de la P38-MAPK favorise l'internalisation de la Dsg3 ainsi que la rétraction de la kératine. Plus précisément, son activation déclenche une cascade de phosphorylation de la kinase MAPKAP2 (MAP kinase activated protein kinase 2) entrainant la phosphorylation la protéine Hsp27 (Heat Shock Protein 27) qui régule à la fois l'actine et le cytosquelette (Berkowitz et al., 2008). La P38-MAPK affecte également la signalisation de l'EGFR (Bektas et al., 2013), l'activation de RhoA (Waschke et al., 2006) et diverses voies apoptotiques. La phosphorylation d'EGFR entraîne l'internalisation et la dégradation de la Dsg3. La Dsg3, la Pkg et l'EGFR sont co-internalisés et transportés vers les endosomes. Ce processus implique les radeaux lipidiques car les composés fixant le cholestérol préviennent l'endocytose (Delva et al., 2008). La RhoA régule l'ancrage des protéines desmosomales dans le cytosquelette. Son inhibition interfère avec la réorganisation de l'actine et la formation des desmosomes (Spindler and Waschke, 2011). De plus, l'activation de la Scr conduit à la phosphorylation de la Pkp3 qui se dissocie de la Dsg3 et induit ensuite internalisation vers le cytosol (Cirillo et al., 2014). L'activation de l'EGFR, de Src, de P38-MAPK et d'autres éléments de signalisation ainsi que l'élévation du Ca²⁺ intracellulaire peuvent conduire à l'activation d'enzymes apoptotiques. L'activation des caspases 1, 3, 8 et 9 ainsi qu'une expression accrue des protéines apoptotiques tels que le ligand de la molécules Fas, le récepteur Fas, la protéine BAX et la protéine TP53 a été observée dans les cultures des peaux traitées avec des IgG anti-Dsg et dans les lésions de patients atteints de pemphigus (Wang et al., 2004). Des taux élevés du ligand de Fas ont été également détectés dans les sérums de patients atteints de PV ou de PF (Puviani et al., 2003). L'inhibition pharmacologique de la caspase 3 a confirmé l'implication fonctionnelle de la machinerie apoptotique dans la dissociation cellulaire (Luyet et al., 2015). Cette activité semble découplée de l'apoptose et engage divers processus cellulaires précédant l'acantholyse, tels que la modification de l'adhésion *via* le clivage protéolytique des queues cytoplasmiques des Dsg (Weiske et al., 2001) et la rétraction des tonofilaments (Pan et al., 2011; Schmidt and Waschke, 2009). Les kératinocytes rétrécissent mais ne meurent pas, ce qui donne aux lésions de pemphigus une apparence de "pierre tombale". Grando a suggéré le terme «apoptolyse» pour décrire la contribution des enzymes apoptotiques au développement de l'acantholyse (Grando et al., 2009) (Figure 22).

4.3. LA REPONSE CELLULAIRE AU COURS DU PEMPHIGUS

Bien que l'inhibition de la fonction des desmosomes par les auto-Ac soit le mécanisme principal conduisant à la perte d'adhésion des kératinocytes, il requière en amont une perte de tolérance qui implique : i) la présentation d'auto-antigènes par des CPA associée à des signaux de co-stimulation ii) l'activation et la différenciation des LT auxiliaires (Th : *T helper*) iii) l'activation et la différenciation des LB en plasmocytes aboutissant à la production d'auto-Ac pathogènes (Figure 23).



Figure 23 : Mécanismes cellulaires auto-immuns impliqués dans la physiopathologie du pemphigus.

Schéma de la réponse auto-immune humorale conduisant à de la production d'auto-anticorps (Ac) et à l'acantholyse dans le pemphigus. La présentation des peptides antigéniques dérivés des desmogleines (Dsg) 1 ou 3 est restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité humain (CMH) de classe II de susceptibilité au pemphigus tel que le HLA (Human Leukocyte Antigene) -DRB1*04. Après activation par le biais du TCR (T cell receptor) et des signaux de co-stimulation, les lymphocytes T (LT) CD4+ naïfs vont se différencier en LT « helper » (Th) de type Th1, Th2, Th17, en lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) ou en lymphocyte T régulateurs de type 1 (Tr1). Les Th2 sécréteurs d'IL-4 et spécifiques des Dsg sont présents uniquement chez les patients atteints de pemphigus. Les Th2, Th17 et Tfh vont activer les lymphocytes B (LB) par des interactions directes ou par la sécrétion de cytokines. Les cytokines sont essentielles pour la prolifération des LB, leurs différenciations en plasmocytes ainsi que dans les processus d'hypermutation et de commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) afin de produire des auto-Ac de haute affinité. Le développement de la réponse humorale auto-immune est étroitement lié à un déséquilibre entre les différentes populations de Th. En effet, l'IFN-y (interféron) produit par les Th1 est capable de supprimer le développement des Th2. Les Tr1 étant des acteurs majeurs de tolérance périphérique, ils peuvent également inhiber l'activation des LT par la production d'IL-10 (interleukine). Cependant, l'IL-10 a des effets complexes et ambivalents et peut favoriser la commutation des Ig vers l'isotype IgG4 associé à la pathogénicité des Ac. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques des Dsg peuvent être exceptionnellement générés et induire une réponse auto-immune cellulaire. Ils sont surtout observés dans les pemphigus paranéoplasiques (PPN) (d'après Kasperkiewicz et al., 2017; Pan et al., 2015).

4.3.1. Les cellules du systeme immunitaire inne

4.3.1.1. <u>Les keratinocytes</u>

En plus de leur rôle primordial dans la fonction de barrière physique de la peau, les kératinocytes constituent une défense immunologique toute aussi importante (Nestle et al., 2009). Ils possèdent des PRR qui leurs permettent de moduler l'environnement chimique et cellulaire de la peau. Ils produisent certaines cytokines tels que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-18, le TNF et des chimiokines de manière constitutive ou induite ce qui leur permet de moduler la réponse immunitaire (Noske, 2018). A l'état physiologique, les kératinocytes n'expriment pas le CMH de classe II mais ils peuvent être amenés à l'exprimer dans des conditions inflammatoires et jouer ainsi le rôle d'une CPA non professionnelle (Nickoloff and Turka, 1994). L'expression des molécules HLA-DR par les kératinocytes a été observée dans la peau des patients atteints de pemphigus (Picut et al., 1987). Ainsi, la présentation des antigènes par les kératinocytes participe probablement à l'activation locale des LT mais leur rôle précis en tant que CPA dans le pemphigus reste à déterminer.

4.3.1.2. <u>Les cellules presentatrices d'antigenes</u>

La peau est un organe très riche en CPA professionnelles, exprimant le CMH de classe Il ainsi que les molécules co-stimulatrices nécessaires à la liaison et à l'activation des Th. Ces cellules forment le lien entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont dotées de mécanismes de détection, d'internalisation, de dégradation et de présentation des peptides antigénique et jouent un rôle clé dans la spécialisation de l'immunité adaptative. Les DC ainsi que le sous-groupe des cellules de Langerhans constituent les principales populations de CPA dans l'épiderme. Cependant, les LB, les monocytes et les macrophages peuvent également jouer le rôle de CPA professionnelles. Les CPA cutanées sont très dynamiques et peuvent pénétrer dans la peau à partir de la circulation périphérique, migrer dans les tissus et vers les ganglions lymphatiques drainants (Kim et al., 2001). Elles y délivrent les 3 signaux essentiels pour la stimulation des Th et leur polarisation vers une fonction effectrice comprenant : i) l'interaction entre le complexe CMH/peptide antigénique et le TCR/CD3 ii) les molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) qui vont se lier à leurs ligands correspondants (CD28, CD40L) et iii) la production de cytokines. L'activation conduit à l'expansion clonale des cellules effectrices spécifiques de l'antigène, qui pourront ainsi migrer au niveau de la peau (Jung, 2004).

-75-

Si les DC sont essentielles pour la stimulation des Th et leur polarisation, elles jouent également un rôle crucial dans l'établissement de la tolérance périphérique. C'est le paradoxe des DC puisqu'elles sont à la fois immunogènes et tolérogènes. L'initiation d'une tolérance immune *versus* une réponse immunologique est liée à l'état de maturation et/ou d'activation de la DC présentant l'antigène (Lutz and Schuler, 2002). Une expression insuffisante des molécules co-stimulatrices peut conduire à l'anergie des LT auto-réactifs (Khan and Ghazanfar, 2018), l'anergie étant un état caractérisé par une incapacité des LT à répondre à une stimulation antigénique (Zheng et al., 2008).

Il existe peu d'études portant sur les CPA dans le pemphigus. Les analyses d'immunohistochimie des infiltrats cellulaires présents dans les lésions soulignent le nombre accru de DC et de cellules de Langerhans dans l'épiderme des patients (Chiossi et al., 2004; Petzelbauer et al., 1993). Les essais, *in vitro*, ont démontré que les CPA de patients mais également d'individus en bonne santé porteurs du gène de susceptibilité HLA-DRB1*0402 peuvent présenter la Dsg3 et activer ainsi les Th, indiquant que le type de CMH de classe II et la présence de ces peptides sont d'une importance capitale pour le développement du pemphigus (Hertl et al., 1998b). De plus, il a été rapporté que des LT CD4+ de patients atteints de PV peuvent proliférer de manière spécifique lorsqu'ils sont cultivés en présence de lymphocytes NK exprimant : i) les molécules du CMH de classe II et ii) le peptide de la Dsg3. Ces LT activés sécrètent alors des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et l'IFN-γ (Stern et al., 2008; Takahashi et al., 2007). Ces observations préliminaires soulignent l'importance des cellules de l'immunité innée dans le contrôle du devenir de la réponse adaptative auto-immune dans le pemphigus (Oostingh et al., 2002).

4.3.1. Les cellules du systeme immunitaire adaptatif

Orientée par les signaux d'activation transmis par l'immunité innée, la réponse immune adaptive nécessite une interaction étroite entre les LT et les LB.

4.3.1.1. Les lymphocytes T

Les LT ne peuvent pas directement reconnaitre les antigènes, mais seulement certains fragments peptidiques dérivés de ces antigènes exprimés par les CPA. Naturellement, les LT ne réagissent pas contre les auto-antigènes en raison de la présence d'une tolérance immunologique centrale et périphérique. Pourtant, des LT spécifiques de la Dsg3 ont été détectés dans le sang périphérique de patients atteints de PV et de porteurs sains d'allèles HLA de classe II associés au PV (Hertl et al., 1998b). Ces clones T auto-réactifs à la Dsg3 reconnaissent un ensemble limité de peptides de la Dsg3 situés dans les domaines EC de la Dsg3, à savoir Dsg3 78–94, Dsg3 96–112, Dsg3 189–205, Dsg3 205–221 et Dsg3 250-266 associés aux HLA-DR β 1*0402 et HLA-DQ β 1*0503 (Veldman et al., 2004b). Des LT auto-réactifs dirigés contre la Dsg1 ont également été identifiés dans la forme endémique du PF (*Fogo selvagem*) (Lin et al., 2000).

Normalement, la tolérance centrale élimine les LT naïfs auto-réactifs qui se développent dans le thymus par la présentation d'auto-antigènes sur les cellules thymiques (Khan and Ghazanfar, 2018). Souvent, dans les MAI, la réponse immunitaire est dirigée contre des peptides dérivés d'antigènes qui ne déclenchent pas cette délétion clonale. Cela peut être dû à une faible expression de ces antigènes dans le thymus ou au fait que leur expression est spécifique d'un tissu (Kreuwel and Sherman, 2001). Bien que la Dsg1 (Mouquet et al., 2008) et la Dsg3 (Skogberg et al., 2015) soient bien exprimées dans le thymus, des LT auto-réactifs échappent au mécanisme de délétion thymique et sont présents en périphérie chez les patients mais également chez certains individus sains. La tolérance centrale par délétion clonale étant imparfaite et incomplète, la neutralisation des LT auto-réactifs repose sur les mécanismes alternatifs de la tolérance périphérique tels que l'anergie, l'ignorance et l'immuno-régulation par des cellules régulatrices afin de prévenir le développement de la MAI (Khan and Ghazanfar, 2018).

La présentation efficace des peptides par les CPA, sous l'influence des cytokines produites conduit les Th auto-réactifs naïfs à se polariser en cellules effectrices de manière programmée. Au cours de la dernière décennie, le spectre des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et régulateurs s'est considérablement élargi. Ces populations sont définies classiquement comme des lignages distincts, avec des phénotypes et des fonctions spécifiques (O'Shea and Paul, 2010) (Figure 24). Parmi les LT impliqués dans la physiopathologie du pemphigus, les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs Th1 et Th2 sont les plus connus mais les Treg, les Th17 et les LT folliculaires *Helper* (Tfh) ont également été décrits (Hertl et al., 2006; Pan et al.,2015) (Figure 23). Les analyses histochimiques des lésions cutanées de PV et de PF montrent davantage d'infiltrations de LT CD4⁺ que de LT CD8⁺. Le rôle des LT CD8⁺ cytotoxiques dans la pathogenèse du pemphigus n'étant pas clairement établit, cette population ne sera pas décrite plus précisément dans ce manuscrit (Giurdanella et al., 2013).

-77-



Figure 24 : Différenciation des lymphocytes CD4+ naïfs

Représentation schématique de la polarisation des lymphocytes T Helper (Th). Selon l'environnement cytokinique conditionné par la cellule présentatrice d'antigène (CPA), le LT CD4+ naïf se différencie en Th de type Th1, Th2, Th17, Tfh ou Treg. Chaque Th est associé à l'expression d'un facteur de transcription « signature » et est caractérisé par un profil de sécrétion de cytokines distinctes. Bcl6 : B-cell lymphoma 6 ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité humain ; Foxp3 : Forkhead box P3 ; GATA3 : GATA binding protein 3 ; IFN : interféron ; IL : interleukine ; Roryt : Retinoid related orphan receptor γ thymus ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; Tbet : T-box transcription factor ; TCR : T cell receptor ; Tfh : lymphocyte T follicular helper ; TGF : transforming growth factor ; TNF : Tumor necrosis factor ; Treg : Lymphocyte T régulateur.

Les lymphocytes T helper Th1 et Th2

L'équilibre Th1/Th2 joue un rôle crucial dans les réponses immunitaires. Un environnement riche en IL-12 et IFN- γ induit une polarisation de type Th1 sous la dépendance des facteurs de transcription T-bet (*Tbox transcription factor*) et STAT4 (*Signal transducer and activator of transcription*). Les Th1 orchestrent la réponse immune à médiation cellulaire responsable de l'activation des macrophages et des LT CD8⁺ cytotoxiques, privilégiée dans les réponses anti-tumorales ou antivirales. Les Th1 produisent de l'IL-2, de l'IFN- γ et du TNF- α et expriment les récepteurs aux chimiokines CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) et CXCR3 (*C-X-C chemokine receptor type 3*). A l'inverse, un environnement riche en IL-4 oriente vers la voie Th2 sous la dépendance des facteurs de transcription STAT5 et GATA3 (*GATA binding protein 3*). Les Th2 favorisent la réponse immunitaire humorale privilégiée lors des réponses contre des pathogènes

extracellulaires, en particulier dans la lutte antiparasitaire mais également dans les réactions allergiques. Les Th2 expriment le récepteur de chimiokines CCR4 (*C-C chemokine receptor type 4*) et vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5, de L'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Luckheeram et al., 2012 ; Zhu and Paul, 2008) (Figure 24).

Si les prédispositions HLA au pemphigus contribuent à la reconnaissance des Dsg et à l'émergence des LT auto-réactifs chez les patients atteints de pemphigus et chez les individus sains, Veldman a démontré que les LT auto-réactifs dirigés contre la Dsg3 présentent une réponse de type Th1 chez les individus en bonne santé différente de celle des patients atteints de PV qui est à prédominance Th2 (Veldman et al., 2003). Des LT auto-réactifs spécifiques de la Dsg1 avec des profils Th1 et Th2 ont été également retrouvés chez des patients atteints de PF (Gebhard et al., 2005). La réponse Th2 joue donc un rôle critique dans la pathogenèse du pemphigus, comme en témoigne l'étude immunohistochimique des infiltrats lymphocytaires et l'étude de l'expression des gènes des cytokines dans des lésions de PV et de PF (Caproni et al., 2001; Santi and Sotto, 2001). La majorité des études réalisées sur les profils cytokiniques ont souligné une régulation à la hausse de la voie Th2, avec une augmentation des taux sériques d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-10 chez les patients atteints de PV ou de PF par rapport aux contrôles sains et inversement, une diminution du taux d'IFN-γ associé au profil Th1 (Bhol et al., 2000; D'Auria et al., 1997; Lee et al., 2017; Satyam et al., 2009). Le modèle murin de pemphigus confirme également le rôle de la réponse Th2 et de la cytokine IL-4 dans le mécanisme immunopathologique (Takahashi et al., 2008, 2009). Ces LT auto-réactifs contribuent, par les signaux tels que les cytokines et les molécules de co-stimulation, à l'activation des LB naïfs, à leurs différenciations en LB mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Le rapport Th1/Th2 influence également la commutation isotypique des Ig. En effet, les cytokines Th1 tels que l'IFN-γ favorisent la commutation vers l'istotype IgG1 tandis que les cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 favorisent la commutation vers l'isotype IgG4 qui est associé à la pathogénicité des Ac anti-Dsg (Armitage et al., 1993). Les travaux de Rizzo ont montré que l'activité des LT Th2 anti-Dsg3 était corrélée de manière significative avec l'activité de la maladie et le titre d'Ac anti-Dsg3 (Rizzo et al., 2005). Ainsi, pendant la phase aiguë de la maladie, le rapport Th1/Th2 est le reflet d'un déséquilibre de la réponse immunitaire. Cette balance évolue au cours des phases de rémission ou de rechute (Zhu et al., 2012).

Les lymphocytes T regulateurs

Les Treg jouent un rôle clé dans la tolérance périphérique. Les Treg peuvent être divisés en deux sous-groupes : i) Les Treg naturels (nTreg) qui sont sélectionnés par des interactions de haute affinité dans le thymus ; ii) les Treg induits (iTreg) ou Th3 qui sont issus de la différenciation des LT CD4⁺ naïfs à la périphérie après une présentation antigénique et sous l'influence de l'IL-10 et du TGF- β (*transforming growth factor \beta*) (Figure 24). Ces deux sous-ensembles de Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead boîte P3*) ainsi que la molécule CD25 qui est la sous-unité α du récepteur de l'IL-2. Les Treg exercent une action répressive sur les LT CD4⁺ et CD8⁺, les NK ou les LB, et ce de plusieurs manières. Ces mécanismes dépendent de la production de cytokines immuno-suppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β ou du contact cellulaire par le biais de molécules immuno-modulatrices comme CTLA-4 (Zhao et al., 2017). Il existe un autre sous-ensemble d'iTreg appelé les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1). Les Tr1 expriment les molécules CD4 et CD25 mais pas le FoxP3 et sécrètent principalement de l'IL-10 (Roncarolo et al., 2006).

Dans de nombreuses MAI, la fonction ou le nombre de Treg sont altérés (Alice Long and Buckner, 2011). Dans le sang des patients atteints de PV, les analyses par cytométrie en flux ont révélé que la proportion de Treg CD4⁺ CD25^{fort} parmi les LT CD4⁺ était considérablement réduite par rapport à des témoins sains (Sugiyama et al., 2007). Les travaux de Veldman ont permis d'isoler des Tr1 sécrétant de l'IL-10 spécifique de la Dsg3 chez des témoins sains porteurs des HLA de classe II associés au PV. Ces Tr1 sont capables de supprimer la réponse proliférative des LT auto-réactifs spécifiques de la Dsg3. Chez les patients atteints de PV, ces Tr1 n'ont été que rarement détectés (Veldman et al., 2004). L'observation d'un ratio Th2/Tr1 fort chez les patients atteints de PV et d'un ratio faible chez les témoins sains suggère qu'il peut exister un équilibre physiologique entre les Th2 et les Tr1 spécifiques de la Dsg3 nécessaire au maintien de la tolérance périphérique (Veldman et al., 2006). La modulation des Treg constitue donc une piste thérapeutique dont l'efficacité a été évaluée dans le modèle murin de pemphigus (Yokoyama et al., 2011). Dans le modèle murin de PV humanisé pour le HLA-DRB1*0402, le traitement par un superagoniste de CD28 (Acm D665) permet une augmentation marquée des Treg associée à une diminution de l'activation des LT spécifiques de la Dsg3 et une réduction des IgG anti-Dsg3 (Schmidt et al., 2016). Ces observations confirment la capacité des Treg à réguler l'auto-immunité et en fait des cibles thérapeutiques potentielles.

-80-

Les lymphocytes T helper 17

Les Th17 constituent un sous-ensemble distinct des Th caractérisés par la production d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22. Les Th17 expriment le facteur de transcription RORyt (*Retinoic acid related orphan receptor* γ *t*) ainsi que des récepteurs aux chimiokines CCR6 (*C-C chemokine receptor type 6*) et CCR4 (Harrington et al., 2005). Les mécanismes d'activation vers la voie Th17 sont complexes et dépendent d'un réseau de cytokines comprenant le TGF- β , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23. Les voies de développement des Th17 et des Treg sont étroitement interconnectées et ont des rôles totalement opposés. Les Th17 présentent des propriétés pro-inflammatoires marquées et jouent un rôle important dans la réponse immune lors d'infections bactériennes et fongiques (Li et al., 2018).

L'importance des Th17 dans l'inflammation et l'auto-immunité est maintenant reconnue (Tesmer et al., 2008). Des travaux récents ont démontré l'implication de la voie Th17 dans la pathogenèse du pemphigus. En effet, une augmentation de la fréquence des Th17 est observée dans le sang des patients atteints de PV par rapport aux témoins (Hennerici et al., 2016; Xu et al., 2013). Les expressions géniques de RORyt et de CCR6 utilisées comme marqueurs des Th17, sont augmentées dans le sang mais également dans les biopsies de peau des patients atteints de PV par rapport aux témoins (Asothai et al., 2015). L'analyse par immunohistochimie des lésions de PV et de PF confirme une accumulation de lymphocytes producteurs d'IL-17 (Arakawa et al., 2009). Les taux sériques d'IL-17 sont également élevés chez les patients atteints de pemphigus (Asothai et al., 2015; Timoteo et al., 2017) mais sans corrélation avec les titres des auto-Ac (Żebrowska et al., 2017). Les mécanismes d'action des Th17 dans le pemphigus n'ont pas encore été décrits. Récemment, la caractérisation de ces mécanismes chez la souris a permis d'établir que les Th17 peuvent directement contribuer à la prolifération des LB mais également influencer la commutation isotypique des Ig (Mitsdoerffer et al., 2010; Patakas et al., 2012). Certains chercheurs ont suggéré que l'interconnexion entre les voies Th17 et Treg (Bettelli et al., 2006) pourrait être à l'origine de la diminution des Treg et contribuer ainsi à l'activation et à la prolifération des LT et des LB conduisant à la production d'auto-Ac (Pan et al., 2015).

► LES LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES HELPER

Les Tfh constituent un groupe de Th récemment découvert et localisé essentiellement dans les centres germinatifs (CG) (Breitfeld et al., 2000). Les CG sont des structures spécialisées présentes au sein des follicules riches en LB (zone B/cortex) des tissus lymphoïdes secondaires, dans lesquels ont lieu l'hypermutation somatique des Ig, la sélection des LB de haute affinité, la commutation isotypique ainsi que la différenciation des LB en LB mémoires ou en plasmocytes. Les Tfh produisent des taux élevés d'IL-21, une cytokine signature, qui agit de façon autocrine sur leur propre différenciation mais qui est également essentielle à la génération du CG et des plasmocytes (Eto et al., 2011; Zotos et al., 2010). Bien que les Tfh puissent produire des cytokines caractéristiques des autres sous-ensembles Th, ils représentent une lignée distincte dont le développement est défini par l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) et STAT3 (Ray et al., 2014; Yu et al., 2009). Les Tfh sont caractérisés par une combinaison de molécules effectrices essentielles à leur développement et à leur fonction comprenant le CXCR5 (C-X-C chemokine receptor 5), des molécules de co-stimulation ICOS, CD40L, CD28, PD-1 (*Programmed cell death 1/CD279*), des récepteurs membres de la famille des SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule) tel que le CD84 et des SAP (SLAMassociating protein) (Choi et al., 2011). De multiples signaux sont impliqués dans la génération des Tfh. Les cytokines du microenvironnement tels que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-21, l'IL-23, l'IL-27, le TGF- β et l'activine A y jouent un rôle important individuellement ou collectivement (Read et al., 2016). En fonction des signaux reçus lors de la présentation de l'antigène par la CPA, le LT naïf va évoluer vers un état dit de « pré-Tfh », qui le conduit à migrer à la frontière entre la zone T (paracortex) et la zone B des follicules. L'expression de CXCR5 est essentielle à la localisation des pré-Tfh en zone T-B favorisant ainsi l'interaction avec les LB activés présentant l'antigène apparenté. La présentation de l'antigène par les LB associée aux signaux réciproques des molécules ICOSL (Inducible Tcell costimulator Ligand/CD275), CD40, CD86, PD-L1 (Programmed death-ligand 1/CD274), et CD84 sont importants pour la différenciation complète des Tfh et favorise leur survie (Figure 25). A l'issue de cette rencontre, les Tfh migrent dans la zone B ou dans le CG où ils contribuent à la survie, à la prolifération, à l'hypermutation somatique, à la commutation isotypique et à la différenciation des LB spécifiques de l'antigène (Ma et al., 2012; Tangye et al., 2013; Ueno et al., 2015).



Figure 25 : Différenciation des lymphocytes T folliculaires helper

Représentation schématique des interactions cellulaires nécessaires à la différenciation des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Dans les tissus lymphoïdes secondaires, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) induisent la polarisation des lymphocytes T (LT) CD4+ naïfs en LT pré-Tfh. Les CPA produisent notamment de l'IL (interleukine)-6, de l'IL-12 et de l'IL-27 qui favorisent l'expression de STAT3, de Bcl-6 (B-cell lymphoma 6 protein) et du récepteur aux chimiokines CXCR5 permettant aux pré-Tfh de migrer à la frontière des zones T et B des follicules favorisant ainsi l'interaction avec les lymphocytes B (LB). La signalisation cellulaire induite par la présentation antigénique par les LB activés associée aux signaux des molécules de co-stimulation CD40L/CD40, ICOS/ICOS-L, CD28/CD86 et des récepteurs SAP/CD84 stimulent le développement complet des Tfh. Cette interaction entraine soit la différenciation des LB en plasmablastes extra-folliculaires à courte durée de vie, soit la formation d'un centre germinatif (CG). Au sein du CG, les Tfh contribuent à la différenciation de LB en plasmocytes à longue durée de vie et en LB mémoires via la sécrétion d'IL-21 qui agit également de manière autocrine sur leur propre différentiation. BCR: B cell receptor; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité humain; CXCR5: C-X-C chemokine receptor 5 ; ICOS: Inducible T-cell costimulatory; ICOSL: ICOS-Ligand; Ig: Immunoglobuline; PD-1: Programmed cell death 1; PD-L1 (Programmed death-ligand 1); SAP : SLAM-associating protein, STAT : signal transducer and activator of transcription ; TCR : T cell recptor (*d'après Ma et al., 2012*).

L'analyse de cette population chez l'Homme a été facilitée par la caractérisation de sous-ensembles de Tfh CD4⁺ CXCR5⁺ mémoires circulants (cTfh) dans le sang qui partagent les propriétés fonctionnelles des Tfh (Simpson et al., 2010). Ces cTfh comprennent en réalité plusieurs populations présentant des phénotypes et des fonctions uniques caractérisées par des profils de cytokiniques distincts. En évaluant l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 classiquement associés aux Th1 et Th17, les cTfh ont été classés en trois principaux sous-ensembles : i) les Tfh1 exprimant le CXCR3, le facteur de transcription T-bet et produisant de l'IFN- γ ; ii) les Tfh17 exprimant le CCR6, le facteur de transcription ROR γ t et produisant de l'IL-17A et de l'IL-22 et iii) les Tfh2 (CXCR3⁻/CCR6⁻) exprimant le facteur de transcription GATA3 et produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Schmitt et al., 2014). Ces sous-ensembles de Tfh produisent de
l'IL-21, mais il existe une hétérogénéité et chaque sous-ensemble a une capacité distincte d'activation des LB. Les travaux de Morita et al ont démontré que les LB naïfs sont stimulés par les Tfh2 et Tfh17, mais pas par les Tfh1. De plus, ces différents sousensembles de Tfh semblent jouer des rôles différents dans la biologie du CG en régulant notamment la commutation isotypique des Ig. Les Tfh2 favorisent la sécrétion d'IgG et d'IgE, tandis que les Tfh17 induisent la production d'IgG et d'IgA. (Morita et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les Tfh associés à différents sous-ensembles de Th influencent de différentes façons l'immunité humorale. Des études récentes ont proposé une régulation des Tfh par un sous-ensemble spécialisé appelé les LT régulateurs folliculaires (Tfr) partageant les caractéristiques des Tfh et des Treg exprimant le CXCR5 et le Foxp3 (Linterman et al., 2011). Les Tfr se localisent dans des CG et y contrôlent la réponse immune humorale par la régulation de la population Tfh (Lim et al., 2004). Il existe encore peu d'études sur les Tfr dans l'auto-immunité (Maceiras et al., 2017). Par contre, il existe maintenant des preuves convaincantes que la dérégulation des Tfh contribue à la pathogenèse de MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Choi et al., 2015a; Kim et al., 2018), la polyarthrite rhumatoïde (Arroyo-Villa et al., 2014) ou les maladies associées aux IgG4 (Akiyama et al., 2015; Chen et al., 2018). Dans ces études, l'activité de la maladie et/ou les titres des auto-Ac semblent corrélés à une altération de l'équilibre des sous-ensembles Tfh avec une dominance des Tfh2 et/ou Tfh17 par rapport aux Tfh1.

Dans le pemphigus, les LB à l'origine des auto-Ac anti-Dsg pathogènes ont subi une commutation vers l'isotype IgG4 et sont à la fois hypermutés et de haute affinité (Cho et al., 2014; Ellebrecht et al., 2018). Ces caractéristiques sont compatibles avec une sélection au sein des CG et suggèrent fortement l'implication des Tfh dans le processus physiopathologique. Les expériences réalisées dans les modèles murins de pemphigus visant à bloquer l'interaction cellulaire notamment avec un Acm anti-CD40L (CD154) ont montré de manière convaincante que les LB et les LT sont nécessaires pour le développement du pemphigus (Aoki-Ota et al., 2006). Une étude plus récente souligne une fréquence plus élevée de cTfh dans le sang des patients atteints de PV que chez des témoins sains ainsi qu'une élévation des taux des cytokines sériques IL-21 et IL-27 associées aux Tfh. Des LT auto-réactifs producteurs d'IL-21 ont également été mise en évidence par ELISPOT chez des patients atteints de pemphigus lors d'une stimulation *ex vivo* avec la Dsg3 (Hennerici et al., 2016). L'analyse des cellules infiltrant les lésions des patients atteints de pemphigus a démontré la présence de LB, de plasmocytes à IgG

spécifiques des Dsg associées à des LT CD4⁺ dans le derme de la zone lésionnelle suggérant la formation d'une structure lymphoïde tertiaire ectopique. Ces LT CD4⁺ infiltrant produisent de l'IL-21 mais également de l'IL-17A . Cependant, ils n'expriment pas le Bcl-6 ou le CXCR5 comme des Tfh classiques (Yuan et al., 2017). Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle des Tfh et leur influence sur la production d'auto-Ac dans le pemphigus.

4.3.1.2. LES LYMPHOCYTES B

Les LB sont les seules cellules capables de se différencier en cellules sécrétrices d'Ac ASC (antibody secreting cell) appelées plasmablastes ou plasmocytes. Outre leur rôle évident dans la production d'Ig, les LB ont des fonctions essentielles dans l'homéostasie immunitaire par la présentation antigénique et par la production de cytokines (Crawford et al., 2006; Harris et al., 2000). Les LB peuvent influencer le développement des réponses des LT CD4⁺ effecteurs et mémoires par la production de cytokines telles que l'IL-6, l'IFNγ et le TNF ou les réguler par leur capacité à produire de l'IL-10 (Lund and Randall, 2010). Les cytokines dérivées des LB sont essentielles pour l'ontogenèse, l'homéostasie et l'organisation structurelle des organes lymphoïdes secondaires en particulier dans la formation du CG, ainsi que pour le développement de tissus lymphoïdes tertiaires ectopiques (LeBien and Tedder, 2008). Les LB sont, par conséquent, les acteurs principaux de la réponse humorale et sont au cœur de la réponse auto-immune dans le pemphigus. Ce rôle central a été conforté par les premiers essais thérapeutiques avec le RTX. L'utilisation de cet Acm chimérique anti-CD20 provoque une déplétion profonde des LB et permet d'obtenir une rémission clinique chez la plupart des patients atteints de pemphigus (86% en rémission à 24 mois) (Joly et al., 2007). Les études de caractérisations génétiques et fonctionnelles des LB anti-Dsg ont été menées afin d'approfondir la compréhension mécanistique de la pathogenèse du pemphigus.

➢ L'ONTOLOGIE DES LYMPHOCYTES B

Au cours de leur développement, les LB subissent différentes étapes de maturation et de différenciation. Les sous-populations de LB sont caractérisés non seulement par l'expression d'une combinaison de marqueurs de surface, mais aussi par leurs voies de développement, leurs fonctions et leurs emplacements anatomiques (Figure 26). Deux étapes successives permettent de générer un répertoire lymphocytaire B, la première au niveau de la moelle osseuse et la seconde au niveau des organes lymphoïdes secondaires.



Figure 26 : Différenciation des Lymphocytes B.

Schéma récapitulatif des stades de développement des lymphocytes B (LB) et des marqueurs de surfaces spécifiques des différentes sous-populations ainsi que leurs emplacements anatomiques. Les LB (CD19) se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. La transition des cellules du stade pro-B au stade pré-B dépend de la génération d'une chaîne lourde (VDJ-Cµ) de l''immunoglobuline (Ig). Le récepteur des pré-B (pré-BCR) est composé de la chaîne lourde μ appariée à la chaîne légère de substitution (λ 5 et V pré-B). La signalisation à partir du pré-BCR régule l'assemblage des séquences V et J des chaînes légères de l'Ig avec les régions constantes κ ou λ (Ollila and Vihinen, 2005). L'IgM exprimée par des LB immatures modifie l'expression de nombreux gènes comprenant le CD20 et initie la sortie en périphérie. L'épissage alternatif de la chaîne lourde de la région constante δ (C δ) génère l'IgD, qui est co-exprimée avec l'IgM sur les LB transitionnels (CD24^{fort} CD38^{fort}) et LB matures naïfs (CD24^{int} CD38^{int}). Le développement des LB se

poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires. La reconnaissance antigénique oriente la réponse des LB en fonction de la spécificité de leur BCR vers une réponse T indépendante ou T dépendante associée ou non à la formation du centre germinatif (CG). Les LB de la zone marginale (CD21^{fort}) expriment souvent des BCR polyréactifs et peuvent rapidement réagir aux antigènes T indépendants (type microbien) et se différencier en plasmocytes à courte durée de vie sécrétant principalement des IgM (Cerutti et al., 2013). Les LB folliculaires (CD23^{fort}) sont activés par la liaison à des antigènes T dépendants et se développent avec l'aide des Lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Certains de ces LB vont se différencier en LB mémoires non commutés (CD27+ IgM+ IgD+/-) et en plasmocyte à courte durée de vie. D'autres LB induisent la formation d'un centre germinatif (CG) avec l'aide des Tfh. Au sein du CG, l'activation du BCR induit un processus de maturation des LB (centroblastes puis centrocytes) par un mécanisme d'hypermutation somatique de la région V de la chaîne lourde de l'Ig et par la commutation isotypique modifiant ainsi l'affinité du BCR et son isotype (de IgM à IgG, IgA ou IgE). In fine, les LB du CG sélectionnés donnent naissance à des LB mémoires commutés (CD27+ $IgG^+/IgA^+/IgE^+$) de haute affinité et à des plasmocytes à longue durée de vie. Les plasmablastes (CD20⁻ CD24⁻ CD38⁺⁺ CD27⁺⁺) et les plasmocytes (CD20⁻ CD38⁺ CD138⁺) résident dans les organes lymphoïdes secondaires ou se logent dans la moelle osseuse. Ces cellules n'expriment plus de BCR mais sécrètent des anticorps (d'après Burger and Wiestner, 2018).

Environ 90% des cellules qui s'engagent dans la lymphopoïèse B n'atteignent pas le stade de LB immatures. Les précurseurs des LB vont subir une série de transformations du stade pro-LB, au pré-LB puis LB immature (Ollila and Vihinen, 2005). Le BCR composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères d'Ig et de deux hétérodimères d'Ig α et d'Ig β , va progressivement se mettre en place suite aux recombinaisons somatiques des gènes codant pour les domaines variables VDJ des Ig sous la dépendance des enzymes RAG1 et RAG2 (*Recombination activating gene 1/2*) (Jung and Alt, 2004) (Figure 26). On estime que 75% des précurseurs B nouvellement générés dans la moelle osseuse expriment des BCR capables de se lier à des auto-antigènes (Wardemann et al., 2003). Dans des circonstances normales, les mécanismes de tolérance régulent ces LB auto-réactifs par l'induction d'apoptose lorsqu'ils rencontrent des auto-antigènes ou par la réédition du BCR ou encore par un processus d'anergie (Nemazee, 2017). Les LB immatures qui réussissent à passer ces points de contrôle poursuivront leur développement en périphérie.

Les stades de développement ultérieurs des LB se situent principalement dans la rate et les ganglions lymphatiques. Les LB immatures co-exprimant des IgM et des IgD appelés « LB transitionnels » vont acquérir la capacité d'être complétements activés et d'interagir avec l'antigène. Les LB matures sont dits « LB naïfs » et vont progressivement se localiser soit dans le compartiment folliculaire B des organes lymphoïdes secondaires, soit dans la zone marginale située à l'interface entre la circulation et le tissu lymphoïde. Au cours de ce processus, les LB vont exprimer des molécules de surface spécifiques telles que la tyrosine phosphatase CD45, le CD19, le CD20, le CD21, le CD40 et l'ICOSL (CD275) qui

-87-

sont des co-récepteurs importants dans les voies de signalisation du BCR. L'activation des LB est déclenchée par la reconnaissance de l'antigène par le BCR (Batista and Harwood, 2009). Cette interaction conduit à l'activation des voies de signalisation intracellulaires, à l'internalisation puis au traitement de l'antigène permettant la présentation des peptides dérivés aux LT CD4⁺ associés au CMH de classe II (Crawford et al., 2006). La différenciation des LB est guidée par la nature de l'antigène, les signaux des TLR associés, les signaux auxiliaires des molécules de co-stimulations ainsi que par l'environnement cytokinique (Nutt et al., 2015).

On distingue deux types de réponses : i) les réponses à des antigènes T indépendants (lipopolysaccharides des capsules bactériennes) qui induisent une expansion des LB en l'absence de coopération avec les LT et une différenciation rapide en LB mémoires et en plasmocytes sécrétants des Ac de faibles affinités. Ils génèrent principalement des IgM fournissant une première ligne de défense spécifique contre les agents pathogènes. En générale, les LB de la zone marginale exprimant des BCR polyréactifs répondent à ces antigènes T indépendants souvent associés aux signaux des ligands des TLR (Cerutti et al., 2013). ii) Les réponses à des antigènes T dépendants, en général de nature glycoprotéique, sont désignés ainsi car les LB nécessitent la collaboration des LT pour se différencier en LB mémoires ou en plasmocytes sécrétants des Ac de haute affinité (Figure 27). Les LB folliculaires activés par la reconnaissance antigénique migrent vers la zone T-B inter-folliculaire où ils subissent une expansion lors de l'interaction avec les LT sensibilisés à l'antigène (Okada et al., 2005). L'aide des LT se présente sous la forme de ligands de co-stimulation (CD40L) et de cytokines (IL-4, IL-21 et l'IFN-y) précédemment décrits qui stimulent la prolifération et la différenciation des LB (Shlomchik and Weisel, 2012). Dans les zones extra-folliculaires, une fraction des LB se différencie en LB mémoires et en plasmablastes à courte durée de vie sécrétants principalement des IgM, tandis qu'une autre fraction de LB interagie avec les Tfh et initie la formation de CG dans les follicules secondaires (De Silva and Klein, 2015). Il a été démontré que les LB, dont le BCR possède une forte affinité pour l'antigène, se dirigent préférentiellement vers une réponse extra-folliculaire. Inversement, les LB ayant un BCR de plus faible affinité sont principalement dirigés vers les CG où ils subissent une maturation (Paus et al., 2006).

Au sein du CG, l'IL-21 et les signaux de co-stimulation dérivés des Tfh contribuent à la génération et à la différenciation des LB de haute affinité pour l'antigène (Haberman et al., 2019) (Figures 25 et 27). Les CG sont scindés en deux grandes zones, la zone sombre

-88-

où la population de LB est très dense et se divise rapidement et la zone claire (Allen et al., 2004). Les LB proliférant dans la zone sombre sont appelés centroblastes et subissent le processus d'hypermutation somatique sous le contrôle de l'enzyme AID (Activationinduced cytidine deaminase). L'expression de l'AID introduit des mutations ponctuelles aléatoires dans les gènes codants pour le BCR pour augmenter son affinité pour l'antigène (Muramatsu et al., 2000). Les LB migrent ensuite en zone claire et sont appelés centrocytes. Les BCR modifiés sont contrôlés par les Tfh et par les cellules dendritiques folliculaires (DCF) afin d'éliminer au plus vite les LB présentant un BCR devenu autoréactif, déficient ou tout simplement insuffisamment affin pour l'antigène (Anderson et al., 2009). En effet, l'antigène est retenu en quantité limitante sous forme de complexes immuns par le récepteur C3d et le CD35 à la surface de DCF, seules les LB ayant des BCR de forte affinité pourront capter l'antigène et ainsi interagir avec les Tfh (Papa and Vinuesa, 2018). De plus, les LB du CG présentent une très forte expression du récepteur pro-apoptotique Fas associée à une faible expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Martinez-Valdez et al., 1996). Seuls les signaux fournis par les DCF et les Tfh permettent leur survie, les LB incapables de recevoir ces signaux meurent par apoptose (Manser, 2004). Ce processus de compétition aboutit à la génération de clones B mutants ayant une forte affinité pour l'antigène. Un sous-ensemble de ces centrocytes va subir une commutation isotypique (class-switch recombination) également sous le contrôle de l'enzyme AID. Il permet de remplacer de manière irréversible les IgM et les IgD par des IgA, des IgG ou des IgE afin de générer des Ac dotés de fonctions effectrices spécialisées. Les LB naïfs ont le potentiel pour basculer vers n'importe quel isotype et les cytokines sécrétées par les LT influencent la commutation isotypique (Stavnezer et al., 2008). Le processus de sélection et de maturation des LB est constitué de plusieurs cycles, où les LB re-circulent de la zone sombre à la zone claire jusqu'à l'obtention d'un BCR suffisamment affin pour l'antigène (Victora et al., 2010). Au stade final, les LB sélectionnés de haute affinité et commutés de type IgG, IgA ou IgE vont quitter le CG. Ils vont alors se différencier en LB mémoires ou en plasmablastes puis en plasmocytes qui migreront dans la moelle oseuse ou dans les muqueuses afin de produire une grande quantité d'IgG, d'IgA ou d'IgE. Certains plasmocytes deviendront des plasmocytes à longue durée de vie, permettant ainsi le maintien d'un titre élevé d'Ac sérique pendant de longues années (Radbruch et al., 2006). Les LB mémoires sont des cellules quiescentes à longue durée de vie rapidement mobilisables lors d'une seconde rencontre avec l'antigène (Kurosaki et al., 2015).



Figure 27 : Réponse des lymphocytes B à des antigènes T dépendants

Représentation schématique de la réponse B à des antigènes T dépendants. Les cellules dendritiques migrent dans les ganglions lymphatiques drainants vers la zone des lymphocytes T (LT) (zone T). Elles présentent les complexes peptide –CMH de classe II aux LT CD4+ naïfs spécifiques de l'antigène et induisent leurs proliférations et leurs différenciations en LT heper (Th). Dans la zone des lymphocytes B (LB) (zone folliculaire B), les LB spécifiques de l'antigène sont activés et migrent vers la frontière des zones T-B pour présenter les peptides antigéniques. L'interaction entre les LB et les LT permet de recevoir les signaux auxiliaires apparentés. Les LB et les lymphocytes T folliculaires (Tfh) différenciés migrent ensuite vers les follicules externes, où les LB vont proliférer (a). Certains de ces LB, en proliférant, vont se différencier en plasmocytes à courte durée de vie (b) donnant naissance aux foyers extra-folliculaires ; d'autres vont se spécialiser en LB mémoire (c) indépendants du centre germinatif (CG). Mais certains LB et Tfh vont former le CG. Au sein de la zone sombre du CG, l'expansion clonale des LB spécifiques de l'antigène s'accompagne d'une diversification du récepteur des LB (BCR) par l'hypermutation somatique (d). Le processus d'hypermutation somatique introduit des modifications de paires de bases dans les gènes de la région variable V(D)J des immunoglobulines (Ig). Certaines de ces mutations entraînent une modification de la séguence d'acides aminés. Les LB en fin de division cellulaire migrent vers la zone claire, où ils sont sélectionnés selon l'affinité du BCR par l'interaction avec les cellules dendritiques folliculaires et les Tfh spécifiques de l'antigène. Les LB qui perdent la capacité de se lier à l'antigène présenté subissent une apoptose. Les LB qui expriment un variant de BCR avec une plus grande affinité peuvent subir une commutation isotypique de l'Ig et se différencier soit en tant que LB mémoire dépendant du CG (e) soit en tant que plasmocytes à longue durée de vie (f) qui contribuent à la mémoire sérologique. Certains LB commutent et réintégrent le cycle du CG. La circulation entre la zone sombre et la zone claire facilite plusieurs cycles itératifs de mutation et de sélection et conduit rapidement à la génération de LB mémoires de haute affinité et de plasmocytes à longue durée de vie (Kurosaki et al., 2015).

► LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B

Dans le sang périphérique, quatre sous-populations principales de LB sont caractérisables par une approche de cytométrie en flux via l'expression des Ig de surface (IgM, IgD, IgG, IgA) associée aux co-marqueurs (Maecker et al., 2012). Ces souspopulations de LB comprennent les LB immatures appelés transitionnels (CD19+CD20+ CD24^{fort} CD38^{fort} IgM⁺ IgD^{+/-}), les LB matures naïfs (CD19⁺ CD20⁺ CD24^{int} CD38^{int}), les LB mémoires ou zone marginal (CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺) et les cellules plasmocytaires (CD19⁺ CD20⁻) (Bouaziz et al., 2014). Dans la population générale, les LB naïfs constituent la population principale avec 60 à 70% des LB alors que les LB mémoires ne représentent que 20 à 30% et les LB transitionnels entre 5 à 10% des LB totaux. Les cellules plasmocytaires ne sont détectées qu'a une très faible fréquence (>2%) et correspondent généralement à des plasmablastes récemment générés migrant vers la moelle osseuse ou les muqueuses (Morbach et al., 2010). Les plasmocytes exprimant la molécule d'adhésion CD138 sont principalement localisés dans la moelle osseuse (McCarron et al., 2017; Mei et al., 2009)(Mei et al., 2009). La représentation majoritaire des LB naïfs dans le sang s'explique par leur mobilité dans l'attente d'une rencontre antigénique, alors que la plupart des LB mémoires résident dans les organes lymphoïdes secondaires ou aux sites de drainage de l'antigène (Tangye and Tarlinton, 2009). Les LB mémoires et les plasmocytes sont les deux constituants principaux de la mémoire immunitaire B. L'affinité du BCR pour l'antigène serait à l'origine de leur différenciation. Une affinité élevée prédisposerait les LB activés à se différencier en cellules plasmocytaires, alors qu'une affinité plus faible orienterait vers un phénotype mémoire (Paus et al., 2006).

• Les lymphocytes B memoires

Les LB mémoires sont des cellules à très longue durée de vie exprimant majoritairement le marqueur de surface CD27 même si une petite fraction de LB mémoires CD27⁻ a été identifiée. L'interaction de CD27 avec son ligand CD70 sur le LT favorise la différenciation rapide des LB mémoires activés en plasmocytes (Agematsu et al., 1998; Jacquot et al., 1997). La caractérisation des Ig de surface et de CD27 a permis de mieux distinguer l'origine et la fonction des sous-ensembles de LB mémoires (Sanz et al., 2008). Ils peuvent être séparés en 3 catégories : i) les LB CD27⁺ n'ayant pas réalisé de commutation isotypique exprimant l'IgM et habituellement l'IgD (IgD⁺ CD27⁺) principalement issu de la zone marginale, contribuant à la protection contre les antigènes T-indépendants (Weller et al., 2004) ; ii) les LB mémoires ayant réalisé leur commutation

isotypique (IgD⁻ CD27⁺) pouvant exprimer l'IgG, l'IgA ou l'IgE ; iii) les LB mémoires minoritaires dits « double négatifs » n'exprimant ni l'IgD ni le CD27 (Fecteau et al., 2006). La caractéristique principale des LB mémoires est leur capacité à réagir rapidement après une nouvelle exposition à l'antigène. Les LB mémoires ont la capacité de se différencier in vitro en ASC sous l'effet d'une stimulation polyclonale indépendante de l'antigène qui peut combiner des agonistes des TLR, des cytokines et/ou un signal CD40L. Basé sur cette propriété, les LB mémoires spécifiques d'un antigène peuvent être détectés et dénombrés dans le sang par ELISPOT (Walsh et al., 2013). Cette technique permet de révéler la fixation de l'Ac spécifique d'antigène sous la forme de « spots » correspondant à la présence d'un plasmablaste. La fréquence des LB mémoires spécifiques d'un antigène est ainsi déterminée en faisant le rapport du nombre de spots spécifiques avec le nombre de spots correspondant aux IgG totales déterminé en parallèle. Cette technique est utilisée notamment dans les études sur la réponse vaccinales (Jahnmatz et al., 2013) ou dans l'analyse de l'alloréactivitée HLA (Karahan et al., 2015, 2017). Elle est reconnue comme étant la technique la plus fiable de quantification du fait de la faible fréquence des LB spécifiques d'antigène. Néanmoins, les LB spécifiques peuvent être également caractérisés par cytométrie en flux grâce à la reconnaissance directe du BCR pour l'antigène (Odendahl et al., 2005)

Différents modèles murins ont permis de mieux caractériser la réponse mémoire humorale. De par leur localisation stratégique au sein des tissus drainants, les LB mémoires constituent la population principale de CPA (Aiba et al., 2010). Le contact spécifique des LT en particulier des Tfh mémoires est une exigence stricte pour la réactivation des LB mémoires (MacLeod et al., 2011). Ce contact spécifique induit une expansion clonale accélérée des LB et des Tfh mémoires ainsi que la différenciation en plasmocytes de haute affinité (Ettinger et al., 2007). Les LB mémoires peuvent également recommencer de nouveaux cycles d'hypermutation et de sélection dans les CG, permettant d'élargir le répertoire B et ainsi d'optimiser la mémoire immunitaire. Il a été démontré que les LB mémoires IgG se différencient généralement en plasmocytes alors que les LB mémoires IgM vont plutôt s'orienter vers une sélection au sein d'un CG (Taylor et al., 2012). Une étude récente a démontré que la perte des Tfh mémoires inhibait la réactivation des LB mémoires et leur différenciation en plasmocytes (Ise et al., 2014). Chez l'homme, une étude originale sur la réponse vaccinale confirme l'implication des Tfh mémoires dans la réponse des LB mémoires. L'analyse de la réponse antigrippale

-92-

rapporte l'émergence, sept jours après vaccination, d'une population transitoire d'ASC dérivée des LB mémoires dans le sang périphérique et d'une population de cTfh activée en corrélation avec l'élévation des titres d'Ac. Après quatorze jours, les LB spécifiques de la grippe apparaissent dans le sang présentant principalement un phénotype mémoires CD27⁺ IgG⁺. Cependant un an après la vaccination, ces cellules ne sont plus retrouvées dans le sang périphérique. L'étude démontre que ces LB mémoires spécifiques de la grippe sont préférentiellement localisés dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans les tissus périphériques (Koutsakos et al., 2018).

• LES CELLULES PLASMOCYTAIRES

La mémoire humorale repose sur la production d'Ac par le compartiment plasmocytaire. Le temps de demi-vie des Ig étant limité entre 2 et 3 semaines, la persistance de l'immunité humorale dépend des mécanismes contrôlant la production, la survie et l'homéostasie des cellules plasmocytaires constituées de cellules à courte et à longue durées de vie. Les plasmablastes générés immédiatement après la rencontre antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires vont migrer via la circulation sanguine dans des niches spécialisées de la moelle osseuse (Odendahl et al., 2005). Le microenvironnement médullaire, via des interactions étroites avec les cellules plasmocytaires, fournit des signaux de survie et de différenciation essentiels pour générer des plasmocytes à longue durée de vie (Ise and Kurosaki, 2019; Kurosaki et al., 2015). Parmi les nombreuses molécules intervenant dans cette fonction, le CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) également appelé SDF1 (stromal cell-derived factor 1) et son récepteur CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) contrôlent la migration vers la moelle osseuse ; l'IL-6 (Cassese et al., 2003) et les membres de la famille du TNF tels que BAFF et APRIL (A proliferation inducing ligand) produits par les cellules stromales jouent un rôle important dans la survie et le maintien des titres d'Ac (Khodadadi et al., 2019). Outre l'importance de ces facteurs extrinsèques, il a également été démontré que la différenciation d'un LB en un plasmocyte à longue durée de vie pourrait être contrôlé par une programmation intrinsèque initiée dans le CG lors de l'interaction CD40/CD40L entre le LB et le Tfh ainsi que par la sécrétion d'IL-21 (Kuchen et al., 2007; Zotos et al., 2010). Les facteurs de transcription les plus importants guidant le programme de développement des plasmocytes sont Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein* 1), IFR4 (Interferon regulatory factor 4), XBP-1 (X-box-binding protein 1) et plus récemment identifié, le facteur ZBTB20 (Zinc finger and BTB domain containing 20) (Nutt

et al., 2011, 2015). La moelle osseuse est la principale niche des plasmocytes mais, en cas d'inflammation chronique, une infiltration de plasmocytes peut être détectée dans des tissus (Hiepe et al., 2011). Peu de choses sont actuellement connues sur la façon dont ces plasmocytes sont maintenus dans les tissus inflammés.

• Les LB dans le pemphigus

Dans le pemphigus, l'analyse des cellules infiltrant les lésions dans le derme des patients atteints de pemphigus souligne la présence tissulaire de LB, de cellules plasmocytaires exprimant CD138 associées à des LT CD4+ sécréteurs d'IL-21(Yuan et al., 2017). Yuan a démontré par ELISPOT que ces LB sont des ASC capables de secréter directement des IgG spécifiques des Dsg. Dans le sang de patients atteints de pemphigus, la présence de LB mémoires anti-Dsg capables de se différencier en ASC a été établie par ELISPOT après stimulation antigénique spécifique in vitro (Nishifuji et al., 2000). Chez les patients les plus graves, des ASC anti-Dsg3 peuvent être directement détectés à des fréquences comprises entre 1,3 et 2,3 ASC anti-Dsg3 pour 10⁵ PBMC. L'analyse des souris immunisées avec la Dsg3 recombinante a démontré que la fréquence des ASC anti-Dsg3 est plus élevée dans la rate et la moelle osseuse que dans les ganglions lymphatiques ou le sang. En se basant sur ces observations, les LB mémoires spécifiques des Dsg présents dans la circulation ne représenteraient qu'une petite faction des LB auto-réactifs. Lors de la phase active de la maladie, une partie des LB anti-Dsg activés semble être libérée en périphérie en plus du pool mémoire. Ainsi, la fréquence des ASC anti-Dsg dans le sang peut refléter, dans une certaine mesure, l'activité de la maladie.

Au cours de cette décennie, l'étude des sous-populations de LB a été affinée grâce à l'analyse des effets du traitement par RTX chez des patients atteints de pemphigus (Joly et al., 2007). La molécule cible, le CD20, est uniquement exprimée sur les LB, qui vont donc être éliminés après la perfusion de RTX. Cependant, le CD20 n'est pas exprimé sur les progéniteurs des LB ni sur les plasmocytes, permettant ainsi la reconstitution lymphocytaire B et le maintien de la protection humorale plasmocytaire (Riley and Sliwkowski, 2000). Notre équipe a démontré que le RTX entraîne une déplétion totale des LB dans le sang des patients atteints de pemphigus sur une période moyenne de 6 à 9 mois. Cette déplétion s'accompagne d'une diminution drastique des taux d'IgG anti-Dsg alors que les réponses anti-infectieuses sont persistantes. Ces dernières ont en effet été évaluées par un niveau soutenu d'Ac anti-toxine tétanique et d'Ac anti-polysaccharide capsulaire du pneumocoque. Le dosage des IgG et IgM totales dans les sérums des patients

a montré une diminution des taux d'IgM uniquement (Colliou et al., 2013; Mouquet et al., 2008). Cette diminution spécifique s'explique, en partie, parce que les IgM sont principalement produites par les plasmablastes et les plasmocytes à courte durée de vie, alors que les IgG seraient plutôt produites par des plasmocytes à longue durée de vie (Manz et al., 2004). Dès lors, l'effet du RTX sur le taux des IgG anti-Dsg est particulièrement intéressant, car il indique que les IgG anti-Dsg sont vraisemblablement produits par des cellules plasmocytaires à courte durée de vie qui sont continuellement réapprovisionnées à partir du pool de LB mémoires. En effet, si les plasmocytes à longue durée de vie étaient à l'origine des IgG anti-Dsg, les rémissions sérologiques après traitement par RTX n'auraient pas été observées (Ellebrecht and Payne, 2017). Le rôle du réservoir de LB mémoire semble particulièrement important dans la physiopathologie du pemphigus. Le retour des LB après le traitement par RTX est caractérisé par la présence de LB naïfs, présentant transitoirement un phénotype transitionnel (CD19+CD24fortCD38fort). Le ratio LB naïfs/LB mémoires est modifié et ceci, de manière prolongé, aboutissant à une modification profonde du répertoire lymphocytaire B (Colliou et al., 2013). Notre équipe a étudié la fréquence des LB circulants spécifiques de la Dsg1 et de la Dsg3 par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de protéines recombinantes ainsi que l'expression de leurs Ig de surface (IgM, IgG). Des LB IgG⁺ et IgM⁺ anti-Dsg ont été mis en évidence chez les patients atteints de pemphigus a une fréquence moyenne de 48±20 LB auto-réactifs pour 10⁶ PBMC (Colliou et al., 2013). Chez les patients en rémission complète après RTX, nous observons une disparition presque complète des LB IgG⁺ anti-Dsg circulant corrélée à une diminution du taux d'IgG anti-Dsg alors que les LB IgM⁺ spécifiques des Dsg sont toujours détectables. Sur le long terme, l'effet bénéfique du traitement par RTX semble être associé à un blocage de la maturation des LB et du processus de commutation isotypique d'IgM à IgG. Nous avons également mis en évidence chez les patients en rémission complète que la population résurgente de LB transitionnels est sécrétrice d'IL-10. Elle pourrait jouer un rôle dans l'effet immunosuppresseur du RTX. Cette propriété sera plus détaillée dans le sous-paragraphe intitulé : les lymphocytes B régulateurs. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier l'ensemble des mécanismes pouvant influencer ou bloquer la maturation des LB.

Dernièrement, l'existence d'un sous ensemble distinct de LB présentant une forte expression de CD19 a été décrite dans le pemphigus (Liu et al., 2017). Cette souspopulation CD19^{fort} a été précédemment caractérisée dans le lupus érythémateux systémique (Culton et al., 2007; Nicholas et al., 2008). Il semblerait que l'altération de l'expression du CD19 puisse modifier l'équilibre entre tolérance et immunité, conduisant à l'auto-immunité. Le CD19 est un co-récepteur du BCR qui régule positivement la signalisation du BCR en formant un complexe protéique avec le CD21 et le CD81 (Tedder et al., 1994). Ainsi, la surexpression du CD19 et d'autres molécules co-stimulatrices telles que CD40, ICOSL, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1/CD54) et OX40L (OX-40 *Ligand/CD252*) observée dans cette sous-population CD19^{fort} pourrait les rendre plus sensibles aux stimuli, tout en renforçant leur capacité à produire des IgG et des IgM. Cette population est enrichie en LB mémoires CD27+ et surexprime les récepteurs CXCR5 et CXCR3. L'analyse transcriptomique a révélé que les gènes impliqués dans l'activation et la différenciation des LB étaient surexprimés suggérant que les LB CD19^{fort} sont à un stade précoce dans la différenciation plasmocytaire. Dans le lupus érythémateux systémique, il a été démontré par ELISPOT que cette population CD19^{fort} est enrichie en LB auto-réactifs anti-Smith corrélé au titre des auto-Ac (Nicholas et al., 2008). Dans le pemphigus, le lien entre les LB anti-Dsg et ce sous-ensemble de LB CD19^{fort} n'est pas encore établit mais un seuil d'activation plus bas pourrait expliquer une activation chronique des LB anti-Dsg et leur différenciation en cellules plasmocytaires productrices d'auto-Ac.

➢ L'HOMEOSTASIE DES LYMPHOCYTES B

Tout au long de leur développement, les LB sont soumis à des sélections positives et négatives pour assurer l'établissement d'un répertoire lymphocytaire B tolérant au soi. L'intensité de l'engagement du BCR est un facteur important dans la sélection négative des LB conduisant à l'apoptose, à la réédition du BCR ou à l'anergie. En revanche, la sélection positive liée à la survie et/ou à l'expansion clonale de LB se produit principalement en périphérie. Elle est influencée par une interaction complexe entre la signalisation du BCR et les signaux de survie comprenant la signalisation des TLR et/ou du CD40 ainsi que les voies de signalisation des facteurs de survie BAFF et APRIL. De ce fait, une signalisation adéquate des corécepteurs peut conférer à certains clones B un avantage sélectif (Rawlings et al., 2017). Dans de nombreuses MAI, ces mécanismes peuvent permettre aux clones B auto-réactifs de pénétrer dans le pool des LB matures. La survie et l'homéostasie des LB sont finement régulées aux différents stades de leur développement par BAFF et APRIL (Vincent et al., 2013). Ces deux ligands sont des protéines transmembranaires de la famille du TNF qui peuvent être clivées par protéolyse pour produire des formes solubles. Ils sont produits par des cellules myéloïdes, telles que les DC, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages mais également par les DCF ou les cellules du stroma (Nardelli et al., 2001). BAFF peut se lier à trois récepteurs distincts BAFF-R, TACI (*Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilinligand interactor*/CD267) et BCMA (*B cell maturation antigen*/CD269) exprimés par les LB, alors que APRIL ne se lie qu'au TACI et au BCMA (Rickert et al., 2011). Ces trois récepteurs BAFF-R, TACI et BCMA, ont des profils d'expression distincts sur les LB au cours de leur développement. Le BAFF-R est essentiel à la fois pour la survie et la maturation des LB immatures (Rowland et al., 2010) et soutient la commutation isotypique dans les CG (Castigli et al., 2005). Le TACI est essentiel pour les réponses des LB aux antigènes T indépendants (Figgett et al., 2013), pour la régulation de l'expansion des LB (Seshasayee et al., 2003) et pour la commutation isotypique en particulier vers l'isotype IgA (Zhang et al., 2015). Le BCMA fournit les signaux essentiels à la survie des plasmablastes et des plasmocytes (O'Connor et al., 2004).

Dans de nombreuses MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Zhang et al., 2001), la polyarthrite rhumatoïde (Cheema et al., 2001), le syndrome de Sjögren (Groom et al., 2002) ou encore la PB (Asashima et al., 2006), le taux de BAFF est élevé dans le sérum des patients. Celui-ci peut être corrélé avec les titres des auto-Ac. Ces études suggèrent que BAFF joue un rôle essentiel dans l'induction de la MAI en favorisant la survie des LB auto-réactifs. Les données actuelles sur le pemphigus n'ont pas mis en évidence de différence entre les taux de BAFF chez les patients atteints de PV et chez les témoins (Asashima et al., 2006). Cependant dans le contexte génétique du pemphigus précédemment présenté, l'interaction épistatique entre certains allèles des gènes codant pour *CD40, BAFF* et *CD40L* observée chez les patients atteints de PF (Malheiros and Petzl-Erler, 2009) pourrait moduler les seuils de signalisations homéostatiques. Ainsi, la présence de LB anti-Dsg pourrait résulter d'une sélection négative réduite et/ou d'une sélection positive plus importante conduisant à un répertoire naïf orienté vers l'auto-réactivité.

► LE REPERTOIRE ANTIGENIQUE ET ISOTYPIQUE

La génération du répertoire antigénique B diversifié et spécifique dépend donc de trois principaux mécanismes qui se produisent au cours des deux phases distinctes du développement des LB.

-97-

• LA RECOMBINAISON SOMATIQUE VDJ

La recombinaison somatique des gènes VDJ codant pour les chaines lourdes et légères de l'Ig a lieu au cours du développement des LB dans la moelle osseuse (Tonegawa, 1983). Les différents loci des Ig nécessitent des réarrangements géniques pour donner lieu à des gènes fonctionnels à l'aide des enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 (Figures 26 et 28). Elles génèrent des cassures dans l'ADN double brin ciblées aux niveaux des séquences signals de recombinaison (SSR) qui bordent les segments V(D)J (Dudley et al., 2005). Le système de réparation entraine la juxtaposition et la jonction d'un segment V, à un D et un J (V et J pour les chaînes légères) afin de former un domaine variable spécifique. Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont éliminées sous forme d'un ADN circulaire (épisome) (Schroeder and Cavacini, 2010). Les réarrangements des gènes des Ig s'effectuent dans un ordre séquentiel, avec le réarrangement des chaînes lourdes en premier, suivi par le réarrangement des chaînes légères. Les réarrangements génèrent une grande diversité, grâce à un grand nombre de combinaisons possibles entre les différents segments V(D)J (supérieure à 10⁹), mais aussi grâce à différents mécanismes moléculaires qui introduisent un degré supérieur de diversité par des mutations ponctuelles, des insertions et des délétions de nucléotides dans les zones de jonction des segments des gènes réarrangés (Desiderio et al., 1984). A la fin de la recombinaison, si le réarrangement V(D)J conduit à une Ig non fonctionnelle ou ayant une affinité potentielle pour des auto-antigènes, le LB peut subir une réédition du BCR. Il s'agit d'une recombinaison supplémentaire du gène de la chaîne légère afin de générer une Ig fonctionnelle non auto-réactive (Mostoslavsky et al., 2004; Nemazee, 2017; Radic et al., 1993). L'assemblage productif des chaînes lourdes (H) et légères (L) permet l'expression d'une IgM à la membrane des LB nouvellement générés. Après des différenciations supplémentaires et l'expression de l'IgD, les LB émergeants migrent vers des organes lymphoïdes secondaires, où ils initient la phase du développement dépendante de l'antigène.



Figure 28 : Mécanismes impliqués dans la génération du répertoire lymphocytaire B Représentation schématique de la recombinaison VDJ de la chaine lourde de l'immunoglobuline (Ig) et du processus de commutation isotypique. Au cours du développement des lymphocytes B (LB) dans la moelle osseuse, la région variable de la chaîne lourde (VH) de l'immunoglobuline est assemblée à partir des régions variable (VH), diversité (DH) et de jonction (JH) des segments de gène de l'Ig par la recombinaison V(D)]. Le processus de réarrangement implique le clivage des séquences de signal de recombinaison (SSR) dans l'ADN, encadrant les segments des gènes réarrangés, qui est effectué par le complexe RAG1–RAG2 (Recombination activating gene 1-2) (A). L'activation antigénique du LB conduit à la formation d'un centre germinatif et à l'activation enzymatique d'AID (Activationinduced cytidine deaminase). L'AID introduit des mutations dans la région V de la chaîne lourde (VH) et de la chaine légère (VL) de l'immunoglobuline (Ig). Ce processus d'hypermutation somatique diversifie davantage le répertoire des Ig et augmente leur affinité (non représenté). L'AID intervint également dans la commutation isotypique en remplaçant la région constante μ par la région constante d'une autre Ig pour générer des IgA, des IgG ou des IgE. Le processus implique la génération d'une cassure d'ADN double brin au niveau des régions de commutation (S), qui précèdent les gènes de la région constante, suivies de la réparation de l'ADN. Cela conduit à un réarrangement du locus CH et à la suppression de la séquence intermédiaire sous la forme d'un épisome. Exemple d'une commutation d'une IgM vers une IgA1 (B) (d'après Chaudhuri and Alt, 2004b; Xu et al., 2012b).

• L'HYPERMUTATION SOMATIQUE

L'hypermutation somatique est un processus qui consiste à modifier, par des mutations, les locus de la région variable réarrangée de l'Ig pour générer un répertoire B diversifié de haute l'affinité (Papavasiliou and Schatz, 2002). Ce processus se produit majoritairement dans la zone sombre du CG où les centroblastes expriment fortement l'enzyme AID (Muramatsu et al., 2000). Cette enzyme catalyse le processus en désaminant les cytidines en uracile conduisant à des cassures de l'ADN double brin (Muramatsu et al., 2000). Ces modifications sont retrouvées majoritairement au sein des motifs WRCY (W = A ou T, R = A ou G, et Y = C ou T) qui sont qualifiés de « points chauds » de mutation, situés principalement dans les régions hypervariables des CDR (complementarity-determining regions) (Rogozin and Diaz, 2004). La réparation de l'ADN fait intervenir les voies des enzymes de l'UNG (Uracil DNA Glycosylase) et de l'APE (Apuric-Apyrmidic Endonuclease) du BER (Base Excision Repair), les protéines du MMR (Mismatch Repair) ainsi que les ADN polymérases réplicatives ou translésionnelles (Hwang et al., 2015). La réparation mutagène des mésappariements U : G entraîne l'introduction de mutations ponctuelles ou plus rarement des insertions et des délétions avec un taux d'environ 10⁻³ changements par paire de bases par cycle cellulaire, ce qui est environ un million de fois supérieur au taux de mutation somatique spontané (Schroeder and Cavacini, 2010). A l'issue de ce processus, les LB ayant augmenté l'affinité de leur BCR pour l'antigène sont sélectionnés positivement par les DCF et les Tfh dans la zone claire du CG.

• LA COMMUTATION ISOTYPIQUE

La commutation isotypique correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN permettant de changer d'isotype (IgM ou IgD en IgG, IgA ou IgE) afin de produire des Ac de même spécificité épitopique mais aux propriétés effectrices diversifiées. Il peut se produire à l'intérieur ou à l'extérieur des CG. Ce processus nécessite l'excision des séquences d'ADN situées entre le gène J et le gène codant pour une chaîne lourde qui impliquent un passage (*switch*) des exons Cµ (IgM) avec des exons en aval tels que C γ , C α ou C ϵ (Chaudhuri and Alt, 2004b; Stavnezer et al., 2008) (Figure 28). La commutation isotypique implique la génération d'une cassure de l'ADN double brin par l'enzyme AID au niveau des régions de commutation S (région *switch*), qui précèdent les gènes de la région constante en amont « donneur » et en aval « accepteur », suivie de la réparation de l'ADN utilisant les activités des voies du BER et du MMR (Hwang et al., 2015). Ce processus conduit à un réarrangement du locus CH et à la suppression de la séquence

intermédiaire sous la forme d'un épisome. L'induction de la commutation isotypique nécessite des stimuli « primaires » qu'ils soient dépendants ou indépendants des LT et des stimuli « secondaires ». Les stimuli primaires, tels que l'interaction du CD40 au CD40L exprimé sur des LT activés et/ou l'engagement du BCR et/ou des voies de signalisation de TLR, induisent la commutation isotypique par l'expression de l'AID et d'autres facteurs de transcription entrainant des modifications épigénétiques dans les régions S (Zan and Casali, 2015). En synergie avec les stimuli primaires, une combinaison spécifique de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 l'IL-10, l'IL-13, l'IL-21, l'INF- γ et/ou le TGF- β (Defrance et al., 1992; Gascan et al., 1991; Pène et al., 2004; Punnonen et al., 1993; Zan et al., 1998) et de signaux co-stimulateurs tels que TACI et BAFF-R (Castigli et al., 2005; Litinskiy et al., 2002) détermine l'isotype vers lequel les LB vont s'orienter. En effet, des promoteurs de transcription situés en amont de chaque région S « accepteur » sont activés sélectivement en présence de certaines cytokines. La transcription de ces régions S dites « germinales » produit un transcrit non codant qui semble avoir pour fonction le recrutement de l'AID vers une région S spécifique afin de diriger le passage aux IgG, IgA et/ou IgE (Xu et al., 2012b).

Les voies de la commutation isotypique menant aux IgG4 présentent un intérêt fondamental pour la pathogenèse du pemphigus. Les études *in vitro* sur les LB ont suggéré l'implication de l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et/ou du TGF- β dans la commutation vers l'IgG4. (Gascan et al., 1991; Jeannin et al., 1998; Pène et al., 2004; Punnonen et al., 1993; Tsuboi et al., 2012). Ces observations sont en concordance avec la réponse de type Th2 privilégiée dans le pemphigus (Gebhard et al., 2005; Veldman et al., 2003). Récemment, l'étude des Tfh dans la maladie liée aux IgG4 a souligné le rôle des Tfh2 sécréteurs d'IL-4 et d'IL-21 dans la commutation et la production d'IgG4 (Akiyama et al., 2015, 2016).

• LE REPERTOIRE B ANTI-DESMOGLEINE

La caractérisation d'un répertoire B est actuellement basée sur la détermination des fréquences d'utilisation de certains segments des gènes VDJ, l'analyse des mutations, l'étude de l'idiotype en particulier du CDR3, l'identification des isotypes ainsi que l'étude de la relation clonale et l'analyse du lignage (Chaudhary and Wesemann, 2018). Pour mieux comprendre la physiopathologie des Ac anti-Dsg, les chercheurs ont cloné les répertoires B anti-Dsg de patients atteints de PV et de PF par la méthode des « *phage display* » (Payne et al., 2005), par la transformation par l'EBV (Zenzo et al., 2012) ou par la génération d'hétérohybridomes (Qian et al., 2007). En parallèle, l'analyse génétique de

ces répertoires a permis de mieux comprendre la manière dont les clones B anti-Dsg se développent et se diversifient en sous-clones.

Le répertoire VH des Ig se compose d'environ 50 segments de gènes fonctionnels, qui sont divisés en 7 familles de gènes (VH1-VH7). Des biais dans l'utilisation de segments de gènes d'Ig sont observés dans divers contextes d'infection et d'auto-immunité (Adderson et al., 1991) suggérant que des antigènes particuliers induisent des réponses immunitaires stéréotypées. Dans le pemphigus, l'analyse génétique a montré que les Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 utilisent préférentiellement certains gènes V pour la chaîne lourde (VH) et plus particulièrement ceux des familles VH1 et VH3 pour le PF et VH1, VH3 et VH4 pour le PV (Ishii et al., 2008; Payne et al., 2005). La majorité des clones B IgG et IgM présentent des profils de mutation somatique compatibles avec un processus d'augmentation d'affinité dirigé par un antigène (Qian et al., 2007). Identifiés chez des patients non apparentés, certains clones B utilisant le gène VH1-46 présentent peu de mutations somatiques, voire aucune mutation pour acquérir une auto-réactivité vis-à-vis de la Dsg3 (Cho et al., 2014). Il a donc été proposé que ces clones B anti-Dsg3 portant le gène VH1-46 apparaissent naturellement. Ils peuvent survivre et échapper à la délétion ou à l'anergie, car la Dsg3 n'est pas exprimée de manière centrale dans la moelle osseuse, son expression est limitée à la périphérie aux épithéliums stratifiés, de sorte que les LB ne rencontrent probablement pas suffisamment d'antigène de la Dsg3 pour subir une délétion clonale (Cho et al., 2016). Ces clones pourraient être importants au début du développement de l'auto-immunité du pemphigus. Il est intéressant de noter que l'utilisation du gène VH1-46 a également été observée dans la réponse immunitaire à l'infection par le Rotavirus (Cho et al., 2016). La réactivité croisée avec un virus ou l'antigène LJM11 de glande salivaire de mouche de sable dans le Fogo Selvagem ont souvent été suggéré pour initier l'activation des LB anti-Dsg (Qian et al., 2016).

Notre équipe a étudié la distribution des longueurs du CDR3 chez des patients atteints de pemphigus par immunoscope et a révélé une expansion clonale B en phase active de la maladie dans les familles VH3 et/ou VH4 (Mouquet et al., 2008b). Après leur première prise de RTX, les patients en rémission complète présentent un répertoire B normal de type gaussien. En phase active de la maladie, l'analyse des séquences des CDR3 a démontré la présence de séquences hautement récurrentes. Yamagami et al ont identifiés un motif consensus D/EXXXW dans lequel un acide aminé acide, soit un acide aspartique (E), est situé 4 acides aminés en amont d'un tryptophane (W)

dans le CDR3 de la chaîne lourde des LB produisant des Ac pathogènes anti-Dsg3 et anti-Dsg1. Ce motif est partagé par des patients atteints de PV et de PF et par le clone AK23 issu du modèle murin de PV. La présence du trytophane semble critique pour la pathogénicité de l'Ac (Yamagami et al., 2010).

Récemment, le criblage à haut débit des LB anti-Dsg chez les patients atteints de PV a confirmé la prédominance des lignées IgG4, suivie par des IgA1, IgG1 et IgA2. L'analyse phylogénétique de ces clones B anti-Dsg a montré que la plupart des clones B anti-Dsg de type IgG4 n'ont pas de relation clonale avec les autres sous-classes IgA1, IgG1 et IgA2. Les IgG1 évoluent vers des IgA1 puis vers des IgA2 mais ne sont pas à l'origine des IgG4. Les clones d'IgA réagissent avec les cinq domaines EC des Dsg, tandis que les IgG4 reconnaissent préférentiellement l'EC1. L'analyse de la propagation épitopique indique que cette dernière se produit rarement entre les domaines EC lors de la diversification par hypermutation somatique ou par commutation de classe. De plus, les lignées IgG4 anti-Dsg qu'elles soient issues des lignées germinales VH1–46 ou des VH2–5, 2–26, 3–9, 3–23, 3–30 et 3–49 semblent avoir développé une auto-réactivité à un stade précoce de leur évolution. Ainsi, malgré la coexistence d'auto-Ac IgG1 et IgG4 dans les sérums des patients atteints de pemphigus, la commutation de classe d'IgG1 n'est pas une voie dominante pour la production d'IgG4. Il s'agit vraisemblablement d'un développement indépendant à partir d'un précurseur communou divergent (Ellebrecht et al., 2018).

Ces observations confortent l'hypothèse d'un répertoire B naïf naturellement orienté vers l'auto-réactivité créant par recombinaison V(D)J à des fréquences rares des IgM anti-Dsg non pathogènes, comme les LB VH1-46. De même, il existe naturellement un répertoire B anti-Dsg1 non pathogène chez des individus sains comme le montre le criblage d'une banque de *phage display* (Cho et al., 2016; Yamagami et al., 2009) ainsi que la détection d'Ac sérique anti-Dsg à faible titre (Kricheli et al., 2000). Cela corrobore nos observations sur l'effet à long terme du RTX sur la diminution du nombre de LB IgG anti-Dsg mais pas celui des IgM chez les patients en rémission complète par rapport à des patients ayant un pemphigus récemment diagnostiqué (Colliou et al., 2013).

La présence de clones auto-réactifs IgM ne semble donc pas être suffisante pour induire l'auto-immunité morbide. Par conséquent, des signaux immunitaires supplémentaires sont nécessaires pour initier l'activation des clones B auto-réactifs et conduire à la différenciation en ASC. La voie d'activation de ces LB responsables de la production des IgG anti-Dsg n'est pas encore clairement établit car il reste difficile de déterminer si ces

ASC pathogènes sont dérivés d'une réponse extra-folliculaire ou au sein d'un CG voir des deux voies en parallèle. Cette question est essentielle pour le traitement du pemphigus. Si les patients atteints de pemphigus présentent un défaut persistant de tolérance, de nouveaux clones B anti-Dsg pourrait se développer et conduire à une rechute. Mais si l'origine des LB anti-Dsg pathogènes est un événement stochastique périphérique, l'élimination de ces LB pourraient permettre une rémission définitive. Les analyses longitudinales des répertoires B IgG anti-Dsg ont démontré une persistance des clones B anti-Dsg identifiés par leur CDR3 chez deux patients atteint de PV lors des rechutes après un traitement par corticothérapie et Mycophénolate mofétil (Hammers et al., 2015). Cette étude n'a détecté qu'un seul nouveau clone B au cours du temps suggérant que l'émergence de LB IgG anti-Dsg n'est pas un processus fréquent, ni continu (Hammers et al., 2018). De plus, l'un de ces patients a été traité par RTX en deuxième intention. Après 4 perfusions, plus aucun clone IgG auto-réactif n'est détecté. L'observation de l'absence de clone B anti-Dsg a été confortée chez deux autres patients atteints de PV en rémission complète longue après RTX soulignant qu'une déplétion complète des LB pathogènes est possible. Ces résultats corroborent nos données cytométriques sur la baisse de fréquence dans le sang des LB IgG anti-Dsg après le traitement par RTX (Colliou et al., 2013). Néanmoins, nous avons constaté dans cette étude à 5 ans que de nombreux patients (80%) ont rechuté après un seul cycle d'injection de RTX. Il est probable que des LB anti-Dsg nichés dans la peau (Yuan et al., 2017), dans la moelle osseuse et/ou les organes lymphoïdes secondaires ne soient pas totalement éliminés par un seul cycle de RTX. Ces cellules pourraient proliférer et se différencier en ACS entrainant une élévation des titres d'Ac anti-Dsg généralement constatée lors des rechutes (Ellebrecht and Payne, 2017). Audelà de son effet direct sur les LB et sur les clones B auto-réactifs, le RTX influence également l'ensemble du système immunitaire car les LB ont de nombreuses fonctions effectrices et régulatrices qui ont été mise en lumière lors de leur déplétion.

Les fonctions effectrices des lymphocytes B

Le rôle des LB dans les MAI est largement associé à la production d'auto Ac. Cependant, l'auto-immunité est complexe et implique les autres fonctions des LB. Ces fonctions effectrices incluent la production de cytokines, de chimiokines et la présentation de l'antigène. Grâce à ces fonctions, les LB peuvent influencer profondément la formation et l'organisation des tissus lymphoïdes secondaires ou tertiaires et moduler les LT et les DC.

Pendant l'organogènese, les cytokines dérivées des LB comme la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ (LT $\alpha 1\beta 2$) ou le TNF guident le développement des tissus lymphoïdes (Tumanov et al., 2002). Lors des réponses immunologiques, les organes lymphoïdes secondaires subissent un remodelage structural profond avec la formation de CG induit notamment par la LTα1β2 produite par les LB (Shen and Fillatreau, 2015). De même, les LB sont au cœur du développement de tissus lymphoïdes tertiaires au niveau des sites ectopiques (Alsughayyir et al., 2017). Dans la peau, ces structures également appelées iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissues), ont été observées à proximité des sites d'inflammation lors d'infection ou de MAI comme dans le lupus érythémateux systémique (Kogame et al., 2018), le syndrome de Sjögren (Roguedas et al., 2010) et récemment dans le pemphigus (Yuan et al., 2017). Elles sont considérées comme des annexes des organes lymphoïdes secondaires car elles possèdent des caractéristiques similaires, telles que des zones organisées riches en LB ou en LT ou structurées en CG avec des DC présentant des antigènes adossés à un réseau de fibroblastes, de veinules endothéliales et des vaisseaux lymphatiques (Jones et al., 2016; Ruddle, 2016). Les iSALT semblent fournir un microenvironnement local pour les LB afin de favoriser la sécrétion de cytokines tels que l'IL-6, l'IL-10, le PDGF et le TGF-β pouvant contribuer à la régénération tissulaire ou à l'inflammation locale (Iwata et al., 2009). La fonction des iSALT dans les pathologies cutanées de type pemphigus reste à déterminer. Cependant, l'expression d'AID au sein des organes lymphoïdes tertiaires ayant été confirmée chez l'homme dans le syndrome de Sjögren (Bombardieri et al., 2007), il est probable que les iSALT contribuent à l'activation locale des LT auto-réactifs, à la maturation d'affinité des LB pathogènes ainsi qu'à la commutation isotypique vers différentes sous-classes d'Ig. La réponse immune humorale ainsi localisée permettrait une production d'auto-Ac directement au sein de la peau pouvant expliquer que les manifestions cutanées ou muqueuses soient limitées à certaines zones (Debes and McGettigan, 2019).

Dans les tissus ou dans les ganglions lymphatiques, la génération de CG repose sur des interactions bidirectionnelles étroitement régulées entre les Tfh et les LB (Kerfoot et al., 2011). Les LB jouent un rôle essentiel dans le processus complexe de différenciation des Tfh par la présentation antigénique, la sécrétion des cytokines (l'IL-6 et l'IL-27) et l'expression des molécules de co-stimulation (ICOSL, CD84) (Deenick et al., 2010; Ma et al., 2012) (Figure 25). Chez des patients atteints de MAI comme le diabète de type 1 (Xu et al., 2013b), la neuromyélite optique (Zhao et al., 2017), le Syndrome de Sjögren

(Verstappen et al., 2017) ou la thrombopénie immunologique (Audia et al., 2017), le traitement par RTX induit une baisse de fréquence des Tfh pendant la phase de déplétion des LB soulignant ainsi l'interdépendance de ces populations.

De fait, la présentation des antigènes aux LT auxiliaires est une fonction essentielle des LB. Étant des CPA professionnelles, les LB sont capables d'internaliser spécifiquement un antigène par leur BCR, de l'apprêter et de présenter efficacement les peptides antigéniques aux LT au sein du CMH de classe II (Janeway et al., 1987; Lanzavecchia, 1985). Ils peuvent également influencer la polarisation des réponses LT effectrices et la formation des LT mémoires grâce aux signaux de co-stimulation (CD40/CD80/CD86) et par la production de cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, ...). Les LB peuvent être subdivisés en divers sous-ensembles de LB « effecteurs » en fonction des cytokines produites (Harris et al., 2000). Ainsi, on distingue les LB effecteurs de type « Be-1 » produisant des cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-12 et le TNF- α et les LB effecteurs de type « Be-2 » produisant des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 et le TNF-α qui favoriseraient respectivement des réponses de type Th1 ou Th2 (Bao and Cao, 2014). La sécrétion de cytokines par les LB semble être régulée par une signalisation extrinsèque fournie par le microenvironnement cytokinique associé à des combinaisons de stimuli comprenant la signalisation du BCR et/ou des TLR et/ou du CD40 (Duddy et al., 2004; Vazquez et al., 2015). Récemment, notre équipe a démontré chez des patients atteints de PB que des LB auto-réactifs spécifiques de la BP180 exprimaient les transcrits des cytokines pro-inflammatoires de l'IL-6, de l'IL-15 et du TNF-α. Chez les patients en complète rémission après traitement par RTX, les LB anti-BP180 rémittents ont une expression transcriptomique moins inflammatoire et des LB IgM⁺ anti-BP180 exprimant les transcrits de l'IL-10 ou de l'IL-1RA ont émergé, suggèrant une plasticité fonctionnelle des LB auto-réactifs (Nicolas et al., 2019).

Dans le pemphigus, on sait relativement peu de choses sur le profil cytokinique des LB et sur la manière dont des sous-ensembles de LB « effecteurs » peuvent contribuer à la réponse auto-immune. Mais l'influence des LB sur la réponse de LT auto-réactifs a été démontrée indirectement chez des patients atteints de pemphigus traité par RTX. En effet, la déplétion des LB n'a pas d'effet sur la proportion des LT totaux dans le sang de ces patients, mais elle entraîne une diminution spécifique et prolongé de la fréquence des LT auto-réactifs de type Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4) quantifiée après stimulation *in vitro* par la Dsg3 (Eming et al., 2008). Ces observations suggèrent que les LB participent activement à l'amplification de la réponse auto-immune (Lund and Randall, 2010). Dans le même

temps, une sous-population de LB secrétant de l'IL10 appelée Breg est augmenté après traitement par RTX et à la capacité de réguler négativement la réponse immune (Colliou et al., 2013).

► LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS

Au cours des dix dernières années, plusieurs études menées chez la souris (Fillatreau et al., 2002) puis chez l'homme ont démontré que les Breg étaient essentiels au maintien de la tolérance immunitaire et à la régulation de l'inflammation. Les Bregs constituent un sous-ensemble de LB ayant des capacités d'immunosuppression principalement via la production d'IL-10. A ce jour, aucun marqueur spécifique des Breg n'a été découvert et les facteurs de transcription qui dirigent leur développement n'ont pas encore été identifiés (Lin et al., 2014; Oleinika et al., 2019). Actuellement, les Breg sont donc caractérisés fonctionnellement par leur capacité à produire des cytokines régulatrices en réponse à une stimulation. La voie d'induction des Breg la plus décrite met en jeu l'engagement du BCR et une co-stimulation via le TLR9 et/ou le CD40 (Bouaziz et al., 2010; Mauri and Bosma, 2012). En plus de ces signaux, des publications récentes suggèrent que l'environnement cytokinique dans lequel se différencient les LB joue un rôle central dans l'induction de Breg (Mauri and Menon, 2017). En effet, des expansions de Breg sont observées en présence de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-21, l'IL-35, l'IFN- α et de BAFF (Giordani et al., 2009; Huang et al., 2017; Menon et al., 2016; Rosser et al., 2014; Yang et al., 2010; Yoshizaki et al., 2012). Les Breg ne semblent pas constituer une population spécifique car plusieurs sous-populations de LB sont capables de développer cette fonction d'immuno-régulation (Rosser and Mauri, 2015). A ce jour, les populations de LB identifiées chez l'homme comme capables de sécréter des cytokines régulatrices comprennent des LB transitionnels CD24^{fort} CD38^{fort} CD1d^{fort} (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013), des LB mémoires CD24^{fort} CD27⁺ (Iwata et al., 2011; Lin et al., 2014), des LB CD25+CD71+ dits Br1 (van de Veen et al., 2013) et des plasmablastes CD27^{int} CD38+ (Masson et al., 2015; Matsumoto et al., 2014). L'incapacité à identifier un facteur de transcription unique, ainsi que l'hétérogénéité du phénotype des Breg, conforte l'idée selon laquelle les Breg ne sont pas spécifiques d'une lignée, mais sont « induits » en fonction des stimulations et du microenvironnement.

A l'inverse, notre équipe, ayant contribué à cette caractérisation des Breg chez l'homme, a identifié le marqueur membranaire CD11c chez un sous-groupe de LB incapable d'acquérir une fonction d'immuno-régulation et de produire de l'IL-10 (Lin et al., 2014). Divers noms ont été attribués à ces LB CD11c⁺, notamment les LB doubles négatifs, les LB mémoires atypiques ou les LB associés à l'âge (ABC : *Age-associated B cells*) (Karnell et al., 2017). Cette population a été décrite comme augmentée dans de nombreuses MAI telles que la sclérose en plaques (Claes et al., 2016) ou la polyarthrite rhumatoïde (Rubtsov et al., 2011). Ces LB CD11c⁺ font actuellement l'objet d'une étude plus approfondie au sein de notre laboratoire notamment dans le pemphigus (Article en cours de rédaction en Annexe n°4). Nos résultats suggèrent que ces LB ont une capacité à se différencier plus rapidement en ASC.

Les Breg sont capables d'inhiber la prolifération des LT (Bouaziz et al., 2010), de moduler la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT, de supprimer la polarisation Th1 (Blair et al., 2010) et Th17 (Flores-Borja et al., 2013), de convertir les LT CD4⁺ en iTreg ou en Tr1 (Flores-Borja et al., 2013; Kessel et al., 2012). Les Breg exercent une inhibition sur la réponse inflammatoire en contrôlant les phénotypes des DC qui diminuent, de fait, leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires jouant ainsi sur la polarisation Th1/Th17 (Lemoine et al., 2011; Morva et al., 2012). Plus récemment, il a été démontré que les Breg contrôlent également la maturation des Tfh et le développement des Tfr réprimant ainsi les réactions du CG et la réponse humorale (Achour et al., 2017). Ces mécanismes dépendent de la production de cytokines immunosuppressives ou du contact cellulaire par le biais de molécules immuno-modulatrices. Dans la grande majorité des études, la fonction des Breg est associée à la production d'IL-10 mais d'autres cytokines anti-inflammatoires ont récemment été décrites telles que l'IL-35 composé de 2 sous unités : IL12p35 et Ebi3 (Epstein-Barr virus induced gene 3) (Shen and Fillatreau, 2015), le TGF-β (Nouël et al., 2015) ou le granzyme B (Lindner et al., 2013). Les Breg peuvent également moduler les réponses adaptatives par l'expression de PD-L1 qui engage le récepteur de mort PD-1 sur les LT (Khan et al., 2015) ou induire l'apoptose via une expression accrue de FasL (Hahne et al., 1996). Enfin, les Br1 contribuent au maintien de la tolérance aux allergènes en produisant une grande quantité d'IgG4 (van de Veen et al., 2013).

La caractérisation fonctionnelle des Breg complique l'analyse de cette population chez l'homme car elle est dépendante des méthodes d'induction (Miyagaki et al., 2015). Néanmoins, une diminution du nombre de Breg et/ou des capacités fonctionnelles altérées ont régulièrement été décrites dans de nombreuses MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Wang et al., 2014), la polyarthrite rhumatoïde (Cui et al., 2015; Daien et al., 2014; Xu et al., 2017), le psoriasis (Hayashi et al., 2016) ou la sclérose en plaque (Lemoine et al., 2011).

Il existe encore peu d'étude s'intéressant aux Breg dans le pemphigus. Les données de Kabuto décrivent une diminution de la fréquence des LB sécréteurs d'IL-10 chez les patients atteints de pemphigus par rapport à des témoins sains (Kabuto et al., 2017). Les travaux de Zhu, démontrent une fonction des Breg altérée. D'après cette étude, les patients atteints de pemphigus ont une plus grande fréquence de LB transitionnels CD24^{fort} CD38^{fort} (généralement associée au phénotype des Breg) que les témoins sains, mais cette population sécrète moins d'IL-10 après stimulation et semble incapable d'empêcher la sécrétion d'IFN-γ par les Th1 (Zhu et al., 2015).

Cependant, dans notre étude sur l'évolution à long terme de la réponse immune des patients atteints de pemphigus traités par le RTX, nous avons décrit un nombre significativement plus élevé de LB transitionnels CD24^{fort} CD38^{fort} sécréteurs d'IL-10 chez les patients en rémission complète par rapport aux patients gardant une maladie active ou rechute ou en rémission incomplète (Colliou et al., 2013). L'augmentation de Breg a également été observée chez des patients atteints de pemphigus en rémission après l'injection d'Ig en intra-veineuse (IgIV) (Kabuto et al., 2016) ou après une corticothérapie (Kabuto et al., 2017), suggérant ainsi un rôle potentiel des Breg dans l'obtention d'une rémission chez les patients atteints de pemphigus. Les Breg semblent contribuer aux rémissions cliniques prolongées et pourraient donc être la nouvelle stratégie thérapeutique (Mauri and Menon).

En résumé, le pemphigus est l'une des rare MAI dont les auto-antigènes et les auto-Ac sont caractérisés. Les Ac pathogènes ciblent principalement les Dsg et sont à l'origine des mécanismes d'acantholyse responsables de la perte d'adhésion des kératinocytes dans la peau et les muqueuses. Le développement du pemphigus semble être associé à la conjonction de nombreux événements très rares comprenant : i) l'émergence de clones B auto-réactifs anti-Dsg issus de la création stochastique de LB naïfs auto-réactifs par la recombinaison V(D)J et/ou issus d'une hypermutation somatique en périphérie ii) une déficience de tolérance thymique conduisant à l'émergence de LT auto-réactifs anti-Dsg en périphérie chez des individus présentant un HLA de susceptibilité iii) une défaillance des mécanismes de tolérance périphérique permettant l'activation auto-immune, probablement en cas d'infection ou d'inflammation ; iv) un déséquilibre de la réponse immune conduisant à la polarisation des LT auto-réactifs vers un profil Th2 avec une balance Th17/Treg perturbée contribuant à l'activation, la prolifération et la maturation des LB ; v) une perturbation des mécanismes de maturation d'affinité impliquant probablement les Tfh permettant aux processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique d'orienter la réponse auto-immune B vers un répertoire B anti-Dsg polyclonal de très haute affinité et d'isotype IgG4 aboutissant à la production d'auto-Ac pathogènes (Pan et al., 2015). Outre les cellules immuno-réactives et régulatrices, les cytokines telles que l'IL4, l'Il6, l'IL-10, l'IL-17, l'IL-21, le BAFF et/ou le TGF-β constituent un microenvironnement qui influence directement chaque étape du développement de la réponse immunopathologique du pemphigus (Giordano and Sinha, 2012). Les nouvelles immunothérapies modulant l'homéostasie des cytokines clés ou des cellules immunitaires ouvrent de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter le pemphigus.

5. Les traitements du pemphigus

Les corticoïdes systémiques sont le pilier du traitement des DBAI. La mortalité chez les patients atteints de pemphigus a considérablement diminué, passant de 75 à 30%, après l'avènement des glucocorticoïdes (GC) au début des années 1950. Bien que très efficace, l'administration de GC à long terme engendre des effets indésirables importants. Dans les années 1980, l'utilisation d'adjuvants immunosuppresseurs tels que l'azathioprine et le mycophénolate mofétil a contribué à réduire davantage la mortalité à moins de 5% (Kridin, 2018b). Les études fondamentales et translationnelles ont permis d'améliorer la

compréhension de la physiopathologie du pemphigus ouvrant la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées afin d'éviter une immunosuppression systémique.

5.1. **PANORAMA DES TRAITEMENTS ACTUELS ET FUTURS DU PEMPHIGUS**

5.1.1. Les traitements actuels

La plupart des traitements actuels visent à améliorer les symptômes en réduisant les auto-Ac directement ou par immunosuppression généralisée et à prévenir les récidives (Figure 29). Selon les recommandations issues du forum européen de dermatologie en coopération avec l'Académie européenne de dermatologie et de vénéréologie, la corticothérapie standard (CS) systémique à raison de 0,5 mg à 1,5 mg/kg/jour est recommandée comme traitement de première intention chez les patients atteints de pemphigus malgré ses nombreux effets iatrogènes (Hertl et al., 2015). À la fin de la phase de consolidation du traitement, la plupart des cliniciens commencent à réduire progressivement la dose de 25% tous les 15 jours. Des adjuvants immunosuppresseurs, le plus souvent l'azathioprine ou le mycophénolate mofétil, peuvent être utilisés en association pour leurs effets épargnants, bien que seuls quelques essais cliniques randomisés aient prouvé leur efficacité (Atzmony et al., 2015). L'objectif du traitement dans la phase initiale est le contrôle de la maladie afin d'empêcher la formation de nouvelles lésions et de démarrer le processus de guérison des lésions existantes. Chez les patients réfractaires au traitement initial ou présentant des contre-indications aux corticoïdes, des options thérapeutiques de deuxième intention ciblant les auto-Ac ou les LB sont recommandées. Les traitements tels que l'injection d'IgIV (Enk et al., 2016), la plasmaphérèse (Søndergaard et al., 1997; Tan-Lim and Bystryn, 1990) ou l'immunoadsorption des IgG (Meyersburg et al., 2012) permettent une réduction très rapide des auto-Ac dans le sérum des patients atteints de pemphigus, entraînant une réponse clinique rapide. Depuis la démonstration de l'efficacité du traitement par déplétion des LB dans notre première étude prospective (Joly et al., 2007; Mouquet et al., 2008b), le RTX est largement utilisé pour le traitement des formes sévères de pemphigus chez des patients réfractaires au traitement par la CS.



Figure 29 : Stratégies thérapeutiques actuelles ou futures du pemphigus

Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le pemphigus et des stratégies thérapeutiques actuelles et émergentes en fonction de leurs mécanismes d'action. Les traitements conventionnels tels que les corticostéroïdes systémiques et les immunosuppresseurs (Mycophénolate mofétil, Methotrexate, Dapsone, ...) affectent un large éventail de cellules et de tissus de manière aspécifique. Les stratégies actuelles de déplétion des auto-anticorps (Ac) réduisent les immunoglobulines G (Ig)G dans le sérum par plasmaphérèse, par immuno-adsorption ou par l'injection d'Ig en intraveineuse (IgIV). Les nouveaux traitements de biothérapies permettent de cibler spécifiquement des acteurs cellulaires ou des médiateurs immunologiques tels les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB), les Ac ou les cytokines et sont potentiellement plus sûre. Le rituximab (Mabthera®) est un Ac chimérique anti-CD20 qui entraine la déplétion de tous les LB comme le Veltuzumab et le Ofatumumab. Parmi les approches thérapeutiques émergentes, l'immunomodulation des cytokines visent à interférer dans la cascade auto-immune en ciblant par exemple le TNF- α (Infliximab ou Etanercept), BAFF (Belimumab) ou les récepteurs de l'IL-4 (Dupilumab), de l'IL-6 (Tocilizumab) ou de BAFF (VAY736). L'Ac anti-FcRn (neonatal Fc receptor) entraine la diminution des IgG (SYNT001). L'immuno-absorption par les Dsg permet l'élimination spécifique des auto-Ac. L'activation des LT peut être régulée par CTLA-4-Ig (Abatacept) ainsi que ppar immunosuppression via des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Étude Poly-Treg). Dans les innovations pharmacologiques, l'inhibition de la BTK (Tyrosine Kinase de Burton) par le PRN1008 permet de réguler les voies de signalisation des leucocytes en particulier celle du BCR. Le KC-706 permet d'inhiber le P38-MARK modulant ainsi les voies de signalisation impactées par les Ac anti-Dsg. Les Dsg3 CAAR-T cell (Chimeric AutoAntibody Receptor T cells) ont été développés afin de détruire spécifiquement les LB auto-réactifs anti-Dsg. BCR : B cell receptor ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité humain; CPA: cellule présentatrice d'antigène, CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 ; Dsg : Desmogléine ; IL : interleukine ; TCR : T cell receptor ; $TNF-\alpha$: Tumor necrosis factor (Inspiré par Kasperkiewicz et al., 2017; Kridin, 2018b; Tavakolpour, 2017).

5.1.1. Les traitements potentiels

Le développement des biothérapies et les connaissances acquises sur la physiopathologie du pemphigus ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques (Figure 29) (Bilgic Temel and Murrell, 2019; Izumi et al., 2019; Tavakolpour, 2017).

Parmi les nouvelles stratégies, certaines envisagent de cibler les LT par immunorégulation via la protéine de fusion CTLA-4-Ig (Abatacept) comme utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Blair and Deeks, 2017) ou via un Acm anti-CD40L comme dans le modèle murin de PV (Aoki-Ota et al., 2006). La vaccination peptidique (PI-0824) constitue une autre méthode dont l'objectif est de rétablir la tolérance des LT pour les Dsg. Une autre stratégie thérapeutique ambitionne de conforter les effets suppresseurs des Treg, démontrés dans le modèle murin de PV (Yokoyama et al., 2011), chez des patients atteints de pemphigus par l'injection de Treg autologues (CD4⁺ CD127^{faible}/CD25⁺) dans le cadre d'un essai clinique de phase I (PolyTreg NCT03239470). D'autres biothérapies visent à interférer dans la cascade auto-immune Th2 par la modulation des cytokines effectrices. L'inhibition du TNF- α par des Acm comme l'Infliximab ou l'Etanercept semble avoir eu un effet favorable dans des observations ponctuelles (Berookhim et al., 2004; Jacobi et al., 2005). Les Acm dirigés contre les récepteurs de l'IL-4 (Dupilumab) et l'IL-6 (Tocilizumab) constituent d'autres options thérapeutiques dans le pemphigus. L'efficacité du Tocilizumab a été rapporté chez une patiente ayant un PF réfractaire (Caso et al., 2013).

Parmi les innovations thérapeutiques, l'Acm anti-FcRn (SYNT001) représente une nouvelle stratégie pour réduire les taux d'auto-Ac car il empêche la liaison FcRn/IgG, entraînant ainsi une diminution des niveaux d'IgG et des complexes immuns. Les résultats préliminaires de son évaluation au cours d'une étude multicentrique de phase I (NCT03075904) ont montré un bénéfice clinique chez des patients atteints de PV et de PF (Izumi et al., 2019). L'immuno-adsorption spécifique des Ac anti-Dsg est également en voie de développement en utilisant des colonnes d'adsorption couplées avec les protéines recombinantes humaines Dsg 1 et 3 (Langenhan et al., 2014). Les nouvelles pistes pharmacologiques visent aussi à bloquer les effets des Ac pathogènes en ciblant les molécules impliquées dans la cascade de signalisation conduisant à l'acantholyse. Dans le modèle murin de PV, l'inhibition de la P38-MAPK est ainsi capable de prévenir l'acantholyse. Malheureusement, l'évaluation de cet inhibiteur de P38-MAPK (KC-706) dans un essai multicentrique de phase II a dû être arrêtée en raison d'événements indésirables graves survenus chez les patients de l'étude.

Les LB restent une cible prioritaire des nouvelles biothérapies. L'Ofatumumab et le Veltuzumab sont des Acm anti-CD20 de deuxième génération qui ont été conçus pour être plus efficaces et mieux tolérés. L'efficacité du Veltuzumab a été rapporté chez une patiente atteinte de PV réfractaire au traitement par RTX (Ellebrecht et al., 2014). Un essai clinique de phase III évaluant l'efficacité de l'Ofatumumab dans le pemphigus a récemment été achevé (NCT01920477) mais les résultats ne sont pas encore connus. D'autres marqueurs de surface des LB tel que le CD22 (Epratuzumab) font l'objet d'innovations thérapeutiques. Les facteurs d'activation des LB tels que le BAFF (Belimumab), APRIL (Atacicept) ou le récepteur BAFF-R (VAY736) sont aussi voies de recherches thérapeutiques. Ces thérapies pourraient avoir des effets plus larges sur la déplétion des LB et la survie des plasmablastes que celles ciblées sur le CD20. A ce jour, seul le VAY736 fait l'objet d'une étude clinique actuellement en cours dans le pemphigus avec un essai de phase II en double aveugle contrôlé par un placebo (NCT01930175). Le PRN1008 est un inhibiteur extrêmement puissant de la tyrosine kinase de Bruton (BTK), enzyme jouant un rôle majeur dans les voies de signalisation dans la plupart des leucocytes. Le PRN1008 permet d'inhiber diverses activités cellulaires notamment la prolifération, la différenciation, la maturation et la survie des LB. L'étude de phase II (NCT02704429) réalisée chez des patients atteints de PV a montré des résultats préliminaires encourageants en terme d'efficacité (Smith et al., 2017). Un essai de phase III (NCT03762265) dans lequel participe le centre de références des maladies bulleuses auto-immunes de Rouen est actuellement en cours. Récemment, Ellebrecht, Payne et ses collaborateurs ont développé des LT conçus pour exprimer un récepteur chimérique comprenant les domaines EC de la Dsg3 fusionnés aux domaines de signalisation cytoplasmiques du TCR inspiré par la technologie des CART-cell (Chimeric Antigen Receptor T cell) (Porter et al., 2011). Les Dsg3 CAAR-T cells (Chimeric AutoAntibody *Receptor T cells*) représentent une grande innovation thérapeutique permettant une déplétion ciblée des LB exprimant des BCR anti-Dsg3. Leur efficacité a été démontrée in *vitro* en utilisant des hybridomes de la Dsg3 tel que AK23, et *in vivo* dans un modèle murin de transfert passif de PV par l'inoculation d'hybridomes (Ellebrecht et al., 2016). Un essai clinique de phase I du Dsg3-CAAR-T cell chez des patients atteints de PV est prévu pour étudier son potentiel thérapeutique et son innocuité.

Ces innovations permettront sans doute dans un futur proche de renforcer l'arsenal thérapeutique pour lutter contre le pemphigus mais de nombreuses étapes restent à franchir afin de vérifier leur efficacité ainsi que leur innocuité. A ce jour, la CS reste incontournable bien que, pour notre équipe, le RTX constitue la meilleure option pour suppléer à la CS et réduire ainsi les risques liés aux effets iatrogènes des traitements.

5.2. LA CORTICOTHERAPIE

Les GC endogènes jouent un rôle crucial dans divers processus physiologiques, ils agissent sur plusieurs types de cellules pour réguler l'expression de gènes contrôlant le métabolisme, la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaires (Bereshchenko et al., 2018). Depuis 1948, les GC de synthèse sont devenus l'un des agents les plus efficaces pour lutter contre les maladies inflammatoires et auto-immunes notamment dans les DBAI (Kubin et al., 2017). Étonnamment, peu de choses sur leurs mécanismes d'action exacts sont connus (Zen et al., 2011). Effectivement, les GC ont des effets pléiotropes sur le système immunitaire. Ils influencent de multiples voies de transduction de signaux entraînant des effets anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, anti-prolifératifs et vasoconstricteurs (Stahn et al., 2007).

Les GC exercent leurs influences par le biais de trois mécanismes d'action comprenant des effets génomiques directs, indirects et non génomiques (Figure 30) (Stahn and Buttgereit, 2008). Les GC lipophiles diffusent à travers les membranes cellulaires pour se lier aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR) cytoplasmiques, qui sont exprimés de manière ubiquitaire (Nicolaides et al., 2010).

La formation du complexe GC/GR induit la dissociation des protéines Hsp (*heat shock protein*) et d'autres protéines stabilisatrices du GR. Elle entraîne une translocation dans le noyau, permettant au complexe de se lier dans la région promotrice de certains gènes appelée GRE (*glucocorticoid response elements*) (Kumar and Thompson, 2005). Le complexe qui en résulte recrute soit des protéines co-activatrices, soit des protéines co-répressives qui facilitent ou répriment la machinerie transcriptionnelle. Environ 10 à 100 gènes dans chaque cellule sont régulés directement par les GC (Hayashi et al., 2004). Cela entraîne une augmentation de l'expression des protéines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β ,...) et une inhibition de l'expression des protéines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-2) (Cain and Cidlowski, 2017). Les effets indirects sur l'expression génique impliquent des interactions entre le complexe GC/GR et d'autres facteurs de transcription comme l'AP-1

(*Activator protein 1*) ou le NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) inhibant ainsi sa translocation nucléaire et l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que des cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ) et des chimiokines (IL-8, CCL5).



Figure 30 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

Représentation schématique des effets génomiques directs, indirects et des mécanismes non génomiques des glucocorticoïdes (GC). Les GC lipophiles traversent facilement la membrane plasmique et se lient aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR) cytosoliques. Au sein des cellules, les enzymes 11 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (11 β -HSD) régulent l'interconversion du cortisol bioactif et de la cortisone inactive. Le complexe GC/GR activé se dissocie des Hsp (heat shock protein) et se transloque dans le noyau, où il induit ou inhibe directement la transcription des gènes. La liaison aux GRE (glucocorticoid response elements) conduit à l'expression de protéines anti-inflammatoires (GRE positif) ou à la suppression de la transcription de gènes pro-inflammatoires (GRE négatif). Le complexe GC/GR peut également inhiber indirectement la transcription de gènes inflammatoires par interaction avec des facteurs de transcription tel que le NF-kB (nuclear factor-kappa B). Les effets non génomiques sont activés par une signalisation via un GR membranaire (GRm), par une interaction directe avec la membrane cellulaire ou mitochondriale ou avec les canaux ioniques membranaires modifiant l'électrophysiologie cellulaire (non représenté) et par une interaction GR avec d'autres protéines de signalisation dans le cytoplasme. LPS : lipopolysaccharide ; IL : Interleukine ; TNF- α : Tumor necrosis factor (d'après Rhen and Cidlowski, 2005).

La formation du complexe GC/GR assure non seulement des effets génomiques, mais également des effets non génomiques *via* la dissociation de différentes protéines associées au GR telles que l'Hsp, le Scr ou les protéines kinases MAPK (Strehl and Buttgereit, 2013). Les effets non génomiques sont à l'origine des effets rapides des GC mais ils sont moins bien connus. Ils ne sont pas médiés par une activité transcriptionnelle, mais par des voies alternatives qui impliquent également des signalisations *via* un autre type de récepteur aux GC membranaire (GRm) présent à la membrane des monocytes et des LB (Bartholome et al., 2004) ou *via* une interaction directe des GC dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et/ou mitochondriale modifiant leurs propriétés physicochimiques ainsi que les activités des protéines associées aux membranes telles que les canaux calciques ou sodiques (Buttgereit and Scheffold, 2002).

Ainsi, les GC agissent clairement par de multiples mécanismes sur diverses cibles comprenant des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion et de costimualtion, des enzymes, des protéines pro- et anti-inflammatoires, des protéines du cycle cellulaire et de l'apoptose. Ces mécanismes expliquent, en partie, l'inhibition de l'activité cellulaire observée avec les GC en particulier dans les cellules impliquées dans l'immunité innée ou adaptative. En outre, les GC ciblent aussi bien les macrophages, les DC, les polynucléaires, les LT et les LB que les cellules épithéliales, les fibroblastes ainsi qu'un large éventail d'autres types cellulaires... Ils peuvent influencer leur maturation, leur activation, leur survie, leur migration, en modulant leur capacité sécrétrice et d'expression de certains récepteurs cellulaires (Zen et al., 2011).

De manière très synthétique, les GC peuvent orienter les DC vers un phénotype tolérogène par une faible expression du CMH de classe II, des molécules co-stimulatrices et des cytokines (IL-1β, IL-6) influençant ainsi la polarisation des Th (Szatmari and Nagy, 2008). Les GC inhibent rapidement la voie de transmission du signal engagée par le TCR (Boldizsar et al., 2010). Ils répriment la différenciation des Th1 et Th17 favorisant la polarisation vers les Th2 (Cain and Cidlowski, 2017; Elenkov, 2004; Jones et al., 2015) et induisent des Treg (Cari et al., 2019). Les effets des GC sur les LB sont moins bien connus. Récemment , il a été démontré que les GC peuvent altérer la signalisation en amont du BCR et des TLR (Franco et al., 2019). Ils peuvent réduire la transcription de loci d'Ig pouvant avoir une incidence sur la production d'Ac. De plus, les CG peuvent induire l'expression des gènes codant pour la cytokine immuno-modulatrice IL-10 liée aux fonctions des Breg (Franco et al., 2019). Enfin, le traitement par GC provoque une

diminution du taux de BAFF (Kamhieh-Milz et al., 2018) jouant sur la survie et la maturation des LB, la production d'Ac et la commutation isotypique ainsi que sur la survie des LB auto-réactifs (Youinou and Pers, 2010).

Les effets des GC sont dose dépendante et l'efficacité clinique des molécules thérapeutiques (prednisone, prednisolone, méthyprednisolone, dexaméthasone, …) nécessite généralement l'utilisation de doses élevées et prolongée. Cependant, une dose cumulée élevée de GC est associée à différents effets indésirables tels que l'ostéoporose, la nécrose osseuse, la myopathie, le glaucome, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie. Les GC peuvent également révéler ou aggraver un diabète, une hypertension, un ulcère, une maladie cardiovasculaire ou une insuffisance surrénale. L'augmentation de l'appétit, la rétention d'eau et de sel entraînant une prise de poids et des troubles neuropsychiatriques tels que l'insomnie, l'irritabilité, l'anxiété, la dépression sont également associés aux effets indésirables de la corticothérapie (Caplan et al., 2017; Kridin, 2018b).

La prednisone et autres GC sont un élément essentiel du traitement du pemphigus (Lever and Schaumburg-Lever, 1984). Ils ont considérablement amélioré le pronostic de la maladie (Rosenberg et al., 1976). L'Académie Européenne de Dermatologie et de Vénéréologie recommande de commencer le traitement des patients atteints de pemphigus par de la prednisone/prednisolone à la dose initiale de 0,5 à 1,5 mg/kg par jour (Hertl et al., 2015). Les patients répondent généralement à cette thérapie dans un délai maximum de deux semaines. Dix à 20% des cas de PV et de PF sont considérés comme cortico-résistants à cette dose initiale de prednisone (Murrell et al., 2008), une dose plus élevée, de 1 à 1,5 mg/kg par jour peut être alors administrée. La cicatrisation des lésions cutanées et surtout des lésions muqueuses est lente et n'est habituellement obtenue qu'après plusieurs semaines, voire plusieurs mois de traitement pour les lésions muqueuses. A l'issue du traitement d'attaque durant habituellement de 3 à 4 semaines, les doses de GC sont diminuées progressivement sur 12 à 24 mois en moyenne (Harman et al., 2017). Environ la moitié des patients rechuteront au cours de cette décroissance (Sharma and Khandpur, 2013). La moitié seulement parviendra à une rémission complète avec une durée moyenne de traitement longue puisqu'elle est de 3 ans (Almugairen et al., 2013). Environ, 20% des PV et PF sont considérés comme corticodépendants à des doses élevées de GC (\geq 20 mg/kg/jour) nécessitant encore une corticothérapie plus de dix ans après le début de la maladie.

L'administration systémique de GC dans le pemphigus permet d'obtenir en quelques jours un contrôle de l'acantholyse dans la peau et la muqueuse du patient pendant le stade aigu de la maladie, malgré un titre élevé d'auto-Ac circulants. Cet effet thérapeutique rapide des GC est associé à une transcription accrue des Dsg et d'autres molécules d'adhésion cellulaire dans les kératinocytes, ce qui compenserait l'interférence induite par les auto-Ac dans la fonction adhésive du desmosome (Nguyen et al., 2004). De plus, l'impact des GC sur le système immunitaire conduit à une diminution des taux d'auto-Ac permettant d'obtenir la rémission (Abasq et al., 2009; Barnadas et al., 2015).

L'efficacité de la CS dans le pemphigus est bien démontrée (Almugairen et al., 2013; Harman et al., 2002) mais son inconvénient majeur est ses effets indésirables dus à la durée prolongée et aux doses élevées nécessaires pour induire la rémission. Ces multiples effets indésirables peuvent même contribuer à de mauvais pronostics voir au décès (Kridin et al., 2017).

5.3. LE RITUXIMAB (MABTHERA®)

Le RTX (Mabthera[®]/Laboratoire Roche) est un Acm IgG1 chimérique qui cible le CD20, un canal calcique transmembranaire impliqué dans l'activation, la prolifération et la différenciation des LB (Figure 31). L'expression de la molécule CD20 est régulée pendant le développement des LB du stade pré-B au stade B mature. Son expression diminue sur les plasmablastes pour disparaître totalement de la surface des plasmocytes (Riley and Sliwkowski, 2000). Par conséquent, le RTX cible les LB en épargnant les progéniteurs B et les plasmocytes, permettant ainsi de conserver la mémoire immunitaire à long terme.

Le fragment Fab du RTX d'origine murine se lie à la molécule CD20 et le fragment Fc d'origine humaine permet le recrutement des différents effecteurs du système immunitaire aboutissant à la déplétion des LB (Reff et al., 1994). Son mécanisme d'action repose sur l'induction d'apoptose ainsi que sur l'activation des processus de cytotoxicité par la CDC faisant intervenir la liaison du fragment C1q du complément et par l'ADCC dépendante des FcγR à la surface des granulocytes, des macrophages et des NK (Boross and Leusen, 2012; Maloney et al., 2002).


Figure 31 : Structure et mécanismes d'action du Rituximab

Représentation de la structure du Rituximab (RTX), de sa cible, la molécule CD20 à la surface des LB, et des mécanismes de cytotoxicité. Le RTX est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 présentant des régions variables d'origine murines et des régions constantes d'origine humaines. Le RTX reconnait la molécule CD20 exprimée spécifiquement par les lymphocytes B. L'action du RTX s'exerce par trois mécanismes principaux : l'induction d'apoptose, la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). CAM : complexe d'attaque membranaire ; IgG : Immunoglobuline G ; NK : Natural Killer (d'après Maloney, 2012).

La majorité des effets indésirables (85 à 90%) se produisent au moment de la perfusion de RTX et ont été caractérisés comme légers ou modérés tels que l'hypotension ou l'hypertension, des prurits ou des éruptions cutanées. Les effets indésirables graves du RTX sont plutôt rares (3%), les principaux évènements rapportés sont des infections, l'exacerbation de maladies cardiovasculaires, la nécrolyse épidermique toxique et de rares cas de leuco-encéphalopathie et de réactivation virale (Kimby, 2005; Virgolini and Marzocchi, 2004).

Le RTX a été approuvé en 1997 par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis et par l'agence européenne des médicaments en 1998 pour le traitement du lymphome non hodgkinien (Cheson and Leonard, 2008). Depuis, le RTX a été utilisé avec succès dans le traitement de nombreuses MAI tels que la polyarthrite rhumatoïde (Edwards and Cambridge, 2001; Leandro et al., 2006), le lupus érythémateux systémique (Looney et al., 2004), la sclérose en plaque (Hauser et al., 2008), la dermatomyosite (Levine, 2005), l'anémie hémolytique auto-immune (Quartier et al., 2001), le purpura thrombopénique immunologique (Stasi et al., 2001) et le pemphigus (Joly et al., 2007). Bien que son efficacité clinique est incontestée, certains mécanismes de résistance au RTX ont été démontrés chez certains patients atteints de lymphomes ou de MAI comprenant : i) la présence de polymorphismes du récepteur FcγRIIIa susceptible de jouer sur l'ADCC (Anolik et al., 2003) ; ii) l'expression des inhibiteurs du complément CD46, CD55 et CD59 influençant la CDC, (Golay et al., 2000) ; iii) la modulation de la densité cellulaire de la protéine CD20 ou la présence de CD20 circulant (exosome) masquant ainsi la protéine cible (Giles et al., 2003; Jilani et al., 2003) ; iv) la production d'HACA (*human anti-chimeric antibodies*), des d'Ac anti-chimères dirigés contre les régions d'origine murines pouvant interférer directement avec le RTX (Lunardon and Payne, 2012).

Dans le pemphigus, plusieurs études de cas ont initialement démontré que le RTX pouvait être efficace en permettant une guérison rapide des lésions cutanées et muqueuses (Cooper et al., 2003; Salopek et al., 2002; Virgolini and Marzocchi, 2003). Les travaux du Pr Joly ont confirmé l'efficacité du RTX dans le traitement du pemphigus sévère avec 86% des patients en rémission complète trois mois après avoir reçu un seul cycle de RTX (selon le schéma « oncologique ») (Joly et al., 2007). La posologie du RTX dans le pemphigus n'étant pas définit (Zakka et al., 2012), deux schémas posologiques ont été principalement utilisés dans les diverses études cliniques menées dans le pemphigus (Cianchini et al., 2007, 2012; Joly et al., 2007; Kasperkiewicz et al., 2011; Matsukura et al., 2012). L'un calqué sur le schéma « oncologique » avec une dose de RTX de 375 mg/m² hebdomadaire pendant 4 semaines (Gürcan et al., 2009), l'autre basé sur le schéma « autoimmun » établie dans la polyarthrite rhumatoïde avec deux perfusions de 1000 mg de RTX administrées à deux semaines d'intervalle (Cohen et al., 2006). Une méta-analyse comparative réalisée dans le pemphigus n'a révélé aucune différence d'efficacité ou de tolérance entre ces deux schémas (Wang et al., 2015). Globalement, le taux de rémission complète obtenu avec ces différents schémas thérapeutiques en utilisant le RTX seul ou associé à un immunosuppresseur classique est supérieur à 80% (Hebert et Joly, 2017). Le traitement par RTX permet une diminution des doses de CS dans la plupart des études (Kim et al., 2017b; Schmidt et al., 2008; Tavakolpour et al., 2018).

Les études sur les données immunologiques, précédemment décrites, ont permis d'éclaircir le mécanisme d'action du RTX dans le pemphigus. En résumé, le RTX entraine une déplétion prolongée des LB périphériques pendant au moins six mois permettant une élimination des LB auto-réactifs. L'arrêt de la restitution du pool de plasmablastes /plasmocytes conduit à la réduction des taux d'Ac anti-Dsg chez la majorité des patients. La reconstitution des LB est caractérisée par la présence prolongée de LB naïfs (Mouquet et al., 2008b). En raison de l'interaction étroite entre les LB et les LT, la déplétion de LB induite par le RTX impact la présentation antigénique, la production de cytokines ainsi que les co-signaux d'activation nécessaires aux LT entrainant indirectement la réduction des LT auto-réactifs (Eming et al., 2008). Le déséquilibre LB naïfs/LB mémoires est maintenu sur le long terme même 5 ans après l'injection initiale de RTX. Le nombre de LB IgG⁺ spécifique des Dsg est fortement diminué chez les patients en rémission complète par rapport à des patients nouvellement diagnostiqués pour le pemphigus contrairement au LB IgM⁺ suggérant qu'un blocage dans le processus de commutation isotypique participe à l'effet bénéfique du traitement par RTX. En outre, l'émergence de Breg semble jouer un rôle dans l'effet immunosuppresseur du RTX (Colliou et al., 2013).

Néanmoins, de nombreuses rechutes ont été rapportées après la reconstitution des LB. Évaluer le taux de rechute après RTX est difficile car de nombreuses études ont un suivi court mais ce taux semble augmenter allant de 40 à 81% avec la durée du suivi clinique (Ahmed et al., 2009, 2015; Colliou et al., 2013; Joly et al., 2007). Il a été démontré que les rechutes après le RTX étaient associées aux mêmes clones B anti-Dsg que ceux observés dans le phase active (Hammers et al., 2015). Cela suggère que les rechutes peuvent être liées à une déplétion incomplète des clones B anti-Dsg potentiellement nichés dans la peau, la moelle osseuse et/ou les organes lymphoïdes secondaires (Nishifuji et al., 2000; Yuan et al., 2017). Les études n'utilisant qu'un seul cycle de RTX ont rapporté des taux de rechute de 15 à 20% après un an et jusqu'à 50% six ans après la perfusion de RTX (Colliou et al., 2013; Kim et al., 2017b). A l'inverse, les études utilisant plusieurs cycles de RTX n'ont pas observé de rechute (Ahmed et al., 2009, 2015; Kim et al., 2011), confortant l'hypothèse que de multiples doses permettraient une déplétion plus profonde des LB. La rechute de la maladie est un problème préoccupant et il existe très peu de données associées à des biomarqueurs disponibles sur le plan clinique permettant de la prédire (Albers et al., 2017). Cependant, il a été montré que, suite à une rechute, la ré-administration de RTX pouvait entraîner une amélioration voire une rémission à long terme (Colliou et al., 2013; Kim et al., 2017b). En outre, nous avons constaté que les 5 patients cortico-intolérants traités par le RTX en première ligne étaient en rémission complète durable (Colliou et al., 2013). Lunardon a également constaté que le RTX était plus efficace lorsqu'il était administré tôt dans l'évolution de la maladie (Lunardon et al., 2012).

Ces résultats plaident en faveur d'une utilisation du RTX répété en plusieurs cycles dès les premiers signes de la maladie. Afin de conforter ces observations, notre équipe, sous l'impulsion du Pr Joly, a mené un essai randomisé du traitement de première intention en comparant un schéma thérapeutique de trois cycles d'injections de RTX associé à de

-122-

faibles doses initiales de prednisone au traitement de référence par CS seule chez des patients atteints de pemphigus.

-124-

OBJECTIFS DE THÈSE

Jusqu'à présent, la première ligne de traitement du pemphigus recommandée est constituée de fortes doses de corticoïdes responsables d'effets secondaires graves, voire mortels. Compte tenu de l'efficacité du traitement par RTX chez les patients atteints de pemphigus réfractaires aux GC, démontrée dans l'étude RITUX 1, ainsi que par les quelques études de cas suggérant que son utilisation en tant que traitement de première intention du pemphigus pourrait permettre une réduction rapide des doses de corticostéroïdes, notre équipe, sous la direction du Pr Joly, a mené un essai randomisé ouvert comparant le traitement avec une dose élevée de prednisone administrée seule pendant 12 à 18 mois avec un schéma thérapeutique contenant du RTX administré en plusieurs cycles (à J0, J365 et J545) associé à de faibles doses initiales de prednisone, progressivement réduit en 3 à 6 mois. Les 90 patients inclus dans l'études ont été suivis pendant 24 mois puis à plus long terme lors d'évaluation après 36 et 90 mois.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre de cette étude clinique RITUX 3 comparant le RTX à la CS dans le traitement de première intention du pemphigus. L'objectif est de comparer l'efficacité et l'innocuité des schémas thérapeutiques à court et long terme mais également de comprendre l'impact immunologique des traitements par RTX et par CS afin de mieux appréhender la réponse lymphocytaire impliquée dans la physiopathologie du pemphigus et d'identifier les mécanismes influençant la réponse thérapeutique.

Pour y répondre, nous avons :

 Réalisé un suivi clinico-biologique des patients incluant les dosages sériques des Ac anti-Dsg1 et Dsg3, ainsi que les phénotypages lymphocytaires réalisés au cours du temps et en particulier lors de la reconstitution du répertoire B après RTX.

- Approfondi l'analyses des LB auto-réactifs par une caractérisation phénotypique mais également en développant un test permettant d'évaluer la fréquence des LB capables de sécréter des IgG anti-Dsg par une approche ELISPOT.

 Étudié, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Nicolas Fazilleau, les LT et LT auto-réactifs, et plus spécifiquement les Tfh anti-Dsg3 chez les patients présentant le HLADRB1*0402 de susceptibilité au PV. - Procédé à une analyse des profils d'expression génique cytokiniques des LB autoréactifs et non auto-réactifs en cellule unique et à une évaluation sérologique des cytokines clés impliquées dans la physiopathologie du pemphigus.

- Validé, avec notre cohorte RITUX 3, l'analyse transcriptomique des LB comparant les patients en rémission complète et incomplète de l'étude RITUX 1 à 79 mois après le traitement initial par RTX.

RÉSULTATS

ARTICLE N°1 :

FIRST-LINE RITUXIMAB COMBINED WITH SHORT-TERM PREDNISONE VERSUS PREDNISONE ALONE FOR THE TREATMENT OF PEMPHIGUS (RITUX 3): A PROSPECTIVE, MULTICENTRE, PARALLEL-GROUP, OPEN-LABEL RANDOMISED TRIAL

Joly P., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Prost-Squarcioni C., Hebert V., Houivet E., Calbo S., Caillot F., Golinski M-L., Labeille B., Picard-Dahan C., Paul C., Richard M-A., Bouaziz J-D., Duvert-Lehembre S., Bernard P., Caux F., Alexandre M., Ingen-Housz-Oro S., Vabres P., Delaporte E., Quereux G., Dupuy A., Debarbieux S., Avenel-Audran M., D'Incan M., Bedane C., Bénéton N., Jullien D., Dupin N., Misery L., Machet L., Beylot-Barry M., Dereure O., Sassolas B., Vermeulin T., Benichou J., Musette P and the french study group on autoimmune bullous skin diseases.

Publié dans The lancet

Dans notre première étude clinique « RITUX 1 », nous avons démontré que le RTX, en traitement de deuxième intention, était capable d'induire une rémission complète à deux ans chez 86% des patients atteints de pemphigus sévère. Plusieurs études ont ensuite suggéré l'utilisation du RTX dans le traitement du pemphigus en première intention.

L'objectif de cette étude multicentrique, randomisée, a été de comparer l'efficacité et la tolérance à 24 mois du traitement par RTX (Mabthera[®]) associé à une corticothérapie générale courte par rapport à une CS de longue durée chez les patients atteints de pemphigus.

Les données cliniques et biologiques des patients entre les deux schémas thérapeutiques ont été comparées. Le critère principal de jugement était la proportion de patients ayant obtenu une rémission complète sevrée de tout traitement à 24 mois.

Après 24 mois, 89% des patients du groupe RTX (41/46) étaient en rémission complète sans traitement contre 34% des patients du groupe CS (15/44) (p <0,0001). L'utilisation du RTX en premier intention a permis de réduire d'environ un tiers, la dose cumulée de prednisone administrée. De plus, les patients du groupe RTX ont présenté deux fois moins d'évènements indésirables graves que ceux affectés au groupe CS. Le RTX induit une déplétion des LB totaux et des LB IgG⁺ spécifiques des Dsg entrainant la disparition des Ac anti-Dsg. Ces résultats contrastent avec la persistance des LB spécifiques des Dsg chez les patients du groupe CS et l'augmentation subséquente des taux d'Ac anti-Dsg à partir du douzième mois lorsque les doses de prednisone ont été réduites à moins de 20 mg/jour.

En conclusion, l'utilisation du RTX associée à de la prednisone à court terme en traitement de première intention chez les patients atteints de pemphigus modéré à sévère est à la fois plus efficace et mieux toléré que le traitement de référence par la prednisone seule. L'efficacité du traitement par RTX semble liée à la disparition des LB anti-Dsg IgG⁺.

Articles

First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial

Pascal Joly, Maud Maho-Vaillant, Catherine Prost-Squarcioni, Vivien Hebert, Estelle Houivet, Sébastien Calbo, Frédérique Caillot, Marie Laure Golinski, Bruno Labeille, Catherine Picard-Dahan, Carle Paul, Marie-Aleth Richard, Jean David Bouaziz, Sophie Duvert-Lehembre, Philippe Bernard, Frederic Caux, Marina Alexandre, Saskia Ingen-Housz-Oro, Pierre Vabres, Emmanuel Delaporte, Gaelle Quereux, Alain Dupuy, Sebastien Debarbieux, Martine Avenel-Audran, Michel D'Incan, Christophe Bedane, Nathalie Bénéton, Denis Jullien, Nicolas Dupin, Laurent Misery, Laurent Machet, Marie Beylot-Barry, Olivier Dereure, Bruno Sassolas, Thomas Vermeulin, Jacques Benichou, Philippe Musette, and the French study group on autoimmune bullous skin diseases

Summary

Background High doses of corticosteroids are considered the standard treatment for pemphigus. Because long-term Lancet 2017; 389: 2031-40 corticosteroid treatment can cause severe and even life-threatening side-effects in patients with this disease, we assessed whether first-line use of rituximab as adjuvant therapy could improve the proportion of patients achieving complete remission off-therapy, compared with corticosteroid treatment alone, while decreasing treatment sideeffects of corticosteroids.

Methods We did a prospective, multicentre, parallel-group, open-label, randomised trial in 25 dermatology hospital departments in France (Ritux 3). Eligible participants were patients with newly diagnosed pemphigus aged 18-80 years being treated for the first time (not at the time of a relapse). We randomly assigned participants (1:1) to receive either oral prednisone alone, 1.0 or 1.5 mg/kg per day tapered over 12 or 18 months (prednisone alone group), or 1000 mg of intravenous rituximab on days 0 and 14, and 500 mg at months 12 and 18, combined with a short-term prednisone regimen, 0.5 or 1.0 mg/kg per day tapered over 3 or 6 months (rituximab plus short-term prednisone group). Follow-up was for 3 years (study visits were scheduled weekly during the first month of the study, then monthly until month 24, then an additional visit at month 36). Treatment was assigned through central computer-generated randomisation, with stratification according to disease-severity (severe or moderate, based on Harman's criteria). The primary endpoint was the proportion of patients who achieved complete remission off-therapy at month 24 (intention-to-treat analysis). This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00784589.

Findings Between May 10, 2010, and Dec 7, 2012, we enrolled 91 patients and randomly assigned 90 to treatment (90 were analysed; 1 patient withdrew consent before the random assignment). At month 24, 41 (89%) of 46 patients assigned to rituximab plus short-term prednisone were in complete remission off-therapy versus 15 (34%) of 44 assigned to prednisone alone (absolute difference 55 percentage points, 95% CI 38:4-71.7; p<0:0001. This difference corresponded to a relative risk of success of 2.61 (95% CI 1.71-3.99, p<0.0001), corresponding to 1.82 patients (95% CI 1.39-2.60) who would need to be treated with rituximab plus prednisone (rather than prednisone alone) for one additional success. No patient died during the study. More severe adverse events of grade 3-4 were reported in the prednisone-alone group (53 events in 29 patients; mean 1.20 [SD 1.25]) than in the rituximab plus prednisone group (27 events in 16 patients; mean 0.59 [1.15]; p=0.0021). The most common of these events in both groups were diabetes and endocrine disorder (11 [21%] with prednisone alone vs six [22%] with rituximab plus prednisone), myopathy (ten [19%] vs three [11%]), and bone disorders (five [9%] vs five [19%]).

Interpretation Data from our trial suggest that first-line use of rituximab plus short-term prednisone for patients with pemphigus is more effective than using prednisone alone, with fewer adverse events.

Funding French Ministry of Health, French Society of Dermatology, Roche.

Introduction

Pemphigus is a life-threatening autoimmune blistering disease affecting the skin and mucosa.1-5 It is mediated by pathogenic autoantibodies directed against the desmoglein 1 and desmoglein 3 adhesion molecules of the epidermis that are responsible for the cohesion

between keratinocytes in the skin and mucosa.6-8 High doses of systemic corticosteroids are considered the standard treatment for patients with pemphigus,910 and little evidence supports the use of conventional immunosuppressants as first-line treatment of this disease.11-15



Published Online March 22, 2017 http://dx.doi.org/10.1016/ \$0140-6736(17)30070-3 See Comment page 1956

Department of Dermatology,

Rouen University Hospital and INSERM U1234, Centre de référence des maladies bulleuses autoimmunes, Normandie University, Rouen, France (Prof P Joly MD, M Maho-Vaillant PhD, V Hebert MD, S Calbo PhD, F Caillot PhD, M L Golinski PhD, S Duvert-Lehembre MD, Prof P Musette MD); Department of Dermatology, University of Paris XIII, Bobigny, France (Prof C Prost-Squarcioni MD, Prof F Caux MD, M Alexandre MD); Department of Biostatistics, Rouer University Hospital and INSERM U1219, Normandie University, Rouen, France (E Houivet MS, Prof Jacques Benichou MD); Department of Dermatology. University of Saint Etienne, Saint Etienne, France (Prof B Labeille MD): Department of Dermatology of Bichat Hospital, University of Paris X, Paris, France (C Picard-Dahan MD); Department of Dermatology, University of Toulouse, Toulouse, France (Prof C Paul MD); Department of Dermatology, Assistance Publique des Hopitaux de Marseille, Aix Marseille University, UMR 911, INSERM CRO2, Marseille, France (Prof M-A Richard MD): Department of Dermatology of St Louis Hospital, Paris 7 Sorbonne Paris Cité University,

Paris, France

(Prof J D Bouaziz MD); Department of Dermatology, University of Reims, Reims, France (Prof P Bernard MD); Department of Dermatology, APHP, Henri Mondor Hospital, Créteil, France (S Ingen-Housz-Oro MD); Department of Dermatology Dijon University Hospital, Dijon, France (Prof P Vabres MD); Department of Dermatology, University of Lille, Lille, France (Prof E Delaporte MD); Department of Dermatology, University of Nantes, Nantes, France (Prof G Quereux MD); Department of Dermatology, University of Rennes, Rennes, France (Prof A Dupuy MD); Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon Sud; Pierre Bénite, Lyon, France (S Debarbieux MD); Department of Dermatology, University of Angers, Angers, France (M Avenel-Audran MD); Department of Dermatology, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France (Prof M D'Incan MD); Department of Dermatology, University of Limoges, Limoges, France (Prof C Bedane MD); Department of Dermatology, Le Mans General Hospital, Le Mans, France (N Bénéton MD); Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, Lyon Claude Bernard University, Lyon (Prof D Jullien MD); Department of Dermatology, University of Paris V, Paris, France (Prof N Dupin MD); Department of Dermatology, Brest University Hospital, Brest, France (Prof L Misery MD); Department of Dermatology, Tours University Hospital, Tours, France (Prof L Machet MD); Department of Dermatology, University of Bordeaux, Bordeaux, France (Prof M Beylot-Barry MD); Department of Dermatology, University of Montpellier, Montpellier, France (Prof O Dereure MD); Department of Internal Medicine, Brest University Hospital, Brest, France

(B Sassolas MD); and Department of Medical Information and Informatics, Rouen University Hospital, Rouen, France (T Vermeulin MD)

Research in context

Evidence before this study

Pemphigus is a life-threatening autoimmune blistering disease affecting the skin and mucosa. The combination of high doses of systemic corticosteroids and conventional immunosuppressive drugs, mostly azathioprine and mycophenolate mofetil, is regarded as standard treatment for severe cases of pemphigus. However, only 50% of patients achieve complete remission off-therapy. Many patients relapse and require a maintenance corticosteroid therapy, leading to high cumulative doses of corticosteroids and accompanying side effects. We searched PubMed for articles published from 2002-2015 with the terms "pemphigus" and "rituximab". We identified more than 400 patients with severe types of pemphigus refractory to conventional immunosuppressive drugs, who were treated with rituximab as second-line or third-line treatment. A few studies compared the first-line use of adjuvant immunosuppressive drugs as steroid-sparing agents versus placebo. Unfortunately, none of the findings from these studies showed a clear beneficial effect from the addition of conventional immunosuppressants to corticosteroids alone. High rates of short-term complete remission between 70% and 80% were reported with good tolerance, but with a 30%-60% relapse rate. Given this high efficacy of rituximab in the refractory type of pemphigus, results from a few case reports have suggested that its use as first-line treatment in pemphigus might permit rapid tapering of corticosteroid doses. Because long-term corticosteroid treatment is responsible for severe and even life-threatening side-effects in patients with pemphigus, we did a randomised trial comparing treatment with a high dose of prednisone alone given for 12 to 18 months with a regimen of rituximab plus

Rituximab, a monoclonal antibody directed against the CD20 antigen of B-lymphocytes, has been shown to be effective in severe types of pemphigus.²⁰⁻³¹ Findings from some uncontrolled case series have suggested that the use of rituximab as first-line treatment of pemphigus permits rapid tapering of corticosteroid doses.^{21,32-35} Because long-term corticosteroid treatment is responsible for severe and even life-threatening sideeffects in patients with pemphigus,36-38 we did a randomised trial comparing a standard corticosteroid regimen of high-dose prednisone given for 12 to 18 months with a regimen of rituximab plus lower initial doses of prednisone, rapidly tapered over 3 to 6 months. The aim of our study was to assess whether the regimen of rituximab plus short-term prednisone could substantially improve the number of patients with pemphigus who achieved long-term complete remission off-therapy, and enable a decrease in cumulative doses of prednisone and a reduction of severe treatment adverse events, compared to prednisone alone.

lower initial doses of prednisone, rapidly tapered over 3 to 6 months. Our aim was to assess whether first-line rituximab plus short-term prednisone could substantially improve the occurrence of long-term complete remission off-therapy in patients with pemphigus, while allowing a decrease in cumulative doses of prednisone and a reduction of severe treatment adverse events, compared with prednisone alone.

Added value of this study

This is the first trial of patients with pemphigus that compared a regimen of high doses of corticosteroids alone with a regimen of rituximab plus low dose of corticosteroids. The findings showed that first-line use of rituximab with short-term prednisone resulted in an increase in achievement of complete remission off-therapy at month 24 of almost three times compared with a corticosteroid-alone regimen. Additionally, median cumulative duration of complete remission-off-therapy was more than seven times higher in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone. Patients in the rituximab plus short-term prednisone group also took about one-third of the prednisone cumulative dose that the corticosteroid-alone group took, and had about half as many severe adverse events.

Implications of all the available evidence

Data from our trial suggest that a regimen of rituximab plus low dose corticosteroids could be used as first-line treatment in patients with moderate to severe pemphigus. The regimen is highly effective, allows rapid tapering of corticosteroids, and causes fewer treatment adverse events than a regimen using corticosteroid doses alone.

Methods

Study design and participants

We did a prospective, multicentre, parallel-group, openlabel, randomised trial in 25 dermatology hospital departments in France (Ritux 3). The Ethics Committee (CPP Nord-Ouest1) approved the study. The references of the trial (ClinicalTrials.gov number, NCT00784589) and full protocol are in the appendix.

We recruited consecutive patients with newly diagnosed pemphigus aged between 18 and 80 years if they fulfilled the following criteria: clinical features suggestive of pemphigus vulgaris or pemphigus foliaceus; a histological image of intraepidermal acantholysis; and deposition of IgG, complement component 3, or both on the keratinocyte membrane detected by direct immunofluorescence.¹³ All patients were treated for the first time, and none was recruited into the study at the time of a relapse. Patients were refered to the dermatology departments participating in the study by dermatologists, stomatologists, or general practitioners.

Correspondence to: Professor Pascal Joly,

Clinique Dermatologique.

Rouen University Hospital.

Pascal.lolv@chu-rouen.fr

See Online for appendix

76031 Rouen, France

Exclusion criteria are listed in the appendix. Classification of pemphigus severity was based on Harman's criteria¹⁹ since no threshold differentiating moderate from severe pemphigus was available at the time the study was designed, whether for the Pemphigus Disease Area Index (PDAI) or Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) scores.^{40,41} Severe pemphigus was defined as skin involvement of more than 5% of the body surface area, or significant mucosal involvement defined as more than ten mucosal erosions, or involvement of two or more mucosal sites. All patients provided written informed consent.

Randomisation

We randomly assigned participants (1:1) to either a corticosteroid-alone regimen using high initial doses of prednisone which were tapered over 12 to 18 months, or rituximab plus a short-term corticosteroid regimen using reduced initial doses of prednisone with rapid tapering over 3 to 6 months. Since the prednisone doses and their tapering differed between the two groups, the study was not masked. We assigned treatment through central computer-generated randomisation, with stratification on disease severity (severe or moderate). The sequence was generated by the Department of Biostatistics. Inclusion of patients was notified by investigators to the sponsor by fax. The administrative staff of the sponsor (Department of clinical research of the Rouen University Hospital) noted the randomisation on the fax and sent it back to the investigators.

Procedures

Patients in the rituximab plus short-term prednisone group received intravenous rituximab (provided by Roche) at a fixed 1000 mg dose on days 1 and 14 after randomisation, then 500 mg at months 12 and 18. Additionally, they took oral prednisone (Cortancyl) once per day at an initial dosage of 0.5 mg/kg per day for moderate pemphigus and 1.0 mg/kg per day for severe pemphigus. The initial prednisone dose was maintained for 1 month and thereafter gradually reduced after achievement of disease control, with the aim to stop prednisone after 3 months in patients with moderate pemphigus. Disease control was defined as the time at which new lesions ceased to form and established lesions began to heal.⁴²

Patients randomly assigned to the prednisone-alone group received an initial dose of prednisone of 1.0 mg/kgper day for moderate pemphigus and 1.5 mg/kg per day for severe pemphigus. The initial dose of prednisone was maintained for 1 month, and thereafter gradually tapered in patients who achieved disease control to stop prednisone after 12 months in patients with moderate pemphigus and after 18 months in patients with severe pemphigus. The protocol for tapering prednisone doses and for treatment of relapses is in the appendix. During the entire study period, no other therapy expected to be active for pemphigus was allowed. In both treatment groups, investigators were allowed to stop treatment if a very severe or life-threatening side-effect occurred, or if a flare of pemphigus was not controlled despite the successive incremental increases in prednisone doses as scheduled in the protocol. Follow-up was initially planned for 2 years but to assess the rate of relapse after the last infusion of rituximab at month 18, we extended the follow-up to 3 years (this protocol amendment was made on April 17, 2014).

Study visits were scheduled weekly during the first month of treatment and then monthly until month 24. An additional visit was subsequently scheduled at month 36. At each study visit, prednisone dose as well as PDAI, ABSIS, and Physician Global Assessment (PGA) pemphigus severity scores (descriptions for all in the appendix) were recorded.^{40,41} The Dermatology Quality of Life Index (DLQI) and Skindex quality of life scores were recorded at baseline and months 3, 6, 9,12, 18, and 24.^{42,43} Blood samples were collected at each study visit. Serum anti-desmoglein 1 and 3 antibodies were measured by ELISA, and blood CD19 B-lymphocytes, and desmogleinspecific B-lymphocytes were analysed as detailed in the appendix.

Outcomes

The primary endpoint was the proportion of patients who achieved complete remission off-therapy at month 24, defined as the absence of new or established lesions while the patient had been off corticosteroids for at least 2 months.⁴⁴ Secondary endpoints were: the proportion of patients who achieved complete remission on minimum therapy at month 24;⁴¹ delay to achievement of complete remission off-therapy; cumulative duration of complete remission off-therapy during the study; relapse occurrence; cumulative dose of prednisone during the study; time change of DLQI and Skindex quality of life scores; concentration of desmoglein-specific B-lymphocytes and desmoglein-specific antibodies at months 12 and 24; and occurrence of severe treatment adverse events (grade 3 or 4, or death from any cause).⁴⁵

Statistical analysis

From our preliminary studies and the scientific literature, ^{1,1,1,5,21} we postulated that the proportion of patients in complete remission off-therapy at month 24 would increase from 40% with corticosteroids alone to 70% with rituximab plus short-term-prednisone. To achieve 80% power relative to this difference for Pearson's χ^2 test at the two-sided 0.05 level and allowing for 5% dropouts, 90 patients (2×45) were required for enrolment. Analyses were based on the intention-to-treat principle. Patients who withdrew from the study were considered as not having reached complete remission off-therapy at month 24. Proportions of patients achieving



Figure 1: Trial profile

Eight of the 12 patients who withdrew from the prednisone-alone group were secondarily treated with rituximab.

complete remission off-therapy at month 24 were compared between the two treatment groups using Pearson's χ^2 test. Absolute rate differences and numbers needed to treat (NNT) were estimated with corresponding 95% CIs. This crude comparison was complemented by a comparison adjusting for sex or PDAI score based on the log-binomial regression model (PROC GENMOD) with the COPY method,46 from which adjusted relative risks (RR) of complete remission off-therapy at month 24 and their 95% CI were estimated. The COPY method allows improved convergence of the log-binomial model by appending a large number of copies of the original dataset to the original dataset, switching the outcome for every observation in one of these copies, and fitting the model to this enlarged dataset. We adjusted for the PDAI rather than the ABSIS or PGA scores, since it results from an international consensus and is the only validated score.⁴¹

Analysis of dichotomous endpoints other than the primary endpoint (complete remission off-therapy at

month 24) relied on the same methods, except that we did no adjustments. Namely, we used Pearson's χ^2 test to compare observed proportions with endpoints (eg, complete remission on-minimal therapy at month 24) between the two treatment groups, and we estimated the RR of observing the endpoint with corresponding 95% CI from unadjusted log-binomial regression. For survivaltype endpoints (eg, disease-free survival), we estimated survival distributions from Kaplan-Meier's method; comparisons between treatment groups relied on the logrank test. We estimated hazard ratios and corresponding 95% CIs from Cox regression. For quantitative endpoints (eg, cumulative dose of prednisone), comparisons between treatment groups relied on Student's t-test or Mann-Whitney's non parametric test as appropriate. For quantitative outcomes with repeated measurements over time (eg, DLQI or Skindex scores), we used a mixed linear model incorporating treatment as a fixed effect and time as a random effect. All statistical tests used the two-sided 0.05 level as their significance threshold. For quantitative variables, we reported means (SD) or median (range) or IQR. NThe study was not overseen by a data monitoring committee. We did all analyses with SAS (version 9.3). This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00784589.

Role of the funding source

The funder of the study provided the rituximab and partly funded the extension of the follow-up period of the study, but had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Between May 10, 2010, and Dec 7, 2012, we enrolled 91 patients the study. One patient withdrew their consent before randomisation, leaving 90 patients randomly assigned to treatment (46 to rituximab plus short-termprednisone and 44 to prednisone alone (figure 1). 74 (82%) of 90 patients in total had pemphigus vulgaris. Mean weight loss before treatment in the 71 (79%) patients who had oral (mucosal) lesions was 6.7 kg (SD 4.5). The two groups were well balanced except for sex and for PDAI score (table 1), which was higher in patients assigned to prednisone alone than in those assigned to rituximab plus short-term prednisone (p=0.0275). Median follow-up for all participants was 729 days (IQR 711–744) and that for patients who did not withdraw from the study was 733 days (727–749 days).

At month 24, 41 (89%) of 46 patients assigned to rituximab plus short-term-prednisone were in complete remission off-therapy versus 15 (34%) of 44 patients assigned to prednisone (absolute difference 55 percentage points, 95% CI 38.4–71.7; p<0.0001. This difference corresponded to an RR of success of 2.61 (95% CI

1.71-3.99; p<0.0001) translating to an NNT of 1.82 patients (95% CI 1.39-2.60); ie, 1.82 patients would need to be treated with rituximab plus short-term prednisone rather than prednisone alone to obtain one additional success.

After adjusting for sex or baseline PDAI score, a strong beneficial effect of rituximab was still evident with an RR of complete remission off-therapy of 2.66 (95% CI 1.73-4.07; P<0.0001) and 2.55 (1.41-3.69; p<0.0001), respectively. In the subgroup of patients with pemphigus vulgaris, 34 (89%) of 38 patients assigned to rituximab plus short-term prednisone group were in complete remission off-therapy at month 24 compared with ten (28%) of 36 patients assigned to prednisone alone (absolute difference 61.7 percentage points, 95% CI 44·1-79·3; p<0·0001). The NNT was 1·62 patients (95% CI 1.26 -2.27), unadjusted RR was 3.22 (95% CI 1.88-5.52; p<0.0001), RR adjusted for sex was 3.24 (1.89-5.57; p<0.0001), and RR adjusted for PDAI score was 3.00 (1.38-4.63; p<0.0001). At month 24, no patient in the rituximab plus short-term prednisone group and one patient in the prednisone-alone group were in complete remission and still receiving minimum therapy. Five patients (11%) assigned to rituximab plus short-term prednisone and 28 patients (64%) assigned to prednisone-alone still had active lesions at month 24, or had no lesions but still took a prednisone dose higher than 10 mg/day (RR 2.45; 95% CI 1.64-3.67; p<0.0001)

Median delay to achieve complete remission off-therapy was 677 days (range 420-713, IQR 577-687) with prednisone alone and 277 days (177-751) with rituximab plus short-term prednisone (p<0.0001). Kaplan-Meier estimates showed that patients in the rituximab plus short-term prednisone group had a higher cumulative probability of achieving complete off-therapy during the study than patients in the prednisone-alone group (figure 2). Median cumulative duration of complete remission off-therapy during the study was more than seven times higher in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone: 446 days (range 0-567, IQR 401-475), than in those assigned to prednisone-alone: 62 days (range 0-608 days, IQR 49-178; p<0.0001). At month 24, relapse had occurred in 11 patients (24%) assigned to rituximab plus short-term prednisone (four [9%] severe, seven [15%] moderate) including three patients who relapsed twice, and 20 patients (45%) assigned to prednisone alone (five [11%] severe, 15 [34%] moderate) including seven patients who relapsed twice and two patients who relapsed three times. More relapses occurred in the prednisone-alone group than in the rituximab plus short-term prednisone group; the proportion of participants who achieved 2-year disease-free survival were 36.7% (95% CI 14.5-59.5) with prednisone-alone versus 75.4% (59.9-85.5; p=0.0191; figure 3). During the third year of follow-up, a relapse occurred in one (2%) of the 41 patients who were in complete remission offtherapy at month 24 in the rituximab plus short-term

	Prednisone alone (n=44)	Rituximab plus short-term prednisone (n=46)
Age (years)	53.1 (13.8)	53.5 (16.2)
Sex		
Female	19 (43%)	31 (67%)
Male	25 (57%)	15 (33%)
Pemphigus subtype		
Vulgaris	36 (82%)	38 (83%)
Foliaceus	8 (18%)	8 (17%)
Severity of pemphigus (by Harman's criteria)		
Moderate	5 (11%)	6 (13%)
Severe	39 (89%)	40 (87%)
ABSIS score*	43.6 (24.1)	34-4 (20-6)
PDAI score (scale ranges from 0 to 250 points)†	46-0 (23-7)	33-5 (28-1)
PGA score‡	6-9 (1-4)	6-4 (1-6)
Quality of life		
Skindex score§	60-3 (23-7)	54-4 (24-3)
DLQI score¶	11-6 (7-0)	10-2 (6-4)
Duration of mucosal lesions (days)	83.0 (41.0-127.5)	112-5 (42-5-186-5)
Duration of cutaneous lesions (days)	83.5 (43.0-206.5)	105-0 (37-5-215-5)

Data are mean (SD), n (%), or median (IQR). ABSIS=Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score. PDAI=Pemphigus Disease Area Index. PGA=Physician Global Assessment. DLQI=Dermatology Quality of Life Index. *40 in the prednisone alone group, 45 in the rituximab plus prednisone group, 142 in the prednisone alone group, 45 in the rituximab plus prednisone group, 142 in the prednisone group, 53 in the prednisone alone group, 38 in the rituximab plus prednisone group, 38 in the rituximab plus prednisone group, 38 in the rituximab plus prednisone group, 138 in the prednisone alone group, 136 in the rituximab plus prednisone group, 38 in the rituximab plus prednisone group, 39 in the rituximab plus prednisone group, 38 in the rituximab plus prednisone group.

Table 1: Baseline characteristics of the intention-to-treat population



Figure 2: Cumulative probability of achieving complete remission off-therapy.

Kaplan-Meier estimates of the cumulative probability of achieving a first episode of complete remission off-therapy during the study. *One patient in the prednisone-alone group and two patients in the rituximab plus short-term prednisone group who achieved complete remission off-therapy during the study further relapsed during the follow-up, and were no longer in complete remission off-therapy at month 24. Three patients in the rituximab group had their month-24 assessment a few days after day 720 and were not considered as being in complete remission off-therapy on this curve.

prednisone group and in four (27%) of the 15 patients who were in complete remission off-therapy at month 24 in the prednisone-alone group.



Figure 3: Clinical and biological response to treatment

Kaplan-Meier estimates of disease-free survival (panel A); evolution of prednisone doses (mg/day; panel B); and anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 antibody ELISA values (panels C and D) of patients with pempigus according to treatment regimen. Red line=patients treated with prednisone alone. Blue line=patients treated with rituximab plus short-term prednisone. Arrows indicate when rituximab infusions were done. *Ten relapse-free patients in the prednisone-alone group and 12 in the rituximab plus short-term prednisone group had their month-24 visit at a mean time of 14·8 days (SD 11·5) and 13·6 days (9·5) before day 730. The dashed line in panels C and D represents the cutoff values proposed by the manufacturer for anti-desmoglein 1 and 3 antibodies. Patients assigned to rituximab plus short-term prednisone took a third of the cumulative dose of prednisone during the study compared with patients assigned to prednisone-alone: $6143 \cdot 1 \text{ mg}$ (SD 2411) versus $17973 \cdot 6 \text{ mg}$ (7 272 $\cdot 5 \text{ mg}$; p<0.0001). The DLQI and Skindex scores showed greater improvements in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone compared with those assigned to prednisone alone (appendix; p=0.0411 and p=0.0137, respectively).

No patients died during the study. 14 patients withdrew from the study: two in the rituximab plus short-term prednisone group (reasons were pregnancy [n=1] and treatment failure [n=1]) and 12 in the prednisone-alone group (reasons were treatment failure [n=4], treatment adverse events [n=8] including severe myopathy [n=2], septic arthritis [n=1], hip osteonecrosis [n=1], psychosis [n=1], chorioretinitis [n=1], 25 kg weight gain [n=1], and cardiac failure [n=1]). More severe adverse events of grade 3-4 were reported in the prednisone-alone group (53 events in 29 patients; mean 1.20 [SD 1.25]) than in the rituximab plus prednisone group (27 events in 16 patients; mean 0.59 [1.15]; p=0.0021; table 2). The most common of these events in both groups were diabetes and endocrine disorder (11 [21%] with prednisone alone vs six [22%] with rituximab plus prednisone), myopathy (ten [19%] vs three [11%]) and bone disorders (five [9%] vs five [19%]).

Total and desmoglein-specific B-lymphocytes disappeared in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone (appendix), whereas their concentrations remained unchanged until the end of the study in patients from the prednisone-alone group. Accordingly, antidesmoglein antibodies that initially decreased from treatment initiation to month 12 in both treatment groups later reincreased from month 12 to month 24 in patients treated with prednisone alone, whereas they remained at low concentrations in patients treated with rituximab plus short-term prednisone (figure 3; appendix). This result was also in accordance with the occurrence of 13 relapses in patients from the prednisone-alone group between months 12 and 24 when prednisone doses were tapered to less than 20 mg/day, whereas only three relapses were noted during this period in patients treated with rituximab plus short-term prednisone.

Discussion

The results from our study show that first-line use of rituximab plus a short prednisone regimen was more effective than prednisone alone for patients with pemphigus on all primary and secondary endpoints. Despite the study not being powered to detect a difference for pemphigus subtypes, the beneficial effect of rituximab was observed not only in pemphigus patients as a whole, but also in patients with the subtype pemphigus vulgaris, which is often considered to be a more severe condition than the other subtype pemphigus foliaceus. We chose

	Total (n=80)	Prednisone alone (n=53)	Rituximab plus short-term prednisone (n=27)
Lung infection	4 (5%)	1 (2%)	3 (11%)
Pneumonia	4 (5%)	1 (2%)	3 (11%)
Various infections	6 (8%)	4 (8%)	2 (7%)
Septicaemia	1(1%)	0	1(4%)
Septic arthritis	1 (1%)	1 (2%)	0
Urinary tract infection	1(1%)	1 (2%)	0
Severe cutaneous herpes	1 (1%)	1 (2%)	о
Spondylodiscitis	1(1%)	0	1 (4%)
Chorioretinitis	1 (1%)	1 (2%)	0
Ocular disorders	2 (3%)	2 (4%)	0
Cataract	2 (3%)	2 (4%)	0
Cardiovascular disorders*	10 (13%)	7 (13%)	3 (11%)
Angina	1 (1%)	1 (2%)	0
Myocardial infarction	1 (1%)	1 (2%)	0
Deep vein thrombosis	2 (3%)	1 (2%)	1 (4%)
Pulmonary embolism	4 (5%)	3 (6%)	1 (4%)
Cardiac failure	2 (3%)	1 (2%)	1 (4%)
Psychiatric disorders	6 (8%)	4 (8%)	2 (7%)
Delirium	1 (1%)	1(2%)	0
Depression	4 (5%)	2 (4%)	2 (7%)
Psychosis	1 (1%)	1(2%)	0
Bone disorders†	10 (13%)	5 (9%)	5 (19%)
Femur fracture	1 (1%)	0	1(4%)
Vertebra fracture	4 (5%)	2 (4%)	2 (7%)
Wrist fracture	2 (3%)	1(2%)	1(4%)
Rotator cuff rupture	1 (1%)	0	1(4%)
Cauda equina syndrome	1 (1%)	1 (2%)	0
1 1			

high doses of prednisone as the standard-regimen, since no trials in the literature showed a clear beneficial effect from the addition of conventional immunosuppressants to corticosteroids alone.¹¹⁻¹⁹ Additionally, the findings from some of these studies showed a higher rate of treatmentadverse events in patients with the combined treatment. Initial treatment with rituximab resulted in a 2.6-fold increase in the proportion of patients achieving complete remission off-therapy at month 24 compared with those treated with prednisone alone. This beneficial effect of the rituximab plus short-term prednisone regimen was still apparent after adjusting for sex and baseline PDAI score, since the RR of complete remission off-therapy did not vary significantly after adjustment. Importantly, the addition of rituximab permitted the rapid tapering of prednisone doses, since about 60% of patients receiving this treatment were able to stop prednisone after 6 months of treatment, resulting in a seven-fold higher duration of

	Total (n=80)	Prednisone alone (n=53)	Rituximab plus short-term prednisone (n=27)
(Continued from previous	column)		
Neurological disorders	3 (4%)	3 (6%)	0
Transient ischaemic attack	1 (1%)	1 (2%)	0
Stroke	1 (1%)	1 (2%)	0
Sciatica	1 (1%)	1 (2%)	0
Myopathy	13 (16%)	10 (19%)	3 (11%)
Major weight gain (>10 kg)	4 (5%)	4 (8%)	0
Diabetes and endocrine disorder‡	17 (21%)	11 (21%)	6 (22%)
Diabetes mellitus requiring insulin	2 (3%)	2 (4%)	0 (<1%)
Cushing syndrome	14 (18%)	8 (15%)	6 (22%)
Adrenal insufficiency	1 (1%)	1(2%)	0
Electrolyte disorder	1 (1%)	1(2%)	0
Hypokalaemia with cardiac arrhythmia	1 (1%)	1(2%)	0
Hepatic disorder	1 (1%)	0	1(4%)
Liver cytolysis	1 (1%)	0	1(4%)
Cutaneous or ear, nose, and throat disorders	3 (4%)	1(2%)	2 (7%)
Major skin atrophy	2 (3%)	0	2 (7%)
Ear, nose, or throat carcinoma	1(1%)	1(2%)	0

*Myocardial infarction, cardiac failure or pulmonary embolism. †Data include both clinically apparent fractures and vertebral fractures visible on radiography. ‡Only patients with diabetes requiring insulin were included in the analysis.

Table 2: Grade 3-4 severe treatment adverse events according to assigned treatment group

complete remission off-therapy during the study compared with patients receiving prednisone alone. Additionally, patients assigned to rituximab plus shortterm prednisone had fewer severe adverse events than those assigned to prednisone alone, which was probably because of lower cumulative doses of prednisone used in the rituximab group during the study.

The fact that patients in the rituximab plus prednisone group did not have more infections than patients treated with prednisone alone, whereas circulating B-lymphocytes were no longer detectable in the rituximab-containing group, is probably because of the persistence of antiinfectious antibodies that are secreted by plasma cells not targeted by anti-CD20 therapy.³⁰ Rituximab might be effective in reducing the costs associated with the treatment of pemphigus,⁴⁷ especially relative to the use of intravenous immune globulins.⁴⁸ Despite the fact that comparisons of costs were not part of the trial, we retrospectively estimated the cost of both treatments, since reimbursement of rituximab is a major concern in clinical practice. We estimated in the present study that the overcost of the first-line use of rituximab was about €5500 per patient, which was was counterbalanced by a major reduction in the cumulative doses of prednisone, and more importantly, in the number of severe and life-threatening treatment adverse events.

Our trial had some limitations. First, it was not blinded, since the tapering of prednisone doses differed between the two treatment groups. Indeed, the same rapid tapering of prednisone in both groups would have allowed the use of a placebo for rituximab in the prednisone-alone group, but would have induced an unethical and artificially high number of relapses in this group, not corresponding to the standard of care for pemphigus patients. Additionally, the use of a placebo for rituximab with two different regimens of corticosteroid tapering would have been impractical in such a multicentre study. In particular, the absence of blinding might have influenced investigators in their decision to withdraw 12 patients from the prednisone-alone group, whereas only two patients withdrew from the rituximabcontaining group. Indeed, eight of the 12 patients who withdrew from the prednisone-alone group were secondarily treated with rituximab allowing a rapid decrease in prednisone doses. This decrease might be partly responsible for the absence of deaths in our study, whereas the reported 2-year mortality rate of pemphigus predicted the occurrence of between 12 and 15 deaths.5.37

Second, one of the four scoring systems used, the PDAI score, was slightly higher in patients from the prednisonealone group at baseline than in those receiving rituximab plus short-term prednisone. However, we believe that this small intergroup difference corresponding to about 5% of the scale of this scoring system was unlikely to constitute a bias that might explain the major therapeutic effect observed in this study. This is also suggested by the fact that the RRs of treatment success were almost the same after adjusting for the baseline PDAI score, irrespective of the population considered: all pemphigus patients or patients with pemphigus vulgaris only. Although patients from this study who were classified as moderate pemphigus using Harman's criteria fitted with the moderate subgroup defined by proposed thresholds on the PDAI score,48 the severe subgroup in our study corresponded to a combination of significant and extensive pemphigus on the PDAI score. Third, despite the fact that the primary endpoint was assessed after a long 2-year follow-up, one could argue that this assessment was close to the last maintenance infusion of rituximab at month 18. This timing of the last infusion is why we prolonged the follow-up of patients to month 36, which showed a low proportion of patients having a relapse after the last infusion of rituximab, suggesting a long-lasting beneficial effect of these maintenance infusions. The 500 mg dose of rituximab used for maintenance, and the time intervals between infusions, were somewhat arbitrary, although rather similar to those used in antineutrophil cytoplasmic

autoantibodies-associated vasculitis.⁴⁰ The occurrence of eight of the 11 relapses in the rituximab plus short-term prednisone group from month 6 to month 12, as well as a reincrease of total and desmoglein-specific blood B-lymphocytes and circulating anti-desmoglein anti bodies during this interval suggest that the first maintenance infusion of rituximab might have been of more value if done at month 6 instead of month 12. Finally, because of the few patients with moderate pemphigus in our study, the indication of a first-line treatment with rituximab combined with 3 months of corticosteroids remains uncertain in these patients.

The striking improvement in the patients' condition in the rituximab plus short-term prednisone group paralleled the long-lasting disappearance of desmogleinspecific circulating B-lymphocytes and consequently, anti-desmoglein antibodies. These findings contrast with the persistence of desmoglein-specific B-lymphocytes in patients from the prednisone-alone group and the subsequent increase of anti-desmoglein antibodies from month 12 when prednisone doses were tapered to less than 20 mg/day, which was probably responsible for the high number of relapses in patients in the prednisonealone group. These findings also contrast with the reincrease of anti-desmoglein antibodies after month 6 in our initial study,³⁰ in which patients were treated with one cycle of rituximab without maintenance infusions. They provide a biological rationale for maintenance infusions of rituximab to maintain a prolonged failure of anti-desmoglein antibodies to minimise the occurrence of relapse after the initial cycle. The cost and potential risk of repeated maintenance infusions of rituximab might argue for an as-needed strategy based on biomarkers which would parallel disease activity. Unfortunately, only anti-desmoglein 1, but not antidesmoglein 3 serum antibodies, are correlated with the evolution of skin and mucosal lesions, respectively.

In conclusion, first-line use of rituximab combined with short-term prednisone in patients with moderate to severe pemphigus is both more effective and safer than a regimen of prednisone alone. It allows a rapid tapering of corticosteroid doses and causes fewer treatment adverse events; these results are probably related to the striking and long-lasting disappearance of antidesmoglein B-cell responses.

Contributors

This trial was designed by the principal investigator (PJ) who also drafted and wrote the manuscript. The investigators designed and undertook the study. PJ and PM were involved in the study conception and design. EH and JB were involved in statistical analysis. MM-V, SC, FC, MLG, and PM were involved in biological and immunological analysis. VH, CP, BL, CP-D, CP-S, M-AR, JDB, SDL, PB, FC, MA, SI-H-O, PV, ED, GQ, AD, SD, MA-A, MD'I, CB, NB, DJ, ND, LMi, LMa, MB-B, OD, and BS were involved in patients enrolment. PJ, JB and PM were involved in the writing of the report. TV was involved in the cost estimation of the study. All authors (except EH, JB, and TV) were involved in clinical or immunological data aquisition. All authors contributed to the critical review and comments an approved the final draft.

Declaration of interests

PJ is consultant for Roche, GSK, Lilly, Principabio, Sanofi Aventis. PM is consultant for Servier and the Singapore Immunology Network. DJ is consultant for Abbvie, Celgen, Novartis, Lilly, Janssen Cilag, Pfizer, and Merck Sharpe & Dohme. All other authors declare no competing interests.

Acknowledgments

The study was supported by a grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, French Ministry of Health (No 2008-005266-31), and a grant from the French Society of Dermatology. We thank Jean Claude Roujeau, and Jean Claude Guillaume for their help in designing the study, Michael Hertl and Rudiger Eming (Marburg Germany) who provided the recombinant desmoglein 1 and 3, Vincent Ferranti and Natacha Colliou for technical assistance, Rob Stern for commenting on the results, and Nikki Sabourin-Gibbs for her help with editing the manuscript.

References

- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; 67: 869–77.
- Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest 1989; 83: 1443–48.
- 3 Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med 1982; 306: 1189–96.
- 4 Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. N Engl J Med 2006; 355: 1800–10.
- 5 Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 337: a180.
- 6 Wu H, Wang ZH, Yan A, et al. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. N Engl J Med 2000; 343: 31–35.
- 7 Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. J Clin Invest 2006; 116: 1159–66.
- 8 Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12855–60.
- 9 Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update. Drugs 2015; 75: 271–84.
- 10 Lever WF, Goldberg HS. Treatment of pemphigus vulgaris with methotrexate. Arch Dermatol 1969; 100: 70–78.
- 11 Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Cochrane Database Syst Rev 2009; 21: CD006263.
- 12 Atzmony L, Hodak E, Leshem YA, et al. The role of adjuvant therapy in pemphigus: a systematic review and meta-analysis. J Am Acad Dermatol 2015; 73: 264–71.
- 13 Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, et al. Pemphigus. S2 guideline for diagnosis and treatment–guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). J Eur Acad Dermatol Venereol 2015; 29: 405–14.
- 14 Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2041–48.
- 15 Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D. Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012; 26: 855–60.
- 16 Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooh M, et al. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol 2007; 57: 622–28.
- 17 Sharma VK, Khandpur S. Evaluation of cyclophosphamide pulse therapy as an adjuvant to oral corticosteroid in the management of pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2013; 38: 659–64.
- 18 Chrysomallis F, Ioannides D, Teknetzis A, Panagiotidou D, Minas A. Treatment of oral pemphigus vulgaris. Int J Dermatol 1994; 33: 803–07.

- 19 Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. Arch Dermatol 2000; 136: 868–72.
- 20 Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. N Engl J Med 2006; 355: 1772–79.
- 21 Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. N Engl J Med 2007; 357: 545–52.
- 22 Kim JH, Kim YH, Kim MR, Kim SC. Clinical efficacy of different doses of rituximab in the treatment of pemphigus: a retrospective study of 27 patients. Br J Dermatol 2011; 165: 646–51.
- 23 Matsukura S, Knowles SR, Walsh S, Shear NH. Effect of a single-cycle alternative dosing regimen for rituximab for recalcitrant pemphigus: a case series of 9 patients. *Arch Dermatol* 2012; 148: 734–39.
- 24 Heelan K, Al-Mohammedi F, Smith MJ, et al. Durable remission of pemphigus with a fixed-dose rituximab protocol. *JAMA Dermatol* 2014; 150: 703–08.
- 25 Cianchini G, Lupi F, Masini C, Corona R, Puddu P, De Pità O. Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: results from a single-center observational study on 42 cases with long-term follow-up. J Am Acad Dermatol 2012; 67: 617–22.
- 26 Leshem YA, Hodak E, David M, Anhalt GJ, Mimouni D. Successful treatment of pemphigus with biweekly 1-g infusions of rituximab: a retrospective study of 47 patients. J Am Acad Dermatol 2013; 68: 404–11.
- 27 Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 2008; 128: 2850–58.
- 28 Zambruno G, Borradori L. Rituximab immunotherapy in pemphigus: therapeutic effects beyond B-cell depletion. J Invest Dermatol 2008; 128: 2745–47.
- 29 Ahmed AR, Shetty S. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. Autoimmun Rev 2015; 14: 323–31.
- 30 Colliou N, Picard D, Caillot F, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci Transl Med 2013; 5: 175ra30.
- 31 Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, Stanley JR. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. J Invest Dermatol 2015; 135: 742–49.
- 32 Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Arch Dermatol* 2012; 148: 1031–36.
- 33 Cho YT, Lee FY, Chu CY, Wang LF. First-line combination therapy with rituximab and corticosteroids is effective and safe for pemphigus. Acta Derm Venereol 2014; 94: 472–73
- 34 Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Cosnes A, et al. First-line treatment of pemphigus vulgaris with a combination of rituximab and high-potency topical corticosteroids. JAMA Dermatol 2015; 151: 200–03.
- 35 Ahmed AR, Nguyen T, Kaveri S, Spigelman ZS. First line treatment of pemphigus vulgaris with a novel protocol in patients with contraindications to systemic corticosteroids and immunosuppressive agents: preliminary retrospective study with a seven year follow-up. *Int Immunopharmacol* 2016; 34: 25–31.
- 36 Leshem YA, Gdalevich M, Ziv M, David M, Hodak F, Mimouni D. Opportunistic infections in patients with pemphigus. J Am Acad Dermatol 2014; 71: 284–92.
- 37 Almugairen N, Hospital V, Bedane C, et al. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. J Am Acad Dermatol 2013; 69: 583–88.
- 38 Lott JP, Gross CP. Mortality from non neoplastic skin disease in the United States. J Am Acad Dermatol 2014; 70: 47-54.
- 39 Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pernphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br J Dermatol 2001; 144: 775–80.
- 40 Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 4–11.
- 41 Rosenbach M, Murrell DF, Bystryn JC, et al. Reliability and convergent validity of two outcome instruments for pemphigus. J Invest Dermatol 2009; 129: 2404–10.

- 42 Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI): a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol* 1994; **19**: 210–16.
- 43 Leplège A, Ecosse E, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P. The French
- version of Skindex (Skindex-France). Adaptation and assessment of psychometric properties. *Ann Dermatol Venereol* 2003; **130**: 177–83. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008; **58**: 1043–46. 44
- US Department of Health and Human Services, National Institutes 45 of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 4.0: May 28, 2009.
- Deddens JA, Petersen MR, Lei X. Estimation of prevalence ratios 46 when PROC GENMOD does not converge. In: Proceedings of the 28th Annual SAS Users Group International Conference, Cary, NC: March 30– April 2, 2003. Paper 270–28.
- Heelan K, Hassan S, Bannon G, et al. Cost and resource use of 47 pemphigus and pemphigoid disorders pre- and post-rituximab. J Cutan Med Surg 2015; 19: 274-82.
- 48 Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br J Dermatol 2016; 175: 142-49.
- 49 Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. N Engl J Med 2014; **371**: 1771–80.

THE LANCET

Supplementary appendix

This appendix formed part of the original submission and has been peer reviewed. We post it as supplied by the authors.

Supplement to: Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al, and the French study group on autoimmune bullous skin diseases. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* 2017; published online March 22. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30070-3.

Supplementary Appendix

References of the clinical trial

- Sponsor registration number : 2008/068/HP
- EudraCT number : 2008-005266-31
- CPP (Ethic's committee) number : CPP 2008/028
- ANSM ((French national agency for drug security) number : A81293-75
- Clinicaltrials number : NCT00784589

Supplementary text: Exclusion criteria

- Already treated pemphigus
- Patient under 18 years of age or older than 80 years of age,
- Non-consenting patient, or patient who cannot be followed regularly.
- Karnofsky index < 50%
- Unstable angina or advanced ischemic cardiopathy (extensive myocardial infarction within the last 3 months or post-infarction heart failure)
- Severe heart failure (NYHA Class III or IV) or severe uncontrolled cardiac disease.
- Uncontrolled cardiac rhythm disorders
- Severe bronchial obstruction
- Past history of malignant disease in the previous 10 years, or current progressive malignant disease, except basal cell carcinoma, and squamous
- cell carcinoma of the skin that have been treated or excised and cured, in situ cervix carcinoma,
- Anaemia (haemoglogin < 10 g/ dL), neutropoenia (<1000/mm3), lymphopoenia (<900/mm3), thrombopoenia (<100 000/mm3)
- Positive test results for hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B core
- antibody (HBcAb), or hepatitis C virus (HCV) serology at screening

- Liver insufficiency, major renal insufficiency
- Currently active alcohol or drug abuse, or history of alcohol or drug abuse within 24 weeks prior to screening
- Patients with positive blood test for HIV.
- Inherited or acquired severe immune deficiency
- Known active infection of any kind (excluding fungal infections of nail), or recent episode of infection, which has required oral antibiotic treatment within 2 weeks prior to enrollment in the trial.
- Infection having required hospitalization, or IV antibiotic treatment within 4 weeks prior to enrollment.
- Past history of severe infection such as fasciitis, osteomyelitis septic arthritis during the year prior to enrollment. Entry into this study may be reconsidered once the infection has fully resolved
- Evidence of any new or uncontrolled concomitant disease that, in the investigator's judgment, would preclude patient participation, including but not limited to nervous system, renal, hepatic, endocrine, malignant, or gastrointestinal disorders
- Any concomitant condition that required treatment with oral or systemic corticosteroids within 12 weeks prior to randomization
- Major surgery within 4 weeks prior to randomization, excluding diagnostic surgery.
- Patients having received immunosuppressive treatment (such as cyclosporine, mycophenolate mofetil, azathioprine), or any other treatment that might potentially be active on pemphigus within 4 weeks prior to randomisation.

- Treatment with intravenous immunoglobulins, plasmapheresis, or other similar procedure within 8 weeks prior to randomisation
- Previous treatment with rituximab or any monoclonal antibody inducing a profound lymphopenia (such as MabCampath),
- Treatment with a live or attenuated vaccine within 28 days prior to randomisation
- History of a severe allergic or anaphylactic reaction to humanised or murine
- monoclonal antibodies, or known hypersensitivity to any component of rituximab
- Lack of peripheral venous access
- Women pregnant or lactating, or intending to become pregnant during the study
- Women who are not postmenopausal (≥ 12 months of non-therapy-induced
- amenorrhea) or surgically sterile must have a negative result from a serum
- pregnancy test within 1 week prior to randomisation.
- Participation in another interventional clinical trial within 28 days prior to
- Randomization

Supplementary text: Protocol for tapering doses of prednisone

SEVERE pemphigus	
Rituximab group (6 months)	CS alone regimen (18 months)
- 1 mg/kg/d x 1 month	- 1.5 mg/kg/d x 1 month
- 0.75 mg/kg/d x 1 month	- 1.25 mg/kg/d x 1 month
- $0.5 \text{ mg/kg/d x 1 month}$	- 1.0 mg/kg/d x 1 month
- 0.3 mg/kg/d x 1 month	- 0.75 mg/kg/d x 1 month
- $0.2 \text{ mg/kg/d x 1 month}$	- 0.5 mg/kg/d x 3 months
- 0.1 mg/kg/j x 1 month	- 0.3 mg/kg/d x 3 months
	- 0.2 mg/kg/d x 4 months
	-0.1 mg/kg/d x 4 months

MODERATE Pemphigus

Rituximab group (3 months)

- 0.5 mg/kg/d x 1 mois
- 0.3 mg/kg/d x 1 mois
- 0.2 mg/kg/d x 1 month

CS alone regimen (12 months)

- 1mg/kg/d x 1 month
- -0.75 mg/kg/d x 1 month
- -0.5 mg/kg/d x 2 months
- 0.3 mg/kg/d x 2 months
- 0.2 mg/kg/d x 3 months
- 0.1 mg/kg/d x 3 months

Supplementary text: Treatment of relapses Rituximab group

Relapsing patients in the rituximab arm had an additional infusion of 1000 mg of rituximab at the time of relapse, which replaced the maintenance infusion of 500 mg at month 12 for patients who relapsed from baseline to month 12, or replaced the 500 mg maintenance infusion at month 18 for patients who relapsed from month 12 to month 18.

Prednisone doses

Moderate relapse

« moderate » relapse was defined according to the same criteria as those used at inclusion

MODERATE relapse occurring during tapering of prednisone doses

<u>Rituximab group</u>	CS alone group
 increase prednisone dose to the previous dose x 1 month 	- increase the prednisone dose to the previous dose x 1 month
- if relapse controlled: taper prednisone doses again as indicated after disease control achievement with starting doses	- if relapse controlled: taper prednisone doses again as indicated after disease control achievement with starting doses
- if not controlled: increase prednisone dose again up to the previous step	- if not controlled: increase prednisone dose again up to the previous step
- If still not controlled by prednisone 0.3 mg/kg/d; increase to 0.5 mg/kg/d	If still not controlled despite 8 weeks of increased pednisone dose, increase to 1

for 1 month

then 0.3 mg/kg/d x 1 month, then 0.2 mg/kg/d x 1 month, then stop prednisone. mg/kg/d for 1month.

Then taper prednisone dose as indicated after disease control achievement with starting doses

MODERATE relapse occurring AFTER stopping prednisone

<u>Rituximab Group</u>	<u>CS alone group</u>
- re start Prednisone	- re start Prednisone
0.3 mg/kg/d x 1 month	0.3 mg/kg/d x 1 month
then 0.2 mg/kg/d x 1 month	then 0.2 mg/kg/d x 1 month
then stop.	then 0.1 mg/kg/d x 1 month
	then stop.
- if not controlled, increase prednisone dose up to: 0.5 mg/kg/d x 1 month	- if not controlled, increase prednisone dose up to: 0.5 mg/kg/d x 1 month
then 1 mg/kg/d if still not controlled	then 1 mg/kg/d if still not controlled

Severe relapse

« severe » relapse is defined according to the same criteria as those used at inclusion

SEVERE relapse occurring during tapering of prednisone doses

<u>Rituximab Group</u>	CS alone group
- increase prednisone dose up to 2 previous steps x 1 month	- increase prednisone dose up to 2 previous steps x 1 month
- if relapse controlled: taper prednisone doses again as indicated after disease control achievement with starting doses	- if relapse controlled: taper prednisone doses again as indicated after disease control achievement with starting doses
- If relapse not controlled, increase to 1 mg/kg/d for 1month.	- If relapse not controlled, increase to 1 mg/kg/d for 1month.
Then taper prednisone dose as indicated after disease control achievement with starting doses	Then taper prednisone dose as indicated after disease control achievement with starting doses

SEVERE RELAPSE occurring AFTER stopping prednisone

<u>Rituximab Group</u>	<u>CS alone group</u>
- re start Prednisone	- re start Prednisone
0.5 mg/kg/d x 1 month	0.5 mg/kg/d x 1 month

then 0.3 mg/kg/d x 1 month	then 0.3 mg/kg/d x 1 month
then stop.	then stop.
-	-
-if not controlled, increase prednisone dose up to: 0.75 mg/kg/d x 1 month	-if not controlled, increase prednisone dose up to: 0.75 mg/kg/d x 1 month
then 1 mg/kg/d if still not controlled	then 1 mg/kg/d if still not controlled
Then taper prednisone dose as indicated after disease control achievement with starting doses	Then taper prednisone dose as indicated after disease control achievement with starting doses

Supplementary text: Assessment of disease extent with the ABSIS,

PDAI and PGA scores

The ABSIS score of cutaneous involvement is based on the extent of the body surface area (BSA) assessed using Wallace's "rule of nines" and type of skin lesions⁸. The value of the BSA affected is multiplied by an index reflecting the predominant lesions: 1.5 (erosive, exudative lesions, bullae, or Nikolsky sign positivity), 1.0 (erosive, dry lesions), or 0.5 (re-epithelialised lesions). ABSIS oral involvement is evaluated by scoring 11 mucosal sites by 1 (presence of lesions) or 0 (absence of lesions), and by completing a subjective severity scale based on discomfort during eating and drinking. Using higher scores to denote worse disease, ABSIS ranges from 0 to 206 points, with 150 points for skin involvement, 11 points for oral involvement, and 45 points for subjective discomfort.

The PDAI has a score ranging from 0 to 263 points, with 250 points representing disease activity (120, 10 and 120 points for skin, scalp, and mucosal activity, respectively) and 13 points representing disease damage⁹. However, the damage component was not included in the present analysis. For skin activity assessment, 12 anatomic sites are assigned a score according to disease extent: 0 (no lesions), 1 (1-3 lesions, up to 1 lesion > 2 cm in any diameter, all \leq 6 cm), 2 (2-3 lesions, at least 2 lesions > 2 cm, all \leq 6 cm), 3 (> 3 lesions, all \leq 6 cm), 5 (> 3 lesions and/or 1 lesion > 6 cm), or 10 (> 3 lesions and/or at least 1 lesion > 16 cm or entire area affected). Scalp activity is assigned a score based on the presence of blisters, erosions or erythema of 0 (no activity), 1 (one quadrant affected), 2 (two quadrants affected), 3 (3 quadrants affected), 4 (whole skull affected) or 10 (at least 1 lesion > 6 cm). For mucosal activity assessment, 12 mucosal sites are assigned a score based on the presence of blisters: 0 (absent), 1 (1 lesion), 2 (2-3 lesions), 5 (> 3 lesions or 2 lesions > 2 cm), or 10 (entire area).

PGA is a visual analogue ten-point scale, based on a physician's subjective impression from 0 (no lesions) to 10 (worst skin and mucosae condition imaginable). It has been used in clinical trials because it is fast and easy to use.

Supplementary text: Immunological evaluation

Blood samples were collected in all patients during the study at days 0, 30, 90, 180, 270, 360, 540, 720. Serum was harvested and titers of IgG antibodies against desmoglein 1 and desmoglein 3 were measured using a desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay test (ELISA) with 1:100 diluted serum (Euroimmun). PBMC were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque gradients (GE Healthcare) to assess B and T lymphocyte counts. The phenotype of PBMCs was determined in the first consecutive 38 included patients by six-color flow cytometry with monoclonal antibodies (mAbs) against CD3, CD4, CD8, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD38 and CD86 (Beckman Coulter and BD Biosciences).

In order to quantify desmoglein 1 and desmoglein 3 specific B lymphocytes, B lymphocytes were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. In the first consecutive 38 included patients, frequency of desmoglein

1 and desmoglein 3 specific B cells was determined by flow cytometry at days 0, 180, 360, 720. Purified B cells were incubated for 30 min at 4°C with histidine-tagged desmoglein 1 or desmoglein 3 (30 ng/µl) (generous gift from M. Hertl and R. Eming Marburg Germany). After two washes, B-cells were stained with anti-human IgG antibodies (BD Biosciences), followed by Fc Block (eBioscience), Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies), antihuman antibodies against CD19, CD27 and IgM (BD Biosciences). Anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify desmoglein-specific cell. The percentage of desmoglein 1 and desmoglein 3 specific cells were determined by using Flowjo software.

Supplementary text: Amendment of the Primary endpoint

The assessed primary endpoint in the initial version of the manuscript was the number of patients in complete remission at the time of the Month 24 evaluation and who were no longer receiving systemic CS therapy for at least three months. The protocol was amended (June 25, 2015) to a duration of at least 2 months for consistency with the *Consensus Treatment of Definitions of Disease Endpoints and Therapeutic Responses for Pemphigus*. (Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points and therapeutic response for pemphigus. J Am Acad Dearmatol 2008; 58:1043-6)

This protocol amendment and SAP amendment occurred before the date of the last follow-up visit of the last patient (December 7, 2015) and before database lock, (March, 3 2016) after which the primary and secondary analyses were performed.

Additional Figure: Evolution of total B lymphocytes and desmoglein-specific B lymphocytes, under treatment.

Evolution of peripheral blood CD19+ B lymphocytes (panel A), and desmoglein 1 (full 1ine) and desmoglein 3 (dashed line) CD19+ IgG+ B lymphocytes (panel B) in pemphigus patients according to treatment regimen (red lines: patients treated with the corticosteroid alone; blue lines: patients treated with rituximab).

Panel A shows a dramatic decrease of peripheral-blood B-cells in the rituximab group from a median percentage of 8.8% (range 3.3% to 29.9%) at baseline to 0% at day 30. Blood B-lymphocytes remained undetectable until day 240. B-cells then reappeared in 9 out of the18 patients tested, and re-increased up to 5.3 % (range 0.3 to 13 %) at day 360. After the 2 maintenance infusions of rituximab at months 12 and 18, blood B-lymphocytes remained undetectable until the end of the study. Conversely, no major variation of blood B-lymphocytes was evidenced during the course of patients treated with corticosteroids alone, from 11.8 % (range 3.3% - 29.9%) at day 0 to 12.7 % (range 3.6% - 40.5 %) at day 360, and 10.5% (range 1.7% - 22.6 %) at the month 24 evaluation.

Panel B shows a dramatic decrease of the respective number of desmoglein 1 and desmoglein 3 IgG+ blood B-lymphocytes in the rituximab group from 35 (range 9 - 88) and 19 (range 6 - 30) cells per million lymphocytes at day 0, to 0 and 0 at day 180, and 2 (range 0-28) and 2 (range 0 to 15) cells per million lymphocytes at day 720.

The respective number of desmoglein 1 and desmoglein 3 specific blood Blymphocytes from patients assigned to the corticosteroid alone group did not vary during the study period, from 40 (range 5-88) and 26 (range 0-52) per million lymphocytes at baseline to 51 (range 9-118) and 31 (range 4 -100) per million of lymphocytes at day 720.

Figure



Additional Figure: Evolution of anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 antibodies in relapsing and non-relapsing patients in both treatment groups:

- The curves below shows the evolution of anti-desmoglein1 antibodies in patients treated with rituximab+short-term prednisone (blue curves on the left). Anti-desmoglein 1 antibodies slightly reincreased at Month 12 in relapsing patients (dashed line), whereas they remained at a very low level in non relapsing patients (full line)
- The red curves on the right showed reincrease of anti-DSG1 antibodies from Month 12 to M24 in relapsing patients treated with corticosteroids alone (dashed line), whereas they remained at a very low level in non-relapsing patients (full line)



The curves below shows the evolution of anti-desmoglein3 antibodies in patients treated with corticosteroids alone. The evolution of anti-DSG3 antibodies did not closely parallel the clinical evolution of mucosal lesions. In particular, the red curves below (full line) showed high anti-DSG3 autoantibody titers in patients who were in clinical remission, off therapy at day 720.



ARTICLE N°2 :

RISK FACTORS FOR SHORT-TERM RELAPSE IN PATIENTS WITH PEMPHIGUS TREATED BY RITUXIMAB AS FIRST LINE THERAPY

Mignard C., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Golinski M-L., Balayé P., Prost-Squarcioni C., Houivet E., Calbo S., Labeille B., Picard-Dahan C., Konstantinou MP., Chaby G., Richard M-A., Bouaziz J-D., Duvert-Lehembre S., Bernard P., Caux F., Alexandre M., Ingen-Housz-Oro S., Vabres P., Delaporte E., Quereux G., Dupuy A., Debarbieux S., Avenel-Audran M., D'Incan M., Bedane C., Bénéton N., Jullien D., Dupin N., Misery L., Machet L., Beylot-Barry M., Dereure O., Sassolas B., Vermeulin T., Benichou J., Joly P., Hebert V. and the French study group on autoimmune bullous skin diseases.

En soumission dans JAMA Dermatologie

L'essai clinique « RITUX 3 » a montré l'efficacité du RTX associé à une corticothérapie courte dans le traitement de première intention des pemphigus modérés à sévères. Durant les 2 ans de suivi, 11 des 46 patients du groupe RTX (24%) ont rechuté dont 9/11 (84%) précocement avant la première perfusion d'entretien à M12. Il a été montré que les perfusions d'entretien de RTX prévenaient efficacement les rechutes.

L'objectif de l'étude était de déterminer des facteurs prédictifs d'une rechute précoce après la première injection de RTX afin d'identifier les patients qui pourraient bénéficier d'une perfusion d'entretien rapprochée à 6 mois.

Les données cliniques et biologiques des 46 patients du groupe RTX de l'essai ont été comparées chez les patients ayant ou n'ayant pas rechuté durant la première année.

L'analyse du profil clinique permet de mettre en évidence que les patients ayant une rechute précoce ont initialement un score PDAI deux fois plus élevé que les patients n'ayant pas fait de rechute dans les 12 premiers mois suivant l'injection du RTX (54,41 *versus* 28,5 ; p = 0,03). Bien qu'une fréquence de LB plus élevée ait initialement été observée chez les patients ayant rechuté (22% *versus* 10% ; p<0,001), tous les patients ont présenté une déplétion complète des LB dans le sang au cours des trois premiers mois suivant l'administration du RTX. Pourtant, l'analyse de l'évolution des Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 souligne une cinétique de décroissance plus lente chez les patients ayant rechuté. Ainsi, lors de l'évaluation du 3^{éme} mois, la persistance d'Ac anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3 avec des taux supérieurs aux seuils prédictifs de rechute (ELISA IgG anti-Dsg1>20 UI/ml et ELISA IgG anti-Dsg3>130 UI/ml) précédemment établis, permet de prédire une rechute avec valeur prédictive positive de 50% et une valeur prédictive négative de 88%.
En conclusion, une forme sévère de pemphigus au diagnostic (PDAI \ge 45) et des taux d'Ac anti-Dsg1 et/ou Dsg3 à 3 mois supérieurs au seuils (anti-Dsg1 \ge 20 ou anti-Dsg3 \ge 120) sont associées à un risque de rechute précoce de 50%. Au contraire, l'absence d'un de ces 2 critères est associée à un taux de rechute faible < 15%. Ces deux facteurs prédictifs pourraient permettre d'identifier un sous-groupe de patients présentant un risque élevé de rechute nécessitant une perfusion d'entretien de RTX au 6^{ème} mois.

Risk factors for short-term relapse in patients with pemphigus treated by rituximab as first-line therapy

Claire Mignard MD¹, Maud Maho-Vaillant PhD¹, Marie-Laure Golinski PhD¹, Pierre Balayé MD², Catherine Prost-Squarcioni MD,PhD³, Estelle Houivet MSc², Sébastien Calbo PhD¹, Bruno Labeille MD,PhD⁴, Catherine Picard-Dahan MD⁵, Maria Polina Konstantinou PhD⁶, Guillaume Chaby MD⁷, Marie-Aleth Richard MD,PhD⁸, Jean-David Bouaziz MD,PhD⁹, Sophie Duvert-Lehembre MD¹⁰, Emmanuel Delaporte MD PhD¹⁰, Philippe Bernard MD,PhD¹¹, Frédéric Caux MD,PhD³, Marina Alexandre MD³, Saskia Ingen-Housz-Oro MD,PhD¹², Pierre Vabres MD,PhD¹³, Gaëlle Quereux MD,PhD¹⁴, Alain Dupuy MD,PhD¹⁵, Sébastien Debarbieux MD¹⁶, Martine Avenel-Audran MD¹⁷, Michel D'Incan MD,PhD¹⁸, Christophe Bedane MD,PhD¹⁹, Nathalie Bénéton MD²⁰, Denis Jullien MD,PhD²¹, Nicolas Dupin MD,PhD²², Laurent Misery MD,PhD²³, Laurent Machet MD,PhD²⁴, Marie Beylot-Barry MD,PhD²⁵, Olivier Dereure MD,PhD²⁶, Bruno Sassolas MD²⁷, Jacques Benichou MD,PhD², Pascal Joly MD,PhD¹, Vivien Hébert MD¹ and the French study group on autoimmune bullous skin diseases

2: Department of Biostatistics and Clinical Research, Rouen University Hospital., Rouen, France.

3: Department of Dermatology, Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Avicenne Hospital, AP-HP, University of Paris 13, Bobigny, France.

4: Department of Dermatology, University of Saint Etienne, Saint Etienne, France

- 5: Department of Dermatology of Bichat Hospital, University of Paris X, Paris, France
- 6: Department of Dermatology, University of Toulouse, Toulouse, France

7: Department of Dermatology, University of Amiens, Amiens, France

8: Department of Dermatology, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Aix Marseille University, UMR 911, INSERM CRO2, Marseille, France

9: Department of Dermatology of St Louis Hospital, Paris 7 Sorbonne Paris Cité University, Paris, France.

10: Department of Dermatology, University of Lille, Lille, France

11: Department of Dermatology, University of Reims, Reims, France.

12: Department of Dermatology, AP-HP, Henri Mondor Hospital, Créteil, France

13: Department of Dermatology, Dijon University Hospital, Dijon, France

^{1:} Department of Dermatology, Rouen University Hospital and INSERM U1234, Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Normandie University, Rouen, France.

14: Department of Dermatology, University of Nantes, Nantes, France.

15: Department of Dermatology, University of Rennes, Rennes, France.

16: Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon Sud; Pierre Bénite, Lyon, France

17: Department of Dermatology, University of Angers, Angers, France

18: Department of Dermatology, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

19: Department of Dermatology, University of Limoges, Limoges, France.

20: Department of Dermatology, Le Mans General Hospital, Le Mans, France.

21: Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, Lyon Claude Bernard University, Lyon, France.

22: Department of Dermatology, University of Paris V, Paris, France

23: Department of Dermatology, Brest University Hospital, Brest, France

24: Department of Dermatology, Tours University Hospital, Tours, France.

25: Department of Dermatology, University of Bordeaux, Bordeaux, France.

26: Department of Dermatology, University of Montpellier, Montpellier, France

27: Department of Internal Medicine, Brest University Hospital, Brest, France.

Corresponding author:

Claire Mignard Dermatology Department, Rouen University Hospital 1 Rue de Germont 76031 Rouen Cedex, France Phone number: 00 (33) 232 88 66 41 E-mail: c.mignard@orange.fr

Key points

Question: Are there predictive factors for short-term relapse in pemphigus patients treated with rituximab as first-line therapy?

Findings: A post hoc analysis of a multicentre randomized control trial which included 47 patients treated with rituximab as first-line identified 2 predictive factors of early relapse: i) a baseline disease activity score PDAI \geq 45 corresponding to severe pemphigus; ii) persistent anti-DSG1 Abs >20 UI/mL and/or anti-DSG3 Abs >130 UI/mL three months after rituximab treatment. These predictors provided a positive predictive value of 50% and a negative predictive value of 94% for the occurrence of early relapse.

Meaning: These two predictive factors help differentiate a subgroup of patients with higher risk of relapse who could benefit from maintenance rituximab infusion at Month 6 from a subgroup of patients with almost no risk of relapse who do not need maintenance therapy

Abstract

Importance: Rituximab and short-term corticosteroids are the new gold standard for newly diagnosed moderate to severe pemphigus patients. The 3-year relapse rate is around 25%. However, 73% of relapses occur during the first year of treatment.

Objective: To determine predictive factors of short-term relapse in pemphigus patients treated with rituximab.

Design: Post hoc prognostic analysis of the rituximab group in a multicenter randomized control trial (RITUX 3), conducted from 2010 to 2015. Patients randomly assigned to the rituximab group were treated with 1000 mg of intravenous rituximab on Day 0 and 14, and 500 mg at Month 12 and 18, combined with a short-term prednisone regimen.

Setting: Twenty dermatology departments in tertiary care centres in France.

Participants: All patients assigned to the rituximab group of the RITUX 3 trial and 3 patients treated according to the study protocol were included in the present study.

Main Outcome(s) and Measure(s): Baseline (pre-treatment) clinical and biological characteristics and evolution of anti-desmoglein (DSG) 1 and anti-DSG3 ELISA values during the 3 months after rituximab treatment were compared between patients who relapsed and those who maintained sustained clinical remission during the first 12 months after treatment. The positive and negative predictive values of predictors were calculated.

Results: Forty-seven patients were included. The baseline PDAI score of relapsing patients was higher than that of non-relapsing patients ($54 \pm 33 \text{ vs } 29 \pm 24$; p=0.03). At Month 3, 7 of 11 relapsing patients (64%) had persistent anti-DSG1 Ab values $\geq 20 \text{ UI/mL}$ and/or anti-DSG3 Ab values $\geq 130 \text{ UI/mL}$, versus 7 of 36 (19%) non-relapsing patients (p=0.01). A PDAI score ≥ 45 defining severe pemphigus, and/or persistent anti-DSG1 Abs $\geq 20 \text{ UI/mL}$ and/or anti-DSG3 Abs $\geq 130 \text{ UI/mL}$ and/or persistent anti-DSG1 Abs $\geq 20 \text{ UI/mL}$ and/or anti-DSG3 Abs $\geq 130 \text{ UI/mL}$ and/or persistent anti-DSG1 Abs $\geq 20 \text{ UI/mL}$ and/or anti-DSG3 Abs $\geq 130 \text{ UI/mL}$ at Month 3 provided a positive predictive value of 50% (95%CI=27-73) and a negative predictive value of 94% (95%CI=73-100) for the occurrence of relapse after rituximab.

Conclusions and Relevance: Initial PDAI score and evolution of anti-DSG Ab ELISA values after the initial cycle of rituximab are easy-to-use predictors of short-term relapse.

Introduction

Pemphigus is a rare life-threatening autoimmune blistering disease involving the skin and mucosa, in which pathogenic IgG antibodies are directed against desmosomal transmembrane glycoproteins: desmoglein (DSG) 3 and 1 (1–6). Initial severity of skin and oral mucous membrane lesions is correlated with anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab levels, respectively (7). High-dose oral corticosteroids (CS) sometimes associated with immunosuppressive drugs (azathioprine, mycophenolate mofetil) have been the mainstay of treatment for a long time (8–15).

In the last decade, more than 1 000 patients with severe recalcitrant or relapsing cases of pemphigus have been treated with rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody. The efficacy and safety of rituximab as first-line treatment in patients with moderate to severe forms of pemphigus have been recently demonstrated in a large randomized controlled trial RITUX 3 trial), in which 90 patients were randomly assigned to receive a standard regimen of CS versus rituximab associated with a short-term CS regimen (16). In this study, the 2-year rate of complete remission (CR) off therapy was 89% in the rituximab arm versus 34% in the standard CS arm. After 24 months of follow-up, 11 relapses (23%) occurred in the rituximab arm versus 20 relapses (46%) in the standard CS regimen arm. Relapses have been consistently reported in the literature in patients who received an initial cycle of rituximab without maintenance infusions during the course of their disease (17–21). Interestingly, in the RITUX 3 trial, only 3 out of the 11 relapses in the rituximab group occurred after the two maintenance infusions at Month 12 and Month 18, whereas 8 out of 11 (73%) relapses occurred between Month 6 and Month 12, which might suggest the potential interest of a first maintenance infusion at Month 6 in some patients.

The aim of the present study was to determine predictive factors of such short-term relapse, in order to identify a subgroup of patients who could benefit most from an additional infusion of rituximab at Month 6 after the initial cycle of rituximab. Indeed, due to the cost and immunosuppressive effect of rituximab, the identification of predictive factors for early relapse would allow us to propose an additional infusion of rituximab only in patients with a high risk of relapse.

Patients and methods

Study design and participants

Data from patients randomly assigned to the rituximab group in the RITUX 3 trial and from patients treated with rituximab according to the same regimen were used in the present study. Patients with newly diagnosed pemphigus were treated with 2 infusions of 1000 mg of intravenous rituximab on Day 0 and Day 14, and 2 infusions of 500 mg at Month 12 and Month 18 combined with a short-term prednisone regimen, 0.5 mg per kilogram per day for moderate pemphigus and 1 mg per kilogram per day for severe pemphigus. The initial prednisone dose was maintained for 1 month, and thereafter gradually reduced after achievement of disease control, with the aim of stopping prednisone after 3 months in patients with moderate pemphigus and after 6 months in patients with severe pemphigus.

Clinical and immunological settings

Clinical data (age, gender, pemphigus type) and pemphigus severity were recorded from patients' case report forms (CRF) and patients' medical files. Baseline pemphigus severity was assessed using the Pemphigus Disease Area Index (PDAI) score (22). A relapse was defined as the reappearance of at least 3 new lesions in a month, which did not heal spontaneously within 1 week (23). Short-term relapse was defined as a relapse which occurred during the first year after the initial cycle of rituximab.

Anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values were measured using a commercially available DSG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (EUROIMMUN Desmoglein test, Medizinische Labordiagnostika, Lübeck, Germany) according to the manufacturer's instructions. Blood samples were collected at Days 0, 30, 90, 180, 270, and 360. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood by Ficoll-Paque gradients (GE Healthcare Lifescience, United States) and cryopreserved. The phenotype of PBMCs was determined by flow cytometry with monoclonal antibodies (mAbs) against CD19-PE, CD4-ECD, CD3-PC5, CD8-FITC (Beckman Coulter, Indianapolis, United States) for T and B cells; and CD4-PerCP, CD25-PE, CD127-FITC (eBioscience, Becton Dickinson, Beckman Coulter) for Treg cells. B Cells were defined as CD19+, T cells were defined as CD3+CD4+, and regulatory T cells as CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}.

Rituximab serum concentrations were measured using a commercially available ELISA (LISA-TRACKER Duo Rituximab, Theradiag, France) at Day 30, Day 60, Day 90 and Day 180 after initial treatment with rituximab.

Statistical analysis

To determine predictive factors for short-term relapse following rituximab therapy, we first compared patients' baseline (pretreatment) clinical characteristics: age, gender, type of pemphigus (Pemphigus vulgaris (PV) versus Pemphigus foliaceus (PF)), type of involvement (skin, mucosal, both) and PDAI severity score, between patients who maintained complete remission for the first year of treatment and those who relapsed during the first year after the initial cycle of rituximab.

Then, we compared the evolution of anti-DSG1 and anti-DSG3 ELISA values during the 6month period after rituximab treatment between patients who maintained complete remission and those who relapsed during the first year.

In order to determine the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of anti-DSG Abs and PDAI score, we used previously published cut-off values. The cut-off value on the PDAI score differentiating severe from non-severe pemphigus was determined from the international study conducted by Boulard et al. (severe pemphigus was defined by a PDAI score \geq 45) (22). According to the study by Abasq et al., cut-off values of 130 U/mL for anti-DSG3 Abs, and 20 UI/mL for anti-DSG1 Abs were used, since they provide both high positive predictive value (84% and 79%, respectively) and negative predictive value (81% and 84%, respectively) for the occurrence of mucosal and skin relapses, (24). To validate these cut-off values from the literature on the present series of pemphigus patients, a receiver-operating characteristic (ROC) curve was calculated. A cut-off value of 20 UI/mL for anti-DSG1 Abs and 120 UI/ml for anti-DSG3 Abs gave optimal sensitivity and specificity. These cut-off values were equal for anti-DSG1 Abs (20 versus 20 UI/ml) and very close for anti-DSG3 (120 versus 130 UI/ml) to those reported by Abasq et al. (24). Positive and negative predictive values of predictors of relapse were calculated based on the 23% rate of relapse observed in patients assigned to the rituximab arm in the RITUX 3 trial.

We compared rituximab serum concentrations depending on time (from Day 14 to Day 180) between relapsing and non-relapsing patients (area under the concentration-time curve; AUC) by the trapezoidal method (Prism 7, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Finally, we compared the proportions of B cells, CD4 T cells and regulatory T cells between relapsing and non-relapsing patients from baseline to Month 6 evaluation using prism software (Two-way ANOVA with Sidak posttest).

-163-

Fisher exact test was used to compare qualitative variables and Student t-test or Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables. For all tests, p <0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed with R statistical software (version 3.5.1, the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Baseline characteristics and clinical course of patients

A total of 47 patients were treated with rituximab plus short-term oral prednisone. Fortyfour of these patients were included in the RITUX 3 trial and the other 3 patients were treated with the same regimen of rituximab plus short-term oral prednisone after the end of the RITUX 3 study.

During the 12 months following the initial infusion of 2g of rituximab, 11 of the 47 patients relapsed (23%; 95% CI: 13-39) after a median delay of 219 days (interquartile range (IQR), 154-277). All relapses occurred after Month 6. There were 6 mucosal, 3 cutaneous and 2 muco-cutaneous relapses.

Mean age, gender of patients, and type of pemphigus (PV versus PF) were not significantly different between patients who relapsed and those who did not (Table I). Patients who relapsed had an initially more severe pemphigus than those who did not relapse (baseline mean PDAI score: 54 ± 33 versus 29 ± 24 ; p=0.03). (Table I). Accordingly, 6 of the 11 patients who relapsed (55%) had severe pemphigus (baseline PDAI score \geq 45) versus 5 of the 36 patients (14%) who did not relapse (p=0.01).

Course of anti-desmoglein antibodies

Mean anti-DSG1 and anti-DSG3 ELISA values decreased from 257 and 850 UI/mL at baseline to 20 and 88 UI/mL at Month 3, and 7 and 38 UI/mL at Month 6, respectively (Fig 1). In order to identify a subgroup of patients with a higher relapse risk who could benefit from a first maintenance infusion of rituximab at Month 6, we first compared the mean anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab levels at baseline and at Month 3 evaluation between the subgroups of relapsing and non-relapsing patients.

Mean (\pm SD) anti-DSG1 Ab ELISA values were non-significantly higher in relapsing patients relative to those with ongoing remission, both at baseline (520 \pm 747 UI/mL versus 245 \pm 280 UI/mL; p=0.28) and at Month 3 (46 \pm 76 UI/mL versus 16 \pm 42 UI/mL; p=0.28). Similar findings were observed for anti-DSG3 Abs at baseline (1444 \pm 1525 UI/mL versus 914 \pm 1114 UI/mL; p=0.35), and at Month 3 (193 \pm 280 UI/mL versus 80 \pm 133 UI/mL; p=0.27).

Course of B-, T- and T reg cells

B cells: At baseline, patients who relapsed had a higher mean percentage of CD19+ B cells than non-relapsing patients (22.11% versus 9.80%; p<0.001) (Fig 2A). Complete B cell

depletion was observed in both relapsing and non-relapsing patients at Month 1 evaluation post rituximab. At Month 6, the frequency of B cells was still close to zero in relapsing as well as non-relapsing patients (0.07%, versus 0.16% p=1).

T cells: The mean percentage of $CD4^+$ T cells measured from baseline to Month 6 was not significantly different between relapsing and non-relapsing patients (Fig 2B). The percentage of $CD25^{hi}$ $CD127^{low}$ regulatory T cells (Tregs) at baseline was higher in patients who did not relapse than in those who relapsed (5.71% versus 2.91, p=0.0004). However, the difference between the two subgroups was no longer statistically significant after rituximab treatment (Fig 2C).

Rituximab serum concentrations

Rituximab serum concentrations in patients' serum measured from Day 30 to Day 180, were not significantly different between relapsing and non-relapsing patients (AUC: 3056 (95CI: 2261-3851) versus 3062 (95CI: 1956-4168)) (Fig 3).

Predictive factors of relapse

At baseline, a PDAI score \geq 45 (corresponding to severe pemphigus) had a positive predictive value of 55% (95%CI: 23-83), for the occurrence of a relapse during the 12-month period following the initial cycle of rituximab. Interestingly, patients with a PDAI score <45 had a high 86% (95%CI: 71-95), negative predictive value for the absence of relapse.

At Month 3, according to the study by Abasq et al., cut-off values of 130 UI/mL for anti-DSG3 Abs, and 20 UI/mL for anti-DSG1 Abs were used since they provide both high positive predictive value (84% and 79%, respectively) and negative predictive value (81% and 84%, respectively) for the occurrence of mucosal and skin relapses. Indeed, at Month 3, 7 of the 11 patients who relapsed (64%) had anti-DSG1 and/or anti-DSG3 Ab ELISA values higher than 20 UI/mL and/or 130 UI/mL, respectively, versus 7 of the 36 patients (19%) who had persistent clinical remission (p=0.01).

This set of two criteria i.e., baseline PDAI score \geq 45 and/or persistent anti-DSG1 Abs \geq 20 UI/ml and/or anti-DSG3 Abs \geq 130 UI/ml, three months after the initial cycle of rituximab provided a sensitivity of 91% (95% CI: 59-100), a specificity of 60% (95% CI: 39-79), a positive predictive value of 50% (95% CI: 27-73) and a negative predictive value of 94% (95% CI: 73-100) for the occurrence of a relapse following the initial cycle of rituximab.

Discussion

This study has identified two simple predictive factors of a short-term relapse after initial treatment by rituximab: i) the initial PDAI score, which reflects the severity of pemphigus, and ii) the evolution of anti-DSG antibodies values three months after the initial cycle of rituximab. These findings are important, since rituximab has been recently approved as first-line treatment of moderate to severe pemphigus (25). The set of criteria identified in the present study provided a 50% (95%CI: 27-73) positive predictive value. Assuming that a maintenance infusion of rituximab at Month 6 would be consistently effective, our results suggest the possibility of treating two patients with a maintenance infusion of rituximab at Month 6 to avoid the relapse of one patient. Conversely, the 94% (95%CI: 73-100) negative predictive value could help avoid a maintenance infusion of rituximab in around half of the patients treated as first line. Avoiding early relapse after an initial cycle of rituximab is also important, since 20% of patients relapsed between Month 6 and Month 12 in our clinical trial (16), whereas only very few relapses (3 out of 11) occurred between Month 12 and the end of the study at Month 36.

It has recently been demonstrated that PDAI score was an easy to use and robust tool to accurately assess pemphigus severity, with a very high inter-rater reliability and a good correlation over time with other markers of pemphigus severity (22,26). Our findings suggest that initial pemphigus severity might be a predictor of early relapse after a first-line treatment by rituximab, since patients who relapsed had a two-fold higher baseline PDAI severity score relative to patients who did not relapse during the 12-month period after the initial cycle of rituximab (54 versus 29 p=0.03). Patients with a PDAI score \geq 45 had a positive predictive value of 55% (95%CI: 23-83) for the occurrence of a relapse during the year following the initial infusion of rituximab, whereas those with a PDAI score <45 had an 86% (95%CI: 71-95) negative predictive value for the absence of relapse after rituximab therapy.

It has already been shown that the evolution of anti-DSG1 and to a lesser degree anti-DSG3 Abs was correlated with the course of pemphigus skin and mucosal lesions (7,24,27,28). Despite the fact that the number of circulating B-lymphocytes was close to zero from 3 to 6 months after the initial cycle of rituximab in both patients who relapsed and those who did not, we observed that patients who relapsed had higher anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab levels at Month 3 evaluation than those who did not relapse after rituximab therapy. This time point was chosen, since it is often used by clinicians to assess the epithelialization of skin and mucosal lesions after the delay of action of rituximab, and because measurement of anti-DSG Abs at Month 3 allows a new infusion of rituximab to be scheduled at Month 6 if necessary.

Owing to the poor specificity of anti-DSG3 Abs, we used cut-off values corresponding to 20 UI/ml for anti-DSG1 and 130 UI/ml for anti-DSG3 Abs, which have been reported to provide high positive- and negative- predictive values for the occurrence of skin and mucosal relapses, respectively (24). Interestingly, these cut-off values were very close to those that we calculated using a ROC curve in our patients. The persistence of anti-DSG1 ELISA values \geq 20 UI/ml and/or anti-DSG3 ELISA values \geq 130 UI/ml at Month 3 evaluation provided a positive predictive value of 50% and a negative predictive value of 88%, which were in fact, very close to those calculated from the initial PDAI score.

We then assessed the evolution of peripheral blood B lymphocytes after treatment with rituximab, since early B cell recovery has been reported to precede the occurrence of a clinical relapse in some autoimmune diseases, in particular rheumatoid arthritis (29–31). We observed that at baseline, the mean percentage of peripheral blood CD19⁺ B cells was higher in patients who relapsed than in those who maintained clinical remission. However, the significance of this finding is uncertain, since we were not able to record patients' blood cell counts, and therefore were unable to determine the absolute number of blood B lymphocytes. Nevertheless, both relapsing and non-relapsing patients had complete B cell depletion during the first three months after rituximab.

Whereas, we did not evidence any difference in the percentage of total CD4⁺ T lymphocytes between patients who relapsed and patients who did not, patients who maintained clinical remission had a higher baseline percentage of Treg cells than those who relapsed, as previously reported in patients with lupus erythematous treated by rituximab (32).

We did not evidence any difference in serum concentration of rituximab between relapsing and non-relapsing patients, which is in accordance with the absence of correlation between the detection of rituximab human anti-chimeric antibodies and the occurrence of relapses reported in a recent study (33).

The interest of using multiple infusions of rituximab during the initial phase of treatment (34) or as maintenance therapy has been suggested in recent studies (35,36). Despite the fact that the short-term tolerance of these regimens using multiple infusion of rituximab seems rather good, they lead to a significant over-cost and prolonged B cell depletion. The two predictive factors identified in the present study would allow a maintenance infusion of

rituximab to be proposed only to a subgroup of patients with a high risk of relapse. We are currently testing these predictors on a new series of pemphigus patients treated with rituximab as first line.

Acknowledgments:

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs (Rouen University Hospital) for her help in editing the manuscript.

References

1. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell. 1991 Nov 29;67(5):869–77.

2. Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest. 1989 May;83(5):1443–8.

3. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med. 1982 May 20;306(20):1189–96.

4. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. BMJ. 2008;337:a180.

5. Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. N Engl J Med. 2006 Oct 26;355(17):1800–10.

6. Amagai M. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol. 1995 Jan;104(1):146–52.

7. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br J Dermatol. 2001 Apr;144(4):775–80.

8. Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update. Drugs. 2015 Feb;75(3):271-84.

9. Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Cochrane Database Syst Rev. 2009 Jan 21;(1):CD006263.

10. Atzmony L, Hodak E, Leshem YA, Rosenbaum O, Gdalevich M, Anhalt GJ, et al. The role of adjuvant therapy in pemphigus: A systematic review and meta-analysis. J Am Acad Dermatol. 2015 Aug;73(2):264–71.

11. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, et al. Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment--guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Mar;29(3):405–14.

12. Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. J Invest Dermatol. 2010 Aug;130(8):2041–8.

13. Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D. Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. J Eur Acad Dermatol Venereol . 2012 Jul;26(7):855–60.

14. Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. Arch Dermatol. 2000 Jul;136(7):868–72.

15. Lever WF, Goldberg HS. Treatment of pemphigus vulgaris with methotrexate. Arch Dermatol. 1969 Jul;100(1):70–8.

16. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet 2017 May 20;389(10083):2031–40.

17. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-Term Remissions of Severe Pemphigus After Rituximab Therapy Are Associated with Prolonged Failure of Desmoglein B Cell Response. Sci Transl Med. 2013 Mar 6;5(175):175ra30.

18. Joly P, Mouquet H, Roujeau J-C, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S, et al. A Single Cycle of Rituximab for the Treatment of Severe Pemphigus. N Engl J Med. 2007 Aug 9;357(6):545–52.

19. Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: A single-center experience with 31 patients. Arch Dermatol. 2012 Sep 1;148(9):1031–6.

20. Vinay K, Cazzaniga S, Amber KT, Feldmeyer L, Naldi L, Borradori L. Rituximab as first-line adjuvant therapy for pemphigus: Retrospective analysis of long-term outcomes at a single center. J Am Acad Dermatol. 2018 Apr;78(4):806–8.

21. Baum S, Gilboa S, Greenberger S, Pavlotsky F, Trau H, Barzilai A. Adjuvant rituximab therapy in pemphigus: a single-center experience of 18 cases. J Dermatol Treat. 2013 Dec;24(6):427–30.

22. Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, Kern JS, Zambruno G, Feliciani C, et al. Calculation of cut-off values based on the ABSIS and PDAI pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br J Dermatol. 2016 Jan 22;

23. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. J Am Acad Dermatol. 2008 Jun 1;58(6):1043–6.

24. Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, et al. Elisa testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch Dermatol. 2009 May 1;145(5):529–35.

25. L. Jelti, C. Prost-Squarcioni, S. Ingen-Housz-Oro, F. Caux, P. Bernard, C. Bedane, et al. Update of the French recommendations for the management of pemphigus. Ann Dermatol Vénéréologie. 2019 Apr;6368(4):263.

26. Hebert V, Boulard C, Houivet E, Duvert Lehembre S, Borradori L, Della Torre R, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. J Invest Dermatol 2019 Jan;139(1):31-37.

27. Patsatsi A, Kyriakou A, Giannakou A, Pavlitou-Tsiontsi A, Lambropoulos A, Sotiriadis D. Clinical significance of anti-desmoglein-1 and -3 circulating autoantibodies in Pemphigus Patients Measured by Area Index and Intensity Score. Acta Derm Venereol. 2014 Mar;94(2):203–6.

28. Nakahara T, Takagi A, Yamagami J, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, et al. High Anti–Desmoglein 3 Antibody ELISA Index and Negative Indirect Immunofluorescence Result in a Patient With Pemphigus Vulgaris in Remission: Evaluation of the Antibody Profile by Newly Developed MethodsDiscrepancy Between ELISA/IIF in Pemphigus Vulgaris. JAMA Dermatol. 2014 Dec 1;150(12):1327–30.

29. Trouvin A-P, Jacquot S, Grigioni S, Curis E, Dedreux I, Roucheux A, et al. Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study. Clin Exp Immunol. 2014 Nov 4;180(1):11–8.

30. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JCW. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2006 Feb;54(2):613–20.

31. Albers LN, Liu Y, Bo N, Swerlick RA, Feldman RJ. Developing biomarkers for predicting clinical relapse in pemphigus patients treated with rituximab. J Am Acad Dermatol. 2017 Dec 1;77(6):1074–82.

32. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. Clin Immunol. 2007 Apr 1;123(1):66–73.

33. D.M. Chen, A. Odueyungbo, P. Joly. Rituximab is an Effective Treatment in Patients with Pemphigus Vulgaris and Demonstrates a Steroid-Sparing Effect. Br J Dermatol 2019. in press.

34. Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. N Engl J Med. 2006 Oct 26;355(17):1772–9.

35. Cianchini G, Lupi F, Masini C, Corona R, Puddu P, De Pità O. Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: results from a single-center observational study on 42 cases with long-term follow-up. J Am Acad Dermatol. 2012 Oct;67(4):617–22.

36. Sanchez J, Ingen-Housz-Oro S, Chosidow O, Antonicelli F, Bernard P. Rituximab as Single Long-term Maintenance Therapy in Patients With Difficult-to-Treat PemphigusRituximab as Single Long-term Maintenance Therapy in Difficult-to-Treat PemphigusLetters. JAMA Dermatol. 2018 Mar 1;154(3):363–5.

Figure and legends

	Relapsing patients	Non-relapsing patients	p value
	n (%)	n (%)	
Number of patients	11 (23.4)	36 (76.6)	
Age (mean ± SD)	50.10 ± 18.12	55.58 ± 16.34	0.30
Gender			
Male	5 (45.5)	12 (33.3)	0.49
remate	0 (34.3)	24 (00.7)	
Type of pemphigus			0.44
Vulgaris	9 (81.8)	31 (86.1)	0.66
Foliaceus	2 (18.2)	3 (13.8)	
Initial presentation			
Mucosal	1 (9.1)	8 (22.2)	0.66
Cutaneous	2 (18.2)	6 (16.7)	1
Muco-cutaneous	8 (72.8)	22 (61.1)	0.72
PDAI (mean score ± SD)	54.41 ± 33.3	28.5±23.91	0.03

 Table I: Baseline clinical characteristics of relapsing patients and non-relapsing patients.



Figure 1: Course of anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab values in relapsing and non-relapsing patients.

Course of auto-antibodies (mean \pm SD) anti-DSG1 (dashed line) and anti-DSG3 (solid line) Abs during the 24-month period after initial treatment with rituximab in relapsing and non-relapsing patients. Arrows indicate the times and doses of rituximab infusions.

Résultats



Figure 2: Frequencies of CD19⁺ B cells, CD4⁺ T cells, and regulatory T cells among lymphocytes during the follow-up.

Frequencies of CD19⁺ B cells (A), CD4⁺ T cells (B), and regulatory T cells (C) in peripheral blood lymphocytes at Day 0, Day 30 and Day 180 after initial treatment with rituximab in relapsing (black) and non-relapsing (grey) patients (*** p<0.001).

Concentration of Rituximab



Figure 3: Comparison of rituximab serum concentrations between relapsing and non-relapsing patients.

Area under the curve (AUC) of rituximab serum concentrations (mg/ml) depending on time (Day 30, Day 60, Day 90 and Day 180) in relapsing (black) and non-relapsing (grey) rituximab-treated patients.

ARTICLE N°3 :

RITUXIMAB AND CORTICOSTEROID EFFECT ON DESMOGLEIN SPECIFIC B CELLS AND T FOLLICULAR HELPER CELLS IN PATIENTS WITH PEMPHIGUS

<u>Maho-Vaillant M.</u>, Perals .C, Golinski ML., Hebert V., Caillot F., Mignard C., Riou G., Petit M., Viguier M., Hertl, M., Boyer O., Calbo S., Fazilleau N. et Joly P.

Article en préparation

Les données de l'évaluation clinique et biologique à 24 mois des patients atteints de pemphigus issues de l'étude RITUX 3 ont permis de démontrer que l'utilisation répétée du RTX associée à une courte corticothérapie en première intention est à la fois plus efficace et moins dangereuse qu'un traitement par la prednisone seule. Le critère d'évaluation principal à 24 mois étant proche de la dernière perfusion d'entretien du RTX à 18 mois, l'efficacité et l'innocuité du schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention ont été confortées après la reconstitution du répertoire lymphocytaire B à 36 mois.

A 36 mois, le groupe RTX présente un taux de rechute de seulement 2%. En effet, 40 des 41 patients du groupe RTX en rémission complète sans traitement à 24 mois le sont toujours 36 mois après la première perfusion de RTX. A l'inverse, le groupe CS présente un taux de rechute de 33%. De plus, la moitié des patients issus du groupe CS présentant une maladie persistante ou ayant rechuté après l'évaluation à 24 mois ont été traités secondairement par le RTX. Ces résultats confirment l'efficacité à long terme de l'utilisation précoce du RTX dès les premiers signes de la maladie associée à une ré-administration de RTX en traitement d'entretien.

L'objectif de cet article est d'étudier l'impact des traitements par RTX et par CS sur la réponse auto-immune B ainsi que sur leurs principaux partenaires, les Tfh, afin de mieux comprendre les mécanismes influençant la réponse thérapeutique.

Nous avons analysé la fréquence et le phénotype de ces cellules auto-réactives dans le sang de patients de l'étude clinique RITUX 3 par cytométrie en flux ainsi que le nombre d'ASC spécifiques des Dsg par ELISPOT. L'analyse des effets de la prednisone a été effectuée entre 9 et 12 mois de traitement lorsque les doses sont réduites à 20 mg/jour et que la maladie est contrôlée. Pour les patients du groupe RTX, l'analyse a été effectuée après la reconstitution du répertoire lymphocytaire B à 36 mois.

Notre analyse phénotypique a révélé qu'en plus d'une fréquence significativement plus élevée de LB spécifiques des Dsg dans le sang des patients atteints de pemphigus que chez les témoins sains, la population B anti-Dsg détectée représentant de 0,1 à 0,6% des LB totaux est particulièrement enrichie en LB mémoires ayant subi une commutation isotypique (CD27⁺IgG⁺). Le traitement par RTX impacte fortement et durablement la répartition des sous-populations de LB après leur reconstitution, modifiant l'équilibre entre des LB naïfs et mémoires et plus particulièrement au sein de la population B autoréactive. Nos résultats démontrent que la fréquence moyenne des LB CD27+IgG+ spécifiques des Dsg est réduite de 13 à 4%. Parallèlement à cette déplétion, plus aucun ASC anti-Dsg n'est détectée par ELISPOT chez les patients en rémission complète 36 mois après la première injection de RTX. A l'inverse, le traitement utilisant la prednisone seule n'a pas influencé la fréquence ou le phénotype des LB anti-Dsg et les ASC anti-Dsg restent détectables même en période de rémission. La génération de LB mémoires CD27⁺ et commuté IgG⁺ est classiquement liée à la maturation des LB au sein des CG et nécessite une collaboration avec les Tfh. Parallèlement à la déplétion B induite par le RTX, nous avons observé une diminution significative de près de 50% de la fréquence des Tfh avant de revenir à une valeur initiale lors du retour de LB. Le traitement par RTX entraine simultanément une réduction durable des taux sériques d'IL-21. En revanche, nous n'avons pas observé de modification de la fréquence des Tfh chez les patients du groupe CS. L'analyse post-traitement des patients présentant le HLA-DRB1*0402 de susceptibilité au PV a permis de mettre en évidence l'existence de Tfh spécifiques de la Dsg3 dans le sang avec une fréquence significativement plus faible chez les patients ayant reçu le RTX comparé à ceux traités uniquement par la prednisone.

En conclusion, l'efficacité à long terme du RTX dans le pemphigus semble donc résulter d'effets plus complexes que la simple délétion initiale des LB auto-réactifs pathogènes. En agissant également sur la coopération cellulaire entre LB et Tfh auto-réactifs, cela expliquerait le blocage de la maturation des LB et la réapparition retardée des LB mémoires spécifiques de la Dsg qui maintiendrait une rémission sur le long terme. Par contre, le taux élevé de rechutes chez les patients du groupe CS peut s'expliquer par la persistance des LB et des Tfh auto-réactifs qui sont certainement à l'origine de la réémergence des Ac anti-Dsg observée entre le 12 ^{éme} et le 24^{éme} mois.

Rituximab and corticosteroid effect on Desmoglein specific B-cells and T-Follicular-Helper-Cells in Pemphigus

Maud Maho-Vaillant PhD^{1,2}, Corinne Perals PhD³, Marie-Laure Golinski PhD^{1,2}, Vivien Hébert MD^{1,2}, Frédérique Caillot Ph⁴, Claire Mignard MD¹, Gaëtan Riou M², Marie Petit PhD², Manuelle Viguier MD, PhD⁵, Mickael Hertl MD, PhD⁶, Olivier Boyer MD, PhD², Sébastien Calbo PhD², Nicolas Fazilleau PhD³ and Pascal Joly MD, PhD^{1,2}

1 : Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Normandie University, Rouen, France

2: Inserm U1234, Normandie University, Rouen, France

3: Inserm U1043, CNRS UMR5282, Toulouse, France

4: Department of Biostatistics, Rouen University Hospital and INSERM U1219, Normandie University, Rouen, France

5: Department of Dermatology, University of Reims, Reims, France

6: Department of Dermatology and Allergology, Philipps University, Marburg, Germany.

Corresponding author:

Maud Maho-Vaillant Inserm U1234, Dermatology Department, Rouen University Hospital Faculté de Médecine et Pharmacie Bâtiment Recherche - 3ème étage 22 Boulevard Gambetta 76183 R O U E N Cedex 1/FRANCE Phone number: 33 235 14 85 53 E-mail: maud.maho@uni-rouen.fr

Abstract:

Background: Pemphigus is an autoimmune blistering disease mediated by autoantibodies directed against desmogleins. We recently showed that first line treatment with rituximab was more effective than oral corticosteroids in the treatment of pemphigus patients.

Objective: To understand the immunological mechanisms which mediate the long-lasting clinical remission after rituximab treatment.

Methods: We analyzed the anti-desmoglein autoantibody titers by ELISA, the phenotype of desmoglein-specific B-cells and T-follicular-helper-cells by flow cytometry, and the number of antibody-secreting-cells by ELISPOT in patients treated with corticosteroids alone or rituximab.

Results: Corticosteroid treatment did not influence the frequency nor the phenotype of desmoglein⁺ B-cells. Anti-desmoglein antibody-secreting-cells were still detected after treatment, even in patients in remission. In contrast, rituximab induced a significant decrease of IgG-switched desmoglein⁺ memory B-cells. Accordingly, anti-desmoglein antibody secreting cells were no longer detected in patients in complete remission. Interestingly, desmoglein-3 specific T-follicular-helper-cells were detected in patients after treatment at a much lower frequency in patients treated with rituximab than in those treated with corticosteroids.

Conclusion: Our findings indicate that the long-lasting response to rituximab in pemphigus involves two mechanisms: i) a sustained depletion of IgG switched memory autoreactive B-cells leading to the disappearance of anti-desmoglein antibody-secreting-cells, and ii) a decrease of desmoglein -specific circulating T-follicular-helper cells, which might explain the delayed reappearance of desmoglein⁺ memory B-cells. In contrast, the persistence of a high frequency of IgG-switched memory autoreactive B-cells and anti-desmoglein antibody-secreting-cells likely explain the re-increase of anti-desmoglein antibodies, and consequently the high rate of relapses observed in patients treated by corticosteroids.

Key words: Pemphigus, Rituximab, corticosteroids, Desmoglein, B-cells, T follicular helper cells and Autoimmunity.

Introduction

Pemphigus is a life-threatening autoimmune disease of the skin and mucosae due to the production of autoantibodies (Abs) directed against two desmosomal proteins: desmoglein (DSG)-1 and DSG-3, which are adhesion molecules of the epidermis that are responsible for the cohesion between keratinocytes ¹⁻⁴. We recently reported the dramatic efficacy of rituximab (RTX), an anti-CD20 monoclonal antibody as first-line treatment of pemphigus patients⁵. Relative to a standard regimen of corticosteroids (CS) alone, RTX associated with a short-term prednisone regimen allowed 89% of patients to achieve complete remission off therapy at Month (M) 24 ⁵. Moreover, RTX allowed a rapid tapering of prednisone doses. RTX is thought to work mainly by B-cell depletion in pemphigus, as in other autoimmune diseases and some studies have reported that relapses were associated with B-cell reconstitution ^{6–8}. DSG specific B-cells have been estimated at about 10-4 of total B-cells. Up to now, the effect of RTX has been mainly assessed on total B-cells, which does not necessarily reflect its effect on autoreactive DSG-specific B-cells. In particular, we previously reported in pemphigus patients treated with RTX as second line, that long term remission was associated with prolonged failure of DSG B-cell response ⁹.

Most of anti-DSG antibodies belong to the IgG4 subclass ^{10,11}, which suggests the involvement of T-Follicular-Helper-Cells (TFH) in the selection within the germinate center (GC). TFH are characterized by the expression of CXCR5 marker and the production of IL-21, a cytokine which is essential for the generation of memory B-cells and plasma cells ^{12,13}. Interestingly, a higher frequency of circulating TFH and increased serum IL-21 levels have been recently reported in PV patients relative to healthy controls ¹⁴. This study suggested the existence of DSG-3-specific autoreactive T cells producing IL-21 upon ex vivo stimulation with DSG-3 ¹⁴. Analysis of skin lesions in patients with pemphigus showed the presence of IL-21 producing CD4 T cells in association with anti-DSG IgG producing plasma cells, which suggested the existence of a cutaneous tertiary lymphoid structure ¹⁵. The aim of the present study was to investigate the effect of RTX or a standard CS regimen alone on the frequency and phenotype of DSG-specific B-cells and DSG-specific TFH in pemphigus patients, in order to explain the persistence of a sustained clinical remission or on the contrary, the occurrence of relapses.

Patients and methods

Ninety patients with pemphigus vulgaris (74) or pemphigus foliaceus (16) were included in a randomized clinical trial (RITUX 3: ClinicalTrials.gov number, NCT00784589) 5. Patients with a newly diagnosed pemphigus were assigned to receive either 1 to 1.5 mg/kg/day of oral prednisone with a progressive tapering of prednisone doses over 12 to 18 months, or 2 infusions of 1g of intravenous RTX on Days 0 and 14 and 500 mg at months 12 and 18, combined with a short-term prednisone regimen, 0.5 mg/kg/day for moderate pemphigus and 1 mg/kg/day for severe pemphigus. The initial prednisone dose was maintained for 1 month and was thereafter gradually reduced after achievement of disease control, with the aim to stop prednisone after 3 months in patients with moderate pemphigus and after 6 M in patients with severe pemphigus. Patients were followed up to 3 years. Patients who relapsed in the standard CS group after assessment of the primary end point point at M24 were allowed to receive RTX during the third year of study.

Clinical and Immunological evaluations

Complete remission (CR) and relapse were defined according to the consensus statement definition for pemphigus end points ¹⁶. Blood samples were collected from patients, and healthy donors from The French Blood Establishment (EFS). Blood samples from patients were collected at baseline and at each follow-up evaluation visits until the end of the study at M36.

Serum auto-antibody titers

Titers of serum anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG antibodies were measured using a DSG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with 1:100 diluted serums (EUROIMMUN).

Cytokine levels

Serum levels of IL-21 were measured by ELISA (BioLegend), according to the manufacturer's protocol.

Phenotyping analysis

PBMC were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque gradients (GE Healthcare Lifescience) to assess B and T lymphocyte markers. The phenotype of PBMCs was determined by flow cytometry with monoclonal Abs (mAbs) against CD3, CD4, CD8, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD27, CD38 CD86, IgD, IgM and IgG (Beckman Coulter and BD Biosciences). TFH were further characterized by using a combination of different markers with

-182-

chemokine receptors mAbs against CD3, CD4, CD45RA, HLA-DR, PD-1, ICOS CXCR5, CXCR3, CCR6, CCR7 (Miltenyi Biotec and BD Biosciences).

Anti-DSG B-cell analysis

In order to analyze the phenotype of DSG-1 and DSG-3 specific B-cells, B-cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Frequency of DSG-1 and DSG-3 specific B-cells was determined by flow cytometry ⁹. Purified B-cells were incubated for 30 min at 4°C with histidine-tagged recombinant DSG-1 or DSG-3 (30 ng/µl) kindly provided by Prof M Herlt ¹⁷. After washing, B-cells were stained with anti-human IgG antibodies (BD Biosciences). Cells were then incubated with Fc Block (eBioscience), LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies) and anti-human antibodies against CD19, CD27 and IgM (BD Biosciences). Anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify DSG-specific B-cells. The percentage and phenotype of DSG-1 and DSG-3 specific cells were determined by using Flowjo software.

Anti-Desmoglein TFH cell analysis

In order to verify that our patients with pemphigus had the HLADRB1*0402 genotype of PV susceptibility, peripheral blood from patients was collected after obtaining informed consent. Genomic DNA from PBMCs was isolated using the NucleoSpin® tissue kit (Macherey-Nagel). The specific analysis of HLADRB1*04 was performed using the Olerup SSP® DRB1*04 PCR Typing Kit (Bionobis) according to the manufacturer's protocol. Autoreactive T cells were only characterized in PV patients with the HLADRB1*0402 genotype. Frequency and phenotype of DSG-3-specific T cells and TFH cells were determined by flow cytometry using the following mAbs against CD3, CD4, CD45RA, HLA-DR, CXCR5, CXCR3, CCR6 CCR7 (Miltenyi Biotec and BD Biosciences) and using tetramer-based detection system using DRB1*0402 tetramers loaded with identified peptides of DSG-3 (NIH Tetramer Core Facility).

Desmoglein-specific B-cell detection using ELISPOT assay

The frequency of circulating total IgG and DSG-specific IgG antibody secreting cells (ASC) was determined by human IgG ELISPOT Basic (Mabtech) according to the manufacturer's instruction. PBMC from pemphigus patients and healthy donors were pre-stimulated with R848 (1µg/ml) and rhIL2 (10 ng/ml) in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin; Life Technologies) in

separate plates for 72 hours. Plates ELISPOT MAIPS 4510 (Millipore) were coated overnight at 4°C with anti-IgG human antibodies. Plates were washed and blocked with complete medium before use. Pre-stimulated PBMC were washed, resuspended in complete medium and transferred to ELISPOT plate, and then incubated for 24 hours with $1x10^5 - 4 x10^5$ PBMC per well to detect anti-DSG-1 and DSG-3 IgG-secreting ASC, and with 2.5 $x10^3 - 1 x10^4$ PBMC per well to detect total IgG ASC. IgG ASC were detected by addition of biotinylated mouse IgG anti-human IgG. Frequency of anti-DSG-1 or anti-DSG-3 IgG secreting ASC was calculated after incubation for 2 hours with histidine-tagged recombinant DSG-1 or DSG-3 proteins $(1\mu g/ml)^{17}$ in PBS Ca2+. Biotinylated anti-histidine $(0.5\mu g/ml)$ (Abcam) was then added. The streptavidin enzyme and substrate TMB were used to detect spots corresponding to total IgG ASC or DSG-specific ASC. The number of spots was determined with ELISPOT Plate Readers and ImmunoSpot software (CTL). Results were expressed as frequencies of DSG-specific IgG ASC among total IgG ASC. The sensitivity and specificity of our ELISPOT assay were estimated at 1 DSG-3 specific ASC/10⁵ total ASC, and 100% respectively.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Prism software was used for statistical analysis. Statistical analysis was performed by Fisher exact test to compare the frequencies of patients with DGS Abs between RTX and CS groups. The paired T-test was performed to compare patients before and after treatment. For multiple analysis, one way Anova with Dunnett post-test or two anova with Sidak's multiple comparisons test was used. A p value of less than 0.05 was considered significant for all analyses

Results

Clinical course of patients

Ninety patients were randomly assigned to the standard CS regimen or the RTX plus shortterm prednisone groups (Fig 1). At the M36 evaluation, 44 of 46 patients (96%) from the RTX group were in Complete remission (CR) off therapy, including 2 patients who were re-treated with RTX between M24 and M36, and 2 patients had persistent disease activity. Fifteen patients from the CS group were in CR off therapy or still on minimal therapy at M24 and 29 had persistent disease activity. Twenty out of 44 patients (45%) from the CS group were treated with RTX between M24 and M36 due to persistent disease activity or CS side effects.

Serum autoantibodies against desmoglein 1 and desmoglein 3

The evolution of mean serum anti-DSG-1 and anti-DSG-3 Ab Elisa values of patients from the RTX and the standard CS groups is shown in Fig 2. In both treatment groups, autoantibody titers decreased from baseline to Day 270; They then re-increased mainly in patients from the CS group, while they remained negative or at very low levels in most patients from the RTX group. At the M24 evaluation, 5% of patients from the RTX group had positive (>20U/ml) serum anti DSG-1 Elisa values versus 29% of patients from the CS group (p<0.01). Anti DSG-3 Abs were still detected in 14% of patients from the RTX group versus 45% of those from the CS group (p<0.01). Since 20 out of 44 (45%) patients from the CS group were treated with RTX between M24 and M36, the dosage of anti-DSG Abs was not performed after the M24 evaluation in these patients. In patients from the RTX group, positive anti DSG-1 and anti-DSG-3 Abs were detected at the M36 evaluation in 2% and 27% of patients' sera, respectively.

Immunophenotyping of Desmoglein 1 and Desmoglein 3-specific B-lymphocytes

DSG-1 and DSG-3-specific circulating B-lymphocytes were detected in blood samples collected at baseline from 30 pemphigus patients at frequencies ranging from 0.11% to 0.54% (mean \pm standard error of the mean: 0.23 \pm 0.01%) of whole CD19⁺ B-cells for DSG-1 specific B-cells, and from 0.1% to 0.6 % (0.21 \pm 0.01%) for DSG-3 specific B-cells. Two fold lower frequencies of DSG-1 and DSG-3 specific B cells were detected in blood samples from 14 healthy donors (DSG-1: 0.12 \pm 0.01% of whole CD19⁺ B-cells; p=0.003. DSG-3: 0.10 \pm 0.01%; p<0.001) (Fig S1 A1 and A2). In pemphigus patients, the CD27 marker of memory B-cells was enriched among DSG-specific B-cells, as it was expressed by 51 \pm 2% of them, versus 31 \pm 3% of whole CD19⁺ B-cells (p<0.0001) (CD27⁺ DSG-1⁺ B-cells: 53 \pm 3%; CD27⁺ DSG-3⁺ B-cells: 49 \pm 3%) (Fig S1 B1). Class-switched IgG+ CD27+ corresponded to 15.5 \pm 1.4%

of DSG-specific B-cells versus $8.4 \pm 1.2\%$ of whole B-cells (p<0.0001) (CD27⁺ IgG⁺ DSG-1⁺ B-cells:16,0 ± 1.6%; CD27⁺ IgG⁺ DSG-3⁺ B-cells: 15.1 ± 2.3%). In healthy controls, even if memory B-cells were enriched in DSG-specific B-cells (Fig S1 B1), class switched IgG⁺ CD27⁺ DSG⁺ memory B cells were detected at much lower frequencies than in pemphigus patients (CD27⁺ IgG⁺ DSG-1⁺ B-cells: 5.6 ± 1.1%, p= 0.003; CD27⁺ IgG⁺ DSG-3⁺: B-cells: 6.0 ± 1.3%, p= 0.015) (Fig S1 B2).

In order to assess the differential effects of CS alone and CS + RTX in patients in CR or with persistent activity, we analyzed the evolution of DSG-1 and DSG-3 specific B lymphocytes at M36 (after B cell recovery corresponding to18 months after the last infusion of RTX) in patients from the RTX group, and between M9 and M12 (when prednisone doses were tapered lower than 20 mg/day) in patients from the CS group. Surprisingly, DSG-1- and DSG-3-specific B-cells were still detected after B-cell recovery at the M36 evaluation in remitted patients from the RTX group at mean frequencies of $0.23 \pm 0.01\%$ and $0.23 \pm 0.02\%$ of B-cells, respectively (Fig 3 A1 and A2), which were close to the frequencies observed at baseline. Interestingly, the mean frequency of CD27⁺ memory B-cells decreased from baseline to M36 (whole B cells: $26.0 \pm 3.4\%$ vs $11.1 \pm 0.9\%$, p<0.005; DSG-1⁺ B-cells: $55 \pm 4\%$ versus $36 \pm$ 4%, p<0.001; DSG-3+ B-cells: $48 \pm 4\%$ versus $36 \pm 5\%$, p<0.05) (Fig 3 B1). Additionally, the frequency of class-switched DSG-specific CD27⁺ IgG⁺ B-cells which reappeared at M36 was much lower than at baseline (DSG-1⁺ B-cells: $3.8 \pm 1.0\%$ vs $13.5 \pm 1.6\%$, p<0.001; DSG-3⁺ Bcells: $4.5 \pm 0.9\%$ vs $13 \pm 2.4\%$, p<0.01) (Fig 3 B2). Interestingly, the one patient in the RTX group with persistent disease activity had the highest frequency of class-switched DSG-3 specific CD27⁺ IgG⁺ B-cells (25%).Unlike to that observed in the RTX group, we did not observe any modification in the frequency of DSG- specific class switched CD27⁺ IgG⁺ B-cells between the baseline and the M12 evaluation (DSG-1 B-cells: $20.9 \pm 2.7\%$ at baseline versus $15.9\pm3.9\%$ at M12, p= 0.17; DSG-3⁺ B-cells: $18.7\pm4.3\%$ versus 20.0±5.3%, p=0.83) (Fig 3 A3, A4, B4 and B5).

Assessment of circulating anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 IgG secreting B-cells using ELISPOT assay.

DSG-1 and DSG-3 specific ASC were measured in 11 patients from the RTX group (including 10 patients in CR and the one patient with persistent disease activity) and 11 patients from the standard CS group. Circulating anti DSG-1 or anti-DSG-3 IgG ASC were not detected in healthy controls (data not show). At baseline, anti DSG-1 and/or anti-DSG-3 IgG ASC were detected both in patients from the RTX group ($0.10 \pm 0.07\%$ and $0.43 \pm 0.16\%$, respectively)

(Fig 4 A) and in those from the standard CS group $(0.10 \pm 0.05\%)$ and $0.32 \pm 0.10\%$, respectively) (Fig 4 B). After B cell recovery at the M36 evaluation, anti DSG-1 or anti-DSG-3 IgG ASC were no more detectable in the 10 patients from RTX group who were in clinical remission (p<0,01 versus baseline samples), whereas 0.17% anti-DSG-3 IgG ASC were still detected in the one patient with persistent mucosal lesions. In contrast, anti DSG-1 and/or anti-DSG-3 IgG ASC were still detected after treatment in patients from the CS group, even in those in remission although at a lower frequency than at baseline (DSG-1 0.10 \pm 0.05% at baseline versus 0.01 \pm 0.01% at M12, p=0.5: DSG-3: 0.32 \pm 0.10% at baseline versus 0.089 \pm 0.050% at M12; p<0.05).

Evolution of circulating B and TFH cells and serum level of IL-21

Since DSG specific memory B-cells decreased and anti-DSG1 and anti-DSG-3 IgG ASC were no more detected in patients in CR after RTX, while the frequency of DSG specific memory B-cells was unchanged and DSG specific ASC were still detected in patients from the CS group, we then studied the frequency of TFH and serum IL-21 levels in both treatment groups. The TFH subpopulation was defined by the expression of the CD4⁺ CD45RA⁻ CXCR5⁺ surface markers. Phenotypic analyses were performed in 11 patients from the RTX group and 9 patients from the standard CS group. Serum IL-21 levels were measured by Elisa in all patients.

The evolution of peripheral blood whole B-cells and TFH frequency and serum IL-21 level during the course of patients treated with RTX or CS alone is shown in Figure 5. In patients from the RTX group, a 50% decrease in TFH frequency (Fig 5B) which paralleled B-cell depletion (Fig 5A) was observed from M3 to M24 after RTX therapy, followed by a re-increase of TFH up to baseline values, which occurred after B-cell recovery. Conversely, no variation of TFH frequency was observed in patients treated with a standard CS regimen. A dramatic and persistent decrease in serum IL-21 level was observed from baseline to M36 in patients treated with RTX, whereas only a transient decrease of IL-21 levels was observed from baseline to M3 in patients from the standard CS group. Indeed, a re-increase of IL-21 levels was observed after M3 in these latter patients, once CS doses were tapered under 20 mg/day (Figure 5 C).

Effect of treatments on frequencies and phenotype of circulating DSG-3 specific T Helper and TFH cells

Because serum IL-21 level remained low at M36 and no anti-DSG IgG ASC were detected in patient in CR from the RTX group, we measured using a tetramer assay, the post-treatment frequency of DSG specific Th and TFH cells in 7 patients treated with RTX and 9 patients treated with a standard CS regimen, who had the HLA-DRB1*0402 PV susceptibility allele. Two-fold less DSG-3-specific circulating Th cells were detected in the RTX group relative to the CS group ($0.41 \pm 0.31\%$ versus $0.97 \pm 0.52\%$) (Figure 6 A). When additionally using the CXCR5 marker, 7 fold less DSG-3-specific circulating TFH were detected in patients treated with RTX compared with patients treated with CS alone ($0.05 \pm 0.03\%$ versus $0.35 \pm 0.31\%$) (Figure 6 B). Interestingly, the one patient with persistent disease activity in the RTX group had the highest frequency of DSG specific Th and TFH cells.

Discussion

This study first showed that the long-lasting efficacy of RTX in pemphigus patients is associated with the prolonged disappearance of circulating anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG secreting B-cells, and consequently the dramatic decrease of serum anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG Abs, as demonstrated by ELISPOT and ELISA assays, respectively. These findings are in contrast with the detection of circulating DSG-1 and DSG-3 specific B-cells in patients in complete remission after rituximab therapy, at frequencies which were in fact, very close to those observed at baseline before treatment, corresponding to around 0.2% of B-cells. This discrepancy is likely related to the fact that most of DSG-3 specific B-cells detected after the B lymphocyte recovery which followed the initial rituximab-induced B-cell depletion mainly corresponded to naïve CD27⁻IgM⁺ (data not show). B-cells, whereas DSG-specific IgG⁺CD27⁺ memory B-cells were detected at a very low frequency, close to that observed in blood samples from healthy donors. We recently analyzed the expression profile of 31 genes of interest related to inflammatory cytokines, TNF receptors and activation markers in DSG specific autoreactive B-cells collected before and after rituximab treatment in pemphigus patients ¹⁸. Surprisingly, we did not evidence major changes in the genotypic profile of DSG specific B-cells after rituximab therapy except for a decrease in the transcription of the IL-1 β and CD27 genes, which was in accordance with the decreased frequency of CD27⁺ DSG-specific memory B-cells in our phenotypic analyses and those recently reported by Pollmann et al ¹⁹. Our results suggest the major role of the blockage of the IgM to IgG class switching process in the long-lasting effect of RTX in remitted patients. Indeed, beyond its direct effect on whole B-cells and DSG specific B-cells, RTX seems to have a broader effect on the immune system by blocking the interactions between B and T cells during and beyond the B-cell depletion period. This broad effect of RTX on the immune system is also suggested by the decreased frequency of DSG-3specific CD4⁺ Th1 and Th2 cells in pemphigus patients treated with RTX ¹⁷.

Based on their capacity to regulate the maturation of B-cells into memory B-cells and plasma cells secreting high affinity IgG, TFH have been investigated in several autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus ²⁰, rheumatoid arthritis ²¹ and IgG4 related disease ^{22,23.} An elevation of IL-21 serum levels and elevated frequencies of TFH have also been described in pemphigus ¹⁴. DSG-3-specific IL-21-producing cells have also been detected, suggesting their potential role in the pathogenesis of pemphigus ¹⁴. In the present study, we observed a decreased frequency of whole TFH and decreased IL-21 serum levels, which lasted for 6 months and paralleled the RTX induced B-cell depletion. Thereafter, we observed a re-increase

in the frequency of whole TFH after B-cell recovery. Such a decrease of TFH and Th17 has been described in patient with Sjögren syndrome or type 1 diabetes mellitus after RTX treatment ^{24,25}. The combination of reduction in the number of TFH and depletion of B-cell precursors likely results in the decreased production of plasmablasts and short-lived plasma cells, which may explain the long-lasting decrease of anti-DSG antibodies.

Interestingly, we detected DSG-3 specific TFH in the blood of pemphigus patients, which had not been previously reported, yet. In contrast with the re-increase of whole TFH after B-cell recovery, DSG-3 specific TFH remained at a low frequency, that may explain the persistence of naïve non commuted DSG specific B-cells in patients with long lasting remission after RTX. Interestingly, the one patient who still had an active disease after RTX treatment at the M36 evaluation had a very high 25% frequency of memory class switch IgG B-cells among DSG-3 specific B-cells, and accordingly, a high frequency of circulating anti-DSG-3 IgG secreting B-cells and high titers of serum anti-DSG-3 IgG antibodies. Moreover, this patient had a higher frequency of autoreactive DSG-3 specific T cells and higher serum IL-21 levels than patients who were in clinical remission after RTX treatment.

In contrast, we did not observe such variations in the number of whole and DSG-specific TFH, nor any reversal of the balance between memory and naïve DSG specific B-cell subpopulations in patients treated with a standard CS regimen, which reinforces the likely role of RTX in these changes. It is likely that the persistence of high frequencies of DSG specific CD27+ IgG+ B-cells in patients from the CS group was responsible for the re-increase of anti-DSG IgG ASC and anti-DSG antibodies observed once CS dose had been tapered, and consequently the high rate of relapses in patients from this treatment group. Interestingly, the dramatic initial decrease of anti-DSG antibodies in patients treated with high dose of prednisone while the frequency of DSG specific CD27⁺ IgG⁺ B-cells remained unchanged might suggest a direct effect of high doses of CS on ASC, which was accordance with the decreased frequency of anti-DSG IgG ASC measured by ELISPOT and the decrease of anti-DSG antibodies during the initial phase of CS treatment in these patients. Such an effect of CSs as well as their ability to inhibit acantholysis ²⁶ may argue for the combination of short-term CS with RTX treatment.

Overall, this study showed that the therapeutic effect of RTX in pemphigus is not due to a long-lasting depletion of DSG specific B-cells but rather to a blockage of the class switching process, the mechanism of which likely involves the disappearance of DSG-specific TFH. While the initial reduction of DSG specific TFH after RTX therapy may be explained by the

parallel depletion of DSG specific B-cells, the mechanisms of the long-lasting reduction of DSG specific TFH remains largely unknown.

Acknowledgements

We thank the French Study Group on Autoimmune Bullous Skin Diseases (Catherine Prost-Squarcioni, Bruno Labeille, Catherine Picard-Dahan, Maria Polina Konstantinou , Guillaume Chaby, Marie-Aleth Richard, Jean David Bouaziz, Sophie Duvert-Lehembre, Philippe Bernard, Frederic Caux, Marina Alexandre, Saskia Ingen-Housz-Oro, Pierre Vabres, Emmanuel Delaporte, Gaelle Quereux, Alain Dupuy, Sebastien Debarbieux, Martine Avenel-Audran, Michel D'Incan, Christophe Bedane, Nathalie Bénéton, Denis Jullien, Nicolas Dupin, Laurent Misery, Laurent Machet, Marie Beylot-Barry, Olivier Dereure, Bruno Sassolas). We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for editing the manuscript.

Footnotes

1 This study was supported by INSERM, Normandy University, the French National PHRC, and the French Society of Dermatology.

2. Abbreviations:

DSG: desmoglein; RTX: Rituximab; CS: corticosteroids; M: month; CR: Complete remission, TFH: T-Follicular-Helper-Cells; Abs: Antibodies mAbs: monoclonal Abs.
References

1. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell. 1991;67:869–77.

2. Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. N Engl J Med. 2006;355:1800–10.

3. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med. 1982;306:1189–96.

4. Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest. 1989;83:1443–8.

5. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet Lond Engl. 2017;

6. Albers LN, Liu Y, Bo N, Swerlick RA, Feldman RJ. Developing biomarkers for predicting clinical relapse in pemphigus patients treated with rituximab. J Am Acad Dermatol. 2017;77:1074–82.

7. Alberici F, Smith RM, Jones RB, Roberts DM, Willcocks LC, Chaudhry A, et al. Long-term follow-up of patients who received repeat-dose rituximab as maintenance therapy for ANCA-associated vasculitis. Rheumatol Oxf Engl. 2015;54:1153–60.

8. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JCW. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2006;54:613–20.

9. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci Transl Med. 2013;5:175ra30.

10. Cho MJ, Lo ASY, Mao X, Nagler AR, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, et al. Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. Nat Commun. 2014;5:4167.

11. Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Zheng Q, Choi EJ, Reddy SG, Mao X, et al. Autoreactive IgG and IgA B Cells Evolve through Distinct Subclass Switch Pathways in the Autoimmune Disease Pemphigus Vulgaris. Cell Rep. 2018;24:2370–80.

12. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. PloS One. 2011;6:e17739.

13. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J Exp Med. 2010;207:365–78.

14. Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, Möbs C, et al. Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. PLoS ONE [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 2];11. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752242/

15. Yuan H, Zhou S, Liu Z, Cong W, Fei X, Zeng W, et al. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. J Invest Dermatol. 2017;137:2362–70.

16. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. J Am Acad Dermatol. 2008;58:1043–6.

17. Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol. 2008;128:2850–8.

18. Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Riou G, Derambure C, et al. Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen. Front Immunol. 2019;10:1794.

19.Pollmann R, Walter E, Schmidt T, Waschke J, Hertl M, Möbs C, et al. Identification of Autoreactive BCell Subpopulations in Peripheral Blood of AutoimmunePatients With Pemphigus Vulgaris. Front Immunol[Internet].2019[cited2019Aug30];10.Availablefrom:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6587433/

20. Choi J-Y, Ho JH, Pasoto SG, Bunin V, Kim S, Carrasco S, et al. Circulating Follicular Helper-Like T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Association with Disease Activity. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 2015;67:988–99.

21. Arroyo-Villa I, Bautista-Caro M-B, Balsa A, Aguado-Acín P, Bonilla-Hernán M-G, Plasencia C, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicullar helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 21];16. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275955/

22. Akiyama M, Suzuki K, Yamaoka K, Yasuoka H, Takeshita M, Kaneko Y, et al. Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 2015;67:2476–81.

23. Chen Y, Lin W, Yang H, Wang M, Zhang P, Feng R, et al. Aberrant Expansion and Function of Follicular Helper T Cell Subsets in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 2018;70:1853–65.

24. Verstappen GM, Kroese FGM, Meiners PM, Corneth OB, Huitema MG, Haacke EA, et al. B Cell Depletion Therapy Normalizes Circulating Follicular Th Cells in Primary Sjögren Syndrome. J Rheumatol. 2017;44:49–58.

25. Xu X, Shi Y, Cai Y, Zhang Q, Yang F, Chen H, et al. Inhibition of Increased Circulating Tfh Cell by Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Patients with Type 1 Diabetes. PLoS ONE [Internet]. 2013 [cited 2018 Apr 2];8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3835920/

26. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grando SA. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. J Biol Chem. 2004;279:2135–46.

Figures and legends



Figure 1. Flow chart of the study.



Figure 2. Evolution of anti-DSG-1 and anti-DSG-3 antibody ELISA values in sera from pemphigus patients, according to treatment regimens.

Red line=patients assigned to the standard CS group. Blue line= Patients assigned to the RTX group. The dashed line represents the cut-off values proposed by the manufacturer for anti-DSG-1 (Panel A) and anti-DSG-3 (Panel B) antibody ELISA values. (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 versus baseline in patients from the RTX group (above the line) and the Standard CS group (below the line).



Figure 3. Frequency and phenotype of peripheral blood whole B-cells and DSG-1 and DSG-3 specific B-cells evaluated by flow cytometry in pemphigus patients at baseline and after treatment.

Blue = Patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent disease activity is indicated by an arrow. Red =patients assigned to standard CS group. Baseline samples corresponds to plain symbols and post treatment samples to open symbols. Panel A: Evolution of the frequency of DSG-1 and 3-specific B-cells among purified CD19⁺ B-cells between baseline and after RTX treatment (A1 and A2) or after CS treatment (A3 and A4). Panel B: Evolution of the memory B-cell subpopulation (CD19⁺CD27⁺) and class switched memory B-cells (CD19⁺ CD27⁺ IgG⁺) among whole B-cells and DSG-specific B-cells at baseline and after RTX treatment (Panels: B1, B2) or after CS treatment (Panels: B4, B5) (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).



Figure 4. Frequency peripheral blood DSG-1 and DSG-3 specific antibody secreting cells evaluated by ELISPOT assay in pemphigus patients at baseline and after treatment.

Panel A in blue = Patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent active disease (AD) is indicated by an arrow. Panel B in red =patients assigned to standard CS group. Representative of total IgG-Antibodies Secreting B cells (ASC) and Dsg-IgG ASC were detected using ELISPOT from peripheral blood of a pemphigus patients and a healthy donor (HD). Baseline samples corresponds to plain symbols and post treatment samples to open symbols. Result are presented as frequencies of DSG-1 and DSG-3 specific IgG antibody secreting cells (ASC) among total IgG ASC IgG after 72 hours of in vitro stimulation of PBMC with IL2 and R848 (*p<0.05; *p<0.01; ***p<0.001).



Figure 5. Evolution of peripheral blood whole B-cells (panel A) and TFH subpopulation of CD4⁺ T cells (panel B), and serum IL-21 level (panel C) during the follow-up of patients according to treatment regimen.

Blue line= Patients assigned to the RTX group. Red line=patients assigned to the standard CS group. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 versus baseline in patients RTX group group (above the line) and the Standard CS group (below the line).



Figure 6. Frequency of peripheral DSG-3 specific T cells (Panel A) and DSG-3 TFH cells (Panel B) evaluated among whole CD4⁺ T cells in pemphigus patients after treatment.

Blue = Patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent active disease is identified by an arrow. Red =patients assigned to the standard CS group. The frequencies were calculated by flow cytometry using DRB1*0402 tetramers loaded with DSG-3 peptides. Analyses were performed at M36 after B-cell recovery in patients from RTX group and at M9-12 when prednisone doses were tapered under 20 mg/day in patients from Standard CS group.



Figure S1. Frequency and phenotype of peripheral blood desmoglein 1 and desmoglein 3 specific B-cells evaluated by flow cytometry in pemphigus patients at baseline (grey squares) and healthy donors (white circles).

Panel A: Frequency of desmoglein 1 (A1) and desmoglein 3 (A2) specific B-cells among purified CD19+ B-cells. Panel B: Phenotype of B-cell subpopulations: Memory B-cells (CD19+CD27+) (B1), and class switched memory B-cells (CD19+CD27+ IgG+) (B2) among whole B-cells and desmoglein specific B-cells. HD: healthy donors (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

DONNEES COMPLEMENTAIRES : ANALYSE PHENOTYPIQUE DES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES HELPER

L'analyse cytométrique des fréquences des LT et plus particulièrement des Tfh autoréactifs post-traitements des patients de l'étude RITUX 3 présentant le HLA-DRB1*0402 de susceptibilité au PV a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les patients traités uniquement par la prednisone et ceux ayant reçu le RTX. Cette étude a permis d'établir, pour la première fois, l'existence de Tfh spécifiques de la Dsg3 dans le sang de patients atteints de pemphigus. La faible fréquence des Tfh spécifiques de la Dsg3 chez les patients du groupe RTX après traitement explique probablement la persistance du phénotype naïf et non-commuté des LB spécifiques des Dsg chez les patients présentant une rémission durable après RTX.

Parallèlement, nous avons réalisé une analyse préliminaire du phénotype des Tfh (CD3+CXCR5+CD45RA-) et des Tfh spécifiques de la Dsg3 (CD3+CXCR5+CD45RA-Tétramére Dsg+) chez les patients atteints de pemphigus après 9 mois de traitement par la CS ou après le retout des LB à 36 mois en évaluant l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 permettant de distinguer les sous-ensembles principaux de Tfh (Schmitt et al., 2014) : Tfh1 (CXCR3+), Tfh2 (CXCR3-CCR6-), Tfh17 (CXCR3-CCR6+) et de Tfh1* CXCR3+ CCR6+) selon le « matériels et méthodes » décrit dans l'article n°3 (Figure complémentaire).

Notre analyse préliminaire du phénotype des Tfh spécifiques de la Dsg3 après traitement par RTX ou CS montre une plus faible proportion de Tfh1 par rapport au phénotype des Tfh non auto-réactifs (moyenne ± erreur standard de la moyenne : CS groupe : $15 \pm 5\%$ versus $29 \pm 4\%$, p<0,005 ; RTX goupe : $13 \pm 6\%$ versus $29 \pm 6\%$ p<0.005) De plus les Tfh spécifiques de la Dsg3 après RTX sont préférentiellement de type Tfh2 (CS groupe Dsg3 Tfh2 : $20 \pm 7\%$ versus groupe RTX Dsg3 Tfh2: $50 \pm 9\%$, p<0.005) alors que ceux après CS sont préférentiellement Tfh1* (CS groupe Dsg3 Tfh1* : $23 \pm 5\%$ versus groupe RTX Dsg3 Tfh1* : $10 \pm 4\%$ p=0,01). Nos observations préliminaires semblent confirmer une altération de l'équilibre au sein des Tfh auto-réactifs avec une dominance de Tfh2 par rapport aux Tfh1 donnant un *ratio* (Tfh1/Tfh2+Tfh17) plus faible que dans la population Tfh non-auto-réactifs après RTX (RTX goupe : $0.55 \pm 0.14\%$ versus $0.19 \pm 0.09\%$, p=0,03).



Figure complémentaire : Analyse phénotypique des lymphocytes T Folliculaires Helper chez des patients atteints de pemphigus après traitements

Carré rouge = patients assignés au groupe corticothérapie standard (CS) après 9 mois de traitement. Cercle Bleu = patients affectés au groupe rituximab (RTX) après le retour des lymphocytes B à 36 mois. (A) : Stratégie d'analyse par cytométrie en flux du phénotype des sous-population de lymphocytes T folliculaire helper (Tfh) (CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-) périphériques spécifiques ou non de la desmogleine 3 (Dsg3) avec un système utilisant des tétramères DRB1* 0402 chargés de peptides de la Dsg3. (B) : Fréquences des sous-populations de Tfh1(CXCR3+), Tfh2 (CXCR3-CCR6-), de Tfh17 (CXCR3-CCR6+) et de Tfh1*(CXCR3+ CCR6+) parmi les Tfh non auto-réactifs et les Tfh spécifiques de la Dsg3 après les traitements par RTX ou CS. (C) : Rapport Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) parmi les Tfh non autoréactifs et les Tfh spécifiques de la Dsg3 après traitements par RTX ou CS. Analyse de comparaisons multiples en Anova two-way avec post-test de Sidak (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).

La caractérisation des Tfh spécifiques des Dsg après traitement ainsi que leur évolution depuis le début de la maladie semblent essentielles pour comprendre leur implication dans la maturation des LB auto-réactifs dans le pemphigus et dans les mécanismes de rémission à long terme.

ARTICLE N°4 :

MODIFICATIONS OF THE TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF AUTOREACTIVE B CELLS FROM PEMPHIGUS PATIENTS AFTER TREATMENT WITH RITUXIMAB OR STANDARD CORTICOSTEROID REGIMEN

Hébert V., Petit M., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Golinski M-L., Riou G., Derambure C., Boyer O., Joly P. et Calbo S.

Publié dans Frontiers in Immunology

Notre récente étude clinique RITUX 3 a clairement démontré que le RTX était plus efficace que la CS en première intention. De plus, nous avons montré que des LB spécifiques des Dsg étaient encore détectables dans le sang des patients atteints de pemphigus en rémission complète après le retrour des LB 36 mois après l'injection initiale du RTX.

L'objectif de cet article était de mieux caractériser les LB auto-réactifs par rapport aux LB non auto-réactifs avant et après traitement afin de comprendre les mécanismes qui interviennent dans cette rémission de longue durée après RTX.

Nous avons étudié les profils d'expression de LB spécifiques ou non des Dsg pour 33 gènes d'intérêt liés aux cytokines ou aux marqueurs d'activation exprimés par les LB, à l'échelle unicellulaire, isolés des patients de l'étude RITUX 3 avant et après traitements.

Les LB spécifiques des Dsg présentent initialement un profil pro-inflammatoire avec une augmentation de la fréquence d'expression de trois gènes codant pour les cytokines *IL-1β*, *IL-12p35* et *IL-23p19* ainsi que pour le gène de l'IRF5 (*Interferon regulatory factor* 5) par rapport aux LB non auto-réactifs. Étonnamment, l'évolution du profil d'expression génique des LB spécifiques des Dsg avant et après traitement par RTX montre peu de changement dans le profil transcriptomique à l'exception de l'IL-1β et du CD27. Chez les patients du groupe CS, la prednisone entraine chez les LB spécifiques des Dsg une diminution de la fréquence l'expression des gènes codant pour l'*IL-1β* et *l'IL-23p19*.

En conclusion, les LB spécifiques des Dsg ont un profil d'expression génique différent de celui des LB non auto-réactifs. Le RTX et la CS ont des effets différents sur l'expression des gènes des LB spécifiques des Dsg sauf pour l'Il-1 β qui semble jouer un rôle important dans la physiopathologie du pemphigus.



ORIGINAL RESEARCH published: 07 August 2019 doi: 10.3389/fimmu.2019.01794



Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen

Vivien Hébert^{1,2*}, Marie Petit¹, Maud Maho-Vaillant^{1,2}, Marie-Laure Golinski^{1,2}, Gaëtan Riou¹, Céline Derambure³, Olivier Boyer¹, Pascal Joly^{1,2} and Sébastien Calbo¹

[†] INSERM U1234, Normandie University, Rouen, France, ² Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France, ³ INSERM U1245, Normandie University, Rouen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

J. Michelle Kahlenberg, University of Michigan, United States

Reviewed by:

Jens Waschke, Ludwig Maximilian University of Munich, Germany Rita A. Moura, University of Lisbon, Portugal

> *Correspondence: Vivien Hébert vivien.hebert@chu-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to Autoimmune and Autoinflammatory Disorders, a section of the journal Frontiers in Immunology

> Received: 05 March 2019 Accepted: 16 July 2019 Published: 07 August 2019

Citation:

Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Riou G, Derambure C, Boyer O, Joly P and Calbo S (2019) Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen. Front. Immunol. 10:1794. doi: 10.3389/fimmu.2019.01794 Pemphigus Vulgaris is an autoimmune disease of the skin and mucous membranes, which is due to the production of pathogenic autoantibodies targeting desmoglein (DSG) 1 and 3, which are adhesion proteins of the keratinocytes. Rituximab is an anti-CD20 mAb which induces a prolonged depletion of blood B cells. We recently showed that rituximab was more effective than a standard oral corticosteroid (CS) treatment, allowing 90% of patients to achieve complete remission (CR). Additionally, we showed that DSG-specific-B (DSG positive) cells were still detectable during the B cell recovery which follows the initial rituximab-induced B cell depletion, even in patients in CR. In order to characterize DSG positive B cells in patients in CR after rituximab or CS treatment relative to those detectable at baseline in patients with an active pemphigus, we studied the expression profile of 31 genes of interest related to inflammatory cytokines, TNF receptors and activation markers. Using quantitative Polymerase Chain Reaction performed on one cell with a microfluidic technique, we found that patients' autoreactive B cells collected at baseline had a significantly higher expression of genes encoding for IL-1β, IL-23p19, and IL-12p35 pro-inflammatory cytokines and the IRF5 transcription factor, than non-autoreactive B cells. Surprisingly, the gene expression profile of DSG positive B cells collected after rituximab treatment in patients in CR was close to that of DSG positive B cells at baseline in patients with active pemphigus, except for the IL-1ß and the CD27 memory marker genes, which were under-expressed after rituximab compared to baseline. Conversely, we observed a decreased expression of genes encoding for IL-1β and IL-23p19 in patients treated with CS relative to baseline. This study showed that: (i) DSG positive autoreactive B cells have a different gene expression profile than non-autoreactive B cells; (ii) rituximab and CS have different effects on the genes' expression in autoreactive DSG positive B cells from pemphigus patients.

Keywords: pemphigus, rituximab, corticosteriods, autoreactive B cell, transcriptomic analysis

INTRODUCTION

Pemphigus is a rare life-threatening autoimmune blistering disease involving the skin and mucosa, leading to erosions and major weight loss, which severely impair patients' quality of life (1–5). It is characterized by the production of pathogenic autoantibodies directed against two desmosomal proteins involved in keratinocyte adhesion: desmoglein 1 (DSG1) and desmoglein 3 (DSG3) (1, 6). DSG3 is mainly found in deep skin epidermal layers and mucosa, while DSG1 is present throughout the epidermis. Anti-DSG3 antibodies (Abs) are observed in pemphigus vulgaris (PV) with mucosal involvement, and anti-DSG1 Abs are observed in patients with pemphigus foliaceus (PF) and those with PV and skin involvement. Binding of anti-DSG Abs to their target antigen results in a loss of keratinocyte adhesion, leading to the so called "acantholysis" phenomenon, which results in the formation of skin and mucosal blisters (7–9).

Until recently, high-dose of oral corticosteroids (CS) sometimes associated with immunosuppressive drugs (azathioprine, mycophenolate mofetil) were the mainstay of pemphigus treatment (10). A recent large randomized controlled study (RCT) from our group demonstrated the interest of the first line use of rituximab in pemphigus (11). A large difference was evidenced in the primary outcome: 89% of patients in the rituximab + short term CS arm were in complete remission off therapy after 2 years, compared with 34% of patients treated with prednisone alone (p < 0001).

Rituximab is a chimeric murine-human monoclonal antibody that binds to the CD20 antigen of B-lymphocytes (anti-CD20 mAb), which is expressed by pre-B-cell and pre-plasma cells. A stop in the renewal of the plasma cell pool is thought to be one of the main mechanisms of the short-term action of rituximab (12, 13). However, the long-term clinical course of pemphigus patients treated with rituximab has not been extensively assessed yet. In particular, apart from a reversal of the naïve/memory Bcell *ratio*, the long-term evolution of reappearing DSG1– and DSG3–specific B cells after rituximab treatment remains largely unknown (14). Furthermore, the effects of oral CS on DSG specific-B cells in pemphigus patients has not been studied yet.

In addition to producing antibodies, B cells secrete multiple cytokines with pro- or anti-inflammatory functions, which can either enhance or downregulate the immune response. Since understanding the long-term modifications of the DSG-specific autoimmune B cell response after rituximab treatment might improve the way we use this drug, we longitudinally analyzed the transcriptomic and phenotypic profiles of one-cell sorted autoreactive DSG-specific B cells from patients with a newly diagnosed pemphigus (during the active phase of disease) and after treatment with rituximab or a standard CS regimen, and compared these results with those observed from non-autoreactive B cells.

RESULTS

Baseline Analysis

Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), we analyzed the single cell mRNA expression of 33 genes

encoding for membrane markers, cytokine receptors or transcription factors (Table SI) which are known to be expressed in B cells from 20 patients. Among them, nine pemphigus patients were treated by rituximab and assessed at baseline and at Month 36 (18 months after the last rituximab infusion); all of them were in complete remission at M36. Eleven pemphigus patients were treated by oral corticosteroids and assessed at baseline and Month 12, after tapering of CS doses; five of these 11 patients were in clinical complete remission at Month 12. The 20 patients had a pemphigus vulgaris with either isolated mucosal involvement or skin and mucosal involvement. Clinical, biological, and immunologic characteristics of patients are presented in Tables 1, 2. Finally, we performed a transcriptomic analysis in seven out of 14 healthy donors (HD) who were studied with phenotypic analyses. Indeed, DSG1-positive (Figure 1A) and DSG3-positive (Figure 1B) B cells were detectable in HD, although at a lower frequency than in the 20 patients with active pemphigus (DSG1 positive 0.11 vs. 0.20%, *p* < 0.001; DSG3 positive 0.10% vs. 0.20%, *p* < 0.001).

We first compared the baseline gene expression between non-autoreactive DSG-negative B cells (201 single cells) and autoreactive DSG-positive B cells (191 single cells) from pemphigus patients. We observed that the mRNA of 11 genes (IL-2, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17F, IL-21, IL-27p28, IFN γ , TGF β 2, and APRIL) was not detected at baseline neither in DSGpositive, nor in DSG negative B cells from pemphigus patients, whereas all housekeeping genes were detected. Therefore, these latter genes were not further analyzed. The 22 remaining genes detected were used to realize a heat map representing the Δ CT expression of these genes between autoreactive and nonautoreactive B cells at baseline (**Figure 1C**).

At baseline, autoreactive DSG-positive and non-autoreactive DSG-negative sorted B cells showed distinct mRNA expression profiles for the three pro-inflammatory cytokine genes IL-1 β , IL-12p35, IL-23p19, and for the transcription factor IRF5 gene which were found to be overexpressed by the DSG-positive relative to the DSG-negative B cell populations (**Figure 1D**), whereas no difference of expression of these four genes was evidenced between DSG-positive (107 single cells) and DSG-negative (69 single cells) B cell populations from HD (data not shown).

Longitudinal Analyses in Patients Treated With Rituximab

We performed a longitudinal analysis by flow cytometry in the nine rituximab-treated pemphigus patients previously analyzed by qPCR. Frequency of DSG1-positive and DSG3-positive autoreactive B cells did not vary significantly between baseline and Month 36 when patients were in complete remission (DSG1 positive: 0.20% vs. 0.22%, p = 0.67; DSG3 positive 0.23% vs. 0.25, p = 0.61; **Figures 2A,B**).

We then analyzed the expression of selected genes in 306 single DSG-positive B cells from the nine rituximab-treated pemphigus patients, including 191 sorted-cells from blood samples collected at baseline and 115 sorted-cells from samples collected at Month 36 after RTX treatment. One hundred

B Cells From Pemphigus Patients

Age	Treatment	Type of pemphigus	Severity	ELISA anti-DSG1 Ab value at D0	ELISA anti-DSG3 Ab value at D0	Clinical status at M36	ELISA anti-DSG1 Ab value at M36	ELISA anti-DSG3 Ab value at M36
51	RTX	Mucosal	Moderate	30	750	Complete remission	<20	80
45	RTX	Mucosal	Severe	<20	360	Complete remission	<20	<20
63	RTX	Mucosal	Severe	<20	2,050	Complete remission	<20	111
28	RTX	PV skin + mucosa	Severe	330	120	Complete remission	<20	555
76	RTX	Mucosal	Severe	<20	530	Complete remission	<20	157
80	RTX	PV skin + mucosa	Severe	410	1,805	Complete remission	<20	<20
52	RTX	PV skin + mucosa	Severe	260	4,000	Complete remission	<20	<20
64	RTX	PV skin + mucosa	Severe	200	131	Complete remission	<20	<20
48	RTX	PV skin + mucosa	Severe	356	176	Complete remission	<20	<20

TABLE 1 | Clinical and biological characteristics of patients from the rituximab group.

 TABLE 2 | Clinical and biological characteristics of patients from the standard corticosteroids (CS) group.

Age	Type of pemphigus	Severity	ELISA anti-DSG1 Ab value at D0	ELISA anti-DSG3 Ab value at D0	Clinical status at M12	ELISA anti-DSG1 Ab value at M12	ELISA anti-DSG3 Ab value at M12
76	PV skin + mucosal	Severe	107	2,400	Complete remission	<20	<20
54	PV skin + mucosal	Severe	1,960	179	Complete remission	<20	<20
66	PV skin + Mucosal	Severe	27	3,350	Complete remission	<20	126
48	PV skin + mucosa	Severe	176	760	Complete remission	<20	<20
33	PV skin + mucosa	Severe	60	143	complete remission	<20	<20
79	PV skin + mucosa	Severe	1,110	553	Incomplete remission	<20	<20
45	PV skin + mucosa	Severe	156	5,217	Incomplete remission	30	1040
61	PV skin + mucosa	Severe	170	1,750	Incomplete remission	<20	550
71	PV skin + mucosa	Severe	665	225	Incomplete remission	77	<20
58	PV skin + mucosa	Severe	1,070	1,065	Incomplete remission	<20	<20
58	PV skin + mucosa	Severe	214	1,979	Incomplete remission	<20	128

and seven single DSG-positive B cells from the seven healthy individuals were used as controls (**Figure 3**).

Interestingly, the expression of the IL-1 β gene in DSG-positive B cells, which was higher at baseline in pemphigus patients than in healthy individuals (12 vs. 6%, p = 0.048), returned to normal values after rituximab treatment (12 vs. 4%, p = 0.039). We also observed that, whereas the frequency of expression of the CD27 memory marker gene in desmoglein-positive B cells collected from pemphigus patients at baseline was close to that observed in healthy individuals (23 vs. 17%, p = 0.24), the CD27 gene expression decreased from baseline to Month 36 in pemphigus patients treated with rituximab (23 vs. 10%, p = 0.03).

Surprisingly, we did not observe any statistically significant variation in the frequency of the other genes studied between samples collected from pemphigus patients at baseline and after rituximab treatment. In non-autoreactive desmoglein-negative B cells, rituximab treatment did not induce modification of gene expression for the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (2 vs. 4.1%, p = 0.73) whereas it induced a decreased frequency of expression of the CD27 memory marker gene (15.1 vs. 6.9%, p = 0.04; **Figure 4**).

Longitudinal Analyses in Patients Treated With Corticosteroids Alone

We performed a longitudinal flow cytometry analysis in the same 11 corticosteroids-treated pemphigus patients previously analyzed by qPCR. In these 11 CS-treated patients, 311 single DSG-positive cells were isolated including 191 sorted-cells from samples collected at baseline and 120 sorted-cells from samples collected at Month 12. This Month 12 evaluation was chosen because patients still received low doses of prednisone at this time point.

B Cells From Pemphigus Patients



After treatment with systemic corticosteroids (**Figure 5**), IL-1 β gene was downregulated (12–1.7%, p = 0.003) allowing to return to values close to those observed in HD. Although the baseline gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL-23p19 in desmoglein-positive B cells from patients was close to that detected in healthy individuals (12.5 vs. 15%, p = 0.59), we observed a downregulation of the gene after corticosteroids treatment (12.5 vs. 1.2%, p < 0.005). We did not observe significant variation in the expression of the other genes studied, including the CD27 memory marker gene (baseline: 23.5% vs. after CS treatment 26.6%, p = 0.48). In non-autoreactive desmoglein-negative B cells (**Figure 6**), corticosteroids treatment induced non-significant variations of the IL-23p19, IL-1 β , and CD27 genes, as other genes from the panel studied.

Assessment of the CD27 Memory Marker in Autoreactive B Cells After Rituximab

To extend the results of our transciptomic analysis, we studied the evolution of the CD27 expression on the cell surface of DSG-positive and DSG-negative B cells during treatment with rituximab or corticosteroids. According to the findings from

B Cells From Pemphigus Patients



transcriptomic analyses, we observed a significant decrease in the frequency of memory CD19+CD27+ autoreactive DSG-positive and DSG-negative B cells after rituximab treatment (**Figure 7A**), that were not observed in patients treated with CS alone without rituximab (**Figure 7B**).

ELISA Assays

In order to evaluate the consequences of the decreased IL- 1β gene expression in DSG-positive B cells from pemphigus patients whether they were treated with corticosteroids or rituximab, we performed longitudinal dosages of serum IL- 1β using ELISA assay.

We observed a non-significant decrease of serum IL-1 β ELISA values in pemphigus patients during the first 3 months of treatment, that was secondarily followed by a re increase of serum levels to baseline values when corticosteroids doses were tapered during patients' follow-up (**Figure 8**).



FIGURE 3 Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1 β and CD27 in one-cell sorted desmoglein-positive autoreactive B cells from healthy donors (white columns n = 107 cells) compared to pemphigus patients before treatment (gray columns, n = 191 cells) or after rituximab treatment (black columns, n = 115 cells). Frequencies were compared using the Fisher's exact test.



FIGURE 4 | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for the IL-1 β and CD27 genes in one-cell sorted desmoglein-negative B cells from healthy donors (white columns, n = 69 cells) and pemphigus patients at baseline (gray columns, n = 201 cells) and after rituximab treatment (black columns, n = 106 cells). Frequencies were compared using the Fisher's exact test.

Finally, the IL-23p19 cytokine, whose gene expression was downregulated after CS treatment in autoreactive B cells, was also analyzed by ELISA. No significant variation in the IL-23p19 serum level was detected in pemphigus patients whether they were treated with rituximab or CS alone (data not shown).

Hébert et al.

B Cells From Pemphigus Patients



FIGURE 5 Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1 β , IL-23p19, and CD27 in one-cell sorted desmoglein-positive from healthy donors (white columns, n = 107 cells) compared to pemphigus patients before treatment before (gray columns, n = 191 cells) and after CS treatment (black columns, n = 120 cells). Frequencies were compared using the Fisher's exact test.



healthy donors (white columns, n = 69 cells), and pemphigus patients at baseline before treatment (gray columns, n = 201 cells) or after corticosteroids treatment (black columns, n = 123 cells). Frequencies were compared using the Fisher's exact test.

DISCUSSION

In this study, we assessed the transcriptomic profiles of 33 genes of potential interest in pemphigus on one-cell sorted autoreactive B cells collected from pemphigus patients at different stages of their disease, in particular during the acute phase of the disease, and after two treatments (systemic corticosteroids alone or associated with rituximab) which were compared in a randomized controlled trial (11).

This methodology has several major interests. First, it allowed to study *ex vivo* autoreactive B-lymphocytes, since pemphigus is one of the rare autoimmune diseases in humans in which autoantibodies directed against DSG are pathogenic (15). Second,



auto-reactive DSG positive B cells are the pre-stage of antibodysecreting plasma cells, which cannot be easily studied *ex vivo* in humans. Third, the one-cell sorting assays are likely relevant since a very low number of circulating autoreactive B cells in the peripheral blood are enough to trigger the disease, as we showed in the baseline analyses. To the best of our knowledge, this singlecell transcriptome analysis of autoreactive cells is the first one performed in patients with an auto immune disorder.

We first evidenced that the transcriptomic profiles of autoreactive and non-autoreactive B cells collected during the active phase of disease were different. Four out of the 31 genes studied (IL-1 β , IL-12p35, IL-23p19, IRF5) were overexpressed in autoreactive relative to non-autoreactive B cells. The most surprising finding in this study was the observation that in addition to the fact that DSG-positive B cells are still detectable after rituximab treatment, arguing against a simple deletion mechanism, the gene expression profile of DSG-positive autoreactive B cells collected after rituximab treatment in patients

Hébert et al.



in complete remission was actually pretty close to that of DSGpositive B cells collected at baseline in patients with active pemphigus, except for the IL-1 β and the CD27 genes, which were downregulated after rituximab compared to baseline.

The downregulation of the CD27 memory marker gene observed in transcriptomic analysis was confirmed by flow cytometry, which showed a lower expression of the CD27 protein at the cell surface of autoreactive B cells after rituximab as well as in non-autoreactive B cells. Thus, the decreased expression of the CD27 gene after rituximab was not specific for DSGpositive B cells. However, the decreased expression of the CD27 marker reflects the blockage of B cell maturation, leading to a prolonged repopulation with naïve B cells, and a delayed reappearance of memory B cells. It has been suggested that autoantibodies are produced by a transitory subpopulation of autoreactive plasmablasts which are continuously refund from autoreactive switched memory B cells (CD20+IgG+CD27+) (13, 16). Thus, changes in CD27 expression which correlates with the disappearance of circulating DSG-positive IgG(+) B lymphocytes are likely responsible for the decreased production of anti-DSG autoantibodies, that contributes to the long lasting clinical remission of the disease after rituximab treatment (14). Another argument which supports this hypothesis is the fact that by using an ELISPOT assay, we showed that DSG3+CD27+ B cells but not DSG3+CD27- B cells are able to differentiate into antibody secreting cells after 72h of stimulation by IL-2 and R848, a TLR7 and eight ligands (still unpublished data). This mechanism was specifically related to rituximab, since it was not observed in patients treated with CS alone, whether they were in complete or incomplete remission.

Conversely, changes in CD27 do not influence the production of alloreactive antibodies which are produced by long-lived plasma cells which do not express the CD20 marker, explaining the absence of modification of total serum IgG levels in after rituximab in most patients.

We also observed that the expression of the IL-1 β gene in DSG specific B cells, which was higher in baseline samples from pemphigus patients than in healthy individuals, and returned

to normal values after rituximab or oral CS treatment, whereas no modification was observed in non-autoreactive desmogleinnegative B cells. This observation might suggest the potential role of IL-1ß in the pathogenicity of pemphigus, since the downregulation observed in autoreactive B cells paralleled disease remission, whether patients were treated with rituximab or oral CS. Indeed, IL-1ß is a pro-inflammatory cytokine mainly produced by hematopoietic cells such as blood monocytes, tissue macrophages and skin dendritic cells in response to TLR ligand, activated complement components or other cytokines such as TNF- α and IL-1 β itself (17, 18). In our work, we observed a slight decrease of serum IL-1ß during the first 3 months of treatment in both CS- and RTX-treated groups, which was likely related to the effect of high doses of CS. It was then followed by a re-increase of serum levels to baseline values when corticosteroids doses were tapered. The role of IL-1 β has previously been suggested by Feliciani et al. who demonstrated that an IL-1ß KO mouse model was less susceptible to passive transfer of IgG isolated from the serum of a PV patient. Moreover, Increased concentrations of IL- 1α and IL-1 β were detected in the serum of untreated PV patients with active disease relative to healthy controls. Additionally, the in vivo and in vitro production of IL-1a and IL-1β decreased in patients in clinical remission after treatment with IVIG. Finally, IL-1β promotes Th17 polarization, which correlates with disease activity (19-24).

Since the frequency of autoreactive B cells in pemphigus patients was surprisingly only doubled compared to healthy donors, it is likely that the different gene expression profiles of IL-1 β and CD27 play a major role in the onset of pemphigus by promoting the emergence/appearance of DSG + CD27+ IgG+ B memory cells, which were only detected in pemphigus patients but not in healthy individuals.

Despite the fact that we observed a difference in the baseline expression of the IL-12p35 between DSG-positive and DSGnegative B cells, we did not observe significant modification in RNA expression in patients in complete remission after rituximab, nor variation in the serum concentration of IL-12p35 during patients' follow-up, which does not support a major role for IL-12p35 in the healing of RTX-treated patients.

We did not analyse the serum concentration of cytokines relevant for B cell activation such as BAFF, APRIL, or IL-6, because we did not observe any modification of the gene expression of these cytokines by autoreactive DSG-positive B cells in our transcriptomic analyses.

Overall, this study showed that self-reactive and non-selfreactive B cell populations from pemphigus patients do not express the same genes during the acute phase of the disease, in particular genes encoding for IL-1 β , IL-12p35, IL-23p19, and IRF5. Additionally, DSG-positive autoreactive B cells can still be observed in patients in complete remission, even in those treated with rituximab, when blood B-lymphocytes reappeared after the initial rituximab-induced depletion. Surprisingly, the gene expression of autoreactive DSG-positive B cells in remitted patients was close to that observed at baseline, except for the CD27 gene which was downregulated in patients treated with rituximab, and the IL-1 β gene, which was down regulated in both treatment groups, likely related to the effect of oral CS.

METHODS

Clinical Study

In the randomized controlled trial, 90 newly-diagnosed pemphigus patients were randomly assigned to receive a standard regimen of CS vs. rituximab associated with a shortterm CS regimen. Patients in the rituximab group were treated with the autoimmune regimen (two infusions of 1,000 mg of rituximab at day 0 and day 14) and a maintenance treatment corresponding to two infusions of 500 mg at Month 12 and Month 18. They also received an initial medium dose of prednisone, 0.5-1 mg/kg/day, depending on initial pemphigus severity (moderate vs. severe), which was rapidly tapered over 3-6 months. Patients assigned in the standard oral CS group were given a higher initial dose of prednisone, 1-1.5 mg/kg/day, with a progressive tapering over 12-18 months, depending on initial pemphigus severity. Patients who participated in the Ritux 3 clinical trial were included in the present study (ClinicalTrials.gov number, NCT00784589).

Patients

Blood samples from rituximab-treated patients were analyzed at baseline before treatment (Day 0) and after 36 months of followup, since we had to wait for the recovery of blood B-lymphocytes after the repeated infusions of rituximab at Day 1 and Month 12 and Month 18. Blood samples from CS-treated patients were analyzed before treatment and at Month 12 at which time patients in the standard CS group were still treated with oral CS.

Serum Auto-Antibody Titers and Cytokine Levels

Titers of IgG antibodies against DSG1 and three were measured by a DSG enzyme-linked immunosorbent assay test (ELISA) with 1:100 diluted serums (EUROIMMUN, Germany, Lübeck). Serum levels of IL-1 β and Il-23p19 were quantified by ELISA (RD and ebioscience, respectively), according to the manufacturer's protocol.

Phenotyping of Desmoglein-Specific B Cells

In order to analyse DSG1 and DSG3 specific B cells, B cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. Then, purified B cells were incubated for 30 min at 4°C with histidine-tagged recombinant DSG1 or DSG3 (30 ng/µl). After washing, B cells were stained with anti-human IgG antibodies (BD Biosciences). Cells were then incubated with Fc Block (eBioscience), LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies), anti-human antibodies directed against CD19, CD27, IgM (BD Biosciences). Anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify desmoglein-specific B cells.

One-Cell Sorting and Pre-amplification

DSG-positive single B cells were sorted using FACS ARIA III into 96-well plates containing 10μ L Platinum Taq polymerase and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), a mixture

of Taqman primer-probes at $0.2\times$ concentration specific for the transcripts of interest (Table SI) and CellsDirect qRT-PCR buffer (Invitrogen). Immediately after cell sorting, samples were centrifuged, incubated at 55°C for 10 min, and subjected to 30 cycles of PCR (50°C 15 min then 95°C for 15 s for the reverse transcription, followed by 30 cycles of 95°C 15 s, and 60°C 4 min for amplification). Subsequent pre-amplified single-cell cDNA was stored at -20° C until analysis.

Real-Time qPCR

After ¼ dilution in TE buffer, each cDNA sample was then separated into 48 separate reactions for further qPCR using the BioMark 48.48 dynamic array nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.). Briefly, following hydraulic chip priming, 48 pre-amplified cDNA samples were mixed with a mild detergent loading solution to allow capillary flow. Samples were then added to a 48.48 nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.) along with 38 individual Taqman primer-probe mixtures listed in Table SI (Applied Biosystems) specific for individual transcripts of interest, allowing a combination of each sample to mix with each probe in every possible combination (a total of 2,304 reactions). The chip was then thermocycled through 40 cycles and fluorescence in the FAM channel was detected using a CCD camera placed above the chip, normalized by ROX (6carboxy-X-rhodamine) intensity. A well containing 100 CD19+ cells and a well without cell were used as positive and negative controls, respectively. To limit potentially biased measurement, cells with <2 expressed genes among the five control genes (HPRT1, B2M, GUSB, TUBB, and GAPDH) were excluded from the analysis. Data were analyzed using Real Time PCR Analysis software with or without normalization of the Ct value for each gene using GAPDH as calibrator gene. We considered that sorted cells expressed a gene if the Ct (threshold of detection) value was < 40 and if the detection curve was a sigmoid. Eleven genes were found to be unexpressed by single B cells including IL-2, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17F, IL-21, IL-27p28, IFNγ, TGFβ2, and APRIL. This absence of detection was due to a too low RNA amount since positive control wells containing 100 CD19+ cells showed detectable expression levels of all tested cytokine genes. We compared the frequency of cytokine gene expressing B cells using qPCR between treatment groups.

∆Ct Analysis

The Δ Ct analysis allows to determine the intensity of the gene of interest expression in cells by comparing its threshold of detection (Ct) with the Ct of the housekeeping gene.

Statistical Analysis

Statistical comparison of the frequency of gene expressing cells was performed with Fisher's exact test. Statistical comparison of percentages of autoreactive B cells in flow cytometry were calculated using the Mann-Whitney *t*-test to compare healthy donors and pemphigus patients; and using the Wilcoxon *t*-test to compare patients before and after treatment. All analyses were performed using the GraphPad Prism Software. A *p*-value ≤ 0.05 was considered as significant. The *, **, *** refer to statistical values explained in the legends.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VH: transcriptomic, cytometric acquisitions, analyses, ELISA assays, and writer. MP: transcriptomic acquisitions. MM-V: transcriptomic, cytometric acquisitions, and ELISA assays. M-LG: cytometric acquisitions. GR: cytometric analyses. CD:

REFERENCES

- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* (1991) 67:869–77. doi: 10.1016/0092-8674(91)90360-B
- Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organspecific, autoantibody-mediated diseases. J Clin Invest. (1989) 83:1443–8. doi: 10.1172/JCI114036
- Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med. (1982) 306:1189–96. doi: 10.1056/NEJM198205203062001
- Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris-incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ*. (2008) 337:a180. doi: 10.1136/bmj.a180
- Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. N Engl J Med. (2006) 355:1800–10. doi: 10.1056/NEJMra061111
- Eyre RW, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. J Exp Med. (1987) 165:1719– 24. doi: 10.1084/jem.165.6.1719
- Hashimoto T, Amagai M, Garrod DR, Nishikawa T. Immunofluorescence and immunoblot studies on the reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1. Epithelial Cell Biol. (1995) 4:63–9.
- Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the Nterminal adhesive region of desmogleins. J Immunol Baltim Md 1950. (2001) 167:5439–48. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5439
- Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the antidesmoglein autoantibody profile. J Am Acad Dermatol. (1999) 40(2 Pt 1):167–70. doi: 10.1016/S0190-9622(99)70183-0
- Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update. Drugs. (2015) 75:271–84. doi: 10.1007/s40265-015-0353-6
- Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet Lond Engl.* (2017) 389:2031–40. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30070-3
- Zambruno G, Borradori L. Rituximab immunotherapy in pemphigus: therapeutic effects beyond B-cell depletion. J Invest Dermatol. (2008) 128:2745–7. doi: 10.1038/jid.2008.330
- Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L, Jacquot S, Lemercier B, Lim A, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. J Invest Dermatol. (2008) 128:2859– 69. doi: 10.1038/jid.2008.178
- 14. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Longterm remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated

transcriptomic analyses. OB: drafting and revision. SC and PJ: transcriptomic analyses, cytometric analyses, drafting, and revision.

FUNDING

This study was supported by INSERM, Normandy University Rouen and Rouen University Hospital, Department of Dermatology, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu. 2019.01794/full#supplementary-material

with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci Transl Med. (2013) 5:175ra30. doi: 10.1126/scitranslmed.3005166

- Futamura S, Martins C, Rivitti EA, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ. Ultrastructural studies of acantholysis induced *in vivo* by passive transfer of IgG from endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). *J Invest Dermatol.* (1989) 93:480–5. doi: 10.1111/1523-1747.ep12284041
- Ellebrecht CT, Payne AS. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. JCI Insight. (2017) 2:e92021. doi: 10.1172/jci.insight.92021
- Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood. (2011) 117:3720– 32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. (2013) 39:1003–18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Feliciani C, Toto P, Amerio P, Pour SM, Coscione G, Shivji G, et al. In vitro and in vivo expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factoralpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. J Invest Dermatol. (2000) 114:71– 7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00835.x
- Bhol KC, Desai A, Kumari S, Colon JE, Ahmed AR. Pemphigus vulgaris: the role of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in pathogenesis and effects of intravenous immunoglobulin on their production. *Clin Immunol Orlando Fla*. (2001) 100:172–80. doi: 10.1006/clim.2001.5061
- Santarlasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. IL-1 and T helper immune responses. Front Immunol. (2013) 4:182. doi: 10.3389/fimmu.2013.00182
- Asothai R, Anand V, Das D, Antil PS, Khandpur S, Sharma VK, et al. Distinctive Treg associated CCR4-CCL22 expression profile with altered frequency of Th17/Treg cell in the immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Immunobiology*. (2015) 220:1129–35. doi: 10.1016/j.imbio.2015.06.008
- Xu R-C, Zhu H-Q, Li W-P, Zhao X-Q, Yuan H-J, Zheng J, et al. The imbalance of Th17 and regulatory T cells in pemphigus patients. *Eur J Dermatol EJD*. (2013) 23:795–802. doi: 10.1684/ejd.2013.2177
- Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, Möbs C, et al. Increased frequency of T follicular helper cells and elevated interleukin-27 plasma levels in patients with pemphigus. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0148919. doi: 10.1371/journal.pone.0148919

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Hébert, Petit, Maho-Vaillant, Golinski, Riou, Derambure, Boyer, Joly and Calbo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Gene Name	Assay ID			
Cytokine Genes				
IL-1β	Hs01555410_m1			
IL-1RA	Hs00893626_m1			
IL-2	Hs00174114_m1			
IL-5	Hs01548712_g1			
IL-6	Hs00985639_m1			
IL-7	Hs00174202_m1			
IL-9	Hs00914237_m1			
IL-10	Hs00961622_m1			
IL-12A	Hs01073447_m1			
IL-12B	Hs01011518_m1			
IL-13	Hs00174379_m1			
IL-15	Hs01003716_m1			
IL-17A	Hs00174383_m1			
IL-17F	Hs00369400_m1			
ΙFNγ	Hs00989291_m1			
ΤΝFα	Hs01113624_g1			
LTA	Hs04188773_g1			
TNFSF10	Hs00921974_m1			
IL-21	Hs00222327_m1			
TGFβ2	Hs00234244_m1			
TNFSF13B	Hs00198106_m1			
TNFSF13	Hs00601664_g1			
EBI3	Hs01057148_m1			
IL-27	Hs00377366_m1			
IL-23A	Hs00900828_g1			
Taci (TNFRSF13B)	Hs00963364_m1			
BCMA (TNFRSF17)	Hs03045080_g1			
BAFF-R (TNFRSF13C)	Hs00606874_g1			
CD11b (ITGAM)	Hs00355885_m1			
CD11c (ITGAX)	Hs00174217_m1			
CD27	Hs00386811-m1			
CD19	Hs00174333-m1			
IRF5	Hs00158114_m1			
Housekeeping Genes				
HPRT1	Hs02800695_m1			
B2M	Hs00984230_m1			
GUSB	Hs00939627_m1			
TUBB	Hs00742828_s1			
GAPDH	Hs02758991_g1			

Table SI: Taqman primers used in High Throughput qPCR Biomark analysis.

ARTICLE N°5 :

LONG-TERM INCREASE OF KCNN4 POTASSIUM CHANNEL SURFACE EXPRESSION ON B CELLS IN PEMPHIGUS PATIENTS AFTER RITUXIMAB TREATMENT

Caillot F., Derambure C., Berkani N., Riou G., Maho-Vaillant M., Calbo S., Joly P. et Musette P.

Publier dans Journals of investigative Dermatology

Dans la précédente étude clinique RITUX 1, nous avons démontré que le RTX, en traitement de deuxième intention, était capable d'induire une rémission complète à long terme chez 59% des patients atteints de pemphigus sévère.

L'objectif de cette étude était d'étudier les transcrits de LB après le retour entre les patients en rémission complète et les patients en rémission incomplète afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques qui interviennent dans la rémission de longue durée.

Nous avons comparé à l'echelle du génome les transcriptomes des LB des patients de l'étude RITUX 1 en rémission complète et incomplète 79 mois après le traitement initial par RTX.

L'analyse a mis en évidence 65 transcrits dont l'expression est significativement dérégulée chez les patients en rémission complète par rapport aux patients en rémission incomplète. Un second groupe de patients ainsi que des patients nouvellement diagnostiqués comprenant des patients de l'étude RITUX 3, ont permis de valider par qRT-PCR (*Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*) que les taux d'expression des transcrits de *KCNN4* (*Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4*), du *COL4A3* (*Collagen type IV alpha 3 chain*) et du *COL4A4* (*Collagen Type IV Alpha 4 Chain*) sont significativement diminués dans les LB des patients en rémission complète par rapport aux patients en rémission incomplète (p<0,01). L'expression protéique de *KCNN4* par les LB est, à l'inverse, augmentée à la surface des LB naïfs et mémoires non commutés chez les patients atteints de pemphigus ayant atteint la rémission complète.

En conclusion, en raison de son implication dans la différenciation des LB, la surexpression protéique du canal potassique KCNN4 à la surface des LB pourrait contribuer à la rémission à long terme après RTX chez les patients atteints de pemphigus en influençant la maturation des LB.

Long-Term Increase of Kcnn4 Potassium Channel Surface Expression on B Cells in Pemphigus Patients after Rituximab Treatment



Journal of Investigative Dermatology (2018) 138, 2666-2668; doi:10.1016/j.jid.2018.05.034

TO THE EDITOR

Pemphigus is a B-cell-mediated autoimmune disease affecting skin and mucous membranes. Pathogenic autoantibodies are directed against desmogleins, which are keratinocyte adhesion proteins. In a previous study, we showed that B-cell depletion induced by an anti-CD20 antibody (Mabthera) is able to trigger a long-term complete remission associated with the persistence of naïve/transitional B cells in 59% of patients with severe pemphigus after a 79-month median follow-up time. We aimed to understand the B-cell-mediated immunological mechanisms that are associated with this long-lasting remission.

We analyzed data from 52 patients with pemphigus among those previously included in our three clinical (ClinicalTrials.gov numbers: trials NCT01299857, NCT00213512, and NCT00784589) (Colliou et al., 2013; Joly et al., 2007, 2017). These studies were approved by the Ethics Committee of the North West area II in France and conducted according to the Declaration of Helsinki principles. Written informed consent was obtained from each patient. Patients had either pemphigus treated by an anti-CD20 antibody (Mabthera; Roche, Basel, Switzerland) for the first time (neopemphigus [NP], n = 21; median age = 56; range: 24-79, NCT00213512 and NCT00784589) or patients were in complete remission (CR, n = 22; median age = 56.5; range: 19-79) or incomplete remission (IR, n = 9; median age = 47; range: 22-56) (NCT01299857 and NCT00784589) after a 61-month mean follow-up. Moreover, peripheral blood mononuclear cells from 16 healthy donors were provided in buffy coats from the French Blood Agency. Peripheral blood mononuclear cells were extracted using Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences), and B cells were isolated by fluorescence-assisted cell sorting (BD FACSArialII; BD Biosciences). RNA extraction was performed using the PicoPure RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). Whole human genomic DNA microarrays were used to analyze one-colored gene expression profiling (4x44K Whole Human Genome; Agilent Technologies) in a first subset of patients (CR n = 3 and IR n = 3). Briefly, the extracted RNA of each patient was labeled by Cyanine-3/CTP and hybridized according to the manufacturer's instructions (Low Input Quick-Labeling Kit; Amp Agilent Technologies). Microarrays were scanned with a 5 μ M pixel size using the DNA Microarray Scanner GB (Agilent Technologies). Image analysis and extraction of raw and normalized signal intensities (Lowess) were performed with Feature Extraction Software 10.5.1.1 (Agilent Technologies). The data were in agreement with the Minimum Information About a Microarray Experiment guidelines and were deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus database (accession number: GSE90152). GeneSpring GX software was used to determine mRNAs differentially regulated by Student's t-test without correction for multiple testing. Nine transcripts out of 65 were retained from bibliographic data analysis ("B cells expression" or

to be confirmed by quantitative realtime reverse transcriptase-PCR (QuantiGene Plex technology; Assay eBioscience) in an independent second set of patients (CR n = 15; IR n = 5): potassium calcium-activated channel subfamily N member 4 (KCNN4), collagen 4A3 (COL4A3), collagen (COL4A4), 4A4 collagen 18A1 propiomelanocortin, (COL18A1), alpha-1,6-mannosyl-blycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, dendritic cell-associated lectin 1, cathepsin F, interferon regulatory factor 5, and three housekeeping genes: actin-β, β2-microglobulin, and TATA box-binding protein. The expression of the KCNN4 potassium channel was assessed on B-cell subsets by flow cytometry (FACS LSRFortessa; BD Biosciences) with a cell viability marker and monoclonal antibodies directed against phenotype markers (IgD, IgG, IgM, CD19, CD24, CD27, CD38, and CD138) and KCNN4 (Alomone, BD Biosciences, eBioscience, Invitrogen). Statistical analysis was performed by nonparametric tests: Mann Whitney or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons.

"pathogenesis of autoimmune disease")

Transcriptomic analysis highlighted 65 transcripts whose abundance is significantly dysregulated in CR compared with IR patients (P < 0.05). Hierarchical clustering of these six patients based on the levels of these 65 transcripts showed a perfect separation of the CR and IR into two clusters (Figure 1a). By reverse transcriptase-PCR, three of nine mRNA tested were confirmed differently expressed: expression levels of KCNN4, COL4A3, and COL4A4 were significantly decreased in B cells from CR compared with IR patients (P < 0.01) (Figure 1b). Furthermore, we assessed expression levels of these

Abbreviations: COL, collagen; CR, complete remission; HC, healthy control; IR, incomplete remission; KCNN4, potassium calcium-activated channel subfamily N member 4; NP, neopemphigus

Accepted manuscript published online 2 July 2018; corrected proof published online 30 August 2018 © 2018 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.

F Caillot et al.

Potassium Channel in Pemphigus Patients



Figure 1. mRNA expression level on B cells of patients in complete remission or incomplete remission. (a) Hierarchical clustering (Euclidean metric – Ward's linkage) based on the 65 gene expression showed two subsets of patients relative to their clinical status: complete (CR n = 3) or incomplete remission (IR n = 3). (b) Data validation by quantitative real-time reverse transcriptase PCR in a second set of patients (CR n = 15; IR n = 5). The levels of nine transcripts were normalized with geometric average of housekeeping genes. (c) The level of previously dysegulated mRNA was assessed in healthy controls (HC n = 6) and in newly diagnosed untreated patients (NP n = 12). All data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Mann-Whitney test (b) or Kruskal-Wallis test with Dunn's correction for multiple comparisons (c) (***P* < 0.01, ****P* < 0.001, ns not significant, a.u. arbitrary unit). CLECL1, dendritic cell-associated lectin 1; COL4A3, collagen 4A3; COL4A4, collagen 4A4; COL18A1, collagen 18A1; CTSF, cathepsin F; IRF5, interferon regulatory factor 5; KCNN4, potassium calcium-activated channel subfamily N member 4; MGAT5, alpha-1,6-mannosyl-blycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase; POMC, propiomelanocortin.

three transcripts in B cells from healthy controls (HC n = 6) and from newly diagnosed untreated patients (NP n = 12). As shown in Figure 1c, the RNA abundance was significantly increased in B cells from NP compared with CR patients for *KCNN4*, *COL4A3*, and *COL4A4* (P < 0.001), with an intermediate level in IR patients.

Because the regulation of KCNN4 during B-cell differentiation, we assessed the protein expression of KCNN4 on B cells from patients with pemphigus (NP n = 8; CR n = 9; IR n = 9) and healthy controls (HC n = 10). As shown in Figure 2, the frequency of KCNN4⁺ B cells and the expression level of the KCNN4 potassium channel on B cells were significantly upregulated in CR compared with NP patients (P < 0.05and P < 0.01, respectively), with an intermediate intensity level in IR patients. The KCNN4 potassium channel was also

upregulated in CR compared with NP patients on B-cell subsets: naïve B cells lgD+),(CD27non-class-switched memory B cells (CD27+ IgD+), and class-switched memory B cells (CD27+ IgD- IgM+) (Figure 2d). This inverse balance between RNA quantification and protein levels at the cell surface is frequently described and may reflect post-transcriptional modulations (Kumar et al., 2016). Post-transcriptional modulations KCNN4 by miRNA in have already been described (hsamir-16-5p [MIRT001448], hsa-mir-[MIRT019994], 375 hsa-mir-1-3p [MIRT024000], hsa-mir-30a-5p [MIRT028637]; Chen et al., 2016).

Our data show that KCNN4 is upregulated at the B-cell surface in patients with pemphigus who achieved CR. KCNN4 is indeed upregulated in naïve and non-class-switched memory B cells following activation, but not in class-switched memory B cells (Wang and Xiang, 2013; Wulf et al, 2004). Furthermore, epigenetic modifications were observed in critical B-cell genes, including KCNN4, during naïve-tomemory B-cell transition (Rodríguez-Cortez et al., 2015). Interestingly, downregulation of KCNN4 induced common variable immunodeficiency disease associated in 25% of the cases with autoimmune diseases (Rodríguez-Cortez et al., 2015). Together, our data highlighted a B-cell-mediated immunological mechanism in remission patients in pemphigus treated by Mabthera involving KCNN4 potassium channel.

ORCID

Frédérique Caillot: http://orcid.org/0000-0001-6201-7201

CONFLICT OF INTEREST

PJ is a consultant for Roche and Principia Biopharma. The rest of the authors state no conflict of interest.

F Caillot et al.

Potassium Channel in Pemphigus Patients



Figure 2. KCNN4 expression on B cells. (a) Frequency of KCNN4 expression on B cells of three representative patients: newly diagnosed untreated patient (NP), complete remission (CR), or incomplete remission (IR) patients. **(b)** Overlay histogram shows the KCNN4 expression level on B cells of these three representative patients: NP (green line), CR (blue line), and IR (red line). **(c)** Frequencies of CD19+ B cells on lymphocytes (left), frequencies of KCNN4+ (middle) and mean fluorescence intensity of KCNN4 (right) on B cells in healthy controls (HC n = 10) and pemphigus patients (NP n = 8; CR n = 9; IR n = 9). **(d)** Frequencies of KCNN4+ on B-cell subgroups. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Kruskal-Wallis test with Dunn's correction for multiple comparisons (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). KCNN4, potassium calcium-activated channel subfamily N member 4.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to N. Sabourin-Gibbs (Rouen University Hospital) for help in editing the manuscript. We thank the French Blood Agency, which provided buffy coats from healthy donors. This study was co-supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund.

Frédérique Caillot¹, Céline Derambure², Nicolas Berkani¹, Gaëtan Riou³, Maud Maho-Vaillant^{1,3}, Sébastien Calbo³, Pascal Joly^{1,3} and Philippe Musette^{1,4,*}

¹Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Rouen, France; ²Inserm U1245, IRIB, Normandie Université, Rouen, France; ³Inserm U1234, IRIB, Normandie Université, Rouen, France; and ⁴Inserm U976 Saint Louis Hospital, Paris, France *Corresponding author e-mail: philippe. musette@chu-rouen.fr

REFERENCES

- Chen Y, Kuang D, Zhao X, Chen D, Wang X, Yang Q, et al. miR-497-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting KCa3.1 in angiosarcoma. Oncotarget 2016;7:58148–61.
- Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci Transl Med 2013;5:175ra30.
- Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. N Engl J Med 2007;357:545–52.
- Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment

of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet 2017;389:2031-40.

- Kumar D, Bansal G, Narang A, Basak T, Abbas T, Dash D. Integrating transcriptome and proteome profiling: strategies and applications. Proteomics 2016;16:2533–44.
- Rodríguez-Cortez VC, Del Pino-Molina L, Rodríguez-Ubreva J, Ciudad L, Gómez-Cabrero D, Company C, et al. Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-to-memory B-cell transition. Nat Commun 2015;6:7335.
- Wang J, Xiang M. Targeting potassium channels Kv1.3 and KC a 3.1: routes to selective immunomodulators in autoimmune disorder treatment? Pharmacotherapy 2013;33:515–28.
- Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG. K+ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. J Immunol 2004;173:776–86.

PROLONGATION A 90 MOIS DE L'ETUDE RITUX 3 : Donnees preliminaires

Nous avons précédemment démontré que le RTX en première intention permettait d'obtenir un taux de rémission complète de 89% sans traitement à 24 mois (M24) chez les patients atteints de pemphigus. Le taux de rechute de ses patients traité par le RTX en première intention était de 2% lors de l'évaluation clinique à 36 mois (M36).

Afin d'étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans la remission prolongée et d'identifier les facteurs prédictifs de la rechute à long terme, l'étude RITUX 3 a fait l'objet d'une extension qui a nécessité le dépôt d'un amendement auprès du comité consultatif de protection des personnes (CPP) de la recherche biomédicale. Les patients ont été suivis en moyenne 90 mois (M90) après l'injection initiale de RTX.

A ce jour, les données clinique et biologique de 34 sur les 46 patients du groupe RTX de l'essai clinique RITUX 3 ont été analysées à M90. Cette partie présente les données préliminaires comprenant les résultats cliniques et l'analyse biologiques de l'évolution des taux sériques des Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 ainsi que l'évolution du phénotype des LB totaux.

• Patients et méthodes :

Les patients de la cohorte RITUX 3, inclus dans le bras RTX ont donc bénéficié d'une visite supplémentaire entre 6 et 8 ans après l'inclusion (PHRC n° : 2018-001417-32). Un prélèvement sanguin de 60 ml a été réalisé et acheminé au laboratoire. Les PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*) ont été isolés par ficoll (GE Healthcare Lifescience) afin d'analyser le phénotype cellulaire par cytométrie en flux mais également pour créer une cellulothèque et une DNAthèque après extraction de l'ADN (KIT Machery Nacel, Nucleospin Tissue). Enfin, les sérums ont été congelés pour créer une sérothèque. Les taux sériques d'Ac anti-Dsg1 et 3 ont été mesurés à l'aide du kit ELISA anti-Dsg1 et 3 (EUROIMMUN) sur l'automate Evolis, à partir des sérums dilués au 1/100. L'analyse phénotypique des LB a été réalisée sur le cytomètre en flux Fortessa (BD Biosciences) après marquage des PBMC avec un mix d'Acm dirigés contre les marqueurs de surfaces : CD11c, CD19, CD20, CD24, CD27, CD38, CD45, CD138 et les Ig de surfaces : IgA, IgD, IgG, IgM (BD Biosciences, eBioscience, Sony Biotechnology, Miltenyi Biotec), ainsi que le

live/dead (Invitrogen). Les analyses ont été réalisées sur le logiciel FlowJo. La comparaison des données a été réalisée en *Anova one way*. Une p-value inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme significative. L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé grâce au logiciel PRISM5 (GraphPad Software Inc)

• Les résultats préliminaires :

o Bilan clinique à 90 mois des patients du groupe RTX

Au total, 34 des 46 patients du groupe RTX ont été revus à M90. Entre M36 et M90, 7 des 34 patients (20,6%) ont rechuté, après un délai médian de 40 mois (39-53). Parmi les 7 patients ayant rechuté, 2 patients étaient déjà en maladie active à M36 et le sont toujours. Les 5 autres patients étaient en rémission complète à M36. Après la rechute, ils ont été re-traités par RTX et sont, à ce jour, en rémission. Plus de la moitié de ces patients avait précédemment rechutés au cours de l'étude. Enfin, 26 des 31 patients (83%) en rémission complète à M36 ont maintenu leur remission sans traitement (Figure n°1).



Figure n°1 : Évaluation clinique à 24, 36 et 90 mois des patients du groupe traité par le Rituximab de l'étude RITUX 3

• Évolution des taux d'auto-anticorps à 90 mois chez les patients du groupe Rituximab :

A M90, les taux d'Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg3 restent faibles (moyenne ± erreur standard de la moyenne : anti-Dsg1 : 13 ± 7 UI/ml ; anti-Dsg3 : 66 ± 36 UI/ml) (Figure n°2). La plupart des patients issus du groupe RTX ne présentent plus aucun auto-Ac à l'exception de quelques patients ayant des taux d'Ac anti-Dsg1 (10%) et anti-Dsg3 (21%) supérieurs aux seuils de positivité. Les 2 patients en maladie active ont des Ac anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3 ≥20UI/ml. Parmi les patients ayant rechuté entre M36 et M90 actuellement en rémission, 2 ont encore des taux d'Ac élevés. Étonnamment, 5 patients ayant une rémission persistante présentent des Ac anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3 ≥20UI/ml à M90. La présence d'auto-Ac ne semble pas toujours en lien direct avec l'activité de la maladie mais pourrait être un facteur prédictif de rechute.



Figure 2 : Évolution du taux moyen des anticorps anti-desmogléine 1 et 3 chez les patients du groupe traité par le Rituximab de l'étude RITUX 3

Évolution des auto-anticorps (moyenne \pm erreur standard de la moyenne) anti-desmogléine (Dsg) 1 (A) et anti-Dsg3 au cours des 90 mois suivant le traitement initial par le rituximab chez les patients. Analyse de comparaisons multiples avec le test de Dunnett (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).

Afin de déterminer des facteurs de risque de rechute, nous avons étudié rétrospectivement la présence d'Ac anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3 à M36, chez les patients en rémission complète persistante ou ayant rechuté entre le 36^{éme} et 90^{éme} mois (Tableau

n°1). Soixante-six pourcent des patients ayant rechutés entre M36 et M90 présentaient des Ac anti-Dsg1 et/ou anti Dsg3 ≥20UI/ml à M36 contre seulement 15% des patients maintenant la rémission à M90 (p=0,022). Le fait d'avoir des auto-Ac supérieur aux seuils à M36 aurait donc une valeur prédictive positive de 50% (prédisant le risque de rechute à M90) et une valeur prédictive négative de 92% (prédisant l'absence de rechute en l'absence d'auto-Ac).

		Patients avec une rechute tardive		Patients sans rechute	
Fréquence de patients d'Anticorps anti Dsg- >seuil 20 UI/ml	ayant des taux ·1 et/ou Dsg-3 L à M36	66 %		15 %	
	Sensibilité	spécificité	VPP	VPN	
Facteur prédictifs: Taux d'Anticorps anti Dsg-1 et/ ou Ac anti Dsg-3 >20 UI/ml à 36 mois	67%	88%	50%	92%	

Tableau n°1 : Les taux anticorps anti-desmogléines à 36 mois sont des facteurs prédictifs d'une rechute à long terme

Évaluation rétrospective des taux d'anticorps (Ac) anti-desmogléines (Dsg) comme facteurs prédictifs de rechutes tardives. Fréquence des patients ayant rechuté ou non entre le 36^{éme} et 90^{éme} mois parmi les patients du groupe traité par le Rituximab ayant des taux d'auto-Ac anti-Dsg supérieurs aux seuils de 20 UI/ml à 36 mois. Calcule de la sensibilité, de la spécificité, de la valeur prédictive positive (VPP) et de la valeur prédictive négative (VPN).

• Évolution du phénotype lymphocytaire B à 90 mois chez les patients du groupe RTX

Du fait de l'implication des LB dans les mécanismes physiopathologiques du pemphigus, nous avons étudié l'évolution du phénotype des LB totaux à M90 pour 23 patients (Figure n°3). La proportion de LB naïfs a augmenté de 75 ± 2% à J0 à 87 ± 1% à M36 (p<0.0001) tandis que celle des LB mémoires a diminué de 25 ± 2% à J0 à 14 ± 2 % à M36 (p<0.0001). Étonnamment, la proportion de LB naïfs à M90 est toujours élevée à 87 ± 2%, et celle des LB mémoires reste basse à 13 ± 2%. Il existe donc un changement majeur du rapport LB naïfs/mémoires, persistant à plus de 7 ans après la dernière perfusion de rituximab.



Figure 3 : Évolution du phénotype des lymphocytes B chez les patients du groupe traité par le Rituximab de l'étude RITUX 3

Évolution des fréquences des sous-populations de lymphocytes B (LB) naïfs (CD19+CD27-) et mémoires (CD19+CD27+) chez les patients du groupe traité par le Rituximab. Analyse de comparaisons multiples avec correction de Bonferroni (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).

En conclusion, l'analyse préliminaire de cette cohorte exceptionnelle a permis de démontrer l'efficacité à 90 mois du schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention puisque 26 des 31 patients (83%) en rémission complète sans traitement à 36 mois le sont toujours 90 mois après la première perfusion de RTX. Ces résultats confirment que le RTX n'entraîne donc pas seulement une déplétion transitoire des LB, mais a un impact à très long terme sur l'homéostasie immunologique, notamment à travers les sous-populations de LB. La modification du rapport LB naïfs/LB mémoires persistant à plus de 7 ans après la première injection de RTX est probablement un des facteurs clés du maintien de la rémission à très long terme. Enfin, notre étude souligne que la présence des auto-Ac anti-Dsg a une valeur prédictive positive de rechute de 50%. L'analyse des populations auto-réactives fera l'objet des prochains travaux réalisés au sein du laboratoire avec une attention particuliaire sur les patients ayant rechuté, afin d'identifier des facteurs prédictifs de rechutes tardives. Nous pensons que la surveillance phénotypique des LB spécifiques des Dsg et en particulier l'émergence de LB mémoire CD27⁺IgG⁺ ainsi que la détection par ELIPSOT d'ASC IgG anti-Dsg, pourraient constituer des outils prédictifs de rechute permettant des interventions thérapeutiques préventives chez les patients atteints de pemphigus.
DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. EVALUATION CLINICO-BIOLOGIQUE DE L'ETUDE RITUX 3

L'objectif premier de l'étude RITUX 3 était d'évaluer l'efficacité et la tolérance du schéma thérapeutique utilisant le RTX en traitement de 1ére intention par rapport au traitement de référence du pemphigus. Jusqu'alors, les fortes doses de GC en systémique telle que la prednisone étaient considérées comme le traitement standard du pemphigus (Hertl et al., 2015). Des adjuvants immunosuppresseurs, le plus souvent l'azathioprine ou le mycophénolate mofétil, sont parfois utilisés en association (Murrell et al., 2008) mais aucun essai dans la littérature n'a montré d'effet bénéfique évident de ce traitement combiné. De plus, certaines études ont même décrit une fréquence plus élevée d'effets indésirables (Atzmony et al., 2015; Beissert et al., 2010; Chrysomallis et al., 1994; Hertl et al., 2015; Ioannides et al., 2000; Sharma and Khandpur, 2013).

Dans l'étude RITUX 3, 90 patients atteints de PV ou de PF modérés ou sévères ont été randomisés pour recevoir soit de la prednisone orale seule à raison de 1,0 à 1,5 mg/kg/jour avec un sevrage progressif sur 12 à 18 mois, soit de la prednisone orale à raison de 0,5 à 1,0 mg/kg/jour avec un sevrage sur 3 à 6 mois associée à l'injection répétée de RTX : un premier cycle à 1000 mg de RTX injecté au premier et au 14^{ème} jours suivi d'un deuxième et d'un troisième cycle à 500 mg de RTX à 12 et à 18 mois respectivement (Joly et al., 2017).

Les données issues de l'évaluation clinique et biologique de ces patients atteints de pemphigus ont permis de démontrer que l'utilisation répétée du RTX associée à une courte corticothérapie en première intention est à la fois plus efficace et moins dangereuse qu'un traitement par la prednisone seule. En effet, le traitement initial avec le RTX a permis d'augmenter de 2,6 fois le nombre de patients en rémission complète sans traitements à 24 mois (89%) comparé à ceux traités avec la prednisone seule (34%) (p<0,0001). De plus, l'utilisation du RTX en premier intention permet de réduire rapidement la dose de prednisone. Après 6 mois de traitement, 60% des patients du groupe RTX sont sevrés en prednisone, diminuant ainsi le délai médian d'obtention de la rémission complète à 277 jours *versus* 677 jours pour les patients du groupe CS, et

-229-

réduisant également de 3 fois la dose cumulée de prednisone (6,1g ± 2,4 versus 17,9g ± 7,3 ; p<0,0001). Au cours des 24 premiers mois de suivi, 11 patients (24%) du groupe RTX ont rechuté dont 8 précocement entre le 6^{éme} et le 12^{éme} mois contre 20 patients (46%) dans le groupe CS. En plus d'un risque plus faible de rechute, les patients du bras RTX ont présenté moins d'évènements indésirables graves que ceux affectés au groupe CS avec 27 événements chez 16 patients soit 34% des patients du groupe RTX contre 53 évènements chez 29 patients soit 66% des patients du groupe CS (p=0,0021). Les événements graves les plus fréquemment observés dans les deux groupes étaient le diabète, les troubles endocriniens, les myopathies et les troubles osseux. Le risque infectieux après RTX est faible puisque l'Acm anti-CD20 ne cible pas les plasmocytes à longue durée de vie (Riley and Sliwkowski, 2000) permettant de maintenir les taux d'Ac anti-infectieux. En effet, nous l'avons précédemment démontré dans l'étude RITUX 1 en mettant en évidence un niveau soutenu d'Ac anti-toxine tétanique et d'Ac anti-polysaccharide capsulaire du pneumocoque chez les 21 patients atteints de pemphigus traités par un cycle de RTX (Joly et al., 2007; Mouquet et al., 2008). Bien que rare (Kanwar et al., 2013; Kasperkiewicz et al., 2012), le risque infectieux est considéré comme étant le principal effet indésirable du traitement par RTX (Leandro, 2013) mais celui-ci n'a pas été augmenté chez les patients du groupe RTX par rapport aux patients du groupe CS représentant respectivement 7% versus 8% des évènements graves. Les récidives ou les effets secondaires graves de la prednisone (myopathie, troubles osseux, prise de poids, insuffisance cardiaque, ...) ont conduit à la sortie d'étude de 12 patients du groupe CS dont 8 ont été traités secondairement par le RTX. Seuls 2 patients du groups RTX sont sortis de l'étude, une patiente pour grossesse et l'autre à cause d'un défaut d'application du schéma thérapeutique. L'absence d'aveugle constitue une des limites de cette étude pouvant avoir influencé les investigateurs dans leur décision de sortir d'étude des patients du groupe CS. L'autre limite est le score initial du PDAI (Pemphigus Disease Area Index) légèrement plus élevé chez les patients du groupe CS que chez les patients recevant le RTX. Le PDAI est un index, récemment évalué, permettant de déterminer avec précision la gravité du pemphigus (Boulard et al., 2016; Hébert et al., 2019a). Cependant, nous pensons que cette différence intergroupe est peu susceptible de constituer un biais qui pourrait expliquer l'effet thérapeutique majeur observé dans cette étude, bien qu'elle ait été prise en compte dans l'analyse statistique.

Notre bilan à 24 mois montre que l'utilisation répétée du RTX associée à une courte corticothérapie est efficace aussi bien chez les patients atteints de PF que ceux atteints de PV. L'analyse à postériori uniquement basée sur les 74 patients atteints de PV conforte l'efficacité du RTX dans ce sous-type considéré comme plus sévère avec 89% des patients atteints de PV dans le groupe RTX en rémission complète à 24 mois contre 28% dans le groupe CS (p<0,0001). Cette étude réalisée en collaboration avec le groupe industriel Roche vient d'être accepté dans le *British Journal of Dermatology* (Chen et al., 2019 en Annexe n° 2).

Concrètement, sur la base de nos résultats, la *Food and Drug Administration* a approuvé l'extension de la couverture d'assurance maladie du RTX pour le PV aux États-Unis. En janvier 2019, le CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) de *l'European Medicines Agency* a également approuvé la nouvelle indication au RTX dans le traitement initial des patients atteints de PV modéré à sévère. Dorénavant, les lignes directrices internationales recommandent que l'utilisation du RTX associé à la prednisone en traitement de courte durée soit considérée comme le nouveau traitement standard du PF et du PV (Murrell and Sprecher, 2017).

Le critère d'évaluation principal à 24 mois étant proche de la dernière perfusion d'entretien du RTX à 18 mois, l'efficacité et l'innocuité du schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention ont été confortées à plus long terme, après la reconstitution du répertoire lymphocytaire B, puisque 40 des 41 patients en rémission complète sans traitement à 24 mois le sont toujours 36 mois après la première perfusion de RTX. Deux patients gardent une maladie active et 2 patients qui ont été retraités avec le RTX après 24 mois sont en rémission avec un traitement minimal. A l'inverse dans le groupe CS, seul 10 des 15 patients maintiennent une rémission complète soit un taux de rechute de 33%. De nombreux patients (45%) issus du groupe CS présentant une maladie persistante ou ayant rechuté après l'évaluation à 24 mois ont été traités secondairement par le RTX. Ces résultats cliniques attestent qu'une utilisation précoce du RTX dès les premiers signes de la maladie associée à une ré-administration de RTX en traitement d'entretien permet d'éviter l'apparition de rechutes. Ils confirment nos observations initiales réalisées dans le cadre de l'étude RITUX 1 sur les 5 patients cortico-intolérants traités par le RTX en première ligne (Colliou et al., 2013) ainsi que les observations de Lunardon sur l'utilisation précoce du RTX (Lunardon et al., 2012). Les études antérieures n'utilisant qu'un seul cycle de RTX ont rapporté de nombreuses rechutes après la reconstitution des LB avec des taux de rechute de 15 à 20% après un an et jusqu'à 50% six ans après la perfusion de RTX (Colliou et al., 2013; Hebert and Joly, 2017; Joly et al., 2007; Kim et al., 2017; Lunardon et al., 2012). Ainsi, conformément aux observations issues des études rétrospectives sur les doses multiples de RTX (Kim et al., 2001; Tavakolpour, 2018), les perfusions d'entretien de RTX de 500 mg fixées arbitrairement à 12 et 18 mois semblent avoir contribué à maintenir la rémission complète sans traitement à 36 mois réduisant le taux de rechute à 2%. Cependant, le moment exact de la reperfusion du RTX pour prévenir les rechutes reste débattu (Murrell et al., 2018).

En effet, dans l'intervalle entre le premier cycle de RTX et les doses d'entretien, nous avons observé, parallèlement à la reconstitution des LB, une légère augmentation du taux d'Ac anti-Dsg coïncidant également à la période de sevrage de la prednisone. Cette période est charnière entre le premier cycle de RTX, le sevrage de la prednisone et les doses d'entretien. Le risque de rechute qui accompagne la diminution des doses de prednisone est bien connu. Selon la littérature, il concerne près de 50% des patients traités uniquement par corticothérapie (Sharma and Khandpur, 2013). Conformément à cette estimation, 46% des patients du groupe CS ont rechuté lors du sevrage de la prednisone Parallèlement, bien que moins fréquentes (24%), l'essentiel des rechutes (81%) survenues dans le groupe RTX sont apparues dans cet intervalle entre le 6^{éme} mois et le 12^{éme} mois. Les 9 patients du groupe RTX présentant une rechute avant le 12^{éme} mois ont été retraités au moment de leur rechute par l'administration d'une perfusion de RTX à 500 mg mais également par la ré-augmention de la dose de prednisone orale. Les CG sont essentiels lors des rechutes pour compenser rapidement l'interférence induite par les auto-Ac en raison de leurs effets immunosuppresseurs sur la synthèse des Ac (Stahn et al., 2007) mais surtout grâce à leurs effets pharmacologiques directs sur les kératinocytes entrainant une transcription accrue des Dsg (Nguyen et al., 2004). Finalement, 6 patients sur les 9 patients rechutant précocement obtiennent une rémission complète à 24 mois et durable à 36 mois sans traitement suggérant ainsi qu'une administration plus précoce de dose d'entretien pratiquée vers le 6^{éme} mois pourrait être utile afin de prévenir les rechutes chez certains patients. Les travaux d'Hammers et coll ont démontré que les rechutes après la rémission étaient associées aux mêmes clones B anti-Dsg que ceux observés dans le phase active suggérant ainsi que les rechutes pouvait être liées à un faible contingent de clones B pathogènes associé une déplétion incomplète(Hammers et al., 2015b). L'analyse rétrospective réalisée par Albers et coll (Albers et al., 2017) portant sur des patients atteints de pemphigus traités par RTX souligne que le nombre de LB CD19⁺ peut s'avérer être un facteur de prédictif de la rechute. En effet, une repopulation précoce après le traitement par RTX est associée à un risque plus élevé de rechute également décrit dans le lupus érythémateux systémique (Lazarus et al., 2012). A l'inverse, les patients dont les LB ré-emergent plus de 12 mois après le traitement présentaient un risque de rechute significativement réduit. Cependant, des rechutes ont également été rapportées avant même la reconstitution des populations de LB (Feldman et al., 2012) comme nous l'avons également constaté pour deux de nos patients rechutant précocement. Dans ces cas, il est concevable que les tissus lymphoïdes servent de réservoir aux LB auto-réactifs et les protègent du RTX. L'analyse de Hammers souligne également que les clones B pathogènes anti-Dsg sont indétectables chez des patients en remission durable après plusieurs perfusions de RTX certainement grâce à une déplétion plus profonde notamment au sein des organes lymphoïdes secondaires ou des tissus (Hammers et al., 2015). En effet, d'après l'analyse des souris immunisées avec la Dsg3 recombinante, la fréquence des ASC anti-Dsg3 est plus élevée dans la rate et la moelle osseuse que dans les ganglions lymphatiques ou le sang (Nishifuji et al., 2000). Plus récemment, la présence tissulaire de LB capables de sécréter des Ac anti-Dsg a été démontrée dans les lésions du derme de patients atteints de PV (Yuan et al., 2017). D'après les études menées dans des modèles murins, la cinétique de l'épuisement des LB et la sensibilité des LB au RTX est variable selon les tissus ou l'environnement (Gong et al., 2005; Hamaguchi et al., 2005). Chez l'homme, les données sur la déplétion des LB dans les organes lymphoïdes secondaires et d'autres tissus solides sont limitées mais confirment toutefois une variabilité tissulaire avec des déplétions incomplètes notamment dans les ganglions lymphatiques ou la rate (Kamburova et al., 2013; Leandro, 2013). Chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités avec un seul cycle de RTX, la déplétion des LB à un mois est totale dans le sang mais celle-ci varie d'un individu à l'autre au sein du tissu synovial des articulations touchées (Vos et al., 2007). Or, cette persistance de LB dans le tissu synovial semble être responsable de rechute précoce. Récemment, l'analyse des réponses vaccinales contre la grippe saisonnière chez les patients atteints de DBAI traités avec le RTX a démontré qu'en dépit d'un nombre réduit de LB mémoires circulants contre le virus de la grippe par rapport à des témoins, les patients conservent une réponse humorale robuste au vaccin, d'ampleur, de qualité et de répertoire comparable à celle des témoins (Cho et al., 2017). Fait important, les patients ayant reçu plusieurs cycles de RTX ont présenté des réponses humorales au vaccin réduites, ces données confortent l'hypothèse de réservoir de LB mémoires probablement résident dans les tissus lymphoïdes, qui ne sont pas épuisés après un cycle de RTX mais que plusieurs cycles de RTX permettraient un épuisement plus complet dans les tissus. Ainsi, l'efficacité du RTX dépendrait en premier lieu, de l'étendue de la déplétion B pouvant être influencée par la dose de RTX, la distribution dans les tissus, mais également des facteurs intrinsèques liés au microenvironnement pouvant influencer les différents effecteurs du système immunitaire intervenant dans le mécanisme d'action de RTX (Leandro, 2013). A ce jour, aucune donnée dans la littérature sur le pemphigus ne décrit l'effet du RTX dans les organes lymphoïdes ou dans les lésions tissulaires pouvant expliquer voire prédire une rechute. L'analyse biologique de tissu est déontologiquement restreinte chez l'homme, aussi notre étude des patients présentant une rechute à court terme s'est concentrée sur l'évaluation de biomarqueurs accessible dans la pratique clinique, comprenant ceux récemment décrits dans l'étude rétrospective d'Albers et coll (Albers et al., 2017), permettant d'identifier les patients présentant un risque élevé de rechute et qui pourraient bénéficier d'une perfusion de RTX à 6 mois.

Tout d'abord, l'analyse du profil clinique permet de mettre en évidence que les patients ayant une rechute précoce ont initialement un score PDAI deux fois plus élevé que les patients n'ayant pas fait de rechute dans les 12 premiers mois suivant l'injection du RTX (54,41 *versus* 28,5 ; p = 0,03). Ainsi, la sévérité initiale du pemphigus constitue un premier facteur de prédiction de survenue de rechute. Les patients dont le score initial de PDAI était \geq 45 avaient une valeur prédictive positive de 55% pour la survenue d'une rechute au cours de l'année suivant la perfusion initiale de RTX, tandis que ceux dont le score PDAI était < 45 avaient une valeur prédictive négative de 86% pour l'absence de rechute au cours de l'année suivant le traitement au RTX.

Avant d'évaluer la réponse immune suite aux traitements par RTX, nous avons vérifié par le dosage des concentrations sanguines en RTX que les doses administrées étaient équivalentes entre les patients présentant une rechute précoce et les patients ne rechutant pas. Qui plus est, aucun des 8 patients ayant rechuté précocement n'a développé d'HACA qui aurait pu interférer avec l'efficacité du RTX comme rapporté dans certain cas de pemphigus (Lunardon and Payne, 2012). Ainsi, bien qu'une fréquence de LB plus élevée ait initialement été observée chez les patients ayant rechuté (22% versus 10% ; p<0,001), tous les patients ont présenté une déplétion complète des LB dans le sang au cours des trois premiers mois suivant l'administration du RTX. La reconstitution des LB après RTX est décrite comme étant un facteur prédictif de la rechute notamment dans la polyarthrite rhumatoïde (Trouvin et al., 2015), le lupus érythémateux systémique (Lazarus et al., 2012) ainsi que dans certaines études sur le pemphigus (Albers et al., 2017; Feldman et al., 2012). Pour autant, l'étude de la cinétique de réapparition des LB aux alentours du 9^{éme} mois après le premier cycle de RTX n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les patients présentant ou non une rechute. Dans cet intervalle entre le retour des LB dans le sang et l'administration des doses d'entretien de RTX, la fréquence des LB reste faible et ne permet pas d'évaluer si des niveaux accrus de Breg auraient pu jouer sur la réponse aux traitements comme chez les patients de l'étude RITUX 1 en rémission à long terme après un traitement par RTX (Colliou et al., 2013). Parallèlement à l'évolution des LB, nous avons observé aucune différence dans le pourcentage de LT CD4⁺ totaux initialement ou au cours du traitement par RTX entre les patients présentant une rechute et ceux qui n'en présentent pas. En revanche, les patients ayant maintenu leur rémission clinique présentaient initialement un pourcentage plus élevé de Treg que ceux ayant rechuté (5.7% versus 2,9%; p = 0,0004). La diminution de la fréquence des Treg est décrite chez des patients atteints de pemphigus en phase active de la maladie par rapport à des témoins sains (Sugiyama et al., 2007; Xu et al., 2013b). Ainsi, la fréquence en Treg pourrait également influencer la sévérité initiale du pemphigus et/ou la réponse au traitement. Le rôle suppresseur des Treg apparait comme important dans le contrôle du pemphigus comme précédemment souligné dans le modèle murin de PV (Yokoyama et al., 2011). De plus, ses données sur les Treg permettent d'expliquer le paradoxe entre l'influence des LT CD4⁺ dans la production d'Ac anti-Dsg et la corrélation inverse entre le nombre de LT CD4⁺ après RTX et le risque de rechute décrit récemment comme biomarqueur de rechute (Albers et al., 2017).

Enfin, l'analyse de l'évolution des Ac anti-Dsg1 et anti-Dsg 3 souligne une cinétique de décroissance plus lente chez les patients rechuteurs. De nombreuses études ont démontré que l'évolution des Ac anti-Dsg1 et, dans une moindre mesure des Ac anti-Dsg3, était corrélée à l'évolution des lésions cutanées et muqueuses du pemphigus (Abasq et al., 2009; Albers et al., 2017; Harman et al., 2001; Patsatsi et al., 2014). Ainsi, lors de l'évaluation du 3^{éme} mois, la persistance d'Ac anti-Dsg1 et/ou anti-Dsg3 avec des taux

-235-

supérieurs aux seuils prédictifs de rechute (ELISA IgG anti-Dsg1>20 UI/ml et ELISA IgG anti-Dsg3>130 UI/ml) précédemment établis (Abasq et al., 2009), permet de fournir une valeur prédictive positive de 50% et une valeur prédictive négative de 88% pour la survenue d'une rechute.

Ainsi, notre étude propose deux facteurs prédictifs principaux pour identifier les patients présentant un risque élevé de rechute comprenant : i) le score PDAI initial reflétant l'activité du pemphigus et ii) l'évolution des Ac anti-Dsg après l'injection initiale du RTX. La combinaison de ces deux critères prédictifs donne une sensibilité de 91%, une spécificité de 60% ainsi qu'une valeur prédictive positive de 50% et une valeur prédictive négative de 94% de risque de rechute après le premier cycle de RTX. Ils fournissent une justification biologique pour les perfusions d'entretien de RTX afin de minimiser la survenue d'une récidive après le cycle initial. Ces résultats seront utiles pour affiner les recommandations des lignes directrices sur l'utilisation du RTX dans le traitement du pemphigus.

Notre laboratoire poursuit actuellement l'étude de ce sous-groupe de patients afin de mieux comprendre les liens entre la sévérité du pemphigus, l'évolution des Ac et la réponse au traitement par le RTX. Parmi les nombreuses pistes, notre équipe focalise son attention sur les auto-Ac et leurs cinétiques. Nous avons, en effet, réussi à développer un dosage en Luminex permettant de quantifier finement les sous-classes des IgG des Ac anti-Dsg3. Dans la grande majorité des études, les Ac anti-Dsg pathogènes appartiennent à la sous-classe IgG4 (Allen et al., 1993; Futei et al., 2001), parfois à la sous-classe IgG1 mais rarement aux sous-classes IgG2 et IgG3 (Futei et al., 2001; Jones et al., 1988). Nos données préliminaires (non présentées) confirment que tous les patients atteints de PV possèdent des IgG4 anti-Dsg3. Certains patients présentent également des IgG1, des IgG2 et/ou des IgG3. La particularité des patients ayant rechuté dans la première année est la combinaison d'au moins trois sous-classe d'IgG comprenant régulièrement l'IgG3, très rarement décrite dans les études sur le pemphigus. Parallèlement, les patients ne rechutant pas précocement présentent seulement une ou deux sous-classes d'IgG. Cette diversification isotypique est peut-être le reflet d'une réponse auto-immune plus importante pouvant jouer sur la réponse aux traitements. Elle pourrait également avoir influencée la cinétique des courbes des auto-Ac chez les patients ayant rechuté précocement après le premier cycle de RTX. Néanmoins, cette décroissance plus lente peut avoir d'autres explications comme la persistance, invérifiable chez l'homme, de plasmablastes ou plasmocytes au sein des tissus lymphoïdes (Hiepe et al., 2011; Odendahl et al., 2005). Elle pourrait également s'expliquer par une modification du catabolisme des IgG auto-immunes pouvant être lié à la glycosylation des Ig ou au FcRn jouant un rôle dans le recyclage des IgG et augmentant ainsi leur temps de demi-vie. Aussi, notre équipe prévoit l'analyse génétique des polymorphismes du promoteur influençant l'activité transcriptionnelle du gène codant pour le FcRn (Akilesh et al., 2007; O'Shannessy et al., 2017) ainsi que l'étude de la glycosylation des Ac anti-Dsg3. La glycosylation est une modification post-traductionnelle des IgG (Zheng et al., 2011), pouvant influencer le rôle effecteur de l'Ac en favorisant son action cytotoxique, mais aussi son recyclage via FcRn (van de Bovenkamp et al., 2016). Parallèlement, nous souhaitons élargir notre analyse aux auto-Ac non-Dsg tels que les Ac anti-Dsc ou anti-mAchR (Amber et al., 2018; Grando, 2011; Sinha and Sajda, 2018b) qui pourraient agir en synergie avec les IgG anti-Dsg et contribuer ainsi au phénotype complexe du pemphigus et éventuellement servir de facteur prédictif de rechute.

Chaque dose de RTX induit de manière similaire un cycle de déplétion des LB suivi de leur réémergence. Cette répétition des cycles de RTX a pour objectif d'atteindre la déplétion complète et profonde des LB auto-réactifs. Ainsi, la multiplication des cycles de RTX a permis de réduire le risque de rechute à 2%. Pourtant, certains patients ont des rechutes après la 1^{ère} ou la 2^{éme} dose d'entretien de RTX. Chez les patients du groupe RTX, 2 patients ont présenté une rechute tardive après le 12^{éme} mois (27%) et 3 patients ayant rechuté précocement ont récidivé. Notre équipe approfondie actuellement l'analyse de ces patients afin d'identifier des biomarqueurs pouvant servir de facteur prédictif pour ces rechutes tardives. Nos observations initiales soulignent que parmi ces 5 patients présentant une rechute tardive, deux patients ont une déplétion B incomplète dans le sang après les doses d'entretien de RTX et ont développé des HACA (données non présentées). Un de ces patients atteint la rémission complète à 24 mois mais rechute juste après. L'autre garde une maladie active lors des évaluations à 24 et 36 mois. Ainsi, certaines rechutes tardives peuvent s'expliquer par une résistance au RTX comme dans un cas de PV précédemment rapporté (Lunardon and Payne, 2012). Aussi, le suivi de la déplétion B après chaque perfusion de RTX et la recherche d'HACA en cas de déplétion B incomplète sont deux nouveaux critères d'évaluation de la réponse au traitement par RTX dans le pemphigus également décrits dans d'autres MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Albert et al., 2008), le syndrome de Sjögren (Pijpe et al., 2005) ou le purpura thrombopénique immunologique (Goto et al., 2009) permettant d'orienter la prise en charge de ces patients vers d'autre stratégies thérapeutique. La résistance au RTX n'explique cependant pas l'origine de toutes les rechutes. Elles peuvent être attribuées à la persistance de LB auto-réactifs ou à un défaut persistant de tolérance conduisant à la réapparition de nouveau clones B spécifiques des Dsg. Cette question est essentielle pour le traitement du pemphigus et sa prise en charge à long terme.

L'efficacité et la tolérance du schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention sont actuellement évalué à très long terme. L'ensemble des patients inclus dans le protocole RITUX 3 ont été convoqués pour une évaluation plus de 90 mois (entre 7-8 ans) après le début du traitement. A ce jour, 65 patients sur les 90 inclus dans l'étude RITUX 3 ont participé à cette nouvelle évaluation dont 34 patients sur les 46 du groupe RTX. Le bilan clinique provisoire souligne que depuis la précédente évaluation à 36 mois, 7 patients parmi les 34 (20,6%) issus du groupe RTX ont rechuté, après un délai médian de 40 mois (39-53). Plus de la moitié de ces patients avait précédemment rechutés au cours de l'étude. Deux patients ont toujours une maladie active et 5 ont été retraités par le RTX et sont à ce jour en rémission. Ainsi, le risque de rechute après RTX reste présent et pose la question des mécanismes immunologiques impliqués dans la rémission et du dépistage des patients présentant un risque de rechute afin de permettre un traitement préventif.

2. EVALUATION DE LA REPONSE AUTO-IMMUNE CHEZ LES PATIENTS DE L'ETUDE RITUX 3

Au-delà de ce bilan clinique, l'étude de la réponse lymphocytaire de l'ensemble des patients inclus dans l'étude RITUX 3 au cours des traitements a permis d'approfondir la compréhension de la réponse auto-immunes du pemphigus et de rendre compte des effets des traitements. Le pemphigus est l'une des rares MAI dont la physiopathologie et les cibles antigéniques sont caractérisées permettant ainsi une étude fine de la réponse auto-immune (Schmidt et al., 2019). Le développement du pemphigus est associé à la conjonction de nombreux événements très rares impliquant l'émergence puis la coopération de LB et de LT auto-réactifs dans un contexte génétique et environnemental (Kasperkiewicz et al., 2017; Pan et al., 2015; Pollmann et al., 2018). Aussi, afin de

comprendre les mécanismes d'action impliqués dans la rémission à long terme, nous avons concentré notre analyse sur la réponse auto-immune en comparant la phase active de la maladie à la phase de rémission mais également sur les différences entre les patients en rémission complète et incomplète après les injections de RTX. Les données générées à partir des patients du groupe CS sont essentielles afin de différencier l'effet clinique des effets thérapeutiques.

L'amélioration spectaculaire de l'état des patients dans le groupe RTX est liée à la diminution drastique des taux d'Ac anti-Dsg1 et 3 et est associée à la disparition prolongée des ASC anti-Dsg dans le sang des patients. Le RTX étant connu pour épargner les cellules plasmocytaires CD20⁻, plusieurs études s'accordent à penser que les auto-Ac anti-Dsg sont certainement produits par des cellules plasmocytaires à courte durée de vie qui sont continuellement réapprovisionnées à partir du pool de LB mémoires (Ellebrecht and Payne, 2017). Cela suggère également, bien que la tolérance soit perturbée chez les patients atteints de pemphigus, permettant la formation de LB auto-réactifs, qu'il existe des mécanismes en place pour empêcher leur développement de plasmocytes à longue durée de vie. Les travaux antérieurs de Nishifuiji et coll. ont démontré la présence des LB mémoires auto-réactifs dans le sang des patients atteints de pemphigus par leur capacité à se différencier en ASC après une stimulation antigénique in vitro avec une fréquence généralement faible (1,3 à 2,3 ASC anti-Dsg3 pour 10⁵ PBMC) (Nishifuji et al., 2000). Leurs fréquences reflètent, dans une certaine mesure, l'activité de la maladie. Notre analyse phénotypique des sous-populations de LB a révélé qu'en plus d'une fréquence significativement plus élevée de LB spécifiques des Dsg dans le sang des patients atteints de pemphigus que chez les témoins sains, la population B anti-Dsg détectée représentant de 0,1 à 0,6% des LB totaux (moyenne = $0,2 \pm 0,1\%$) est particulièrement enrichie en LB mémoires ayant subi une commutation isotypique (CD27⁺IgG⁺ : 15,5±3% des LB spécifiques des Dsg). Conformément à nos précédentes observations (Colliou et al., 2013), la proportion des LB IgG⁺ anti-Dsg est très faible chez les individus en bonne santé et est préférentiellement composée de CD27+IgM+. Ainsi, notre analyse phénotypique complète la récente caractérisation des LB mémoires CD19⁺CD27⁺ spécifiques de la Dsg3, réalisée par l'équipe de Pollmann (Pollmann et al., 2019), en mettant l'accent sur l'importance de la commutation isotypique IgG dans le processus physiopathologique du pemphigus. Sans pouvoir exclure complétement un risque de marquage aspécifique des protéines recombinantes Dsg sur les IgM, ces résultats confortent l'hypothèse d'une auto-réactivité B naturelle non pathogène ne produisant initialement pas d'auto-Ac (Wardemann et al., 2003). L'émergence de clones B auto-réactifs est d'autant plus vraisemblable que la Dsg3 n'est pas exprimée de manière centrale dans la moelle osseuse limitant ainsi la délétion clonale (Cho et al., 2014). Il est alors probable que lors d'une réponse immune ou *via* d'autres facteurs déclenchants, des clones B anti-Dsg mémoires puissent acquérir la capacité à se différencier en ASC pour produire de Ac pathogènes, constituant ainsi la base d'une éventuelle rechute de la maladie (Nishifuji et al., 2000; Pollmann et al., 2019).

Or, la population des LB mémoires est profondément et durablement impactée par le traitement car le RTX modifie la répartition des sous-populations de LB après leur reconstitution, modifiant l'équilibre entre les LB naïfs et mémoires (Colliou et al., 2013), et plus particulièrement au sein de la population B auto-réactive. En effet, nos résultats démontrent que la fréquence moyenne des LB CD27⁺ IgG⁺ spécifiques des Dsg est réduite de 13,5 ± 1,5% à 4,0% ±0,6 (p<0,05). Parallèlement à cette déplétion, plus aucune ASC anti-Dsg n'est détectée par ELISPOT chez les patients en rémission complète 36 mois après la première injection de RTX. Ces résultats sont à corréler à la diminution des taux d'Ac IgG anti-Dsg1 et 3 observée dans le sérum des patients. Seul le patient gardant une maladie active 36 mois après les cycles de RTX présente encore des ASC anti-Dsg3 dans le sang et un taux élevé d'Ac anti-Dsg3. Ainsi, l'efficacité du traitement RTX dans le pemphigus semble bien lié à l'élimination drastique et profonde des LB mémoires IgG+ spécifiques des Dsg. Néanmoins, des LB spécifiques des Dsg restent détectables à la même fréquence après RTX lors de la reconstitution lymphocytaire, mais ces LB auto-réactifs présent majoritairement un phénotype naïf et non commuté de type IgM. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un répertoire B naïf naturellement orienté vers l'auto-réactivité créant par recombinaison V(D)J à des fréquences rares des IgM anti-Dsg non pathogènes, comme les LB VH1-46 (Cho et al., 2014). De plus, l'élévation sérique des taux de BAFF constatée chez les patients atteints de pemphigus traités par le RTX (Nagel et al., 2009 et Annexe n°3) contribue certainement à la survie de ces clones B naïfs anti-Dsg. En effet, l'élévation du taux sérique de BAFF et l'expression de ses récepteurs à la surface des LB sont considérés comme des facteurs participant à la rechute post-RTX en favorisant la survie et la maturation de nouveaux clones B pathogènes dans la polyarthrite rhumatoïde (Becerra et al., 2017; Torre et al., 2010). L'expression de BAFF-R est significativement plus faible dans toutes les sous-populations lymphocytaires B chez les patients post-RTX par rapport aux témoins sains et aux patients pré-RTX. Certaines études suggèrent qu'après fixation du BAFF, le BAFF-R est internalisé, ce qui expliquerait la diminution de la MFI (*mean fluorescence intensity*) (Sellam et al., 2007). Notre récente analyse du phénotype des LB auto-réactifs et non auto-réactifs confirme une diminution de la MFI de BAFF-R à la suite du traitement par RTX mais uniquement à la surface des LB non auto-réactifs. Étonnamment, à la surface des LB spécifiques des Dsg, la MFI de BAFF-R reste équivalente à sa valeur initiale. Cette différence d'expression de BAFF-R selon les sous-populations de LB après le RTX est certainement le reflet d'un mécanisme de maturation différent au sein des LB auto-réactifs pouvant contribuer au maintien de la rémission complète par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé (Annexe n°3).

A l'inverse, le traitement utilisant la prednisone seule n'a pas influencé la fréquence ou le phénotype des LB anti-Dsg. Les ASC anti-Dsg sont toujours détectables lors des périodes de rémission dans le sang des patients issus du groupe CS à des fréquences plus faible. La persistance des LB et des ACS IgG anti-Dsg après le traitement par CS est certainement à l'origine de la fréquence plus élevées des rechutes lorsque les doses de prednisone sont réduites à moins de 20 mg/jour. Dans les études sur les réponses grippales, les ASC ont présentes dans la circulation quelques jours après le rappel et disparaissent par la suite pour être de nouveau localisées uniquement au sein des tissus lymphoïdes secondaires (Cho et al., 2017; Koutsakos et al., 2018). En se basant sur ces observations, la présence permanente des ASC anti-Dsg dans le sang des patients atteints de pemphigus témoigne de la chronicité de la réponse auto-immune et ne représente certainement qu'une petite faction des LB auto-réactifs.

Grâce à leurs fonctions effectrices, incluant la production de cytokines et la présentation de l'antigène, les LB peuvent influencer profondément la formation de CG et l'organisation des tissus lymphoïdes mais également moduler les LT et les DC (LeBien and Tedder, 2008; Lund and Randall, 2010). Ainsi, en modifiant l'équilibre des sousensembles des LB totaux et des LB spécifiques des Dsg d'un profil effecteur possédant une forte proportion de LB mémoires vers un profil riche en LB naïfs, le RTX semble impacter l'ensemble du système immunitaire. Les travaux de Eming ont d'ailleurs souligné que la déplétion des LB dans le sang des patients atteints de pemphigus entraîne indirectement une diminution spécifique et prolongée de la fréquence des LT auto-réactifs sécrétant de l'IFN- γ (type Th1) et de l'IL-4 (type Th2) quantifiée après stimulation *in vitro* par la Dsg3, sans pourtant impacter les LT totaux (Eming et al., 2008). Afin de connaitre le ou les

-241-

mécanismes effecteurs ou régulateurs des LB impliqués dans la régulation de la réponse auto-immune, nous avons analysé le profil d'expression génique de 33 gènes d'intérêt dans le pemphigus, à l'échelle unicellulaire, entre des LB spécifiques des Dsg et les LB non auto-réactifs (Hébert et al., 2019b).

Nos résultats confirment que les LB spécifiques de la Dsg présentent initialement un profil pro-inflammatoire avec la surexpression de trois gènes codant pour les cytokines IL-1β, IL-12p35 et IL-23p19 ainsi que pour le gène de l'IRF5. L'augmentation de l'expression génique d'IFR5 a également été observée dans le lupus érythémateux systémique (Lazzari and Jefferies, 2014). L'IFR5 est un facteur de transcription clé du système immunitaire jouant un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire, il régule l'expression des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires et module la maturité des LB et la production d'Ac (De et al., 2017; Eames et al., 2016). Il est intéressant de remarquer que dans un modèle murin, l'IRF5 est associé aux LB ABC CD11c⁺ (Manni et al., 2018) Cette population a été décrite comme augmentée dans de nombreuses MAI telles que la sclérose en plaques (Claes et al., 2016), la polyarthrite rhumatoïde (Rubtsov et al., 2011) ou le lupus érythémateux systémique (Wang et al., 2018). Notre caractérisation des LB CD11c⁺ chez des donneurs sains a démontré que cette sous-population de LB est à un stade plus avancé dans la différenciation plasmocytaire (Annexe n°4). Nos résultats soulignent également une augmentation de la fréquence des LB CD11c⁺ dans le sang des patients atteints de pemphigus. Les caractéristiques des CD11c⁺ font échos à la récente description dans le pemphigus du sous-ensemble de LB CD19^{fort} sur-exprimant des gènes impliqués dans l'activation et la différenciation des LB (Liu et al., 2017). Le lien entre les LB anti-Dsg et ces sous-ensembles de LB CD11c⁺ ou CD19^{hi} n'est pas encore établit mais une analyse par ELIPSOT semblable à celle effectué par Nicholas et coll. dans le lupus érythémateux systémique (Nicholas et al., 2008) permettrait d'établir si la population CD11c⁺ était enrichie en LB auto-réactifs.

Étonnamment, l'évolution du profil d'expression génique de ces LB spécifiques des Dsg avant et après traitement par RTX montre peu de chargement dans le profil transcriptomique à l'exception de l'*IL-1* β et de *CD27*. Conformément à nos observations phénotypiques, la fréquence de transcription du marqueur CD27 associé aux LB mémoires est significativement diminuée après le traitement par RTX aussi bien dans les LB spécifiques des Dsg (23 *versus* 10%, p = 0,03) que dans les LB non auto-réactifs. Ainsi,

-242-

l'expression de CD27 est le reflet de la modification du rapport entre des sous-populations de LB naïfs et mémoires après le traitement par RTX qui est au centre du mécanisme de rémission à long terme. Parallèlement à la rémission clinique, chez les patients traités par RTX mais également par CS, la fréquence des LB exprimant le transcrit du gène de l'*IL-1* β initialement augmentée dans les LB spécifiques de Dsg des patients atteints de pemphigus diminue après traitement (12 verus 1,7%, p = 0,003) pour être proche de celle de la population B auto-réactive issu d'individus sains. Cette diminution suggère un potentiel rôle de l'IL-1ß dans la physiopathologie du pemphigus. L'IL-1ß est une cytokine principalement produite par des cellules hématopoïétiques telles que les monocytes, les macrophages et les DC en réponse au ligand du TLR, à des composants du complément ou à d'autres cytokines telles que le TNF- α (Dinarello, 2011; Garlanda et al., 2013). Cette cytokine pro-inflammatoire joue un rôle central dans l'immunité innée et dans l'inflammation notamment dans la polarisation des LT vers un profil TH17 (Lasigliè et al., 2011) qui est impliqué dans la physiopathologie du pemphigus (Hennerici et al., 2016; Xu et al., 2013). Un taux sérique accru d'IL-1β est observé dans de nombreuses MAI et particulièrement dans des pathologies de la peau comme le psoriasis, le lupus érythémateux systémique cutané et les DBAI tels la PB et le pemphigus (Cigni et al., 2014; Ludwig and Schmidt, 2009; Mee et al., 2006). Notre analyse sérique de l'évolution du taux d'IL-1ß montre une légère diminution au cours des trois premiers mois de traitement dans les deux groupes de patients probablement liée à l'effet de fortes doses de prednisone suivi d'une ré-augmentation au taux initial. Une réduction immédiate de l'IL- 1α et de l'IL-1 β dans le sérum a été précédemment démontrée chez des patients atteints de pemphigus en rémission clinique après une perfusion d'IgIV (Bhol et al., 2001). L'implication de l'IL-1β dans la physiopathologie du pemphigus a été également suggérée par Feliciani et coll. qui ont démontré que les souris IL-1β KO était moins sensibles au transfert passif d'IgG isolées à partir de sérum d'un patient atteint de PV (Feliciani et al., 2000). Plus récemment, les travaux de Ritvo et coll. ont révélé l'existence d'un axe de l'IL-1 régulant les réponses du CG, impliquant les récepteurs de l'IL-1 (IL-1R1 et IL-1R2) et leurs antagonistes (IL-1Ra) dans le contrôle des Tfh et des Tfr. Ces travaux, ont notamment démontré, *in vitro*, que l'IL-1β active la production d'IL-4 et d'IL-21 par les Tfh (Ritvo and Klatzmann, 2019; Ritvo et al., 2017). Ainsi, le rôle direct de l'IL-1β dans l'activation des Tfh pourrait contribuer à la production d'Ac pathogéniques et l'effet des

traitements sur la sécrétion de cette cytokine par les LB apparait alors comme un point de contrôle de la réponse humorale.

Étrangement, par rapport à nos précédentes observations sur l'influence des Breg dans la rémission après RTX (Colliou et al., 2013), nous n'avons pas observé d'augmentation de la fréquence des LB exprimant les transcrits des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 dans les LB spécifiques Dsg ou les LB totaux qui pourraient contribuer à la régulation de la réponse immunitaire (Hébert et al., 2019b). Il est à noter que les LB triés ont été directement isolés du sang et analysés sans stimulation, le profil d'expression génique est donc le reflet de l'état des LB circulants. Il est vraisemblable que ce profil puisse être différent localement dans la peau ou les muqueuses notamment au sein des lésions. Seule une analyse des cellules infiltrant les lésions pourrait permettre de connaitre le profil cytokinique des LB lors de l'acantholyse. L'essor des nouvelles stratégies d'isolement des cellules ainsi que l'évolution des méthodes d'analyse transcriptomique permettent maintenant d'envisager une analyse locale de toutes les cellules au sein d'une biopsie d'une lésion chez des patients atteints de pemphigus (Hu et al., 2016).

Parallèlement, nous avons étudié rétrospectivement le transcriptome global par puces à ADN de tous les LB isolés de patients en rémission complète ou en rémission incomplète issus de l'étude RITUX 1 après la restauration du répertoire lymphocytaire B, 6 ans après l'injection initiale de RTX (Caillot et al., 2018). Cette analyse a mis en évidence 65 transcrits dont l'expression est significativement dérégulée chez les patients en rémission complète par rapport aux patients en rémission incomplète. Notre analyse bibliographique a restreint l'étude à 9 transcrits dont l'expression est associée aux LB ou à un contexte auto-immun. Les LB isolés d'un second groupe de patients indépendants et des patients nouvellement diagnostiqués pour le pemphigus comprenant des patients de l'étude RITUX 3 ont permis de valider par qRT-PCR que les taux d'expression des transcrits de KCNN4, du COL4A3 et du COL4A4 sont significativement diminués dans les LB des patients en rémission complète par rapport aux patients en rémission incomplète (p<0,01). L'expression protéique de KCNN4 est inversement augmentée à la surface des LB dans les sous-populations naïves ou mémoires commutées ou non chez les patients atteints de pemphigus ayant atteint la complète rémission par rapport aux patients nouvellement diagnostiqués. Cette relation inverse entre la quantification de l'ARN et les

-244-

niveaux de protéines à la surface des cellules est souvent décrite et peut refléter des modulations post-transcriptionnelles (Kumar et al., 2016). Le canal potassique KCNN4 joue un rôle important dans l'activation, la migration et la prolifération cellulaires en régulant le potentiel membranaire et la signalisation du Ca²⁺ (Wulff and Castle, 2010; Wulff et al., 2004). L'expression du canal KCNN4 est impliqué dans la différenciation des LB du stade naïf au stade mémoire avec une surexpression à la surface des LB mémoires ayant commutés (Wang and Xiang, 2013; Wulff et al., 2004). Plus récemment, des altérations épigénétiques des gènes impliqués dans la maturation des LB comprenant KCNN4 ont été observées chez des patients atteints de CVID (*Common Variable Immune Deficiency*). Cette maladie est caractérisée par un trouble de la différenciation des LB notamment de LB mémoires commutés et est associée dans 25% des cas à des manifestations auto-immunes (Rodríguez-Cortez et al., 2015). Au vu de son rôle dans la différenciation des LB, le canal potassique KCNN4 semble être impliqué dans les mécanismes permettant le maintien de la rémission à long terme après RTX chez les patients atteints de pemphigus.

Nos observations phénotypiques et transcriptomiques confirment que l'efficacité du RTX dans le pemphigus va au-delà du processus initial de déplétion. Le déséquilibre de la balance naïf/mémoire maintenu à long terme suggère que le traitement par RTX perturbe également d'autres processus impliqués dans la maturation des LB et de la commutation de classe des IgM en IgG permettant ainsi de maintenir la rémission bien après le retour des LB dans le sang des patients. Par conséquent, des signaux immunitaires supplémentaires sont nécessaires pour initier l'activation et surtout la maturation des clones B auto-réactifs et ainsi, conduire à la différenciation en ASC. La voie d'activation de ces LB responsables de la production des IgG anti-Dsg n'est pas encore clairement établit mais elle nécessite la coopération de LT comme le souligne les modèles murins de PV transgéniques pour le HLA de classe II humain HLA-DRB1*0402 (Eming et al., 2014) ou l'impact sur la production d'IgG anti-Dsg3 qu'induit le blocage des interactions entre les LB et LT par l'Ac anti-CD40L (Aoki-Ota et al., 2006). La génération de LB mémoires CD27+, commutés IgG⁺ est classiquement liée à la maturation des LB au sein des CG et nécessitent une collaboration avec les Tfh (Breitfeld et al., 2000) qui contribuent aux processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique (Eto et al., 2011; Ma et al., 2012; Tangye et al., 2013; Ueno et al., 2015; Zotos et al., 2010). L'implication des Tfh a été étudiée dans plusieurs maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (Choi et al., 2015), la polyarthrite rhumatoïde (Arroyo-Villa et al., 2014), des maladies liées aux IgG4 (Akiyama et al., 2015; Chen et al., 2018) et plus récemment dans le pemphigus. En effet, une augmentation de la fréquence de Tfh a été décrite dans le sang des patients atteints de PV ainsi qu'une élévation des taux sériques d'IL-21 et d'IL-27 (Hennerici et al., 2016). Des LT auto-réactifs producteurs d'IL-21 spécifiques de la Dsg3 ont également été détectés, ce qui suggère leur rôle potentiel dans la pathogenèse du pemphigus (Hennerici et al., 2016). Initialement, nous avons constaté que les patients atteints de pemphigus de l'étude RITUX 3 présentaient des taux sériques d'IL-21 plus élevés que ceux des témoins sains (données non présentées). Parallèlement à la déplétion B induite par le RTX, nous avons observé une diminution significative de près de 50% de la fréquence des Tfh associée à la réduction des taux sériques en d'IL-21. Une telle diminution des Tfh après traitement par RTX a également été rapporté chez des patients atteints du syndrome de Sjögren ou du diabète de type 1 (Verstappen et al., 2017; Xu et al., 2013) soulignant ainsi l'interdépendance de ces populations. Ainsi, la déplétion des précurseurs des LB associée à la réduction des Tfh entraîne probablement une diminution de la production des plasmablastes et des plasmocytes à courte durée de vie, ce qui pourrait expliquer la disparition durable des Ac anti-Dsg. Après la reconstitution lymphocytaire B, la fréquence des Tfh a ré-augmenté pour revenir à sa valeur initiale, mais les taux d'IL-21 sont restés faibles. En revanche, nous n'avons pas observé de telles variations dans la fréquence des LB ou des Tfh chez les patients du groupe CS. L'évolution du taux d'IL-21 montre une légère diminution au cours des premiers mois de traitement probablement liée à l'effet de fortes doses de prednisone (Li et al., 2014) suivi d'une réaugmentation à sa valeur initiale en parallèle de la ré-ascension des taux d'Ac anti-Dsg.

L'analyse cytométrique des fréquences des LT et plus particulièrement des Tfh autoréactifs post-traitements des patients présentant le HLA-DRB1*0402 de susceptibilité au PV (Veldman et al., 2007) a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les patients traités uniquement par la prednisone et ceux ayant reçu le RTX. Cette étude a permis d'établir, pour la première fois, l'existence de Tfh spécifiques de la Dsg3 dans le sang de patients atteints de pemphigus. La faible fréquence des Tfh spécifiques de la Dsg3 chez les patients du groupe RTX après traitement explique probablement que les taux d'IL-21 soient restés bas après le retour des LB et des Tfh, ce qui contribue certainement à la persistance du phénotype naïf et non-commuté des LB spécifiques des Dsg chez les patients présentant une rémission durable après RTX. Il est intéressant de remarquer que le patient en maladie active persistante après RTX, présentant des taux d'Ac anti-Dsg3 élevés et pour lequel des ACS anti-Dsg3 ont été détectées dans le sang, présente également une fréquence plus élevée de LT de Tfh spécifiques de la Dsg3 et des taux sériques d'IL-21 plus élevés que les patients en rémission complète après RTX.

En résumé, chez les patients du groups CS, la persistance des LB et des Tfh anti-Dsg est certainement à l'origine de la fréquence plus élevée de rechutes lorsque les doses de prednisone sont réduites à moins de 20 mg/jour. Cependant, ces travaux montrent également que la prednisone agie sur diverses cibles de façon dose dépendante en modulant principalement les cytokines clés impliquées dans la physiopathologie du pemphigus telles que l'IL-1β (Hébert et al., 2019b), l'IL-21 ou BAFF (Kamhieh-Milz et al., 2018 et annexe n°3) influençant ainsi la production d'auto-Ac (Youinou and Pers, 2010) démontré par à la diminution transitoire des taux d'Ac anti-Dsg et de la fréquence des ASC anti-Dsg déterminer par ELISPOT. Ces effets ainsi que leur capacité à inhiber l'acantholyse en modulant directement l'expression des Dsg dans la peau (Nguyen et al. 2004) justifie pleinement la combinaison de la CS à court terme avec le traitement RTX. De plus, nos résultats ont clairement montré que l'effet thérapeutique à long terme du RTX dans le pemphigus résulte d'effets plus complexe que la simple délétion des LB auto-réactifs pathogènes en jouant également sur la coopération cellulaire entre les LB et les Tfh, permettant ainsi un blocage du processus de maturation des LB auto-réactifs et de la commutation de classe. Bien que la réduction initiale des Tfh spécifiques de la Dsg après le traitement par RTX puisse s'expliquer par la déplétion parallèle des LB spécifiques de la Dsg, les mécanismes de la déplétion durable de Tfh spécifiques de la Dsg restent largement inconnus.

L'ensemble de nos données posent la question du l'évolution à très long terme du répertoire lymphocytaire B et Tfh auto-immun et du risque de générer de nouveaux clones pathogènes.

Nous poursuivons actuellement l'étude des patients 90 mois après la première injection de RTX. A 36 mois, la plupart des patients issus du groupe RTX ne présentaient plus aucun auto-Ac à l'exception de quelques patients ayant des taux d'Ac anti-Dsg1 (2%) et d'Ac anti-Dsg3 (27%) supérieurs aux seuils de positivité. Notre bilan clinico-biologique provisoire à 90 mois souligne que 83% des patients ont maintenu une rémission complète sans traitement. Cependant, les patients en rémission complète avec des Ac anti-Dsg à

-247-

M36 présentent un risque de rechute de prêt de 50%. Généralement, il existe une corrélation étroite entre les titres d'Ac et l'activité de la maladie (Amagai, 1999; Ishii et al., 1997) mais des rémissions cliniques de patients gardant des titres d'IgG anti-Dsg élevés ont précédemment été décrites (Abasq et al., 2009; Belloni-Fortina et al., 2009; Harman et al., 2001; Ishii et al., 2005). Notre laboratoire s'intéresse particulièrement à l'évolution des auto-Ac chez ces patients pour comprendre les différences en termes d'isotypes, d'idiopypes ou de pathogénicité afin d'identifier des biomarqueurs pouvant servir de facteur prédictif pour ces rechutes tardives. De nombreuse études ont démontré que la réponse anti-Dsg est polyclonale avec des Ac ayant des activités pathogènes distinctes (Chen et al., 2017; Cho et al., 2019; Payne et al., 2005; Zenzo et al., 2012). Les épitopes reconnus par les Ac anti-Dsg détermineraient leur activité pathogène ainsi que l'activité de la maladie (Hammers et al., 2018; Sharma et al., 2009; Tsunoda et al., 2003; Yamagami et al., 2009b). Toutefois, d'autres facteurs pourraient également influencer la pathogénicité des auto-Ac, comme la glycosylation (Zheng et al., 2011) ou une combinaison particulière avec des auto-Ac non-Dsg tels que les Ac anti-Dsc ou anti-mAchR (Amber et al., 2018).

L'analyse préliminaire du phénotype des LB totaux confirme la persistance à plus de 90 mois après la dernière injection de RTX du déséquilibre de la balance LB naïfs/mémoires (Colliou et al., 2013). A ce jour, peu d'études ont analysé à si long terme et parmi un si grand nombre de patients la reconstitution lymphocytaire B après RTX. Ces résultats confirment que le RTX n'entraîne pas seulement une déplétion transitoire des LB, mais a un impact à très long terme sur l'homéostasie immunologique. Ces données posent la question du renouvellement phénotypique ou fonctionnel du répertoire des LB auto-réactifs et donc des mécanismes par lesquels le RTX confère son efficacité clinique à très long terme. Nous focalisons actuellement notre attention sur les patients ayant rechuté ou non afin d'identifier des facteurs prédictifs de rechutes tardives. Nous pensons que la surveillance phénotypique des LB spécifiques des Dsg et en particulier l'émergence de LB mémoire CD27⁺IgG⁺ ainsi que la détection par ELIPSOT d'ASC IgG anti-Dsg, pourraient constituer des outils prédictifs de rechute permettant des interventions thérapeutiques préventives chez les patients atteints de pemphigus.

Parallèlement, nous poursuivons notre collaboration avec le Dr Fazilleau afin d'analyser le phénotype des Tfh auto-réactifs anti-Dsg3 en évaluant l'expression des

-248-

récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 permettant de distinguer les trois sousensembles principaux de Tfh (Tfh1, Tfh2 et Tfh17) (Schmitt et al., 2014). Chacun des sousensembles de Tfh a une capacité distincte à activer les LB. Notre analyse préliminaire du phénotype des Tfh spécifiques de la Dsg3 après traitement par RTX ou CS montre une plus faible proportion de Tfh1 par rapport au phénotype des Tfh non auto-réactifs. Or, les travaux de Morita et coll. ont montré que les LB naïfs sont préférentiellement stimulés par les Tfh2 et les Tfh17, mais pas par les Tfh1 (Morita et al., 2011). De plus les Tfh spécifiques de la Dsg3 après RTX sont préférentiellement de type Tfh2 alors que ceux après CS sont préférentiellement Tfh1*. A notre connaissance, il s'agit de la première caractérisation phénotypique de Tfh auto-réactifs dans une MAI chez l'homme. Nos observations préliminaires semblent confirmer une altération de l'équilibre au sein des Tfh auto-réactifs avec une dominance de Tfh2 par rapport au Tfh1 précédemment décrit dans l'ensemble des Tfh comme étant un des mécanismes de modulation de la réponse auto-immune dans plusieurs MAI (Akiyama et al., 2015; Arroyo-Villa et al., 2014; Chen et al., 2018; Choi et al., 2015b). La caractérisation plus en avant de cette population après traitement ainsi que son évolution depuis le début de la maladie semble essentielle pour comprendre son implication dans la maturation des LB auto-réactifs dans le pemphigus et dans les mécanismes de rémission à long terme. Les Tfh ou plus probablement la cytokine IL-21 pourraient potentiellement devenir de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre le pemphigus (Tavakolpour, 2016).

CONCLUSION

L'utilisation en première intention du RTX en association avec la prednisone à court terme chez les patients atteints de pemphigus (PF ou PV) modéré à sévère est à la fois plus efficace et moins dangereuse qu'un traitement par prednisone seule. Il permet une réduction rapide des doses de corticostéroïdes et réduit le nombre d'événements indésirables liés au traitement. De plus, les doses d'entretien de 500 mg de RTX après 12 et 18 mois se sont révélées très efficaces et bien tolérées pour obtenir des rémissions cliniques à long terme. Ainsi ces travaux ont concrètement amélioré la vie des patients atteints de pemphigus car le schéma thérapeutique utilisant le RTX en première intention est maintenant recommandé aux États-Unis et en Europe.

Nos analyses immunologiques des patients ont permis d'approfondir le mécanisme d'action des GC et du RTX. Nos données ont clairement démontré qu'au-delà de la déplétion initiale des clones auto-réactifs pathogènes, le RTX entraine une modulation profonde du système immunitaire adaptatif chez les patients atteints de pemphigus. En effet, le RTX entraine une modification du profil phénotypique et transcriptomique des LB spécifiques des Dsg et impacte également les Tfh auto-réactifs, leurs partenaires cellulaires dans les centres germinatifs, ce qui explique que la rémission de la maladie perdure au-delà de la réapparition des LB dans le sang des patients. Par contre, le taux élevé de rechutes chez les patients du groupe CS peut s'expliquer par la persistance des LB et des Tfh auto-réactifs qui sont certainement à l'origine de la ré-émergence des Ac anti-Dsg observée lors du sevrage entre le 12 ^{éme} et les 24^{éme} mois. Néanmoins, les effets de la prednisone sur les cytokines et la production d'Ac ainsi que leur capacité à inhiber l'acantholyse justifie pleinement la combinaison de la CS à court terme avec le traitement RTX.

Ces résultats confirment le rôle central des LB dans la physiopathologie du pemphigus mais soulignent également l'implication des Tfh contribuant probablement aux mécanismes de maturation des LB auto-immuns.

-251-

-252-

RÉFÉRENCES

A

Aalberse, R.C., and Schuurman, J. (2002). IgG4 breaking the rules. Immunology *105*, 9–19.

Abasq, C., Mouquet, H., Gilbert, D., Tron, F., Grassi, V., Musette, P., and Joly, P. (2009). ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch. Dermatol. *145*, 529–535.

Abdallah, F., Mijouin, L., and Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. Mediators Inflamm. *2017*.

Abida, O., Zitouni, M., Kallel-Sellami, M., Mahfoudh, N., Kammoun, A., Ben Ayed, M., Masmoudi, A., Mokni, M., Fezzaa, B., Ben Osman, A., et al. (2009). Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with the HLA-DR3 gene: anti-desmoglein 1 antibody-positive healthy subjects bear protective alleles. Br. J. Dermatol. *161*, 522–527.

Achour, A., Simon, Q., Mohr, A., Séité, J.-F., Youinou, P., Bendaoud, B., Ghedira, I., Pers, J.-O., and Jamin, C. (2017). Human regulatory B cells control the TFH cell response. J. Allergy Clin. Immunol. *140*, 215–222.

Adderson, E.E., Shackelford, P.G., Quinn, A., and Carroll, W.L. (1991). Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *147*, 1667–1674.

Agematsu, K., Nagumo, H., Oguchi, Y., Nakazawa, T., Fukushima, K., Yasui, K., Ito, S., Kobata, T., Morimoto, C., and Komiyama, A. (1998). Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. Blood *91*, 173–180.

Ahmed, A.R., Yunis, E.J., Khatri, K., Wagner, R., Notani, G., Awdeh, Z., and Alper, C.A. (1990). Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 7658–7662.

Ahmed, A.R., Wagner, R., Khatri, K., Notani, G., Awdeh, Z., Alper, C.A., and Yunis, E.J. (1991). Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5056–5060.

Ahmed, A.R., Spigelman, Z., Cavacini, L.A., and Posner, M.R. (2009). Treatment of Pemphigus Vulgaris with Rituximab and Intravenous Immune Globulin.

Ahmed, A.R., Kaveri, S., and Spigelman, Z. (2015). Long-Term Remissions in Recalcitrant Pemphigus Vulgaris. N. Engl. J. Med. *373*, 2693–2694.

Ahmed, A.R., Carrozzo, M., Caux, F., Cirillo, N., Dmochowski, M., Alonso, A.E., Gniadecki, R., Hertl, M., López-Zabalza, M.J., Lotti, R., et al. (2016). Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. Exp. Dermatol. *25*, 839–846.

Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Luche, H., Fehling, H.J., Casellas, R., Kanagawa, O., et al. (2010). Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 12192– 12197.

Akilesh, S., Christianson, G.J., Roopenian, D.C., and Shaw, A.S. (2007). Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 4580–4588.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell *124*, 783–801.

Akiyama, M., Suzuki, K., Yamaoka, K., Yasuoka, H., Takeshita, M., Kaneko, Y., Kondo, H., Kassai, Y., Miyazaki, T., Morita, R., et al. (2015). Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *67*, 2476–2481.

Akiyama, M., Yasuoka, H., Yamaoka, K., Suzuki, K., Kaneko, Y., Kondo, H., Kassai, Y., Koga, K., Miyazaki, T., Morita, R., et al. (2016). Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. Arthritis Res. Ther. *18*, 167.

Albers, L.N., Liu, Y., Bo, N., Swerlick, R.A., and Feldman, R.J. (2017). Developing biomarkers for predicting clinical relapse in pemphigus patients treated with rituximab. J. Am. Acad. Dermatol. *77*, 1074–1082.

Albert, D., Dunham, J., Khan, S., Stansberry, J., Kolasinski, S., Tsai, D., Pullman-Mooar, S., Barnack, F., Striebich, C., Looney, R.J., et al. (2008). Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythaematosus. Ann. Rheum. Dis. *67*, 1724– 1731.

Alexander, C.-M., Tygrett, L.T., Boyden, A.W., Wolniak, K.L., Legge, K.L., and Waldschmidt, T.J. (2011). T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. Immunology *133*, 452–468.

Alice Long, S., and Buckner, J.H. (2011). CD4+FOXP3+ Treg in human autoimmunity: more than a numbers game. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *187*, 2061–2066.

Al-Jassar, C., Bikker, H., Overduin, M., and Chidgey, M. (2013). Mechanistic Basis of Desmosome-Targeted Diseases. J. Mol. Biol. *425*, 4006–4022.

Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nat. Immunol. *5*, 943–952.

Allen, E.M., Giudice, G.J., and Diaz, L.A. (1993). Subclass reactivity of pemphigus foliaceus autoantibodies with recombinant human desmoglein. J. Invest. Dermatol. *100*, 685–691.

Almugairen, N., Hospital, V., Bedane, C., Duvert-Lehembre, S., Picard, D., Tronquoy, A.-F., Houivet, E., D'incan, M., and Joly, P. (2013). Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. J. Am. Acad. Dermatol. *69*, 583–588.

Alsughayyir, J., Pettigrew, G.J., and Motallebzadeh, R. (2017). Spoiling for a Fight: B Lymphocytes As Initiator and Effector Populations within Tertiary Lymphoid Organs in Autoimmunity and Transplantation. Front. Immunol. *8*, 1639.

Amagai, M. (1999). Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. J. Dermatol. Sci. *20*, 92–102.

Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell *67*, 869–877.

Amagai, M., Ishii, K., Hashimoto, T., Gamou, S., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995). Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. J. Invest. Dermatol. *105*, 243–247.

Amagai, M., Koch, P.J., Nishikawa, T., and Stanley, J.R. (1996). Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Is Localized in the Lower Epidermis, the Site of Blister Formation in Patients. J. Invest. Dermatol. *106*, 351–355.

Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., and Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. J. Am. Acad. Dermatol. *40*, 167–170.

Amagai, M., Tsunoda, K., Suzuki, H., Nishifuji, K., Koyasu, S., and Nishikawa, T. (2000). Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J. Clin. Invest. *105*, 625–631.

Amber, K.T., Valdebran, M., and Grando, S.A. (2018). Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. Front. Immunol. *9*.

Anderson, S.M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A.M., Kleinstein, S.H., and Shlomchik, M.J. (2009). Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 7314– 7325.

Anhalt, G.J., Labib, R.S., Voorhees, J.J., Beals, T.F., and Diaz, L.A. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N. Engl. J. Med. *306*, 1189–1196.

Anhalt, G.J., Till, G.O., Diaz, L.A., Labib, R.S., Patel, H.P., and Eaglstein, N.F. (1986). Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *137*, 2835–2840.

Anhalt, G.J., Kim, S.C., Stanley, J.R., Korman, N.J., Jabs, D.A., Kory, M., Izumi, H., Ratrie, H., Mutasim, D., and Ariss-Abdo, L. (1990). Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. N. Engl. J. Med. *323*, 1729–1735.

Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Sanz, I., Rosenblatt, J., and Looney, R.J. (2003). The relationship of FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. *48*, 455–459.

Aoki, V., Rivitti, E.A., Diaz, L.A., and Cooperative Group on Fogo Selvagem Research (2015). Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. J. Dermatol. *42*, 18–26.

Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M., and Nishikawa, T. (2004). A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. Br. J. Dermatol. *151*, 346–354.

Aoki-Ota, M., Kinoshita, M., Ota, T., Tsunoda, K., Iwasaki, T., Tanaka, S., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2006). Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. J. Invest. Dermatol. *126*, 105–113.

Arakawa, M., Dainichi, T., Yasumoto, S., and Hashimoto, T. (2009). Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. J. Dermatol. Sci. *53*, 228–231.

Armitage, R.J., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., and Fanslow, W.C. (1993). Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *150*, 3671–3680.

Arroyo-Villa, I., Bautista-Caro, M.-B., Balsa, A., Aguado-Acín, P., Bonilla-Hernán, M.-G., Plasencia, C., Villalba, A., Nuño, L., Puig-Kröger, A., Martín-Mola, E., et al. (2014). Constitutively altered frequencies of circulating follicullar helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. *16*.

Asashima, N., Fujimoto, M., Watanabe, R., Nakashima, H., Yazawa, N., Okochi, H., and Tamaki, K. (2006). Serum levels of BAFF are increased in bullous pemphigoid but not in pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. *155*, 330– 336.

Asothai, R., Anand, V., Das, D., Antil, P.S., Khandpur, S., Sharma, V.K., and Sharma, A. (2015). Distinctive Treg associated CCR4-CCL22 expression profile with altered frequency of Th17/Treg cell in the immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. Immunobiology *220*, 1129– 1135.

Atzmony, L., Hodak, E., Leshem, Y.A., Rosenbaum, O., Gdalevich, M., Anhalt, G.J., and Mimouni, D. (2015). The role of adjuvant therapy in pemphigus: A systematic review and metaanalysis. J. Am. Acad. Dermatol. *73*, 264–271.

Audia, S., Rossato, M., Trad, M., Samson, M., Santegoets, K., Gautheron, A., Bekker, C., Facy, O., Cheynel, N., Ortega-Deballon, P., et al. (2017). B cell depleting therapy regulates splenic and circulating T follicular helper cells in immune thrombocytopenia. J. Autoimmun. *77*, 89–95. Ayatollahi, M., Joubeh, S., Mortazavi, H., Jefferis, R., and Ghaderi, A. (2004). IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *18*, 241–242.

Ayed, M.B., Martel, P., Zitouni, M., Gilbert, D., Turki, H., Mokni, M., Osman, A.B., Kamoun, M.R., Zahaf, A., Makni, S., et al. (2002). Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein 1 gene polymorphism. Genes Immun. *3*, 378–379.

Β

Bao, Y., and Cao, X. (2014). The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: A comprehensive review. J. Autoimmun. *55*, 10–23.

Barnadas, M.A., Rubiales, M.V., Gich, I., and Gelpí, C. (2015). Usefulness of specific antidesmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunoassay and indirect immunofluorescence in the evaluation of pemphigus activity. Int. J. Dermatol. *54*, 1261–1268.

Bartholome, B., Spies, C.M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.-R., Lauster, R., et al. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and upregulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J. *18*, 70–80.

Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nouira, R., Jomaa, B., Zahaf, A., Ben Osman, A., Mokhtar, I., and Fazaa, B. (1995). Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. J. Invest. Dermatol. *104*, 302–305.

Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nat. Rev. Immunol. *9*, 15–27.

Becerra, E., De La Torre, I., Leandro, M.J., and Cambridge, G. (2017). B cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis relapsing after rituximab: expression of B cell-activating factorbinding receptors on B cell subsets. Clin. Exp. Immunol. *190*, 372–383.

Beissert, S., Mimouni, D., Kanwar, A.J., Solomons, N., Kalia, V., and Anhalt, G.J. (2010). Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. J. Invest. Dermatol. *130*, 2041–2048. Bektas, M., Jolly, P.S., Berkowitz, P., Amagai, M., and Rubenstein, D.S. (2013). A Pathophysiologic Role for Epidermal Growth Factor Receptor in Pemphigus Acantholysis. J. Biol. Chem. *288*, 9447–9456.

Belloni-Fortina, A., Faggion, D., Pigozzi, B., Peserico, A., Bordignon, M., Baldo, V., and Alaibac, M. (2009). Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. Clin. Dev. Immunol. 2009, 187864.

Bereshchenko, O., Bruscoli, S., and Riccardi, C. (2018). Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. Front. Immunol. *9*.

Berkowitz, P., Chua, M., Liu, Z., Diaz, L.A., and Rubenstein, D.S. (2008). Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. Am. J. Pathol. *173*, 1628–1636.

Berkun, Y., Mimouni, D., and Shoenfeld, Y. (2005). Pemphigus following hepatitis B vaccination-coincidence or causality? Autoimmunity *38*, 117–119.

Berookhim, B., Fischer, H.D., and Weinberg, J.M. (2004). Treatment of recalcitrant pemphigus vulgaris with the tumor necrosis factor alpha antagonist etanercept. Cutis *74*, 245–247.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature *441*, 235–238.

Beutner, E.H., Lever, W.F., Witebsky, E., Jordon, R., and Chertock, B. (1965). AUTOANTIBODIES IN PEMPHIGUS VULGARIS: RESPONSE TO AN INTERCELLULAR SUBSTANCE OF EPIDERMIS. JAMA 192, 682–688.

Beutner, E.H., Jordon, R.E., and Chorzelski, T.P. (1968). The Immunopathology of Pemphigus and Bullous Pemphigoid**From the Department of Microbiology, SUNY at Buffalo School of Medicine, Buffalo, New York, Mayo Graduate School of Medicine, Rochester, Minn., and the Department of Dermatology, Warsaw Medical School, Warsaw, Poland. J. Invest. Dermatol. *51*, 63–80.

Bhol, K., Natarajan, K., Nagarwalla, N., Mohimen, A., Aoki, V., and Ahmed, A.R. (1995). Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 5239–5243. Bhol, K.C., Rojas, A.I., Khan, I.U., and Ahmed, A.R. (2000). Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. Cytokine *12*, 1076–1083.

Bhol, K.C., Desai, A., Kumari, S., Colon, J.E., and Ahmed, A.R. (2001). Pemphigus Vulgaris: The Role of IL-1 and IL-1 Receptor Antagonist in Pathogenesis and Effects of Intravenous Immunoglobulin on Their Production. Clin. Immunol. *100*, 172–180.

Bilgic Temel, A., and Murrell, D.F. (2019). Pharmacological advances in pemphigus. Curr. Opin. Pharmacol. *46*, 44–49.

Blair, H.A., and Deeks, E.D. (2017). Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. Drugs *77*, 1221–1233.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity *32*, 129–140.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 207–217.

Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms. Science 296, 1308–1313.

Boldizsar, F., Talaber, G., Szabo, M., Bartis, D., Palinkas, L., Nemeth, P., and Berki, T. (2010). Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology *215*, 521–526.

Bombardieri, M., Barone, F., Humby, F., Kelly, S., McGurk, M., Morgan, P., Challacombe, S., De Vita, S., Valesini, G., Spencer, J., et al. (2007). Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 4929–4938.

Boross, P., and Leusen, J.H.W. (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. Am. J. Cancer Res. *2*, 676–690.

Borradori, L., and Sonnenberg, A. (1999). Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. J. Invest. Dermatol. *112*, 411–418. Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. Eur. J. Immunol. *40*, 2686–2691.

Bouaziz, J.-D., Masson, A. de, Buanec, H.L., Bagot, M., and Bensussan, A. (2014). Lymphocytes B régulateurs : état des connaissances. médecine/sciences *30*, 721–724.

Boulais, N., and Misery, L. (2007). Merkel cells. J. Am. Acad. Dermatol. *57*, 147–165.

Boulard, C., Duvert Lehembre, S., Picard-Dahan, C., Kern, J.S., Zambruno, G., Feliciani, C., Marinovic, B., Vabres, P., Borradori, L., Prost-Squarcioni, C., et al. (2016). Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br. J. Dermatol. *175*, 142–149.

van de Bovenkamp, F.S., Hafkenscheid, L., Rispens, T., and Rombouts, Y. (2016). The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 1435–1441.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J. Exp. Med. *192*, 1545–1552.

Brenner, S., and Wohl, Y. (2006). A burning issue: burns and other triggers in pemphigus. Cutis 77, 145–146.

Brenner, S., Tur, E., Shapiro, J., Ruocco, V., D'Avino, M., Ruocco, E., Tsankov, N., Vassileva, S., Drenovska, K., Brezoev, P., et al. (2001). Pemphigus vulgaris: environmental factors. Occupational, behavioral, medical, and qualitative food frequency questionnaire. Int. J. Dermatol. *40*, 562–569.

Brenner, S., Srebrnik, A., and Goldberg, I. (2003). Pemphigus can be induced by topical phenol as well as by foods and drugs that contain phenols or thiols. J. Cosmet. Dermatol. *2*, 161–165.

Bumiller-Bini, V., Cipolla, G.A., de Almeida, R.C., Petzl-Erler, M.L., Augusto, D.G., and Boldt, A.B.W. (2018). Sparking Fire Under the Skin? Answers From the Association of Complement Genes With Pemphigus Foliaceus. Front. Immunol. 9. Burger, J.A., and Wiestner, A. (2018). Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. Nat. Rev. Cancer *18*, 148–167.

Buttgereit, F., and Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids *67*, 529–534.

С

Caillot, F., Derambure, C., Berkani, N., Riou, G., Maho-Vaillant, M., Calbo, S., Joly, P., and Musette, P. (2018). Long-Term Increase of Kcnn4 Potassium Channel Surface Expression on B Cells in Pemphigus Patients after Rituximab Treatment. J. Invest. Dermatol. *138*, 2666–2668.

Cain, D.W., and Cidlowski, J.A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. Nat. Rev. Immunol. *17*, 233–247.

Calkins, C.C., Setzer, S.V., Jennings, J.M., Summers, S., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kowalczyk, A.P. (2006). Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. J. Biol. Chem. *281*, 7623–7634.

Camisa, C., and Helm, T.N. (1993). Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasiainduced autoimmune disease. Arch. Dermatol. *129*, 883–886.

Cano, R.L.E., and Lopera, H.D.E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes (El Rosario University Press).

Caplan, A., Fett, N., Rosenbach, M., Werth, V.P., and Micheletti, R.G. (2017). Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: Ocular, cardiovascular, muscular, and psychiatric side effects and issues unique to pediatric patients. J. Am. Acad. Dermatol. *76*, 201–207.

Capon, F., Bharkhada, J., Cochrane, N.E., Mortimer, N.J., Setterfield, J.F., Reynaert, S., Black, M.M., Vaughan, R.W., Trembath, R.C., and Harman, K.E. (2006). Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. *154*, 67–71.

Caproni, M., Giomi, B., Cardinali, C., Salvatore, E., Pestelli, E., D'Agata, A., Bianchi, B., Toto, P., Feliciani, C., and Fabbri, P. (2001). Further support for a role for Th2-like cytokines in blister formation of pemphigus. Clin. Immunol. Orlando Fla *98*, 264–271.

Carcassi, C., Cottoni, F., Floris, L., Vacca, A., Mulargia, M., Arras, M., Boero, R., La Nasa, G., Ledda, A., Pizzati, A., et al. (1996). HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *48*, 662–667.

Cari, L., De Rosa, F., Nocentini, G., and Riccardi, C. (2019). Context-Dependent Effect of Glucocorticoids on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Regulatory T Cells: A Review of the Empirical Evidence and Clinical Applications. Int. J. Mol. Sci. 20.

Caso, F., Iaccarino, L., Bettio, S., Ometto, F., Costa, L., Punzi, L., and Doria, A. (2013). Refractory pemphigus foliaceus and Behçet's disease successfully treated with tocilizumab. Immunol. Res. *56*, 390–397.

Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 1684– 1690.

Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.-P., Bram, R.J., Jabara, H., and Geha, R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. J. Exp. Med. *201*, 35–39.

Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. Nat. Rev. Immunol. *13*, 118–132.

Chaplin, D.D. (2010). Overview of the Immune Response. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S3-23.

Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004a). Classswitch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. Nat. Rev. Immunol. *4*, 541.

Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004b). Classswitch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. Nat. Rev. Immunol. *4*, 541–552.

Cheema, G.S., Roschke, V., Hilbert, D.M., and Stohl, W. (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum. *44*, 1313–1319.

Chen, D.M., Odueyungbo, A., Csinady, E., Gearhart, L., Lehane, P., Cheu, M., Maud, V., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., et al. (2019). Rituximab is an Effective Treatment in Patients with Pemphigus Vulgaris and Demonstrates a Steroid-Sparing Effect. Br. J. Dermatol.

Chen, J., Den, Z., and Koch, P.J. (2008). Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. J. Cell Sci. *121*, 2844–2849.

Chen, J., Zheng, Q., Hammers, C.M., Ellebrecht, C.T., Mukherjee, E.M., Tang, H.-Y., Lin, C., Yuan, H., Pan, M., Langenhan, J., et al. (2017). Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. Cell Rep. *18*, 237–247.

Chen, Y., Chernyavsky, A., Webber, R.J., Grando, S.A., and Wang, P.H. (2015). Critical Role of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Pathogenic Action of Antimitochondrial Autoantibodies Synergizing with Antidesmoglein Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. J. Biol. Chem. *290*, 23826–23837.

Chen, Y., Lin, W., Yang, H., Wang, M., Zhang, P., Feng, R., Chen, H., Peng, L., Zhang, X., Zhao, Y., et al. (2018). Aberrant Expansion and Function of Follicular Helper T Cell Subsets in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *70*, 1853–1865.

Chernyavsky, A., Chen, Y., Wang, P.H., and Grando, S.A. (2015). Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptolysis. Int. Immunopharmacol. *29*, 76–80.

Cheson, B.D., and Leonard, J.P. (2008). Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. N. Engl. J. Med. *359*, 613– 626.

Chiossi, M.P.V., Costa, R.S., and Roselino, A.M.F. (2004). Dermal dendritic cell number correlates with serum autoantibody titers in Brazilian pemphigus foliaceus patients. Braz. J. Med. Biol. Res. *37*, 337–341.

Cho, A., Bradley, B., Kauffman, R., Priyamvada, L., Kovalenkov, Y., Feldman, R., and Wrammert, J. (2017). Robust memory responses against influenza vaccination in pemphigus patients previously treated with rituximab. JCI Insight *2*.

Cho, A., Caldara, A.L., Ran, N.A., Menne, Z., Kauffman, R.C., Affer, M., Llovet, A., Norwood, C., Scanlan, A., Mantus, G., et al. (2019). Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. Cell Rep. *28*, 909– 922.e6.

Cho, M.J., Lo, A.S.Y., Mao, X., Nagler, A.R., Ellebrecht, C.T., Mukherjee, E.M., Hammers, C.M., Choi, E.-J., Sharma, P.M., Uduman, M., et al. (2014). Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. Nat. Commun. *5*, 4167. Cho, M.J., Ellebrecht, C.T., Hammers, C.M., Mukherjee, E.M., Sapparapu, G., Boudreaux, C.E., McDonald, S.M., Crowe, J.E., and Payne, A.S. (2016). Determinants of VH1-46 Cross-Reactivity to Pemphigus Vulgaris Autoantigen Desmoglein 3 and Rotavirus Antigen VP6. J. Immunol. *197*, 1065–1073.

Choi, S., and Schwartz, R.H. (2007). Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. Semin. Immunol. *19*, 140–152.

Choi, J.-Y., Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S.T., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015a). Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *67*, 988–999.

Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). Bcl6 dependent T follicular helper cell differentiation diverges from effector cell differentiation during priming and depends on the gene Icos. Immunity *34*, 932–946.

Chowdhury, M.M., and Natarajan, S. (1998). Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. Br. J. Dermatol. *139*, 500–503.

Chrysomallis, F., Ioannides, D., Teknetzis, A., Panagiotidou, D., and Minas, A. (1994). Treatment of oral pemphigus vulgaris. Int. J. Dermatol. *33*, 803–807.

Cianchini, G., Corona, R., Frezzolini, A., Ruffelli, M., Didona, B., and Puddu, P. (2007). Treatment of Severe Pemphigus With Rituximab: Report of 12 Cases and a Review of the Literature. Arch. Dermatol. *143*, 1033–1038.

Cianchini, G., Lupi, F., Masini, C., Corona, R., Puddu, P., and Pità, O.D. (2012). Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: Results from a single-center observational study on 42 cases with long-term follow-up. J. Am. Acad. Dermatol. *67*, 617–622.

Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol. *30*, 30–41.

Cigni, A., Pileri, P.V., Faedda, R., Gallo, P., Sini, A., Satta, A.E., Marras, R., Carta, E., Argiolas, D., Rum, I., et al. (2014). Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 10, and Tumor Necrosis Factor α in Active and Quiescent Systemic Lupus Erythematosus. J. Investig. Med. *62*, 825–829.

Cipolla, G.A., Park, J.K., Lavker, R.M., and Petzl-Erler, M.L. (2017). Crosstalk between Signaling Pathways in Pemphigus: A Role for Endoplasmic Reticulum Stress in p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation? Front. Immunol. 8.

Cirillo, N. (2016). Desmosome assembly, homeostasis, and desmosomal disease.

Cirillo, N., Lanza, A., and Prime, S.S. (2010). Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. Exp. Cell Res. *316*, 580–592.

Cirillo, N., AlShwaimi, E., McCullough, M., and Prime, S.S. (2014). Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3. Autoimmunity 47, 134–140.

Claes, N., Fraussen, J., Vanheusden, M., Hellings, N., Stinissen, P., Wijmeersch, B.V., Hupperts, R., and Somers, V. (2016). Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. J. Immunol. *197*, 4576–4583.

Cohen, S.B., Emery, P., Greenwald, M.W., Dougados, M., Furie, R.A., Genovese, M.C., Keystone, E.C., Loveless, J.E., Burmester, G.-R., Cravets, M.W., et al. (2006). Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum. *54*, 2793–2806.

Colliou, N., Picard, D., Caillot, F., Calbo, S., Le Corre, S., Lim, A., Lemercier, B., Le Mauff, B., Maho-Vaillant, M., Jacquot, S., et al. (2013). Longterm remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci. Transl. Med. *5*, 175ra30.

Cooper, H.L., Healy, E., Theaker, J.M., and Friedmann, P.S. (2003). Treatment of resistant pemphigus vulgaris with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab). Clin. Exp. Dermatol. *28*, 366–368.

Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L., and Gray, D. (2006). Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 3498–3506.

Cui, D., Zhang, L., Chen, J., Zhu, M., Hou, L., Chen, B., and Shen, B. (2015). Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. Clin. Exp. Med. *15*, 285–292.

Culton, D.A., Nicholas, M.W., Bunch, D.O., Zhen, Q.L., Kepler, T.B., Dooley, M.A., Mohan, C., Nachman, P.H., and Clarke, S.H. (2007). Similar CD19 Dysregulation in Two Autoantibody-Associated Autoimmune Diseases Suggests a Shared Mechanism of B-Cell Tolerance Loss. J. Clin. Immunol. *27*, 53–68.

Culton, D.A., Qian, Y., Li, N., Rubenstein, D., Aoki, V., Filhio, G.H., Rivitti, E.A., and Diaz, L.A. (2008). Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. J. Autoimmun. *31*, 311–324.

Culton, D.A., McCray, S.K., Park, M., Roberts, J.C., Li, N., Zedek, D.C., Anhalt, G.J., Cowley, D.O., Liu, Z., and Diaz, L.A. (2015). Mucosal pemphigus vulgaris anti-Dsg3 IgG is pathogenic to the oral mucosa of humanized Dsg3 mice. J. Invest. Dermatol. *135*, 1590–1597.

D

Daien, C.I., Gailhac, S., Mura, T., Audo, R., Combe, B., Hahne, M., and Morel, J. (2014). Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *66*, 2037–2046.

Dalla-Costa, R., Pincerati, M.R., Beltrame, M.H., Malheiros, D., and Petzl-Erler, M.L. (2010). Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. Hum. Immunol. *71*, 809– 817.

Dar, S.A., Akhter, N., Haque, S., Singh, T., Mandal, R.K., Ramachandran, V.G., Bhattacharya, S.N., Banerjee, B.D., and Das, S. (2016). Tumor necrosis factor (TNF)- α -308G/A (rs1800629) polymorphism distribution in North India and its association with pemphigus: Case-control study and meta-analysis. Autoimmunity *49*, 179–187.

D'Auria, L., Bonifati, C., Mussi, A., D'Agosto, G., De Simone, C., Giacalone, B., Ferraro, C., and Ameglio, F. (1997). Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. Eur. Cytokine Netw. *8*, 383–387.

De, S., Zhang, B., Shih, T., Singh, S., Winkler, A., Donnelly, R., and Barnes, B.J. (2017). B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation. Front. Immunol. 8, 1938.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. Nat. Rev. Immunol. *15*, 137–148.

De Simone, C., Caldarola, G., D'agostino, M., Zampetti, A., Amerio, P., and Feliciani, C. (2008). Exacerbation of pemphigus after influenza vaccination. Clin. Exp. Dermatol. *33*, 718–720.

Debes, G.F., and McGettigan, S.E. (2019). Skin-Associated B Cells in Health and Inflammation. J. Immunol. *202*, 1659–1666.

Deenick, E.K., Chan, A., Ma, C.S., Gatto, D., Schwartzberg, P.L., Brink, R., and Tangye, S.G. (2010). Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. Immunity *33*, 241–253.

Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. J. Exp. Med. *175*, 671–682.

Delgado, J.C., Hameed, A., Yunis, J.J., Bhol, K., Rojas, A.I., Rehman, S.B., Khan, A.A., Ahmad, M., Alper, C.A., Ahmed, A.R., et al. (1997). Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. Hum. Immunol. *57*, 110–119.

Delva, E., Jennings, J.M., Calkins, C.C., Kottke, M.D., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2008). Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynaminindependent mechanism. J. Biol. Chem. *283*, 18303–18313.

Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The Desmosome. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*.

Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. Nature *311*, 752–755.

Dhandha, M.M., Seiffert-Sinha, K., and Sinha, A.A. (2012). Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. Autoimmunity *45*, 516–526.

Di Zenzo, G., Zambruno, G., and Borradori, L. (2012). Endemic pemphigus foliaceus: towards understanding autoimmune mechanisms of disease development. J. Invest. Dermatol. 132, 2499-2502.

Didona, D., and Di Zenzo, G. (2018). Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. Front. Immunol. *9*.

Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood *117*, 3720–3732.

Duddy, M.E., Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? J. Immunol. *172*, 3422–3427.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences. In Advances in Immunology, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 43–112.

Duvert-Lehembre, S., and Joly, P. (2014). [Autoimmune blistering diseases]. Rev. Med. Interne *35*, 166–173.

Ε

Eames, H.L., Corbin, A.L., and Udalova, I.A. (2016). Interferon regulatory factor 5 in human autoimmunity and murine models of autoimmune disease. Transl. Res. J. Lab. Clin. Med. *167*, 167–182.

Eaton, D.P., Diaz, L.A., Hans-Filho, G., Santos, V.D., Aoki, V., Friedman, H., Rivitti, E.A., Sampaio, S.A.P., Gottlieb, M.S., Giudice, G.J., et al. (1998). Comparison of Black Fly Species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian Reservation with a High Prevalence of Fogo Selvagem to Neighboring Disease-Free Sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. J. Med. Entomol. *35*, 120–131.

Eberhard, Y., Burgos, E., Gagliardi, J., Vullo, C.M., Borosky, A., Pesoa, S., and Serra, H.M. (2005). Cytokine polymorphisms in patients with pemphigus. Arch. Dermatol. Res. *296*, 309–313.

Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1833*, 3471–3480.

Edwards, J.C., and Cambridge, G. (2001). Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. Rheumatol. Oxf. Engl. *40*, 205–211.

Elenkov, I.J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1024*, 138–146.

Ellebrecht, C.T., and Payne, A.S. (2017). Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. JCI Insight *2*, e92021.

Ellebrecht, C.T., Choi, E.J., Allman, D.M., Tsai, D.E., Wegener, W.A., Goldenberg, D.M., and Payne, A.S. (2014). Subcutaneous veltuzumab, a humanized anti-CD20 antibody, in the treatment of refractory pemphigus vulgaris. JAMA Dermatol. *150*, 1331–1335.

Ellebrecht, C.T., Bhoj, V.G., Nace, A., Choi, E.J., Mao, X., Cho, M.J., Di Zenzo, G., Lanzavecchia, A., Seykora, J.T., Cotsarelis, G., et al. (2016). Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. Science *353*, 179–184.

Ellebrecht, C.T., Mukherjee, E.M., Zheng, Q., Choi, E.J., Reddy, S.G., Mao, X., and Payne, A.S. (2018). Autoreactive IgG and IgA B Cells Evolve through Distinct Subclass Switch Pathways in the Autoimmune Disease Pemphigus Vulgaris. Cell Rep. *24*, 2370–2380.

Eming, R., Nagel, A., Wolff-Franke, S., Podstawa, E., Debus, D., and Hertl, M. (2008). Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. *128*, 2850–2858.

Eming, R., Hennerici, T., Bäcklund, J., Feliciani, C., Visconti, K.C., Willenborg, S., Wohde, J., Holmdahl, R., Sønderstrup, G., and Hertl, M. (2014). Pathogenic IgG Antibodies against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRB1*04:02–Restricted T Cells. J. Immunol. *193*, 4391–4399.

Enk, A.H., Hadaschik, E.N., Eming, R., Fierlbeck, G., French, L.E., Girolomoni, G., Hertl, M., Jolles, S., Karpati, S., Steinbrink, K., et al. (2016). European Guidelines (S1) on the use of high-dose intravenous immunoglobulin in dermatology. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *30*, 1657–1669.

España, A., Diaz, L.A., Mascaró, J.M., Giudice, G.J., Fairley, J.A., Till, G.O., and Liu, Z. (1997). Mechanisms of Acantholysis in Pemphigus Foliaceus. Clin. Immunol. Immunopathol. *85*, 83– 89.

Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. PloS One *6*, e17739.

Ettinger, R., Sims, G.P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R.T., Grammer, A.C., Kuchen, S., and Lipsky, P.E. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *178*, 2872–2882.

Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., and Biedermann, T. (2018). Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. Trends Immunol. *39*, 315–327.

F

Fecteau, J.F., Côté, G., and Néron, S. (2006). A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 3728–3736.

Feldman, R.J., Christen, W.G., and Ahmed, A.R. (2012). Comparison of immunological parameters in patients with pemphigus vulgaris following rituximab and IVIG therapy. Br. J. Dermatol. *166*, 511–517.

Feliciani, C., Toto, P., Pour, S.M., Coscione, G., Amerio, P., Amerio, P., Shivji, G., Wang, B., and Sauder, D.N. (2000). In Vitro and In Vivo Expression of Interleukin-1 α and Tumor Necrosis Factor- α mRNA in Pemphigus Vulgaris: Interleukin-1 α and Tumor Necrosis Factor- α are Involved in Acantholysis. J. Invest. Dermatol. 114, 71–77.

Figgett, W.A., Fairfax, K., Vincent, F.B., Le Page, M.A., Katik, I., Deliyanti, D., Quah, P.S., Verma, P., Grumont, R., Gerondakis, S., et al. (2013). The TACI receptor regulates T-cell-independent marginal zone B cell responses through innate activation-induced cell death. Immunity *39*, 573– 583.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat. Immunol. *3*, 944–950.

Firooz, A., Mazhar, A., and Ahmed, A.R. (1994). Prevalence of autoimmune diseases in the family members of patients with pemphigus vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. *31*, 434–437.

Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. Sci. Transl. Med. *5*, 173ra23-173ra23.

Franco, L.M., Gadkari, M., Howe, K.N., Sun, J., Kardava, L., Kumar, P., Kumari, S., Hu, Z., Fraser, I.D.C., Moir, S., et al. (2019). Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type– dependent transcriptional responses. J. Exp. Med. *216*, 384–406. Fuchs, E. (2016). Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address. Curr. Top. Dev. Biol. *116*, 357–374.

Funakoshi, T., Lunardon, L., Ellebrecht, C.T., Nagler, A.R., O'Leary, C.E., and Payne, A.S. (2012). Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. Br. J. Dermatol. *167*, 1245–1253.

Futei, Y., Amagai, M., Ishii, K., Kuroda-Kinoshita, K., Ohya, K., and Nishikawa, T. (2001). Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. J. Dermatol. Sci. *26*, 55–61.

G

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. Immunity *39*, 1003–1018.

Garrod, D.R., Berika, M.Y., Bardsley, W.F., Holmes, D., and Tabernero, L. (2005). Hyperadhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. J. Cell Sci. *118*, 5743–5754.

Gascan, H., Gauchat, J.F., Roncarolo, M.G., Yssel, H., Spits, H., and Vries, J.E. de (1991). Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J. Exp. Med. *173*, 747–750.

Gazit, E., Slomov, Y., Goldberg, I., Brenner, S., and Loewenthal, R. (2004). HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. Hum. Immunol. *65*, 39–46.

Gebhard, K.L., Veldman, C.M., Wassmuth, R., Schultz, E., Schuler, G., and Hertl, M. (2005). Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive Thelper (Th) 1 and Th2 cells in patients with pemphigus foliaceus and healthy individuals. Exp. Dermatol. *14*, 586–592.

Getsios, S., Huen, A.C., and Green, K.J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 271–281.

Giles, F.J., Vose, J.M., Do, K.-A., Johnson, M.M., Manshouri, T., Bociek, G., Bierman, P.J., O'Brien, S.M., Keating, M.J., Kantarjian, H.M., et al. (2003). Circulating CD20 and CD52 in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's disease. Br. J. Haematol. *123*, 850–857.

Giordani, L., Sanchez, M., Libri, I., Quaranta, M.G., Mattioli, B., and Viora, M. (2009). IFN- α amplifies human naïve B cell TLR-9-mediated activation and Ig production. J. Leukoc. Biol. *86*, 261–271.

Giordano, C.N., and Sinha, A.A. (2012). Cytokine networks in Pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint. Autoimmunity *45*, 427– 439.

Giurdanella, F., Fania, L., Gnarra, M., Toto, P., Di Rollo, D., Sauder, D.N., and Feliciani, C. (2013). A Possible Role for CD8+ T Lymphocytes in the Cell-Mediated Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. Mediators Inflamm. *2013*.

Golay, J., Zaffaroni, L., Vaccari, T., Lazzari, M., Borleri, G.-M., Bernasconi, S., Tedesco, F., Rambaldi, A., and Introna, M. (2000). Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. Blood *95*, 3900–3908.

Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W.P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W.Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., et al. (2005). Importance of Cellular Microenvironment and Circulatory Dynamics in B Cell Immunotherapy. J. Immunol. *174*, 817–826.

González-Escribano, M.F., Jiménez, G., Walter, K., Montes, M., Perez-Bernal, A.M., Rodríguez, M.R., Conejo-Mir, J.S., and Núñez-Roldán, A. (1998). Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens *52*, 275–278.

Goodnow, C.C. (1996). Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 2264– 2271.

Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature *435*, 590–597.

Goto, S., Goto, H., Tanoshima, R., Kato, H., Takahashi, H., Sekiguchi, O., and Kai, S. (2009). Serum sickness with an elevated level of human anti-chimeric antibody following treatment with rituximab in a child with chronic immune thrombocytopenic purpura. Int. J. Hematol. *89*, 305–309.

Grando, S.A. (2006). Cholinergic control of epidermal cohesion. Exp. Dermatol. *15*, 265–282.

Grando, S.A. (2011). Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. Autoimmunity *45*, 7–35.

Grando, S.A., Zelickson, B.D., Kist, D.A., Weinshenker, D., Bigliardi, P.L., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W.R., and Dahl, M.V. (1995). Keratinocyte Muscarinic Acetylcholine Receptors: Immunolocalization and Partial Characterization. J. Invest. Dermatol. *104*, 95– 100. Grando, S.A., Bystryn, J.-C., Chernyavsky, A.I., Frušić-Zlotkin, M., Gniadecki, R., Lotti, R., Milner, Y., Pittelkow, M.R., and Pincelli, C. (2009). Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. Exp. Dermatol. *18*, 764–770.

Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: New Perspectives on a Classic. J. Invest. Dermatol. *127*, 2499–2515.

Groom, J., Kalled, S.L., Cutler, A.H., Olson, C., Woodcock, S.A., Schneider, P., Tschopp, J., Cachero, T.G., Batten, M., Wheway, J., et al. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. *109*, 59–68.

Gürcan, H.M., Keskin, D.B., Stern, J.N.H., Nitzberg, M.A., Shekhani, H., and Ahmed, A.R. (2009). A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. Int. Immunopharmacol. *9*, 10–25.

Η

Haberman, A.M., Gonzalez, D.G., Wong, P., Zhang, T., and Kerfoot, S.M. (2019). Germinal center B cell initiation, GC maturation, and the coevolution of its stromal cell niches. Immunol. Rev. *288*, 10–27.

Haddy, N., Sass, C., Maumus, S., Marie, B., Droesch, S., Siest, G., Lambert, D., and Visvikis, S. (2005). Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF- α and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. Eur. J. Hum. Genet. *13*, 109–117.

Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H.R., and Tschopp, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. Eur. J. Immunol. *26*, 721– 724.

Hamaguchi, Y., Uchida, J., Cain, D.W., Venturi, G.M., Poe, J.C., Haas, K.M., and Tedder, T.F. (2005). The Peritoneal Cavity Provides a Protective Niche for B1 and Conventional B Lymphocytes during Anti-CD20 Immunotherapy in Mice. J. Immunol. *174*, 4389–4399.

Hammers, C.M., Chen, J., Lin, C., Kacir, S., Siegel, D.L., Payne, A.S., and Stanley, J.R. (2015). Persistence of Anti-Desmoglein 3 IgG+ B-Cell Clones in Pemphigus Patients Over Years. J. Invest. Dermatol. *135*, 742–749.

Hammers, C.M., Tang, H.-Y., Chen, J., Emtenani, S., Zheng, Q., and Stanley, J.R. (2018). Research Techniques Made Simple: Mass Spectrometry for Analysis of Proteins in Dermatological Research. J. Invest. Dermatol. *138*, 1236–1242.
Haniffa, M., Gunawan, M., and Jardine, L. (2015). Human skin dendritic cells in health and disease. J. Dermatol. Sci. *77*, 85–92.

Hans-Filho, G., Aoki, V., Rivitti, E., Eaton, D.P., Lin, M.S., and Diaz, L.A. (1999). Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)--1998. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Clin. Dermatol. *17*, 225-235; discussion 105-106.

Harman, K.E., Seed, P.T., Gratian, M.J., Bhogal, B.S., Challacombe, S.J., and Black, M.M. (2001). The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br. J. Dermatol. *144*, 775–780.

Harman, K.E., Gratian, M.J., Shirlaw, P.J., Bhogal, B.S., Challacombe, S.J., and Black, M.M. (2002). The transition of pemphigus vulgaris into pemphigus foliaceus: a reflection of changing desmoglein 1 and 3 autoantibody levels in pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. *146*, 684– 687.

Harman, K.E., Brown, D., Exton, L.S., Groves, R.W., Hampton, P.J., Mustapa, M.F.M., Setterfield, J.F., and Yesudian, P.D. (2017). British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris 2017.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat. Immunol. *6*, 1123–1132.

Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat. Immunol. *1*, 475–482.

Hashimoto, T. (2001). Immunopathology of IgA pemphigus. Clin. Dermatol. *19*, 683–689.

Hashimoto, K., Miki, Y., Nakata, S., and Matsuyama, M. (1977). HLA-A10 in Pemphigus Among Japanese. Arch. Dermatol. *113*, 1518– 1519.

Hashimoto, T., Kiyokawa, C., Mori, O., Miyasato, M., Chidgey, M.A., Garrod, D.R., Kobayashi, Y., Komori, K., Ishii, K., Amagai, M., et al. (1997). Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. J. Invest. Dermatol. *109*, 127–131.

Hatzfeld, M., Wolf, A., and Keil, R. (2014). Plakophilins in Desmosomal Adhesion and Signaling. Cell Commun. Adhes. *21*, 25–42.

Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara,

M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. N. Engl. J. Med. *358*, 676–688.

Hayashi, M., Yanaba, K., Umezawa, Y., Yoshihara, Y., Kikuchi, S., Ishiuji, Y., Saeki, H., and Nakagawa, H. (2016). IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with psoriasis. J. Dermatol. Sci. *81*, 93–100.

Hayashi, R., Wada, H., Ito, K., and Adcock, I.M. (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. Eur. J. Pharmacol. *500*, 51–62.

Hebert, V., and Joly, P. (2017). Rituximab in pemphigus. Immunotherapy *10*, 27–37.

Hébert, V., Boulard, C., Houivet, E., Duvert Lehembre, S., Borradori, L., Della Torre, R., Feliciani, C., Fania, L., Zambruno, G., Camaioni, D.B., et al. (2019a). Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. J. Invest. Dermatol. *139*, 31–37.

Hébert, V., Petit, M., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Riou, G., Derambure, C., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. (2019b). Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen. Front. Immunol. *10*, 1794.

Hennerici, T., Pollmann, R., Schmidt, T., Seipelt, M., Tackenberg, B., Möbs, C., Ghoreschi, K., Hertl, M., and Eming, R. (2016). Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. PLoS ONE *11*.

Hertl, M., Amagai, M., Sundaram, H., Stanley, J., Ishii, K., and Katz, S.I. (1998a). Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. J. Invest. Dermatol. *110*, 62–66.

Hertl, M., Karr, R.W., Amagai, M., and Katz, S.I. (1998b). Heterogeneous MHC II Restriction Pattern of Autoreactive Desmoglein 3 Specific T Cell Responses in Pemphigus Vulgaris Patients and Normals. J. Invest. Dermatol. *110*, 388–392.

Hertl, M., Eming, R., and Veldman, C. (2006). T cell control in autoimmune bullous skin disorders. J. Clin. Invest. *116*, 1159–1166.

Hertl, M., Jedlickova, H., Karpati, S., Marinovic, B., Uzun, S., Yayli, S., Mimouni, D., Borradori, L., Feliciani, C., Ioannides, D., et al. (2015). Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment – guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. *29*, 405– 414. Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. *9*, 195–205.

Hiepe, F., Dörner, T., Hauser, A.E., Hoyer, B.F., Mei, H., and Radbruch, A. (2011). Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. Nat. Rev. Rheumatol. *7*, 170–178.

Horn, T.D., and Anhalt, G.J. (1992). Histologic features of paraneoplastic pemphigus. Arch. Dermatol. *128*, 1091–1095.

Hu, C.H., Michel, B., and Schiltz, J.R. (1978). Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. Am. J. Pathol. *90*, 345–361.

Hu, P., Zhang, W., Xin, H., and Deng, G. (2016). Single Cell Isolation and Analysis. Front. Cell Dev. Biol. *4*.

Hu, Y., Converse, C., Lyons, M.C., and Hsu, W.H. (2017). Neural control of sweat secretion: a review. Br. J. Dermatol.

Huang, A., Cheng, L., He, M., Nie, J., Wang, J., and Jiang, K. (2017). Interleukin-35 on B cell and T cell induction and regulation. J. Inflamm. Lond. Engl. *14*.

Hunger, R.E., Sieling, P.A., Ochoa, M.T., Sugaya, M., Burdick, A.E., Rea, T.H., Brennan, P.J., Belisle, J.T., Blauvelt, A., Porcelli, S.A., et al. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. J. Clin. Invest. *113*, 701–708.

Hwang, j.k., alt, f.w., and yeap, l.-s. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. Microbiol. Spectr. *3*.

Ι

Ioannides, D., Chrysomallis, F., and Bystryn, J.-C. (2000). Ineffectiveness of Cyclosporine as an Adjuvant to Corticosteroids in the Treatment of Pemphigus. Arch. Dermatol. *136*, 868–872.

Ise, W., and Kurosaki, T. (2019). Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. Immunol. Rev. *288*, 64–74.

Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J.B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T., and Kurosaki, T. (2014). Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 11792–11797.

Ishii, K., Amagai, M., Hall, R.P., Hashimoto, T., Takayanagi, A., Gamou, S., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigenspecific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *159*, 2010–2017.

Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Amagai, M. (2005). In Vitro Keratinocyte Dissociation Assay for Evaluation of the Pathogenicity of Anti-Desmoglein 3 IgG Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. *124*, 939–946.

Ishii, K., Lin, C., Siegel, D.L., and Stanley, J.R. (2008). Isolation of pathogenic monoclonal antidesmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies. J. Invest. Dermatol. *128*, 939–948.

Ishii, N., Teye, K., Fukuda, S., Uehara, R., Hachiya, T., Koga, H., Tsuchisaka, A., Numata, S., Ohyama, B., Tateishi, C., et al. (2015). Antidesmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. Br. J. Dermatol. *173*, 59–68.

Ishikawa, H., Li, K., Tamai, K., Sawamura, D., and Uitto, J. (2000). Cloning of the mouse desmoglein 3 gene (Dsg3): interspecies conservation within the cadherin superfamily. Exp. Dermatol. 9, 229–239.

Iwata, Y., Yoshizaki, A., Komura, K., Shimizu, K., Ogawa, F., Hara, T., Muroi, E., Bae, S., Takenaka, M., Yukami, T., et al. (2009). CD19, a Response Regulator of B Lymphocytes, Regulates Wound Healing through Hyaluronan-Induced TLR4 Signaling. Am. J. Pathol. *175*, 649–660.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10– competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood *117*, 530–541.

Izumi, K., Bieber, K., and Ludwig, R.J. (2019). Current Clinical Trials in Pemphigus and Pemphigoid. Front. Immunol. *10*.

I

Jablonska, S., Chorzelski, T.P., Beutner, E.H., and Chorzelska, J. (1975). Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. Int. J. Dermatol. *14*, 353–359.

Jacobi, A., Schuler, G., and Hertl, M. (2005). Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor- α inhibitor infliximab. Br. J. Dermatol. *153*, 448–449.

Jacquot, S., Kobata, T., Iwata, S., Morimoto, C., and Schlossman, S.F. (1997). CD154/CD40 and

CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. J. Immunol. *159*, 2652–2657.

Jahnmatz, M., Kesa, G., Netterlid, E., Buisman, A.-M., Thorstensson, R., and Ahlborg, N. (2013). Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. J. Immunol. Methods *391*, 50–59.

Jamin, C., Achour, A., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2014). Les lymphocytes régulateurs : une nouvelle coopération entre cellules T et B pour un contrôle plus efficace de la réponse immunitaire. /data/revues/07554982/v43i1/S07554982130 06519/.

Janeway, C.A., Ron, J., and Katz, M.E. (1987). The B cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *138*, 1051–1055.

Javor, J., Chmurova, N., Parnicka, Z., Ferencik, S., Grosse-Wilde, H., Buc, M., and Svecova, D. (2010). TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms show a weak association with pemphigus vulgaris in the Slovak population. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *24*, 65–68.

Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J.F., and Bonnefoy, J.Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *160*, 3555–3561.

Jilani, I., O'Brien, S., Manshuri, T., Thomas, D.A., Thomazy, V.A., Imam, M., Naeem, S., Verstovsek, S., Kantarjian, H., Giles, F., et al. (2003). Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood *102*, 3514–3520.

Johnson, J.L., Najor, N.A., and Green, K.J. (2014). Desmosomes: Regulators of Cellular Signaling and Adhesion in Epidermal Health and Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *4*.

Joly, P. (1997). Pemphigus parananeoplasique. Medecine Therapeutique *3*, 705–708.

Joly, P., and Litrowski, N. (2011). Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). Clin. Dermatol. *29*, 432–436.

Joly, P., Thomine, E., Gilbert, D., Verdier, S., Delpech, A., Prost, C., Lebbe, C., Lauret, P., and Tron, F. (1994). Overlapping Distribution of Autoantibody Specificities in Paraneoplastic Pemphigus and Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. *103*, 65–72. Joly, P., Mouquet, H., Roujeau, J.-C., D'Incan, M., Gilbert, D., Jacquot, S., Gougeon, M.-L., Bedane, C., Muller, R., Dreno, B., et al. (2007). A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. N. Engl. J. Med. *357*, 545–552.

Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M.L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., et al. (2017). First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, openlabel randomised trial. Lancet Lond. Engl.

Jonca, N., Guerrin, M., Hadjiolova, K., Caubet, C., Gallinaro, H., Simon, M., and Serre, G. (2002). Corneodesmosin, a Component of Epidermal Corneocyte Desmosomes, Displays Homophilic Adhesive Properties. J. Biol. Chem. *277*, 5024– 5029.

Jones, C.C., Hamilton, R.G., and Jordon, R.E. (1988). Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. J. Clin. Immunol. *8*, 43–49.

Jones, G.W., Hill, D.G., and Jones, S.A. (2016). Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together. Front. Immunol. *7*.

Jones, S.A., Perera, D.N., Fan, H., Russ, B.E., Harris, J., and Morand, E.F. (2015). GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation. J. Autoimmun. *61*, 73–80.

de Jongh, G.J., Zeeuwen, P.L.J.M., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P.G., Blokx, W., Dogan, A., Hiemstra, P.S., van de Kerkhof, P.C., and Schalkwijk, J. (2005). High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. *125*, 1163–1173.

Jordon, R.E., Beutner, E.H., Witebsky, E., Blumental, G., Hale, W.L., and Lever, W.F. (1967). Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA *200*, 751–756.

Jung, S. (2004). Good, bad and beautiful—the role of dendritic cells in autoimmunity. Autoimmun. Rev. *3*, 54–60.

Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. Cell *116*, 299–311.

K

Kabuto, M., Fujimoto, N., and Tanaka, T. (2016). Increase of interleukin-10-producing B cells associated with long-term remission after

i.v. immunoglobulin treatment for pemphigus. J. Dermatol. *43*, 815–818.

Kabuto, M., Fujimoto, N., Takahashi, T., and Tanaka, T. (2017). Decreased level of interleukin-10-producing B cells in patients with pemphigus but not in patients with pemphigoid. Br. J. Dermatol. *176*, 1204–1212.

Kalantari-Dehaghi, M., Molina, D.M., Farhadieh, M., Morrow, W.J., Liang, X., Felgner, P.L., and Grando, S.A. (2011). New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. Exp. Dermatol. *20*, 154– 156.

Kalantari-Dehaghi, M., Anhalt, G.J., Camilleri, M.J., Chernyavsky, A.I., Chun, S., Felgner, P.L., Jasinskas, A., Leiferman, K.M., Liang, L., Marchenko, S., et al. (2013a). Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. PLoS ONE *8*.

Kalantari-Dehaghi, M., Chen, Y., Deng, W., Chernyavsky, A., Marchenko, S., Wang, P.H., and Grando, S.A. (2013b). Mechanisms of Mitochondrial Damage in Keratinocytes by Pemphigus Vulgaris Antibodies. J. Biol. Chem. *288*, 16916–16925.

Kamburova, E.G., Koenen, H.J.P.M., Borgman, K.J.E., ten Berge, I.J., Joosten, I., and Hilbrands, L.B. (2013). A single dose of rituximab does not deplete B cells in secondary lymphoid organs but alters phenotype and function. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *13*, 1503–1511.

Kamhieh-Milz, J., Ghosoun, N., Sterzer, V., and Salama, A. (2018). Effect of glucocorticoid treatment on BAFF and APRIL expression in patients with immune thrombocytopenia (ITP). Clin. Immunol. Orlando Fla *188*, 74–80.

Kanwar, A.J., Tsuruta, D., Vinay, K., Koga, H., Ishii, N., Dainichi, T., and Hashimoto, T. (2013). Efficacy and safety of rituximab treatment in Indian pemphigus patients. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. *27*, e17–e23.

Karahan, G.E., de Vaal, Y.J.H., Roelen, D.L., Buchli, R., Claas, F.H.J., and Heidt, S. (2015). Quantification of HLA class II-specific memory B cells in HLA-sensitized individuals. Hum. Immunol. *76*, 129–136.

Karahan, G.E., Vaal, Y.J.H. de, Krop, J., Wehmeier, C., Roelen, D.L., Claas, F.H.J., and Heidt, S. (2017). A Memory B Cell Crossmatch Assay for Quantification of Donor-Specific Memory B Cells in the Peripheral Blood of HLA-Immunized Individuals. Am. J. Transplant. *17*, 2617–2626. Karnell, J.L., Kumar, V., Wang, J., Wang, S., Voynova, E., and Ettinger, R. (2017). Role of CD11c+ T-bet+ B cells in human health and disease. Cell. Immunol. *321*, 40–45.

Kárpáti, S., Amagai, M., Liu, W.L., Dmochowski, M., Hashimoto, T., and Horváth, A. (2000). Identification of desmoglein 1 as autoantigen in a patient with intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis type of IgA pemphigus. Exp. Dermatol. 9, 224–228.

Karray, M., and Badri, T. (2018). Pemphigus, Herpetiformis. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Kasperkiewicz, M., Shimanovich, I., Ludwig, R.J., Rose, C., Zillikens, D., and Schmidt, E. (2011). Rituximab for treatment-refractory pemphigus and pemphigoid: A case series of 17 patients. J. Am. Acad. Dermatol. *65*, 552–558.

Kasperkiewicz, M., Eming, R., Behzad, M., Hunzelmann, N., Meurer, M., Schulze-Koops, H., von Wussow, P., Hertl, M., Zillikens, D., Freivogel, K., et al. (2012). Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: experience of the German Registry of Autoimmune Diseases. JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges. *10*, 727–731.

Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C.T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A.S., and Amagai, M. (2017). Pemphigus. Nat. Rev. Dis. Primer *3*, 17026.

Katsamba, P., Carroll, K., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Posy, S., Rajebhosale, M., Price, S., Jessell, T.M., Ben-Shaul, A., et al. (2009). Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 11594–11599.

Kawasaki, H., Tsunoda, K., Hata, T., Ishii, K., Yamada, T., and Amagai, M. (2006). Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. J. Invest. Dermatol. *126*, 2621–2630.

Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the inter-follicular zone. Immunity *34*, 947–960.

Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., and Toubi, E. (2012). Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. Autoimmun. Rev. *11*, 670–677.

Keymeulen, A.V., Mascre, G., Youseff, K.K., Harel, I., Michaux, C., Geest, N.D., Szpalski, C., Achouri, Y., Bloch, W., Hassan, B.A., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. J. Cell Biol. *187*, 91–100.

Khan, U., and Ghazanfar, H. (2018). Chapter Three - T Lymphocytes and Autoimmunity. In International Review of Cell and Molecular Biology, L. Galluzzi, and N.-P. Rudqvist, eds. (Academic Press), pp. 125–168.

Khan, A.R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C.T., and Fallon, P.G. (2015). PD-L1^{hi} B cells are critical regulators of humoral immunity. Nat. Commun. 6, 5997.

Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., and Hiepe, F. (2019). The Maintenance of Memory Plasma Cells. Front. Immunol. *10*.

Kim, J.H., Kim, Y.H., Kim, M.R., and Kim, S.-C. (2011). Clinical efficacy of different doses of rituximab in the treatment of pemphigus: a retrospective study of 27 patients. Br. J. Dermatol. *165*, 646–651.

Kim, S.-C., Chung, Y.L., Kim, J., Cho, N.J., and Amagai, M. (2001). Pemphigus vulgaris with autoantibodies to desmoplakin. Br. J. Dermatol. *145*, 838–840.

Kim, S.J., Lee, K., and Diamond, B. (2018). Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. Front. Immunol. *9*.

Kim, T.-G., Kim, S.H., and Lee, M.-G. (2017a). The Origin of Skin Dendritic Cell Network and Its Role in Psoriasis. Int. J. Mol. Sci. *19*.

Kim, T.H., Choi, Y., Lee, S.E., Lim, J.M., and Kim, S.-C. (2017b). Adjuvant rituximab treatment for pemphigus: A retrospective study of 45 patients at a single center with long-term follow up. J. Dermatol. *44*, 615–620.

Kimby, E. (2005). Tolerability and safety of rituximab (MabThera®). Cancer Treat. Rev. *31*, 456–473.

Kitajima, Y. (2013). New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. Kaohsiung J. Med. Sci. *29*, 1–13.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. Nat. Rev. Immunol. *9*, 833– 844.

Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J.P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M.G., Levy, M., Montagutelli, X., Ahmad, W., Aita, V.M., et al. (2003). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. Cell *113*, 249–260.

Kneisel Andrea, and Hertl Michael (2011). Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges. 9, 927–947.

Koch, A.W., Pokutta, S., Lustig, A., and Engel, J. (1997a). Calcium Binding and Homoassociation of E-cadherin Domains. Biochemistry (Mosc.) *36*, 7697–7705.

Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. Eur. J. Cell Biol. *53*, 1–12.

Koch, P.J., Mahoney, M.G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G.F., Whitaker-Menezes, D., and Stanley, J.R. (1997b). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. J. Cell Biol. *137*, 1091–1102.

Kogame, T., Yamashita, R., Hirata, M., Kataoka, T.R., Kamido, H., Ueshima, C., Matsui, M., Nomura, T., and Kabashima, K. (2018). Analysis of possible structures of inducible skin-associated lymphoid tissue in lupus erythematosus profundus. J. Dermatol. *45*, 1117–1121.

Köhler, K.F., and Petzl-Erler, M.L. (2006). No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Int. J. Immunogenet. *33*, 141–144.

Komai, A., Amagai, M., Ishii, K., Nishikawa, T., Chorzelski, T., Matsuo, I., and Hashimoto, T. (2001). The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well with the changes in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. Br. J. Dermatol. *144*, 1177–1182.

Koneczny, I. (2018). A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. Front. Immunol. 9.

Korang, K., Ghohestani, R., Krieg, T., Uitto, J., and Hunzelmann, N. (2002). Exacerbation of pemphigus foliaceus after tetanus vaccination accompanied by synthesis of auto-antibodies against paraneoplastic pemphigus antigens. Acta Derm. Venereol. *82*, 482–483.

Korman, N.J., Eyre, R.W., Zone, J., and Stanley, J.R. (1991). Drug-induced pemphigus:

autoantibodies directed against the pemphigus antigen complexes are present in penicillamine and captopril-induced pemphigus. J. Invest. Dermatol. *96*, 273–276.

Koulu, L., Kusumi, A., Steinberg, M.S., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R. (1984). Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. J. Exp. Med. *160*, 1509–1518.

Koutsakos, M., Wheatley, A.K., Loh, L., Clemens, E.B., Sant, S., Nüssing, S., Fox, A., Chung, A.W., Laurie, K.L., Hurt, A.C., et al. (2018). Circulating TFH cells, serological memory, and tissue compartmentalization shape human influenza-specific B cell immunity. Sci. Transl. Med. *10*, eaan8405.

Krain, L.S., Terasaki, P.I., Newcomer, V.D., and Mickey, M.R. (1973). Increased Frequency of HL-A10 in Pemphigus Vulgaris. Arch. Dermatol. *108*, 803–805.

Kreuwel, H.T.C., and Sherman, L.A. (2001). The T-cell repertoire available for recognition of self-antigens. Curr. Opin. Immunol. *13*, 639–643.

Kricheli, D., David, M., Frusic-Zlotkin, M., Goldsmith, D., Rabinov, M., Sulkes, J., and Milner, Y. (2000). The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. Br. J. Dermatol. *143*, 337–342.

Kridin, K. (2018a). Subepidermal autoimmune bullous diseases: overview, epidemiology, and associations. Immunol. Res. *66*, 6–17.

Kridin, K. (2018b). Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris. Ther. Clin. Risk Manag. *14*, 757–778.

Kridin, K., Sagi, S.Z., and Bergman, R. (2017). Mortality and Cause of Death in Patients with Pemphigus. Acta Derm. Venereol. *97*, 607–611.

Kridin, K., Zelber-Sagi, S., Comaneshter, D., and Cohen, A.D. (2018a). Coexistent Solid Malignancies in Pemphigus: A Population-Based Study. JAMA Dermatol. *154*, 435–440.

Kridin, K., Zelber-Sagi, S., Comaneshter, D., Batat, E., and Cohen, A.D. (2018b). Pemphigus and hematologic malignancies: A population-based study of 11,859 patients. J. Am. Acad. Dermatol. *78*, 1084–1089.e1.

Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R.E., and Magin, T.M. (2013). Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α mediated desmoplakin phosphorylation. J. Cell Biol. *201*, 681–692. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., and Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. Front. Physiol. *9*.

Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 5886–5896.

Kumar, R., and Thompson, E.B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure:function relationship. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *94*, 383–394.

Kumar, D., Bansal, G., Narang, A., Basak, T., Abbas, T., and Dash, D. (2016). Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. Proteomics *16*, 2533–2544.

Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 149–159.

L

Lakshmi, M.J.D., Jaisankar, T.J., Rajappa, M., Thappa, D.M., Chandrashekar, L., Divyapriya, D., Munisamy, M., and Revathy, G. (2017). Correlation of antimuscarinic acetylcholine receptor antibody titers and antidesmoglein antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus. J. Am. Acad. Dermatol. *76*, 895–902.

Langenhan, J., Dworschak, J., Saschenbrecker, S., Komorowski, L., Schlumberger, W., Stöcker, W., Westermann, J., Recke, A., Zillikens, D., Schmidt, E., et al. (2014). Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins. Exp. Dermatol. *23*, 253–259.

Langerhans, P. (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med. *44*, 325–337.

Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. Nature *314*, 537–539.

Lasigliè, D., Traggiai, E., Federici, S., Alessio, M., Buoncompagni, A., Accogli, A., Chiesa, S., Penco, F., Martini, A., and Gattorno, M. (2011). Role of IL-1 Beta in the Development of Human TH17 Cells: Lesson from NLPR3 Mutated Patients. PLoS ONE 6.

Lazarus, M.N., Turner-Stokes, T., Chavele, K.-M., Isenberg, D.A., and Ehrenstein, M.R. (2012). Bcell numbers and phenotype at clinical relapse following rituximab therapy differ in SLE patients according to anti-dsDNA antibody levels. Rheumatology *51*, 1208–1215.

Lazzari, E., and Jefferies, C.A. (2014). IRF5mediated signaling and implications for SLE. Clin. Immunol. Orlando Fla *153*, 343–352.

Le Borgne, M., Dubois, B., and Kaiserlian, D. (2007). [Dendritic cells of mucosa and skin: "recruited for vaccination"]. Med. Sci. MS *23*, 819–825.

Leandro, M.J. (2013). B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. Arthritis Res. Ther. *15*, S3.

Leandro, M.J., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R., and Edwards, J.C.W. (2006). Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *54*, 613–620.

LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. Blood *112*, 1570–1580.

Lee, S.H., Hong, W.J., and Kim, S.-C. (2017). Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus. Ann. Dermatol. *29*, 438–445.

Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. J. Autoimmun. *36*, 228–238.

Leung, C.L., Green, K.J., and Liem, R.K.H. (2002). Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. Trends Cell Biol. *12*, 37–45.

Lever, W.F. (1951). Pemphigus: a histopathologic study. AMA Arch. Dermatol. Syphilol. *64*, 727–753.

Lever, W.F., and Schaumburg-Lever, G. (1984). Treatment of pemphigus vulgaris. Results obtained in 84 patients between 1961 and 1982. Arch. Dermatol. *120*, 44–47.

Lever, W.F., and Talbott, J.H. (1942). PEMPHIGUS: A HISTORICAL STUDY. Arch. Dermatol. Syphilol. *46*, 800–823.

Levine, T.D. (2005). Rituximab in the treatment of dermatomyositis: an open-label pilot study. Arthritis Rheum. *52*, 601–607.

Li, Y., Rauniyar, V.K., Yin, W.F., Hu, B., Ouyang, S., Xiao, B., and Yang, H. (2014). Serum IL-21 levels decrease with glucocorticoid treatment in myasthenia gravis. Neurol. Sci. *35*, 29–34.

Li, Y., Wei, C., Xu, H., Jia, J., Wei, Z., Guo, R., Jia, Y., Wu, Y., Li, Y., Qi, X., et al. (2018). The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. Mediators Inflamm. 2018.

Lieberman, J. (2003). The ABCs of granulemediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat. Rev. Immunol. *3*, 361–370.

Lighaam, L.C., and Rispens, T. (2016). The Immunobiology of Immunoglobulin G4. Semin. Liver Dis. *36*, 200–215.

Lim, H.W., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2004). Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. J. Clin. Invest. *114*, 1640–1649.

Lin, M.S., Fu, C.L., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E.A., Moraes, J.R., Moraes, M.E., Lazaro, A.M., Giudice, G.J., Stastny, P., et al. (2000). Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J. Clin. Invest. *105*, 207–213.

Lin, W., Cerny, D., Chua, E., Duan, K., Yi, J.T.J., Shadan, N.B., Lum, J., Maho-Vaillant, M., Zolezzi, F., Wong, S.C., et al. (2014). Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 2258–2266.

Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. Cancer Res. *73*, 2468–2479.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat. Med. *17*, 975–982.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. *3*, 822–829.

Liu, Q., Bu, D.-F., Li, D., and Zhu, X.-J. Genotyping of HLA-I and HLA-II alleles in Chinese patients with paraneoplastic pemphigus. Br. J. Dermatol. *158*, 587–591.

Liu, Z., Zeng, W., Huang, X., Wang, S., Zheng, J., Pan, M., and Wang, Y. (2017). Peripheral CD19hi B cells exhibit activated phenotype and functionality in promoting IgG and IgM production in human autoimmune diseases. Sci. Rep. 7.

Lo, A.S., Mao, X., Mukherjee, E.M., Ellebrecht, C.T., Yu, X., Posner, M.R., Payne, A.S., and Cavacini, L.A. (2016). Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. PLOS ONE *11*, e0156800.

Loiseau, P., Lecleach, L., Prost, C., Lepage, V., Busson, M., Bastuji-Garin, S., Roujeau, J.-C., and Charron, D. (2000). HLA Class II Polymorphism Contributes to Specify Desmoglein Derived Peptides in Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. J. Autoimmun. *15*, 67–73.

Lombardi, M.L., Mercuro, O., Tecame, G., Fusco, C., Ruocco, V., Salerno, A., Pirozzi, G., and Manzo, C. (1996). Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 47, 228– 230.

Looney, R.J., Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Arend, L.J., Sloand, J.A., Rosenblatt, J., and Sanz, I. (2004). B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: A phase I/II dose-escalation trial of rituximab. Arthritis Rheum. *50*, 2580–2589.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. Clin. Dev. Immunol. *2012*.

Ludwig, R.J., and Schmidt, E. (2009). Cytokines in autoimmune bullous skin diseases. Epiphenomena or contribution to pathogenesis? G. Ital. Dermatol. E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. E Sifilogr. *144*, 339–349.

Lunardon, L., and Payne, A.S. (2012). Inhibitory human anti-chimeric antibodies to rituximab in a pemphigus patient. J. Allergy Clin. Immunol. *130*, 800–803.

Lunardon, L., Tsai, K.J., Propert, K.J., Fett, N., Stanley, J.R., Werth, V.P., Tsai, D.E., and Payne, A.S. (2012). Adjuvant Rituximab Therapy of Pemphigus: A Single-Center Experience With 31 Patients. Arch. Dermatol. *148*, 1031–1036.

Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. Nat. Rev. Immunol. *10*, 236–247.

Lutz, M.B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. *23*, 445–449.

Luyet, C., Schulze, K., Sayar, B.S., Howald, D., Müller, E.J., and Galichet, A. (2015). Preclinical Studies Identify Non-Apoptotic Low-Level Caspase-3 as Therapeutic Target in Pemphigus Vulgaris. PLoS ONE *10*.

Lykhmus, O., Gergalova, G., Koval, L., Zhmak, M., Komisarenko, S., and Skok, M. (2014). Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathways of apoptosis induction. Int. J. Biochem. Cell Biol. *53*, 246–252.

Μ

Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. J. Exp. Med. *209*, 1241–1253.

Maceiras, A.R., Fonseca, V.R., Agua-Doce, A., and Graca, L. (2017). T follicular regulatory cells in mice and men. Immunology *152*, 25–35.

Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu. Rev. Immunol. *21*, 231– 264.

MacLeod, M.K.L., David, A., McKee, A.S., Crawford, F., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2011). Memory CD4 T cells provide accelerated help to B cell because they express CXCR5. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 2889–2896.

Maecker, H.T., McCoy, J.P., and Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat. Rev. Immunol. *12*, 191–200.

Mahoney, M.G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P.J., Amagai, M., and Stanley, J.R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J. Clin. Invest. *103*, 461–468.

Malheiros, D., and Petzl-Erler, M.L. (2009). Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. Genes Immun. *10*, 547–558.

Maloney, D.G. (2012). Anti-CD20 Antibody Therapy for B-Cell Lymphomas. N. Engl. J. Med. *366*, 2008–2016.

Maloney, D.G., Smith, B., and Rose, A. (2002). Rituximab: Mechanism of action and resistance. Semin. Oncol. *29*, 2–9.

Manni, M., Gupta, S., Ricker, E., Chinenov, Y., Park, S.H., Shi, M., Pannellini, T., Jessberger, R., Ivashkiv, L., and Pernis, A.B. (2018). Regulation of Age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity. Nat. Immunol. *19*, 407–419.

Manser, T. (2004). Textbook germinal centers? J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 3369–3375.

Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F., and Radbruch, A. (2004). Maintenance of serum antibody levels. Annu. Rev. Immunol. *23*, 367–386.

Mao, X., Nagler, A.R., Farber, S.A., Choi, E.J., Jackson, L.H., Leiferman, K.M., Ishii, N., Hashimoto, T., Amagai, M., Zone, J.J., et al. (2010). Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. Am. J. Pathol. *177*, 2724–2730.

Marchenko, S., Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Gindi, V., and Grando, S.A. (2010). Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. J. Biol. Chem. *285*, 3695–3704.

Martel, P., Gilbert, D., Drouot, L., Prost, C., Raux, G., Delaporte, E., Joly, P., and Tron, F. (2001). A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. Genes Immun. *2*, 41–43.

Martel, P., Gilbert, D., Busson, M., Loiseau, P., Lepage, V., Drouot, L., Delaporte, E., Prost, C., Joly, P., Charron, D., et al. (2002). Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. Genes Immun. *3*, 205–210.

Martel, P., Loiseau, P., Joly, P., Busson, M., Lepage, V., Mouquet, H., Courville, P., Flageul, B., Charron, D., Musette, P., et al. (2003). Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. J. Autoimmun. *20*, 91–95.

Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. J. Exp. Med. *183*, 971–977.

Masson, A. de, Bouaziz, J.-D., Buanec, H.L., Robin, M., O'Meara, A., Parquet, N., Rybojad, M., Hau, E., Monfort, J.-B., Branchtein, M., et al. (2015). CD24hiCD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versushost disease. Blood *125*, 1830–1839.

Matejuk, A. (2018). Skin Immunity. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *66*, 45–54.

Matsui, T., and Amagai, M. (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. Int. Immunol. *27*, 269–280.

Matsukura, S., Knowles, S.R., Walsh, S., and Shear, N.H. (2012). Effect of a Single-Cycle Alternative Dosing Regimen for Rituximab for Recalcitrant Pemphigus: A Case Series of 9 Patients. Arch. Dermatol. *148*, 734–739.

Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Immunity *41*, 1040–1051. Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. Annu. Rev. Immunol. *30*, 221–241.

Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). The "short" history of regulatory B cells. Trends Immunol. *29*, 34–40.

Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. J. Clin. Invest. *127*, 772–779.

Mauri, C., and Menon, M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. J. Clin. Invest. *127*, 772–779.

McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr. Biol. CB *16*, R551-560.

McCarron, M.J., Park, P.W., and Fooksman, D.R. (2017). CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. Blood *129*, 2749–2759.

McGrath, J.A. (2015). Recently Identified Forms of Epidermolysis Bullosa. Ann. Dermatol. *27*, 658–666.

Mee, J.B., Cork, M.J., di Giovine, F.S., Duff, G.W., and Groves, R.W. (2006). Interleukin-1: a key inflammatory mediator in psoriasis? Cytokine *33*, 72–78.

Mei, H.E., Yoshida, T., Sime, W., Hiepe, F., Thiele, K., Manz, R.A., Radbruch, A., and Dörner, T. (2009). Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. Blood *113*, 2461–2469.

Menon, M., Blair, P.A., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2016). A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. Immunity 44, 683–697.

Meşe, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap Junctions: Basic Structure and Function. J. Invest. Dermatol. *127*, 2516–2524.

Meyersburg, D., Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., and Zillikens, D. (2012). Immunoadsorption in Dermatology. Ther. Apher. Dial. *16*, 311–320.

Mihai, S., and Sitaru, C. (2007). Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. J. Cell. Mol. Med. *11*, 462–481.

Miller, J.F., and Heath, W.R. (1993). Selfignorance in the peripheral T-cell pool. Immunol. Rev. *133*, 131–150.

Mindorf, S., Dettmann, I.M., Krüger, S., Fuhrmann, T., Rentzsch, K., Karl, I., Probst, C., Komorowski, L., Fechner, K., van Beek, N., et al. (2017). Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. Exp. Dermatol. *26*, 1267–1270.

Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jäger, A., Kim, H.-J., Korn, T., Kolls, J.K., Cantor, H., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2010). Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 14292–14297.

Miyagaki, T., Fujimoto, M., and Sato, S. (2015). Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. Int. Immunol. *27*, 495–504.

Miyagawa, S., Higashimine, I., Iida, T., Yamashina, Y., Fukumoto, T., and Shirai, T. (1997). HLA-DRB1*04 and DRB1*14 Alleles Are Associated with Susceptibility to Pemphigus Among Japanese. J. Invest. Dermatol. *109*, 615– 618.

Moll, I., Roessler, M., Brandner, J.M., Eispert, A.-C., Houdek, P., and Moll, R. (2005). Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. Eur. J. Cell Biol. *84*, 259–271.

Morbach, H., Eichhorn, E.M., Liese, J.G., and Girschick, H.J. (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. Clin. Exp. Immunol. *162*, 271–279.

Morell-Dubois, S., Carpentier, O., Cottencin, O., Queyrel, V., Hachulla, E., Hatron, P.-Y., and Delaporte, E. (2008). Stressful life events and pemphigus. Dermatol. Basel Switz. *216*, 104–108.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. Immunity *34*, 108–121.

Morrison, S.F. (2016). Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. Auton. Neurosci. Basic Clin. *196*, 14–24.

Morva, A., Lemoine, S., Achour, A., Pers, J.-O., Youinou, P., and Jamin, C. (2012). Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. Blood *119*, 106–114.

Mosaad, Y.M., Fathy, H., Fawzy, Z., and El-Saied, M.A. (2012). Tumor necrosis factor- α -308 G>A and interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphisms and pemphigus. Hum. Immunol. *73*, 560–565.

Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Rajewsky, K. (2004). The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion Mechanism. Cell *118*, 539–544.

Mouquet, H., Berrih-Aknin, S., Bismuth, J., Joly, P., Gilbert, D., and Tron, F. (2008a). Expression of pemphigus-autoantigen desmoglein 1 in human thymus. Tissue Antigens *71*, 464–470.

Mouquet, H., Musette, P., Gougeon, M.-L., Jacquot, S., Lemercier, B., Lim, A., Gilbert, D., Dutot, I., Roujeau, J.C., D'Incan, M., et al. (2008b). B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. J. Invest. Dermatol. *128*, 2859–2869.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell *102*, 553–563.

Murrell, D.F., and Sprecher, E. (2017). Rituximab and short-course prednisone as the new gold standard for new-onset pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Br. J. Dermatol. *177*, 1143–1144.

Murrell, D.F., Dick, S., Ahmed, A.R., Amagai, M., Barnadas, M.A., Borradori, L., Bystryn, J.-C., Cianchini, G., Diaz, L., Fivenson, D., et al. (2008). Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. J. Am. Acad. Dermatol. *58*, 1043– 1046.

Murrell, D.F., Peña, S., Joly, P., Marinovic, B., Hashimoto, T., Diaz, L.A., Sinha, A.A., Payne, A.S., Daneshpazhooh, M., Eming, R., et al. (2018). Diagnosis and Management of Pemphigus: recommendations by an International Panel of Experts. J. Am. Acad. Dermatol.

Ν

Nagel, A., Podstawa, E., Eickmann, M., Müller, H.-H., Hertl, M., and Eming, R. (2009). Rituximab Mediates a Strong Elevation of B-Cell-Activating Factor Associated with Increased Pathogen-Specific IgG but Not Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. *129*, 2202–2210.

Nagel, A., Lang, A., Engel, D., Podstawa, E., Hunzelmann, N., de Pita, O., Borradori, L., Uter, W., and Hertl, M. (2010). Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. Clin. Immunol. Orlando Fla *134*, 320–330.

Nakagawa, T., and Miyamoto, T. (1985). The role of IgG4 as blocking antibodies in asthmatics and in bee keepers. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. *77*, 204–205.

Narbutt, J., Lesiak, A., Klich, I., Torzecka, J.D., Sysa-Jedrzejowska, A., and Młynarski, W. (2010). ICOS gene polymorphism may be associated with pemphigus. J. Cutan. Med. Surg. *14*, 291–297.

Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P.A., Olsen, H.S., Migone, T.S., Sosnovtseva, S., Carrell, J.A., Feng, P., Giri, J.G., et al. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood *97*, 198–204.

Nekrasova, O., and Green, K.J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. Trends Cell Biol. *23*, 537–546.

Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat. Rev. Immunol. *17*, 281–294.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. Nat. Rev. Immunol. *9*, 679– 691.

Nguyen, V.T., Lee, T.X., Ndoye, A., Shultz, L.D., Pittelkow, M.R., Dahl, M.V., Lynch, P.J., and Grando, S.A. (1998). The Pathophysiological Significance of Nondesmoglein Targets of Pemphigus Autoimmunity: Development of Antibodies Against Keratinocyte Cholinergic Receptors in Patients With Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus. Arch. Dermatol. *134*, 971–980.

Nguyen, V.T., Ndoye, A., and Grando, S.A. (2000a). Novel Human α 9 Acetylcholine Receptor Regulating Keratinocyte Adhesion is Targeted by Pemphigus Vulgaris Autoimmunity. Am. J. Pathol. *157*, 1377–1391.

Nguyen, V.T., Ndoye, A., and Grando, S.A. (2000b). Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. J. Biol. Chem. *275*, 29466–29476.

Nguyen, V.T., Ndoye, A., Shultz, L.D., Pittelkow, M.R., and Grando, S.A. (2000c). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris–like lesions. J. Clin. Invest. *106*, 1467–1479.

Nguyen, V.T., Ndoye, A., Bassler, K.D., Shultz, L.D., Shields, M.C., Ruben, B.S., Webber, R.J., Pittelkow, M.R., Lynch, P.J., and Grando, S.A. (2001). Classification, clinical manifestations, and immunopathological mechanisms of the epithelial variant of paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome: а reappraisal of paraneoplastic pemphigus. Arch. Dermatol. 137, 193-206.

Nguyen, V.T., Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Kitajima, Y., Pittelkow, M., and Grando, S.A. (2004). Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. J. Biol. Chem. *279*, 2135–2146.

Nicholas, M.W., Dooley, M.A., Hogan, S.L., Anolik, J., Looney, J., Sanz, I., and Clarke, S.H. (2008). A novel subset of memory B cells is enriched in autoreactivity and correlates with adverse outcomes in SLE. Clin. Immunol. Orlando Fla *126*, 189–201.

Nickoloff, B.J., and Turka, L.A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. Immunol. Today *15*, 464–469.

Nicolaides, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2010). The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. Steroids *75*, 1.

Nicolas, B., Pascal, J., Marie-Laure, G., Natacha, C., Annick, L., Anis, L., Gaetan, R., Frederique, C., Philippe, B., Christophe, B., et al. (2019). B-cell depletion induces a shift in self antigen specific Bcell repertoire and cytokine pattern in patients with bullous pemphigoid. Sci. Rep. *9*.

Nishifuji, K., Amagai, M., Kuwana, M., Iwasaki, T., and Nishikawa, T. (2000). Detection of Antigen-Specific B Cells in Patients with Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay: Requirement of T Cell Collaboration for Autoantibody Production. J. Invest. Dermatol. *114*, 88–94.

Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members11Edited by M. Yaniv. J. Mol. Biol. *299*, 551–572.

Noske, K. (2018). Secreted immunoregulatory proteins in the skin. J. Dermatol. Sci. *89*, 3–10.

Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J.O., and Hillion, S. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. J. Autoimmun. *59*, 53–60.

Nutt, S.L., Taubenheim, N., Hasbold, J., Corcoran, L.M., and Hodgkin, P.D. (2011). The genetic network controlling plasma cell differentiation. Semin. Immunol. *23*, 341–349.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat. Rev. Immunol. *15*, 160–171.

0

O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. J. Exp. Med. *199*, 91– 98.

Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B.F., Jacobi, A.M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A., et al. (2005). Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. Blood *105*, 1614– 1621.

Ogawa, H., Sakuma, M., Morioka, S., Kitamura, K., Sasai, Y., Imamura, S., and Inaba, Y. (1995). The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. J. Dermatol. Sci. *9*, 136–141.

Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A., and Nishikawa, T. (2002). Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. *118*, 199–204.

Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigenengaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. PLoS Biol. *3*, e150.

Olaru, F., and Jensen, L.E. (2010). Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors (TLRs). Exp. Dermatol. *19*, e314–e316.

Oleinika, K., Mauri, C., and Salama, A.D. (2019). Effector and regulatory B cells in immunemediated kidney disease. Nat. Rev. Nephrol. *15*, 11.

Ollila, J., and Vihinen, M. (2005). B cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *37*, 518–523.

Ono, S., and Kabashima, K. (2015). Novel insights into the role of immune cells in skin and inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT). Allergo J. Int. *24*, 170–179.

Oostingh, G.J., Sitaru, C., Kromminga, A., Dormann, D., and Zillikens, D. (2002). Autoreactive T cell responses in pemphigus and pemphigoid. Autoimmun. Rev. *1*, 267–272.

O'Shannessy, D.J., Bendas, K., Schweizer, C., Wang, W., Albone, E., Somers, E.B., Weil, S., Meredith, R.K., Wustner, J., Grasso, L., et al. (2017). Correlation of FCGRT genomic structure with serum immunoglobulin, albumin and farletuzumab pharmacokinetics in patients with first relapsed ovarian cancer. Genomics *109*, 251– 257. O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science *327*, 1098–1102.

Otten, J.V., Hashimoto, T., Hertl, M., Payne, A.S., and Sitaru, C. (2014). Molecular Diagnosis in Autoimmune Skin Blistering Conditions. Curr. Mol. Med. *14*, 69–95.

Oursler, J.R., Labib, R.S., Ariss-Abdo, L., Burke, T., O'Keefe, E.J., and Anhalt, G.J. (1992). Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. J. Clin. Invest. *89*, 1775–1782.

Ozanam, J.A.F. (1823). Histoire medicale generale et particuliere des maladies epidemiques, contagieuses et epizootiques qui ont regne en Europe depuis le temps les plus recules, et notamment depuis le 14. siecle jusqu'a nos jours (Mequignon-Marvis).

Р

Pan, M., Liu, X., and Zheng, J. (2011). The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. Clin. Exp. Dermatol. *36*, 703–707.

Pan, M., Zhu, H., and Xu, R. (2015). Immune cellular regulation on autoantibody production in pemphigus. J. Dermatol. *42*, 11–17.

Pan, M., Zhu, H., and Xu, R. Immune cellular regulation on autoantibody production in pemphigus. J. Dermatol. *42*, 11–17.

Paolino, G., Didona, D., Magliulo, G., Iannella, G., Didona, B., Mercuri, S.R., Moliterni, E., Donati, M., Ciofalo, A., Granata, G., et al. (2017). Paraneoplastic Pemphigus: Insight into the Autoimmune Pathogenesis, Clinical Features and Therapy. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Papa, I., and Vinuesa, C.G. (2018). Synaptic Interactions in Germinal Centers. Front. Immunol. 9.

Papavasiliou, F.N., and Schatz, D.G. (2002). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. Cell *109 Suppl*, S35-44.

Patakas, A., Benson, R.A., Withers, D.R., Conigliaro, P., McInnes, I.B., Brewer, J.M., and Garside, P. (2012). Th17 Effector Cells Support B Cell Responses Outside of Germinal Centres. PLOS ONE 7, e49715.

Patsatsi, A., Kyriakou, A., Giannakou, A., Pavlitou-Tsiontsi, A., Lambropoulos, A., and Sotiriadis, D. (2014). Clinical significance of antidesmoglein-1 and -3 circulating autoantibodies in Pemphigus Patients Measured by Area Index and Intensity Score. Acta Derm. Venereol. *94*, 203–206. Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. J. Exp. Med. *203*, 1081–1091.

Pavoni, D.P., Cerqueira, L.B., Roxo, V.M.M.S., and Petzl-Erler, M.L. (2006). Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol. *39*, 1227–1232.

Payne, A.S., Hanakawa, Y., Amagai, M., and Stanley, J.R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. Curr. Opin. Cell Biol. *16*, 536–543.

Payne, A.S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J.R., and Siegel, D.L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. J. Clin. Invest. *115*, 888–899.

Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., and Yssel, H. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells. J. Immunol. *172*, 5154–5157.

Pereira, N.F., Hansen, J.A., Lin, M.-T., Roxo, V.M.M.S., Braun, K., and Petzl-Erler, M.L. (2004). Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. Cytokine *28*, 233–241.

Petzelbauer, P., Födinger, D., Rappersberger, K., Volc-Platzer, B., and Wolff, K. (1993). CD68 Positive Epidermal Dendritic Cells. J. Invest. Dermatol. *101*, 256–261.

Petzl-Erler, M.L., and Santamaria, J. (1989). Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? Tissue Antigens *33*, 408–414.

Picut, C., Meunier, J., Lee, C., and Lewis, R. (1987). Expression of HLA-DR and OKT6 antigens on keratinocytes and dendritic cells in pemphigus. Arch. Dermatol. Res. *279*, 516–520.

Pijpe, J., Imhoff, G.W. van, Spijkervet, F.K.L., Roodenburg, J.L.N., Wolbink, G.J., Mansour, K., Vissink, A., Kallenberg, C.G.M., and Bootsma, H. (2005). Rituximab treatment in patients with primary Sjögren's syndrome: An open-label phase II study. Arthritis Rheum. *52*, 2740–2750.

Pincerati, M.R., Dalla-Costa, R., and Petzl-Erler, M.L. (2010). CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. Genet. Mol. Biol. 33, 442-444.

Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., and Hertl, M. (2018). Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. Clin. Rev. Allergy Immunol. *54*, 1–25.

Pollmann, R., Walter, E., Schmidt, T., Waschke, J., Hertl, M., Möbs, C., and Eming, R. (2019). Identification of Autoreactive B Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients With Pemphigus Vulgaris. Front. Immunol. *10*, 1375.

Porro, A.M., Caetano, L. de V.N., Maehara, L. de S.N., and Enokihara, M.M. dos S. (2014). Nonclassical forms of pemphigus: pemphigus herpetiformis, IgA pemphigus, paraneoplastic pemphigus and IgG/IgA pemphigus. An. Bras. Dermatol. *89*, 96–106.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. N. Engl. J. Med. *365*, 725–733.

Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N., Menon, S., Zurawski, G., Malefyt, R. de W., and Vries, J.E. de (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *90*, 3730–3734.

Puviani, M., Marconi, A., Pincelli, C., and Cozzani, E. (2003). Fas Ligand in Pemphigus Sera Induces Keratinocyte Apoptosis through the Activation of Caspase-8. J. Invest. Dermatol. *120*, 164–167.

Q

Qian, Y., Diaz, L.A., Ye, J., and Clarke, S.H. (2007). Dissecting the Anti-Desmoglein Autoreactive B Cell Repertoire in Pemphigus Vulgaris Patients. J. Immunol. *178*, 5982–5990.

Qian, Y., Jeong, J.S., Ye, J., Dang, B., Abdeladhim, M., Aoki, V., Hans-Filhio, G., Rivitti, E.A., Valenzuela, J.G., and Diaz, L.A. (2016). Overlapping IgG4 responses to self and environmental antigens in endemic pemphigus foliaceus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 2041– 2050.

Quartier, P., Brethon, B., Philippet, P., Landman-Parker, J., Le Deist, F., and Fischer, A. (2001). Treatment of childhood autoimmune haemolytic anaemia with rituximab. Lancet Lond. Engl. *358*, 1511–1513. R

Raboudi, A., Liaiem, N., Jones, M., Bacha, T., Jaziri, F., Hriz, A., Ezzine, N., and Zeglaoui, F. (2017). Pemphigus et maladies auto-immunes. Rev. Médecine Interne *38*, A223–A224.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nat. Rev. Immunol. *6*, 741–750.

Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S., and Weigert, M. (1993). B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. J. Exp. Med. *177*, 1165–1173.

Rafei, D., Müller, R., Ishii, N., Llamazares, M., Hashimoto, T., Hertl, M., and Eming, R. (2011). IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. Am. J. Pathol. *178*, 718–723.

Rawlings, D.J., Metzler, G., Wray-Dutra, M., and Jackson, S.W. (2017). Altered B cell signalling in autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. *17*, 421.

Ray, J.P., Marshall, H.D., Laidlaw, B.J., Staron, M.M., Kaech, S.M., and Craft, J. (2014). Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. Immunity *40*, 367–377.

Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood *83*, 435–445.

Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. N. Engl. J. Med. *353*, 1711–1723.

Rickert, R.C., Jellusova, J., and Miletic, A.V. (2011). Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease. Immunol. Rev. *244*, 115–133.

Riley, J.K., and Sliwkowski, M.X. (2000). CD20: a gene in search of a function. Semin. Oncol. *27*, 17–24.

Ritvo, P.-G., and Klatzmann, D. (2019). Interleukin-1 in the Response of Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells. Front. Immunol. *10*.

Ritvo, P.-G.G., Churlaud, G., Quiniou, V., Florez, L., Brimaud, F., Fourcade, G., Mariotti-Ferrandiz, E., and Klatzmann, D. (2017). Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and

suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. Sci. Immunol. 2.

Rizzo, C., Fotino, M., Zhang, Y., Chow, S., Spizuoco, A., and Sinha, A.A. (2005). Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. Clin. Exp. Dermatol. *30*, 535–540.

Rock, B., Martins, C.R., Theofilopoulos, A.N., Balderas, R.S., Anhalt, G.J., Labib, R.S., Futamura, S., Rivitti, E.A., and Diaz, L.A. (1989). The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). N. Engl. J. Med. *320*, 1463–1469.

Rodríguez-Cortez, V.C., del Pino-Molina, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ciudad, L., Gómez-Cabrero, D., Company, C., Urquiza, J.M., Tegnér, J., Rodríguez-Gallego, C., López-Granados, E., et al. (2015). Monozygotic twins discordant for common variable immunodeficiency reveal impaired DNA demethylation during naïve-tomemory B-cell transition. Nat. Commun. *6*, 7335.

Rogozin, I.B., and Diaz, M. (2004). Cutting Edge: DGYW/WRCH Is a Better Predictor of Mutability at G:C Bases in Ig Hypermutation Than the Widely Accepted RGYW/WRCY Motif and Probably Reflects a Two-Step Activation-Induced Cytidine Deaminase-Triggered Process. J. Immunol. *172*, 3382–3384.

Roguedas, A.-M., Pers, J.-O., Lemasson, G., Devauchelle, V., Tobón, G.J., Saraux, A., Misery, L., and Youinou, P. (2010). Memory B-cell aggregates in skin biopsy are diagnostic for primary Sjögren's syndrome. J. Autoimmun. *35*, 241–247.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol. Rev. *212*, 28–50.

Roscoe, J.T., Diaz, L., Sampaio, S.A., Castro, R.M., Labib, R.S., Takahashi, Y., Patel, H., and Anhalt, G.J. (1985). Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. J. Invest. Dermatol. *85*, 538–541.

Rosenberg, F.R., Sanders, S., and Nelson, C.T. (1976). Pemphigus: A 20-Year Review of 107 Patients Treated With Corticosteroids. Arch. Dermatol. *112*, 962–970.

Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. Immunity *42*, 607–612.

Rosser, E.C., Oleinika, K., Tonon, S., Doyle, R., Bosma, A., Carter, N.A., Harris, K.A., Jones, S.A., Klein, N., and Mauri, C. (2014). Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. Nat. Med. *20*, 1334–1339.

Rowland, S.L., Leahy, K.F., Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2010). BAFF-R signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 4570–4581.

Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R.T., Gillis, J.Z., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)– driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. Blood *118*, 1305–1315.

Ruddle, N.H. (2016). High Endothelial Venules and Lymphatic Vessels in Tertiary Lymphoid Organs: Characteristics, Functions, and Regulation. Front. Immunol. 7.

Ruocco, E., Ruocco, V., Schiavo, A.L., Brunetti, G., and Wolf, R. (2014). Viruses and Pemphigus: An Intriguing Never-Ending Story. Dermatology *229*, 310–315.

Ruocco, V., Ruocco, E., Lo Schiavo, A., Brunetti, G., Guerrera, L.P., and Wolf, R. (2013). Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. Clin. Dermatol. *31*, 374–381.

Ruocco, V., Ruocco, E., Caccavale, S., Gambardella, A., and Lo Schiavo, A. (2015). Pemphigus vegetans of the folds (intertriginous areas). Clin. Dermatol. *33*, 471–476.

S

Saito, M., Stahley, S.N., Caughman, C.Y., Mao, X., Tucker, D.K., Payne, A.S., Amagai, M., and Kowalczyk, A.P. (2012). Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. PLoS ONE *7*.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *155*, 1151–1164.

Salopek, T.G., Logsetty, S., and Tredget, E.E. (2002). Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) for the treatment of recalcitrant, life-threatening pemphigus vulgaris with implications in the pathogenesis of the disorder. J. Am. Acad. Dermatol. *47*, 785–788.

Salviano-Silva, A., Petzl-Erler, M.L., and Boldt, A.B.W. (2017). CD59 polymorphisms are associated with gene expression and different sexual susceptibility to pemphigus foliaceus. Autoimmunity *50*, 377–385.

Santi, C.G., and Sotto, M.N. (2001). Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J. Am. Acad. Dermatol. *44*, 446–450.

Sanz, I., Wei, C., Lee, F.E.-H., and Anolik, J. (2008). Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. Semin. Immunol. *20*, 67–82.

Sarig, O., Bercovici, S., Zoller, L., Goldberg, I., Indelman, M., Nahum, S., Israeli, S., Sagiv, N., Martinez de Morentin, H., Katz, O., et al. (2012). Population-specific association between a polymorphic variant in ST18, encoding a proapoptotic molecule, and pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. *132*, 1798–1805.

Satyam, A., Khandpur, S., Sharma, V.K., and Sharma, A. (2009). Involvement of TH1/TH2 Cytokines in the Pathogenesis of Autoimmune Skin Disease—Pemphigus Vulgaris. Immunol. Invest. *38*, 498–509.

Scaglione, G.L., Fania, L., De Paolis, E., De Bonis, M., Mazzanti, C., Di Zenzo, G., Lechiancole, S., Messinese, S., and Capoluongo, E. (2020). Evaluation of cutaneous, oral and intestinal microbiota in patients affected by pemphigus and bullous pemphigoid: A pilot study. Exp. Mol. Pathol. *112*, 104331.

Scharf, S.J., Freidmann, A., Steinman, L., Brautbar, C., and Erlich, H.A. (1989). Specific HLA-DQB and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris. Proc. Natl. Acad. Sci. *86*, 6215–6219.

Schattner, E., and Friedman, S.M. (1996). Fas expression and apoptosis in human B cells. Immunol. Res. *15*, 246–257.

Schepens, I., Jaunin, F., Begre, N., Läderach, U., Marcus, K., Hashimoto, T., Favre, B., and Borradori, L. (2010). The protease inhibitor alpha-2-macroglobulin-like-1 is the p170 antigen recognized by paraneoplastic pemphigus autoantibodies in human. PloS One *5*, e12250.

Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2010). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. Neurosci. Biobehav. Rev. *34*, 177–184.

Schiltz, J.R., and Michel, B. (1976). Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. J. Invest. Dermatol. *67*, 254–260. Schmidt, E., and Waschke, J. (2009). Apoptosis in pemphigus. Autoimmun. Rev. *8*, 533–537.

Schmidt, E., and Zillikens, D. (2013). Pemphigoid diseases. Lancet Lond. Engl. *381*, 320–332.

Schmidt, E., Bröcker, E.-B., and Goebeler, M. (2008). Rituximab in treatment-resistant autoimmune blistering skin disorders. Clin. Rev. Allergy Immunol. *34*, 56–64.

Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., and Joly, P. (2019). Pemphigus. Lancet Lond. Engl. *394*, 882–894.

Schmidt, T., Willenborg, S., Hünig, T., Deeg, C.A., Sonderstrup, G., Hertl, M., and Eming, R. (2016). Induction of T regulatory cells by the superagonistic anti-CD28 antibody D665 leads to decreased pathogenic IgG autoantibodies against desmoglein 3 in a HLA-transgenic mouse model of pemphigus vulgaris. Exp. Dermatol. *25*, 293– 298.

Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends Immunol. *35*, 436–442.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S41–S52.

Sekiguchi, M., Futei, Y., Fujii, Y., Iwasaki, T., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2001). Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 5439–5448.

Sellam, J., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J., Ittah, M., Lavie, F., Lacabaratz, C., Gestermann, N., Proust, A., and Lambotte, O. (2007). Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. *66*, 790–797.

Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D., and Grewal, I.S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. Immunity *18*, 279–288.

Sharma, V.K., and Khandpur, S. (2013). Evaluation of cyclophosphamide pulse therapy as an adjuvant to oral corticosteroid in the management of pemphigus vulgaris. Clin. Exp. Dermatol. *38*, 659–664.

Sharma, P.M., Choi, E.J., Kuroda, K., Hachiya, T., Ishii, K., and Payne, A.S. (2009). Pathogenic antidesmoglein monoclonal antibodies demonstrate variable ELISA activity due to preferential binding of mature versus proprotein isoforms of desmoglein 3. J. Invest. Dermatol. *129*, 2309–2312.

Shen, P., and Fillatreau, S. (2015). Antibodyindependent functions of B cells: a focus on cytokines. Nat. Rev. Immunol. *15*, 441–451.

Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. Immunol. Rev. *247*, 52–63.

Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. *62*, 234–244.

Sinha, A.A. (2011). The Genetics of Pemphigus. Dermatol. Clin. *29*, 381–391.

Sinha, A.A., and Sajda, T. (2018a). The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis." Front. Med. 5.

Sinha, A.A., and Sajda, T. (2018b). The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the "Super Compensation Hypothesis." Front. Med. *5*.

Skogberg, G., Lundberg, V., Berglund, M., Gudmundsdottir, J., Telemo, E., Lindgren, S., and Ekwall, O. (2015). Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. Immunol. Cell Biol. *93*, 727–734.

Slomov, E., Loewenthal, R., Goldberg, I., Korostishevsky, M., Brenner, S., and Gazit, E. (2003). Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers. Hum. Immunol. *64*, 771– 779.

Smith, P.F., Krishnarajah, J., Nunn, P.A., Hill, R.J., Karr, D., Tam, D., Masjedizadeh, M., Funk, J.O., and Gourlay, S.G. (2017). A phase I trial of PRN1008, a novel reversible covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, in healthy volunteers. Br. J. Clin. Pharmacol. *83*, 2367–2376.

Søndergaard, K., Carstens, J., and Zachariae, H. (1997). The Steroid-Sparing Effect of Long-Term Plasmapheresis in Pemphigus: An Update. Ther. Apher. 1, 155–158.

Sosinsky, G.E., and Nicholson, B.J. (2005). Structural organization of gap junction channels. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *1711*, 99–125. Spaeth, S., Riechers, R., Borradori, L., Zillikens, D., Büdinger, L., and Hertl, M. (2001). IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. *144*, 1183–1188.

Spindler, V., and Waschke, J. (2011). Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. Ann. Anat. - Anat. Anz. *193*, 177–180.

Spindler, V., and Waschke, J. (2014). Desmosomal Cadherins and Signaling: Lessons from Autoimmune Disease. Cell Commun. Adhes. *21*, 77–84.

Spindler, V., and Waschke, J. (2018). Pemphigus—A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. Front. Immunol. 9.

Spindler, V., Heupel, W.-M., Efthymiadis, A., Schmidt, E., Eming, R., Rankl, C., Hinterdorfer, P., Müller, T., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2009). Desmocollin 3-mediated Binding Is Crucial for Keratinocyte Cohesion and Is Impaired in Pemphigus. J. Biol. Chem. *284*, 30556–30564.

Stahn, C., and Buttgereit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. Nat. Rev. Rheumatol. *4*, 525–533.

Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2007a). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol. Cell. Endocrinol. *275*, 71– 78.

Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2007b). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol. Cell. Endocrinol. *275*, 71– 78.

Stanley, J.R., and Amagai, M. (2006). Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. N. Engl. J. Med. *355*, 1800–1810.

Stanley, J.R., Yaar, M., Hawley-Nelson, P., and Katz, S.I. (1982). Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. J. Clin. Invest. *70*, 281–288.

Stanley, J.R., Koulu, L., and Thivolet, C. (1984). Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. J. Clin. Invest. *74*, 313–320.

Stanley, J.R., Tanaka, T., Mueller, S., Klaus-Kovtun, V., and Roop, D. (1988). Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. J. Clin. Invest. *82*, 1864–1870.

Stasi, R., Pagano, A., Stipa, E., and Amadori, S. (2001). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood *98*, 952–957.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. Annu. Rev. Immunol. *26*, 261–292.

Stern, J.N.H., Keskin, D.B., Barteneva, N., Zuniga, J., Yunis, E.J., and Ahmed, A.R. (2008). Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris – preliminary observations. Clin. Exp. Immunol. *152*, 472–481.

Strehl, C., and Buttgereit, F. (2013). Optimized glucocorticoid therapy: Teaching old drugs new tricks. Mol. Cell. Endocrinol. *380*, 32–40.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell *75*, 1169–1178.

Sugiyama, H., Matsue, H., Nagasaka, A., Nakamura, Y., Tsukamoto, K., Shibagaki, N., Kawamura, T., Kitamura, R., Ando, N., and Shimada, S. (2007). CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. Dermatol. Basel Switz. *214*, 210–220.

Sullivan, L.C., Clements, C.S., Rossjohn, J., and Brooks, A.G. (2008). The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. Tissue Antigens *72*, 415–424.

Szatmari, I., and Nagy, L. (2008). Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. EMBO J. *27*, 2353–2362.

Т

Takae, Y., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2009). Pemphigus mouse model as a tool to evaluate various immunosuppressive therapies. Exp. Dermatol. *18*, 252–260.

Takahashi, H., Amagai, M., Tanikawa, A., Suzuki, S., Ikeda, Y., Nishikawa, T., Kawakami, Y., and Kuwana, M. (2007). T Helper Type 2-Biased Natural Killer Cell Phenotype in Patients with Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. *127*, 324–330.

Takahashi, H., Amagai, M., Nishikawa, T., Fujii, Y., Kawakami, Y., and Kuwana, M. (2008). Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 1526–1535.

Takahashi, H., Kuwana, M., and Amagai, M. (2009). A Single Helper T Cell Clone Is Sufficient to Commit Polyclonal Naive B Cells to Produce Pathogenic IgG in Experimental Pemphigus Vulgaris. J. Immunol. *182*, 1740–1745.

Takahashi, H., Kouno, M., Nagao, K., Wada, N., Hata, T., Nishimoto, S., Iwakura, Y., Yoshimura, A., Yamada, T., Kuwana, M., et al. (2011). Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J. Clin. Invest. *121*, 3677–3688.

Takahashi, Y., Patel, H.P., Labib, R.S., Diaz, L.A., and Anhalt, G.J. (1985). Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. J. Invest. Dermatol. *84*, 41–46.

Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. J. Cell Sci. *116*, 17–27.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell *140*, 805–820.

Tan, S.R., McDermott, M.R., Castillo, C.J., and Sauder, D.N. (2006). Pemphigus vulgaris induced by electrical injury. Cutis *77*, 161–165.

Tanasilovic, S., Popadic, S., Medenica, L., and Popadic, D. (2017). Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus determined by CD86 and CTLA4 polymorphisms. Clin. Dermatol. *35*, 236– 241.

Tangye, S.G., and Tarlinton, D.M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. Eur. J. Immunol. *39*, 2065–2075.

Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — T_{FH} cells in human health and disease. Nat. Rev. Immunol. *13*, 412–426.

Tan-Lim, R., and Bystryn, J.-C. (1990). Effect of plasmapheresis therapy on circulating levels of pemphigus antibodies. J. Am. Acad. Dermatol. *22*, 35–40.

Tansey, E.A., and Johnson, C.D. (2015). Recent advances in thermoregulation. Adv. Physiol. Educ. *39*, 139–148.

Tao, M.H., Smith, R.I., and Morrison, S.L. (1993). Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-

specific differences in complement activation. J. Exp. Med. *178*, 661–667.

Tavakolpour, S. (2016). Dupilumab: a revolutionary emerging drug in atopic dermatitis and its possible role in pemphigus. Dermatol. Ther. *29*, 299–299.

Tavakolpour, S. (2017). Current and future treatment options for pemphigus: Is it time to move towards more effective treatments? Int. Immunopharmacol. *53*, 133–142.

Tavakolpour, S. (2018). Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Arch. Dermatol. Res. *310*, 95–106.

Tavakolpour, S., Mahmoudi, H., Balighi, K., Abedini, R., and Daneshpazhooh, M. (2018). Sixteen-year history of rituximab therapy for 1085 pemphigus vulgaris patients: A systematic review. Int. Immunopharmacol. *54*, 131–138.

Taylor, J.J., Jenkins, M.K., and Pape, K.A. (2012). Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. Trends Immunol. *33*, 590–597.

Tedder, T.F., Zhou, L.J., and Engel, P. (1994). The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. Immunol. Today *15*, 437–442.

Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., and Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. Immunol. Rev. *223*, 87–113.

Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2004). Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. Immunity *20*, 785–798.

Thivolet, J. (1994). Pemphigus: Past, Present and Future. Dermatology *189*, 26–29.

Timoteo, R.P., da Silva, M.V., Miguel, C.B., Silva, D.A.A., Catarino, J.D.S., Rodrigues Junior, V., Sales-Campos, H., and Freire Oliveira, C.J. (2017). Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. Mediators Inflamm. *2017*, 7151285.

Tissot, F.S., Boulter, E., Estrach, S., and Féral, C.C. (2016). The body's tailored suit: Skin as a mechanical interface. Eur. J. Cell Biol. *95*, 475–482.

Tobin, D.J. (2006). Biochemistry of human skin—our brain on the outside. Chem. Soc. Rev. *35*, 52–67.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature *302*, 575–581.

Torre, I. de la, Moura, R.A., Leandro, M.J., Edwards, J., and Cambridge, G. (2010). B-cellactivating factor receptor expression on naive and memory B cells: relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following Bcell depletion therapy. Ann. Rheum. Dis. *69*, 2181–2188.

Toumi, A., Abida, O., Ben Ayed, M., Masmoudi, A., Turki, H., and Masmoudi, H. (2013). Cytokine gene polymorphisms in Tunisian endemic pemphigus foliaceus: a possible role of il-4 variants. Hum. Immunol. *74*, 658–665.

Tracey, W.D. (2017). Nociception. Curr. Biol. *27*, R129–R133.

Trampert, D.C., Hubers, L.M., van de Graaf, S.F.J., and Beuers, U. (2018). On the role of IgG4 in inflammatory conditions: lessons for IgG4-related disease. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1864*, 1401–1409.

Tron, F., Gilbert, D., Mouquet, H., Joly, P., Drouot, L., Makni, S., Masmoudi, H., Charron, D., Zitouni, M., Loiseau, P., et al. (2005). Genetic factors in pemphigus. J. Autoimmun. *24*, 319–328.

Tron, F., Gilbert, D., Joly, P., Mouquet, H., Drouot, L., Ayed, M.B., Sellami, M., Masmoudi, H., and Makni, S. (2006). Immunogenetics of pemphigus: An update. Autoimmunity *39*, 531– 539.

Trouvin, A.-P., Jacquot, S., Grigioni, S., Curis, E., Dedreux, I., Roucheux, A., Boulard, H., Vittecoq, O., Le Loët, X., Boyer, O., et al. (2015). Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximabtreated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study. Clin. Exp. Immunol. *180*, 11– 18.

Tsuboi, H., Matsuo, N., Iizuka, M., Tsuzuki, S., Kondo, Y., Tanaka, A., Moriyama, M., Matsumoto, I., Nakamura, S., and Sumida, T. (2012). Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4related disease. Arthritis Res. Ther. *14*, R171.

Tsukita, S., and Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? Trends Cell Biol. *9*, 268–273.

Tsunoda, K., Ota, T., Suzuki, H., Ohyama, M., Nagai, T., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. (2002). Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. Eur. J. Immunol. *32*, 627–633.

Tsunoda, K., Ota, T., Aoki, M., Yamada, T., Nagai, T., Nakagawa, T., Koyasu, S., Nishikawa, T., and Amagai, M. (2003). Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 2170–2178.

Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K.J., and Jones, J.C.R. (2011). Hemidesmosomes and focal contact proteins: Functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. J. Dermatol. Sci. *62*, 1–7.

Tufano, M.A., Baroni, A., Buommino, E., Ruocco, E., Lombardi, M.L., and Ruocco, V. (1999). Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. Br. J. Dermatol. *141*, 1033–1039.

Tumanov, A.V., Kuprash, D.V., Lagarkova, M.A., Grivennikov, S.I., Abe, K., Shakhov, A.N., Drutskaya, L.N., Stewart, C.L., Chervonsky, A.V., and Nedospasov, S.A. (2002). Distinct Role of Surface Lymphotoxin Expressed by B Cells in the Organization of Secondary Lymphoid Tissues. Immunity *17*, 239–250.

U

Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. Nat. Immunol. *16*, 142–152.

V

Valladeau, J. (2006). [Langerhans cells]. Med. Sci. MS 22, 144–148.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity *12*, 71–81.

Van der Zee, S., and Aalberse, R.C. (1987). IgG4 and hyposensitization. N. Engl. Reg. Allergy Proc. *8*, 389–391.

Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., and Zlotnik, A. (2015). B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. Cytokine *74*, 318–326.

van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 1204–1212.

Veldman, C., Stauber, A., Wassmuth, R., Uter, W., Schuler, G., and Hertl, M. (2003). Dichotomy of

autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 635–642.

Veldman, C., Höhne, A., Dieckmann, D., Schuler, G., and Hertl, M. (2004a). Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 6468–6475.

Veldman, C., Nagel, A., and Hertl, M. (2006). Type I Regulatory T Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. *140*, 174–183.

Veldman, C., Eming, R., Wolff-Franke, S., Sonderstrup, G., Kwok, W.W., and Hertl, M. (2007). Detection of low avidity desmoglein 3reactive T cells in pemphigus vulgaris using HLA-DR beta 1*0402 tetramers. Clin. Immunol. Orlando Fla *122*, 330–337.

Veldman, C.M., Gebhard, K.L., Uter, W., Wassmuth, R., Grötzinger, J., Schultz, E., and Hertl, M. (2004b). T Cell Recognition of Desmoglein 3 Peptides in Patients with Pemphigus Vulgaris and Healthy Individuals. J. Immunol. *172*, 3883–3892.

Verstappen, G.M., Kroese, F.G.M., Meiners, P.M., Corneth, O.B., Huitema, M.G., Haacke, E.A., Vegt, B. van der, Arends, S., Vissink, A., Bootsma, H., et al. (2017). B Cell Depletion Therapy Normalizes Circulating Follicular Th Cells in Primary Sjögren Syndrome. J. Rheumatol. *44*, 49– 58.

Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy Using a Photoactivatable Fluorescent Reporter. Cell *143*, 592–605.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. Front. Immunol. *5*.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. Nat. Rev. Immunol. *8*, 523–532.

Vincent, F.B., Saulep-Easton, D., Figgett, W.A., Fairfax, K.A., and Mackay, F. (2013). The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. Cytokine Growth Factor Rev. *24*, 203–215.

Virgolini, L., and Marzocchi, V. (2003). Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. Successful result in refractory Pemphigus vulgaris: report of a case. Haematologica *88*, ELT24-ELT24.

Virgolini, L., and Marzocchi, V. (2004). Rituximab in autoimmune diseases. Biomed. Pharmacother. *58*, 299–309.

Vodo, D., Sarig, O., Geller, S., Ben-Asher, E., Olender, T., Bochner, R., Goldberg, I., Nosgorodsky, J., Alkelai, A., Tatarskyy, P., et al. (2016). Identification of a Functional Risk Variant for Pemphigus Vulgaris in the ST18 Gene. PLoS Genet. *12*.

Vos, K., Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., van Schaardenburg, D., Gerlag, D.M., and Tak, P.P. (2007). Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *56*, 772–778.

Vu, T.N., Lee, T.X., Ndoye, A., Shultz, L.D., Pittelkow, M.R., Dahl, M.V., Lynch, P.J., and Grando, S.A. (1998). The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Arch. Dermatol. *134*, 971–980.

W

Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. Nat. Rev. Immunol. *11*, 852–863.

Wallach, D., Cottenot, F., Pelbois, G., Cavelier, B., Didierjean, L., and Saurat, J.-H. (1982). Subcorneal pustular dermatosis and monoclonal IgA. Br. J. Dermatol. *107*, 229–234.

Walsh, P.N., Friedrich, D.P., Williams, J.A., Smith, R.J., Stewart, T.L., Carter, D.K., Liao, H.-X., McElrath, M.J., and Frahm, N. (2013). Optimization and qualification of a memory B-cell ELISpot for the detection of vaccine-induced memory responses in HIV vaccine trials. J. Immunol. Methods *394*, 84–93.

Wang, J., and Xiang, M. (2013). Targeting Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1: Routes to Selective Immunomodulators in Autoimmune Disorder Treatment? Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther. *33*, 515–528.

Wang, H.-H., Liu, C.-W., Li, Y.-C., and Huang, Y.-C. (2015). Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens. Acta Derm. Venereol. *95*, 928–932.

Wang, J.X., Fukunaga-Kalabis, M., and Herlyn, M. (2016). Crosstalk in skin: melanocytes,

keratinocytes, stem cells, and melanoma. J. Cell Commun. Signal. *10*, 191–196.

Wang, L., Zhao, P., Ma, L., Shan, Y., Jiang, Z., Wang, J., and Jiang, Y. (2014). Increased Interleukin 21 and Follicular Helper T-like Cells and Reduced Interleukin 10+ B cells in Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus. J. Rheumatol. *41*, 1781–1792.

Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J.L., Naiman, B., Gross, P.S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., et al. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c hi T-bet + B cells in SLE. Nat. Commun. *9*, 1–14.

Wang, X., Brégégère, F., Frusić-Zlotkin, M., Feinmesser, M., Michel, B., and Milner, Y. (2004). Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *9*, 131–143.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science *301*, 1374–1377.

Warren, S.J.P., Arteaga, L.A., Rivitti, E.A., Aoki, V., Hans-Filho, G., Qaqish, B.F., Lin, M.S., Giudice, G.J., and Diaz, L.A. (2003). The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. J. Invest. Dermatol. *120*, 104–108.

Waschke, J., Spindler, V., Bruggeman, P., Zillikens, D., Schmidt, G., and Drenckhahn, D. (2006). Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. J. Cell Biol. *175*, 721– 727.

Weiske, J., Schöneberg, T., Schröder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R., and Huber, O. (2001). The Fate of Desmosomal Proteins in Apoptotic Cells. J. Biol. Chem. *276*, 41175–41181.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood *104*, 3647–3654.

Wolpowitz, D., and Gilchrest, B.A. (2006). The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it? J. Am. Acad. Dermatol. *54*, 301–317.

Wucherpfennig, K.W., Yu, B., Bhol, K., Monos, D.S., Argyris, E., Karr, R.W., Ahmed, A.R., and Strominger, J.L. (1995). Structural basis for major

histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. Proc. Natl. Acad. Sci. *92*, 11935–11939.

Wulff, H., and Castle, N.A. (2010). Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: an overview of recent advances, and promising trends. Expert Rev. Clin. Pharmacol. *3*, 385–396.

Wulff, H., Knaus, H.-G., Pennington, M., and Chandy, K.G. (2004). K+ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 776–786.



Xu, L., Liu, X., Liu, H., Zhu, L., Zhu, H., Zhang, J., Ren, L., Wang, P., Hu, F., and Su, Y. (2017). Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. Front. Immunol. *8*.

Xu, R.-C., Zhu, H.-Q., Li, W.-P., Zhao, X.-Q., Yuan, H.-J., Zheng, J., and Pan, M. (2013a). The imbalance of Th17 and regulatory T cells in pemphigus patients. Eur. J. Dermatol. EJD *23*, 795–802.

Xu, X., Shi, Y., Cai, Y., Zhang, Q., Yang, F., Chen, H., Gu, Y., Zhang, M., Yu, L., and Yang, T. (2013b). Inhibition of Increased Circulating Tfh Cell by Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Patients with Type 1 Diabetes. PLoS ONE *8*.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012a). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. Nat. Rev. Immunol. *12*, 517–531.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012b). Immunoglobulin class switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. Nat. Rev. Immunol. *12*, 517–531.

Y

Yalçin, B., and Alli, N. (2007). Pemphigus vulgaris following antirabies vaccination. J. Dermatol. *34*, 734–735.

Yamagami, J., Kacir, S., Ishii, K., Payne, A.S., Siegel, D.L., and Stanley, J.R. (2009a). Antibodies to the desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 5615–5621.

Yamagami, J., Kacir, S., Ishii, K., Payne, A.S., Siegel, D.L., and Stanley, J.R. (2009b). Antibodies to the desmoglein 1 precursor proprotein but not to the mature cell surface protein cloned from individuals without pemphigus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 5615–5621.

Yamagami, J., Payne, A.S., Kacir, S., Ishii, K., Siegel, D.L., and Stanley, J.R. (2010). Homologous regions of autoantibody heavy chain complementarity-determining region 3 (H-CDR3) in patients with pemphigus cause pathogenicity. J. Clin. Invest. *120*, 4111–4117.

Yamamoto, Y., Aoyama, Y., Shu, E., Tsunoda, K., Amagai, M., and Kitajima, Y. (2007). Antidesmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. J. Biol. Chem. *282*, 17866–17876.

Yang, J., Siqueira, M.F., Behl, Y., Alikhani, M., and Graves, D.T. (2008). The transcription factor ST18 regulates proapoptotic and proinflammatory gene expression in fibroblasts. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *22*, 3956–3967.

Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.-H., Xu, H., Zheng, B.-J., Cao, X., and Lu, L. (2010). Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 3321–3325.

Yasuda, H., Kobayashi, H., Hashimoto, T., Itoh, K., Yamane, M., and Nakamura, J. (2000). Subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus: demonstration of autoantibodies to desmocollin-1 and clinical review. Br. J. Dermatol. *143*, 144–148.

Yeh, S.-W., Cavacini, L.A., Bhol, K.C., Lin, M.-S., Kumar, M., Duval, M., Posner, M.R., and Ahmed, A.R. (2006). Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. Clin. Immunol. Orlando Fla *120*, 68–75.

Yin, T., and Green, K.J. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. Semin. Cell Dev. Biol. *15*, 665–677.

Yokoyama, T., Matsuda, S., Takae, Y., Wada, N., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. (2011). Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. Int. Immunol. *23*, 365–373.

Yong, A.A., and Tey, H.L. (2013). Paraneoplastic pemphigus. Australas. J. Dermatol. *54*, 241–250.

Yoshida, K., Ishii, K., Shimizu, A., Yokouchi, M., Amagai, M., Shiraishi, K., Shirakata, Y., Stanley, J.R., and Ishiko, A. (2017). Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. J. Dermatol. Sci. *85*, 197–207.

Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D.J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E.I., Spolski, R., Poe, J.C., Leonard, W.J., and Tedder, T.F. (2012). Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. Nature *491*, 264–268.

Youinou, P., and Pers, J.-O. (2010). The late news on baff in autoimmune diseases. Autoimmun. Rev. *9*, 804–806.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. Immunity *31*, 457–468.

Yuan, H., Zhou, S., Liu, Z., Cong, W., Fei, X., Zeng, W., Zhu, H., Xu, R., Wang, Y., Zheng, J., et al. (2017). Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. J. Invest. Dermatol. *137*, 2362–2370.

Z

Zahraoui, A. (2004). Les junctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. Médecine/Sciences *20*, 580–585.

Zakka, L.R., Shetty, S.S., and Ahmed, A.R. (2012). Rituximab in the treatment of pemphigus vulgaris. Dermatol. Ther. *2*, 17.

Zan, H., and Casali, P. (2015). Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. Front. Immunol. *6*.

Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., and Casali, P. (1998). CD40 Engagement Triggers Switching to IgA1 and IgA2 in Human B Cells Through Induction of Endogenous TGF- β : Evidence for TGF- β But Not IL-10-Dependent Direct S μ \rightarrow S α and Sequential S μ \rightarrow S γ , S γ \rightarrow S α DNA Recombination. J. Immunol. 161, 5217–5225.

Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L., and Doria, A. (2011). The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. Autoimmun. Rev. *10*, 305–310.

Zenzo, G.D., Lullo, G.D., Corti, D., Calabresi, V., Sinistro, A., Vanzetta, F., Didona, B., Cianchini, G., Hertl, M., Eming, R., et al. (2012). Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. J. Clin. Invest. *122*, 3781–3790.

Zhang, J., Roschke, V., Baker, K.P., Wang, Z., Alarcón, G.S., Fessler, B.J., Bastian, H., Kimberly, R.P., and Zhou, T. (2001). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *166*, 6–10.

Zhang, Y., Li, J., Zhang, Y.-M., Zhang, X.-M., and Tao, J. (2015). Effect of TACI Signaling on Humoral Immunity and Autoimmune Diseases. J. Immunol. Res. *2015*.

Zhao, C., Li, H.-Z., Zhao, D.-D., Ma, C., Wu, F., Bai, Y.-N., Zhang, M., Li, Z.-Y., and Guo, J. (2017a). Increased Circulating T Follicular Helper Cells Are Inhibited by Rituximab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. Front. Neurol. *8*.

Zhao, H., Liao, X., and Kang, Y. (2017b). Tregs: Where We Are and What Comes Next? Front. Immunol. 8.

Zheng, K., Bantog, C., and Bayer, R. (2011). The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. MAbs *3*, 568–576.

Zheng, Y., Zha, Y., and Gajewski, T.F. (2008). Molecular regulation of T-cell anergy. EMBO Rep. *9*, 50–55.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557–1569.

Zhu, H., Chen, Y., Zhou, Y., Wang, Y., Zheng, J., and Pan, M. (2012). Cognate Th2-B cell interaction is essential for the autoantibody production in pemphigus vulgaris. J. Clin. Immunol. *32*, 114–123.

Zhu, H.-Q., Xu, R.-C., Chen, Y.-Y., Yuan, H.-J., Cao, H., Zhao, X.-Q., Zheng, J., Wang, Y., and Pan, M. (2015). Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus. Br. J. Dermatol. *172*, 101–110.

Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. J. Cell Sci. *113 (Pt 18)*, 3127–3139.

Zimmerman, A., Bai, L., and Ginty, D.D. (2014). The gentle touch receptors of mammalian skin. Science *346*, 950–954.

Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J. Exp. Med. *207*, 365–378.

ANNEXES

<u>ANNEXE N°1</u>:

CURSUS ET PUBLICATIONS

1. CURSUS

2015-2019/Doctorante en Biologie Cellulaire et Moléculaire spécialité Immunologie à l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EdNBISE) sous la direction Pr Joly et du Dr Calbo

2002-2005/Licence et Master Recherche spécialité Physiologie et Biologie Cellulaire et Moléculaire, à l'université de Rouen

2001-2002/Certificat d'Etudes Spécialisées Technologiques en Recherche Biomédicale, option immunologie à l'Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée (ESTBA) à Paris

1999-2001/ Brevet de Technicien Supérieur d'Analyses Biologiques à l'ESTBA à Paris

2. COMMUNICATIONS ORALES

2019/ESDR- Congress of European Society of Dermatological Research:

Maho-Vaillant, M., Pérals, C., Golinski, M-L., Hébert, V., Riou, G., Boyer, O., Viguier, M., Calbo, S., Fazilleau, N. and Joly, P. *Rituximab and corticosteroid effect on Desmoglein specific B cells and T Follicular Helper Cells in patients with Pemphigus.*

2017/JDP- Journées Dermatologiques de Paris :

Maho-Vaillant, M., Caillot, F., Hebert, V., Marie, M., Golinski, M-L., Boyer, O., Joly, P., Calbo, S. Quantification des cellules B autoréactives sécrétrices d'anticorps chez les patients atteints de pemphigus après traitement par rituximab ou corticoïde.

3. COMMUNICATIONS AFFICHEES

2019/ESDR- Congress of European Society of Dermatological Research :

Maho-Vaillant, M., Pérals, C., Golinski, M-L., Hébert, V., Riou, G., Boyer, O., Viguier, M., Calbo, S., Fazilleau, N. and Joly, P. *Evolution of autoreactive B and T cells in pemphigus patients with Rituximab or corticosteroid regimen treatment.*

Mignard, C., Maho-Vaillant, M., Hébert, V., Boyer, O., Calbo, S. and Joly, P. Long-term immunological followup of pemphigus patients treated with rituximab as first line treatment.

2019/*The Annual Meeting of the American Association of Immunologists:*

Calbo, S., Demeules, M., Derambure, C., Riou, G., Maho-Vaillant, M., Boyer, O., Joly, P., and Golinski, M-L. *Characterization of CD11c+ B-cells from human blood.*

2018/CARD- Le Congrès Annuel de Recherche Dermatologique :

Maho-Vaillant, M., Caillot, F., Hebert, V., Marie, M., Golinski, M-L., Boyer, O., Joly, P., Calbo, S. Évolution des lymphocytes B spécifiques des désmogleines chez les patients atteints de pemphigus après traitement par rituximab ou corticoïde.

2018/JDP- Journées Dermatologiques de Paris :

Mignard, C., Hébert, V., Maho-Vaillant, M., Calbo, S., Bénichou, J. et Joly, P. Facteurs de risque de rechute précoce chez les patients atteints de pemphigus traités par rituximab en première ligne.

Hebert, V., **Maho-Vaillant**, **M.**, Golinski, M-L., Calbo, S., Petit, M., Boyer, O. et Joly P. Étude de l'axe BAFF/BAFF-récepteur des lymphocytes B de patients pemphigus traités par rituximab ou corticothérapie. Analyse sérique, transcriptomique et cytométrique.

2017/ESDR- Congress of European Society of Dermatological Research:

Maho-Vaillant, M., Golinski, M-L., Caillot, F. Hébert, V., Petit, M., Riou, G., Boyer, O., Joly, P. and Calbo, S. Autoreactive B-cells phenotype analysis in pemphigus patients before and after anti-CD20 treatment

2017/*JDP- Journées Dermatologiques de Paris :*

Hébert, V., Petit, M., **Maho-Vaillant**, **M.**, Golinski, M.-L., Riou, G., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. Effet du rituximab sur la population B des patients atteints de pemphigus : profils phénotypique et cytokinique avant et après traitement

2016/ESDR- Congress of European Society of Dermatological Research:

Caillot, F., Derambure, C., Berkani, N., Riou, G., Maho-Vaillant, M. et *al*. B-cells transcriptome analysis in pemphigus patients after anti-CD20 treatment

2016/JNRB- Journée normande de recherche biomédicale :

Joly, P., **Maho-Vaillant, M.**, Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M.L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., et al. *First line use of Rituximab versus standard corticosteroid regimen in the treatment of patients with Pemphigus: a multicenter randomized study.*

4. **PUBLICATIONS**

-Évaluation clinique et biologique des effets thérapeutiques du Rituximab chez des patients atteints de pemphigus dans le cadre de Protocole Hospitalier de Recherche Clinique :

Maho-Vaillant, M., Perals, C., Golinski, M-L., Hebert, V., Caillot, F., Mignard C, Riou G., et al. *Rituximab and corticosteroid effect on Desmoglein specific B cells and T Follicular Helper Cells in patients with Pemphigus* (en préparation/Article n°3).

Mignard, C., **Maho-Vaillant, M.**, Golinski, M-L., Balayé, P., Prost-Squarcioni, C., Houivet, E., Calbo, S., Labeille, B., Picard-Dahan, C. et al. *Risk factors for short-term relapse in patients with pemphigus treated by rituximab as first line therapy* (en soumission dans *JAMA dermatology*/Article n°2).

Hébert, V., **Maho-Vaillant**, M., Golinski, M.-L., Petit, M., Riou, G., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. *Modifications* of the BAFF/BAFF-receptor axis in patients with pemphigus treated with rituximab versus standard corticosteroids regimen (en preparation/Annexe n°3).

Chen, D.M., Odueyungbo, A., Csinady, E., Gearhart, L., Lehane, P., Cheu, M., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., et al. (2019). *Rituximab is an Effective Treatment in Patients with Pemphigus Vulgaris and Demonstrates a Steroid-Sparing Effect*. Br. J. Dermatol (Annexe n°2)

Hébert, V., Petit, M., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Riou, G., Derambure, C., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. (2019). *Modifications of the transcriptomic profile of autoreactive b cells from pemphigus patients after treatment with Rituximab or a standard corticosteroid regimen.* Front. Immunol. *10*, 1794.

Caillot, F., Derambure, C., Berkani, N., Riou, G., **Maho-Vaillant, M.**, M., Calbo, S., Joly, P., and Musette, P. (2018). *Long-Term Increase of Kcnn4 Potassium Channel Surface Expression on B Cells in Pemphigus Patients after Rituximab Treatment.* J. Invest. Dermatol. *138*, 2666–2668.

Joly, P., Maho-Vaillant, M., Prost-Squarcioni, C., Hebert, V., Houivet, E., Calbo, S., Caillot, F., Golinski, M.L., Labeille, B., Picard-Dahan, C., et al. (2017). *First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial.* Lancet Lond. Engl.

Colliou, N., Picard, D., Caillot, F., Calbo, S., Le Corre, S., Lim, A., Lemercier, B., Le Mauff, B., Maho-Vaillant, M., Jacquot, S., et al. (2013). *Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response*. Sci. Transl. Med. *5*, 175ra30.

-Identification et caractérisation de sous-population de lymphocytes B : les lymphocytes B régulateurs et les lymphocytes B CD11c⁺:

Golinski, M-L., Demeules, M., Derambure, C., Riou, G, Maho-Vaillant, M., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. *CD11c+ B-cells are mainly memory cells prone to differentiate into antibody-secreting-cells* (en soumission/Annexe n°4).

Lin, W., Cerny, D., Chua, E., Duan, K., Yi, J.T.J., Shadan, N.B., Lum, J., Maho-Vaillant, M., Zolezzi, F., Wong, S.C., et al. (2014). *Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate.* J. Immunol. Baltim. Md 1950 193, 2258–2266.

Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). *IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro.* Eur. J. Immunol. 40, 2686–2691.

-Étude des mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors des toxidermies :

Sabbah, B., Janela, B., Maho-Vaillant, M. et *al. Drug dependent IL-10 and TNF* α regulation in DRESS patients (en préparation)

-Étude des chimiokines dans la réponse anti-tumorale :

Lavergne, E., Combadière, C., Iga, M., Boissonnas, A., Bonduelle, O., Maho, M., Debré, P., and Combadière, B. (2004). Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. J. Immunol. Baltim. Md 1950 173, 3755–3762.

Boissonnas, A., Combadiere, C., Lavergne, E., Maho, M., Blanc, C., Debré, P., and Combadière, B. (2004). Antigen distribution drives programmed antitumor CD8 cell migration and determines its efficiency. J. Immunol. Baltim. Md 1950 173, 222–229.

Lavergne, E., Combadière, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J.-L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P.M., Debré, P., and Combadière, C. (2003). Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. Cancer Res. 63, 7468–7474.

ANNEXE N°2 :

RITUXIMAB IS AN EFFECTIVE TREATMENT IN **P**ATIENT WITH PEMPHIGUS VULGARIS AND DEMONSTRATES A STEROID EFFECT

Chen D.M., Odueyungbo A., Csinady E., Gearhart L., Lehane P., Cheu M., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Prost-Squarcioni C., Hebert V., Houivet E., Calbo S., Caillot F., Golinski M.L., Labeille B., Picard-Dahan C., Paul C., Richard M.A., Bouaziz J.D., Duvert-Lehembre S., Bernard P., Caux F., Alexandre M., Ingen-Housz-Oro S., Vabres P., Delaporte E, Quereux G., Dupuy A., Debarbieux S., Avenel-Audran M., D'Incan M., Bedane C., Bénéton N., Jullien D., Dupin N., Misery L., Machet L., Beylot-Barry M., Dereure O., Sassolas B., Benichou J., Musette P., Joly P., and the French Study Group on Autoimmune Bullous Diseases

Accepté dans BJD (Britsh Journal of Dermantology)

L'essai clinique « RITUX 3 » a montré que l'utilisation du RTX associé à de la prednisone à court terme en traitement de première intention chez les patients atteints de pemphigus modéré à sévère est à la fois plus efficace et mieux toléré que le traitement de référence par la prednisone seule.

Afin d'obtenir l'approbation des autorités sanitaires pour l'utilisation du RTX dans le PV, nous avons collaboré avec le laboratoire Roche pour analyser uniquement les données des patients atteints de PV.

Après 24 mois de traitement, 89,5% des patients atteints de PV traités par le RTX associé à de la prednisone à court terme ont obtenu une rémission complète sans traitement *versus* 27,8% des patients traités par la prednisone seule. De plus, les patients traités par le RTX ont reçu une dose cumulée de prednisone plus faible et présenter moins d'effets indésirables graves ou mettant en jeu le pronostic vital que les patients traités par la prednisone seule.

En conclusion, chez les patients présentant un PV modéré à sévère, le RTX associé à la prednisone à court terme s'est avéré plus efficace que la prednisone seule. Ces résultats ont mené à l'obtention des approbations réglementaires pour l'utilisation du RTX chez les patients atteints de PV aux États-Unis et en Europe.

-291-

Article type : Original Article

Title: Rituximab is an Effective Treatment in Patients with Pemphigus Vulgaris and Demonstrates a Steroid-Sparing Effect

Running head: Rituximab in Pemphigus Vulgaris

D.M. Chen,¹ A. Odueyungbo,² E. Csinady,³ L. Gearhart,³ P. Lehane,⁴ M. Cheu,¹ M. Maho-Vaillant,⁵ C. Prost-Squarcioni,⁶ V. Hebert,⁵ E. Houivet,⁷ S. Calbo,⁵ F. Caillot,⁵ M.L. Golinski,⁵ B. Labeille,⁸ C. Picard-Dahan,⁹ C. Paul,¹⁰ M.A. Richard,¹¹ J.D. Bouaziz,¹² S. Duvert-Lehembre,⁵ P. Bernard,¹³ F. Caux,⁶ M. Alexandre,⁶ S. Ingen-Housz-Oro,¹⁴ P. Vabres,¹⁵ E. Delaporte,¹⁶ G. Quereux,¹⁷ A. Dupuy,¹⁸ S. Debarbieux,¹⁹ M. Avenel-Audran,²⁰ M. D'Incan,²¹ C. Bedane,²² N. Bénéton,²³ D. Jullien,²⁴ N. Dupin,²⁵ L. Misery,²⁶ L. Machet,²⁷ M. Beylot-Barry,²⁸ O. Dereure,²⁹ B. Sassolas,³⁰ J. Benichou,⁷ P. Musette,⁵ P. Joly,⁵ and the French Study Group on Autoimmune Bullous Diseases

¹Genentech, Inc, South San Francisco, CA, 94080, USA; ²Roche Products Ltd, Mississauga, ON L5N 5M8, Canada; ³F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland 4070; ⁴Roche Products Ltd, Welwyn City Garden AL7 1TW, UK; ⁵Department of Dermatology, Rouen University **Ho**spital, and INSERM U 1234, National Reference Centre on Autoimmune Bullous Disease, Normandy University, 76000 Rouen, France, ⁶Department of Dermatology, Avicenne Hospital and INSERM UMR1125, Paris 13 University, 93000 Bobigny, France; ⁷Department of Biostatistics, Rouen University Hospital and INSERM U1181, Normandy University, 76000 Rouen, France; ⁸Department of Dermatology, University of Saint Etienne, 42023 Saint Etienne, France; ⁹Department of Dermatology of Bichat – Claude Bernard Hospital, 75018 Paris, France; ¹⁰Department of Dermatology, University of Toulouse, 31013 Toulouse,

France; ¹¹Department of Dermatology, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Aix This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/bjd.18482

Marseille University, UMR 911, INSERM CRO2, 13007 Marseille, France; ¹²Department of Dermatology of Saint Louis Hospital, Paris 7 Sorbonne Paris Cité University, 75010 Paris, France; ¹³Department of Dermatology, University of Reims, 51100 Reims, France; ¹⁴Department of Dermatology, APHP, Henri Mondor Hospital, 94010 Créteil, France; ¹⁵Department of Dermatology, Dijon University Hospital, 21079 Dijon, France; ¹⁶Department of Dermatology, University of Lille and Claude-Huriez Hospital, 59037 Lille, France; ¹⁷Department of Dermatology, University of Nantes, 44035 Nantes, France; ¹⁸Department of Dermatology, University of Rennes, 35042 Rennes, France; ¹⁹Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France; ²⁰Department of Dermatology, University of Angers, 49035 Angers, France; ²¹Department of Dermatology, University of Clermont-Ferrand, 63001 Clermont-Ferrand, France; ²²Department of Dermatology, University of Limoges, 87032 Limoges, France; ²³Department of Dermatology, Le Mans General Hospital, 72037 Le Mans, France; ²⁴Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, Lyon Claude Bernard University, 69003 Lyon, France; ²⁵Department of Dermatology, Cochin Hospital, University of Paris V, 75006 Paris, France; ²⁶Department of Dermatology, Brest University Hospital, 29200 Brest, France; ²⁷Department of Dermatology, Tours University Hospital, 37044 Tours, France; ²⁸Department of Dermatology, University of Bordeaux, Bordeaux, France; ²⁹Department of Dermatology, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France; ³⁰Department of Internal Medicine, Brest University Hospital, 29200 Brest, France

Corresponding author:

Diana Chen, MD, MBA 1 DNA Way, MS 451B South San Francisco, CA 94080, USA Telephone: +1-650-225-1034 eFax: +1-650-275-9120 Email: chen.diana_m@gene.com

Funding sources: F. Hoffmann-La Roche, French Ministry of Health, and French Society of Dermatology

Conflicts of Interest: D. M. Chen and M. Cheu are employees of Genentech. A. Odueyungbo, E. Csinady, L. Gearhart and P. Lehane are employees of Roche. P. Joly is a consultant for Roche, GSK, Lilly, Principia Biopharma, and Sanofi Aventis. F. Caux is a consultant for Pierre Fabre Dermatologie and Principia Biopharma. P. Musette is a consultant for Servier and the Singapore Immunology Network. D. Jullien is a consultant for Abbvie, Celgene, Novartis, Lilly, Janssen Cilag, Pfizer, and Merck Sharpe & Dohme. All other authors declare no competing interests.

Statements

What's already known about this topic?

- o Pemphigus vulgaris (PV) is the most common type of pemphigus
- Corticosteroids, a standard first-line treatment for PV, have significant side effects
- Although their effects are unproven, adjuvant corticosteroid-sparing agents are routinely used to minimize steroid exposure and corticosteroid-related side effects

 There is evidence that the anti-CD20 antibody rituximab is effective in the treatment of patients with severe, recalcitrant pemphigus and in patients with newly diagnosed pemphigus

What do these study results add?

- This is a more detailed analysis of PV patients, a subset of the pemphigus population, enrolled in an investigator-initiated trial
- Rituximab plus prednisone was steroid-sparing, more patients achieved complete remission off prednisone, of longer duration, and fewer patients experienced Grade 3 or 4 steroid-related events than prednisone alone
- This collaboration between academia and industry, utilizing independent posthoc analyses, led to regulatory authority approvals of rituximab in moderate to severe PV

Summary

Background: Corticosteroids (CS) with or without adjuvant immunosuppressant agents are standard treatment for pemphigus vulgaris (PV). The efficacy of adjuvant therapies in minimising steroid-related adverse events (AEs) is unproven.

Objective: To utilise data collected in a French investigator-initiated, phase 3, open-label, randomized, controlled trial to demonstrate the efficacy and safety of rituximab and seek approval from health authorities for its use in PV.

Methods: This is an independently-conducted, post-hoc analysis of the moderate to severe PV subset enrolled in the Ritux-3 study (ClinicalTrials.gov NCT00784589). Patients were randomized to rituximab plus 0.5 or 1.0 mg/kg/day prednisone tapered over 3 or 6 months or 1.0 or 1.5 mg/kg/day prednisone-alone tapered over 12 or 18 months, respectively,

according to disease severity. The primary endpoint was complete remission at Month 24 without CS (CRoff) for ≥2 months. The 24-month efficacy and safety results, including CS exposure and CS-related AEs, are reported.

Results: At Month 24, 34/38 (89.5%) on rituximab plus prednisone achieved CRoff \geq 2 months vs 10/36 (27.8%) prednisone-alone. Median total cumulative prednisone dose was 5800-mg rituximab plus prednisone vs 20,520 mg prednisone-alone. Eight/36 (22.2%) prednisone-alone patients withdrew from treatment due to AEs; one rituximab-plus-prednisone patient withdrew due to pregnancy. 24/36 (66.7%) on prednisone-alone experienced a Grade 3 or 4 CS-related AE vs 13/38 (34.2%) on rituximab plus prednisone.

Conclusions: In patients with moderate to severe PV, rituximab plus short-term prednisone was more effective than prednisone alone. Rituximab-treated patients had less CS exposure and were less likely to experience severe or life-threatening CS-related AEs.

INTRODUCTION

Pemphigus is a group of autoimmune bullous disorders involving mucous membranes and/or skin.¹ The most common type of pemphigus is pemphigus vulgaris (PV), comprising approximately 80% of pemphigus diagnoses in the United States and Europe followed by pemphigus foliaceus (PF).² PV is mediated by circulating autoantibodies targeting desmoglein (Dsg)-3 and, in some patients, also Dsg-1, resulting in the loss of epidermal cell-cell adhesion.¹

The use of corticosteroids (CS) in treating PV is well established. Reported rates of remission vary but occur, on average, in approximately 25% of patients treated with CS alone.³ The unsatisfactory safety profile of chronic high-dose CS therapy, including diabetes, hypertension, gastrointestinal bleeding and ulceration, myopathy, osteoporosis, osteonecrosis, infection, and death,^{2,4-6} has led to combining CS with an immunosuppressive

agent, such as azathioprine or mycophenolate mofetil and to minimising steroid exposure.⁷⁻¹⁰ Despite widespread use, it is controversial whether these steroid-sparing agents are beneficial.¹¹

Rituximab is a chimeric, humanized anti-CD20 monoclonal antibody¹² believed to exert its clinical effects in pemphigus through depletion of Dsg-specific immunoglobulin G– positive B lymphocytes.¹³ The efficacy of rituximab in the treatment of severe, recalcitrant pemphigus has been reported in the literature for the past decade. In patients with newly diagnosed pemphigus, Joly et. al¹⁴ Ritux-3 study demonstrated that rituximab plus short-term CS was safe and significantly more effective than CS alone.

Roche was granted Orphan Drug Designation and Breakthrough Therapy Designation to rituximab for the treatment of PV by the US Food and Drug Administration (FDA). The lead investigator, Rouen University Hospital, and Roche then collaborated and Roche independently analyzed data collected from patients diagnosed with PV (excluding patients with PF) in the Ritux 3 study and submitted applications to seek regulatory approvals for rituximab as a treatment for moderate to severe PV in the United States and the European Union. The 24-month study treatment results of this independent post-hoc analysis of PV patients are reported herein. These results in PV patients extend the published findings of Joly et al¹⁴.

MATERIALS AND METHODS

Study design

The Ritux 3 study was sponsored by Rouen University Hospital, Rouen, France (Rouen) and designed, managed and conducted by the French Study Group on Autoimmune Bullous Diseases.¹⁴ Roche provided the rituximab during the 24-month study treatment period. The Ethics Committee (CPP Nord-Ouest1) approved the study.

Patients were stratified by disease severity (moderate or severe)¹⁵ and randomized 1:1 to rituximab plus short-term, low-dose prednisone (rituximab plus prednisone arm) or long-term, standard-dose prednisone (prednisone-alone arm). After achievement of disease control, doses of prednisone were tapered (**Table S1**). Patients in the rituximab plus prednisone arm received an initial intravenous (IV) infusion of 1000 mg rituximab on Study Day 1 in combination with 0.5 mg/kg/day oral prednisone tapered off over 3 months (moderate disease) or 1 mg/kg/day oral prednisone tapered off over 6 months (severe disease) and a second IV infusion of 1000 mg rituximab on Study Day 15. Maintenance infusions of rituximab 500 mg were administered at Months 12 and 18. Patients randomised to prednisone received an initial 1 mg/kg/day oral prednisone tapered off over 12 months (moderate disease) or 1.5 mg/kg/day oral prednisone tapered off over 18 months (severe disease). A similar CS tapering regimen in the prednisone-alone arm as for the rituximab plus prednisone arm was unacceptable, because it was not standard of care and could result in artificially high relapse rates.

Patients treated with rituximab who relapsed could receive an additional infusion of rituximab 1000 mg in combination with reintroduced or escalated prednisone dose. Maintenance and relapse infusions were administered no sooner than 16 weeks following the previous infusion. Patients treated with prednisone who relapsed resumed or escalated their prednisone dose. If relapse occurred during the prednisone taper, the prednisone dose was increased to a prior dose level that permitted disease control. If relapse occurred after prednisone withdrawal, prednisone was resumed at a dose of 0.3 mg/kg/day or 0.5 mg/kg/day depending on the severity of relapse.

Patients

All patients provided written informed consent before study participation. Patients were 18 to 80 years old, newly diagnosed, had moderate or severe disease by Harman's criteria¹⁵ and had no prior therapies for pemphigus. Only patients with PV were included in the efficacy and safety analyses conducted for the applications seeking regulatory approval for rituximab use in PV and are presented in the current manuscript. (See **Supplemental Materials** for primary analysis results in PF patients).
Statistical analyses and methods

Trial data and associated documents (such as case report forms and randomization specification) were obtained from Rouen, translated into English and formatted according to regulatory submission requirements (Clinical Data Interchange Standards Consortium Data Exchange Standards and coding of adverse events [AEs] using Medical Dictionary for Regulatory Activities) and analysed according to an independent statistical analysis plan prepared by Roche.

Descriptive analysis was used to compare the rituximab plus prednisone and prednisone-alone arms for proportion of patients who achieved complete remission (CR) off CS therapy (CRoff), median cumulative dose of prednisone and proportion of patients who relapsed. Last observation carried forward imputation was used to impute prednisone data for missed visits. Infusion-related reactions (IRRs) and CS-related AEs were identified through post-hoc Roche medical review.

This study did not have a prospective plan for immunogenicity assessment; therefore, antidrug antibodies (ADA) were measured from frozen serum samples as a posthoc retrospective evaluation. A validated bridging ELISA was used for detection and characterization of ADA with rituximab-naive PV patients as controls.

CD19+ B cells and anti-desmoglein results are described in Supplemental

Materials.

Study outcomes

The primary endpoint was the proportion of patients at Month 24 who achieved CR on 0 mg prednisone for at least 2 consecutive months (CRoff \geq 2 months). CRoff \geq 3 months at Month 24 was also analysed. CR was defined as complete epithelialization and absence of new and/or established skin and mucosal lesions. Secondary objectives included proportion of patients who relapsed (relapse defined as the appearance of \geq 3 new lesions in 1 month that did not heal spontaneously within 1 week or the extension of established lesions in a patient who had previously achieved disease control), median cumulative prednisone dose at Month 24, duration off CS therapy in patients who responded at Month 24, and incidences of

treatment-related AEs, all serious AEs (SAEs), and CS-related AEs. For IRRs, symptoms of intolerance to treatment were documented at the first planned visit after the infusion.

RESULTS

Patient disposition and baseline characteristics

In total, 74 patients with PV were randomized to receive rituximab plus prednisone (n = 38) or prednisone alone (n = 36) (**Fig 1**). The median cumulative dose of rituximab at Month 24 was 3000 mg. The treatment arms were similar with respect to age, body mass index and body surface area (**Table 1**). The median (range) age was 51.5 (25-79) years. Overall, 66/74 (89.2%) patients had moderate to severe PV by Harman's criteria and 59/74 (79.7%) patients according to Pemphigus Disease Area Index score \geq 15.¹⁶ There were more female patients in the rituximab plus prednisone arm than the prednisone-alone arm (27/38 [71.1%)] vs 15/36 [41.7%]). One patient in the rituximab plus prednisone arm (2.6%) withdrew from treatment due to pregnancy and delivered a full-term healthy baby. In the prednisone-alone arm, 12/36 (33.3%) patients withdrew from treatment: 8¹ (22.2%) due to AEs, 4 (11.1%) due to other reasons (treatment not effective in 3 patients and patient decision in 1), and 1 (2.8%) due to loss of follow-up.

Clinical efficacy

At Month 24, the proportion of patients who achieved CRoff ≥ 2 months was higher in the rituximab plus prednisone arm than prednisone alone (4/38 [89.5%] vs 10/36 [27.8%]) (**Table 2**). These results were consistent for men (10/11 [90.9%] vs 6/21 [28.6%]) and women (24/27 [88.9%] vs 4/15 [26.7%]). The proportion of patients who achieved CRoff ≥ 3 months at Month 24 was also higher in the rituximab plus prednisone arm than in the prednisone-alone arm (34/38 [89.5%] vs 9/36 [25.0%]). Median duration of CRoff ≥ 2 months at Month 24 was longer in rituximab plus prednisone-treated patients than in prednisone-

¹ 1 patient withdrew due to AE and treatment not effective

alone-treated patients (498.5 vs 125.0 days). Fewer patients in the rituximab plus prednisone arm had a severe or moderate relapse at Month 24 compared with the prednisone-alone arm (9/38 [23.7%] vs 18/36 [50.0%]) (**Table 2**). In addition, fewer patients in the rituximab plus prednisone arm had \geq 1 relapses (7 patients relapsed once and 2 patients relapsed twice) than in the prednisone-alone arm (12 patients relapsed once, 5 patients relapsed twice, and 1 patient relapsed three times).

Median prednisone doses decreased over the course of the study in both arms as reflected by the CS tapering regimen; however, patients in the rituximab plus prednisone arm had a median dose of prednisone 0 mg at Month 6 for the remainder of the 24-month treatment duration (**Fig. 2**). Median (range) cumulative prednisone exposure at Month 24 was 5800 (2304-29,303) mg in the rituximab plus prednisone arm compared with 20,520 (2409-60,565) mg in the prednisone-alone arm. The number of patients in the rituximab plus prednisone arm off prednisone or on minimal therapy (prednisone dose $\leq 10 \text{ mg/day}$) compared to the prednisone-alone arm over the 24-month treatment period showed a steroid-sparing effect of rituximab (**Figure 3**). CRmin (inclusive of prednisone dose 0 mg/day) \geq 2 months at Month 24 was higher in the rituximab plus prednisone arm compared to the prednisone arm (**Table 2**). Clinical images of rituximab-treated patients are shown in **Figure 4**.

Safety

Treatment-related AEs that occurred at a rate of \geq 5% among patients in either treatment arm are shown in **Table 3**. Treatment-related AEs reported in \geq 15% of patients in the rituximab plus prednisone arm were IRR, insomnia, depression, and Cushing's syndrome; in the prednisone-alone arm, these AEs were insomnia, weight increased, Cushing's syndrome, bronchitis, tremor, arthralgia, asthenia, agitation, and muscle disorder. In the rituximab plus prednisone arm, 11/38 (28.9%) patients experienced 28 Grade 3 treatment-related AEs and 2/38 (5.3%) experienced 7 Grade 4 treatment-related AEs. In the prednisone-alone arm, 19/36 (52.8%) patients experienced 53 Grade 3 AEs and 3/36 (8.3%) experienced 4 Grade 4 AEs. The Grade 3 and 4 treatment-related AEs that occurred in \geq 10% of patients in either treatment arm were Cushing's syndrome (6/38 [15.8%] vs 7/36 [19.4%]), muscle disorder (1/38 [2.6%] vs 7/36 [19.4%]), myopathy (0% vs 4/38 [11.1%]) and weight increased (0% vs 4/38 [11.1%]).

SAEs occurred through Month 24 in 11 (28.9%) rituximab plus prednisone patients and in 16 (44.4%) prednisone-alone patients (**Table 4**). One patient treated with rituximab plus prednisone withdrew due to pregnancy. In the prednisone-alone arm, 8 patients (22.2%) withdrew from treatment due to 10 SAEs, including necrosis of the femoral heads, CSinduced myopathy, Cushing's syndrome, weight increased, psychiatric decompensation, and chorioretinitis. No patients died during the study.

Onset of Grade 4 and most frequent (≥5% of patients) Grade 3 events is shown in **Supplemental Materials**.

Infusion-related reactions

Overall, 22 patients (57.9%) in the rituximab plus prednisone arm experienced ≥1 IRR at any time during the study, none of which were fatal or led to discontinuation of rituximab. IRRs occurred primarily at the first (11 patients [28.9%]) and second infusions (15 patients [39.5%]), and the incidence decreased to 13.2% and 10.5% for the third and fourth infusions, respectively. All IRRs were mild to moderate (Grades 1 or 2) except for 1 Grade 3 SAE (arthralgia). No patients withdrew due to IRRs.

Infections

Treatment-related infections occurred in 14 patients (36.8%) in the rituximab plus prednisone arm and 15 patients (41.7%) in the prednisone-alone arm. The most frequent infections (≥5% in either treatment arm) were bronchitis (3/38 [7.9%] vs 7/36 [19.4%]), herpes simplex infection (5/38 [13.2%] vs 1/36 [2.8%]), urinary tract infection (2/38 [5.3%] vs 3/36 [8.3%]), fungal infection (2/38 [5.3%] vs 2/36 [5.6%]), skin bacterial infection (1/38 [2.6%] vs 3/36 [8.3%]), herpes zoster infection (2/38 [5.3%] vs 1/36 [2.8%]), and conjunctivitis (2/38 [5.3%]

vs 0). Three patients (7.9%) in the rituximab plus prednisone arm experienced 5 serious infections (1 patient with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia²; 1 patient with infective thrombosis, intervertebral discitis, and staphylococcal sepsis; and 1 patient with lung infection), and 1 patient (2.8%) in the prednisone-alone arm experienced 1 serious infection (*Pneumocystis jirovecii* pneumonia).

CS-related AEs

The number of patients with \geq 1 CS-related AE was similar in both treatment arms (31/38 [81.6%] in the rituximab plus prednisone arm and 31/36 [86.1%] in the prednisone-alone arm); however, fewer rituximab plus prednisone patients experienced Grade 3 (severe) or 4 (life-threatening) CS-related AEs than prednisone-alone patients (13/38 [34.2%] and 22/36 [61.1%], respectively). The difference between treatment arms was mainly due to more prednisone patients experiencing Grade 3 or 4 myopathy, muscle disorder, and weight increase. The majority of Grade 3 or 4 CS-related AEs in both treatment arms occurred within the first 9 months of treatment. In the rituximab plus prednisone arm, none of the CS-related AEs led to study withdrawal. In the prednisone-alone arm, 6 patients were withdrawn due to CS-related AEs.

Immunogenicity

Thirty-four patients in the rituximab plus prednisone arm had stored serum samples at baseline and ≥1 time point post-baseline that were evaluable and analysed retrospectively for ADA status (methods described in **Supplemental Materials**). Twenty patients (58.8%) had ≥1 positive ADA titre at any time before Month 24. Of these 20 ADA positive patients, 17 (85.0%) achieved the primary endpoint. Seven of 20 (35.0%) experienced an IRR after testing positive for ADA compared with 6/14 patients (42.9%) who were ADA negative. No severe or serious IRRs occurred in patients with a positive ADA titre.

² No PCP prophylaxis was given in the trial.

DISCUSSION

This manuscript presents the unique and successful collaboration between academia and industry using investigator-initiated trial data from patients with PV. The efficacy and safety data in the subset of patients with PV are more detailed analyses of patient outcomes that extend the published findings of Joly et al¹⁴. These analyses led to the FDA and the European Commission granting approvals for use of rituximab as a treatment in patients with moderate to severe PV.¹²

A higher proportion of patients with moderate to severe PV on rituximab and shortterm, low-dose CS achieved CR and successfully tapered off CS for ≥ 2 and ≥ 3 months at Month 24 compared with patients receiving a standard high-dose and long-term CS regimen. Rituximab plus prednisone-treated patients had a longer median duration of CRoff ≥ 2 months. The number and frequency of relapses and the number of patients experiencing severe or moderate relapse were lower in the rituximab plus prednisone arm than in the prednisone-alone arm. There was no effect of gender on the proportion of patients achieving CRoff ≥ 2 months at Month 24. ADA status appeared to have no impact on the achievement of CRoff ≥ 2 months at Month 24.

B-cell depletion and therefore reduction of anti-desmoglein 1 and 3 autoantibodies were supportive for the mode-of-action of rituximab in pemphigus vulgaris (see Supplemental Materials).

Rituximab was well tolerated in patients with PV and had a steroid-sparing effect. Fewer patients in the rituximab plus prednisone arm developed Grade 3 or 4 CS-related AEs than in the standard dose prednisone-alone arm. The greater frequency and number of Grade 3 and 4 events related to CS in the prednisone-alone arm can be explained by the greater prednisone exposure (dose and duration). Treatment discontinuations due to CS-related AEs were reported in the prednisone-alone arm only. No new safety concerns were identified. The safety profile of rituximab, including occurrence and severity of infection, was consistent with its known profile in the approved autoimmune indications, rheumatoid arthritis, granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis.¹² Although more patients in the rituximab plus prednisone arm experienced serious infections than the prednisone-alone arm, these infections were manageable and did not result in treatment discontinuation. The nature and severity of IRR symptoms of rituximab were similar to those previously reported for autoimmune indications and occurred primarily at the first and second infusions. Similar proportions of patients with ADA positivity and negativity experienced IRRs. The presence of ADA did not appear to impact the safety and efficacy of rituximab in patients with PV.

This study has its limitations. First, although the study had an open-label design and the standard dose and duration prednisone regimen could have been favored over the low dose prednisone plus rituximab regimen, the efficacy results showed greater benefit in rituximab plus prednisone-treated patients. Furthermore, sensitivity analyses were conducted to assess the robustness of the efficacy results (described in Supplemental Materials) and showed that bias is unlikely to explain the large treatment effect of rituximab compared to prednisone. Secondly, IRRs were derived from retrospective reporting of symptoms of intolerance, and the conservative approach of identifying all symptoms of intolerance and AEs occurring the day of or 1 day after infusion as IRRs may have led to the overestimation of patients with ≥ 1 IRR. More patients experiencing an IRR at the second infusion may have been influenced by the fact that AEs were first documented with the second infusion and were reported retrospectively for the first infusion. A third limitation is that while related and unrelated SAEs were reported, only nonserious AEs considered to be treatment-related were recorded. Finally, comparisons of the incidence of antibodies to rituximab between our immunogenicity assay and a different assay used in previous trials in different patient populations are not possible because of differences in assay sensitivity and specificity, sample handling, collection time, post-hoc analysis of frozen serum samples, and/or other factors.

CONCLUSIONS

The treatment regimen of rituximab plus prednisone compared with prednisone alone showed the compelling efficacy of rituximab at achieving CRoff ≥2 months in patients with PV. Rituximab had clinically meaningful benefit and allowed for a steroid-sparing regimen of lower cumulative doses of prednisone over a shorter duration. Fewer rituximab-treated patients experienced severe and life-threatening CS-related AEs than patients treated with standard dose and duration prednisone. ADA positivity did not appear to have a negative impact on efficacy or safety outcomes. No new safety concerns with rituximab were identified in patients with moderate to severe PV.

Acknowledgments

We wish to thank the investigators in the French Study Group on Autoimmune Bullous Diseases who designed the Ritux 3 study and collected data on their study patients and the patients who participated in the Ritux 3 study. We also wish to thank Rouen University who allowed Roche to have access to the study database and supporting documents and Everest Clinical Research for assisting Roche with the independently conducted data analysis and review of document translations. Support for third-party writing assistance for this manuscript, furnished by Health Interactions, Inc, was provided by F. Hoffmann-La Roche.

ADA, antidrug antibody AE, adverse event CR, complete remission CRoff, complete remission off corticosteroid (prednisone) therapy CS, corticosteroids Dsg, desmoglein IRR, infusion-related reaction ITT, intention-to-treat PDAI, pemphigus disease area index

PF, pemphigus foliaceus

Abbreviations

- PV, pemphigus vulgaris
- SAE, serious adverse event
- US FDA, United States Food and Drug Administration

References

1 Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmunity Reviews* 2014; **13**:477-481.

2 Toth GG, Jonkman MF. Therapy of pemphigus. *Clin Dermatol* 2001; **19**:761-7.

3 Bystryn JC. Adjuvant therapy of pemphigus. Arch Dermatol 1984; 120:941-51.

4 Carson PJ, Hameed A, Ahmed AR. Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1996; **34**:645-52.

5 Almugairen N, Hospital V, Bedane C, et al. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. *J Am Acad Dermatol* 2013; **69**:583-8.

6 Lester RS, Knowles SR, Shear NH. The risks of systemic corticosteroid use. *Dermatol Clin* 1998; **16**:277-88.

7 Murrell DF, Pena S, Joly P, et al. Diagnosis and Management of Pemphigus: recommendations by an International Panel of Experts. *J Am Acad Dermatol* 2018; **Feb 10. pii**: S0190-9622(18)30207-X. **doi:** 10.1016/j.jaad.2018.02.021.

8 Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, et al. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol* 2010; **130**:2041-8.

9 Martin LK, Werth V, Villanueva E, et al. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1):CD006263. doi:CD006263.

10 Harman KE, Brown D, Exton LS, et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of pemphigus vulgaris 2017. *Br J Dermatol* 2017; **177**:1170-201.

11 Martin LK, Werth VP, Villaneuva EV, Murrell DF. A systematic review of randomized controlled trials for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 2011; **64**:903-8.

12 Rituxan (rituximab) injection, for intravenous use: US prescribing information. South San Francisco, CA: Genentech, Inc. 2018.

13 Colliou N, Picard D, Caillot F, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci Transl Med* 2013; **5**:175ra30.

14 Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* 2017; **389**:2031-40.

15 Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, et al. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001; **144**:775-80.

16 Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard- Dahan C, et al. Calculation of cut- off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. *Br J Dermatol* 2016; **175**:142-9.

17 Shankar G, Arkin S, Cocea L, et al. Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. *AAPS J* 2014; **16**:658-73.

Figure Legend

Figure 1. Patient disposition. AE, adverse event; ITT, intention-to-treat; PF, pemphigus foliaceus, PV, pemphigus vulgaris.

* Withdrawal from treatment due to pregnancy; [†]AEs included corticosteroid-induced myopathy, necrosis of femoral heads, Cushing's syndrome, psychiatric decompensation, chorioretinitis; [‡] One prednisone patient discontinued treatment due to ineffectiveness of treatment (Other) and withdrew from the study due to SAEs of dyspnoea and oedema.

Figure 2. Median prednisone dose over time.

Figure 3: Number of patients who were off or on minimal corticosteroid (<10mg/day) therapy over time.

Figure 4. Pemphigus vulgaris (PV). (a) Oral involvement in a patient with severe PV at Baseline (PDAI 38) and (b) at Month 4 (PDAI 2) after treatment with rituximab plus prednisone. (c) Oral mucosal involvement in a patient with severe PV before and (d) at Month 2 after treatment with rituximab plus prednisone.

Tables and Figures

	Rituximab + Prednisone	Prednisone alone	Total
	(n = 38)	(n = 36)	(N = 74)
Sex			
Female, n (%)	27 (71.1)	15 (41.7)	42 (56.8)
Male, n (%)	11 (28.9)	21 (58.3)	32 (43.2)
Age, years			
Mean (SD)	54.7 (16.2)	51.8 (13.4)	53.3 (14.8)
Median (range)	55.0 (25-79)	49.0 (30-79)	51.5 (25-79)
Baseline weight, kg			
Mean (SD)	68.3 (21.4)	75.2 (18.7)	71.7 (20.3)
Median (range)	63.0 (43-177)	74.5 (43-155)	69.5 (43- 177)
Baseline body mass index, kg/m ²			
Mean (SD)	27.0 (15.26)	25.7 (5.13)	26.4 (11.45)
Median (range)	25.4 (15-115)	25.3 (17-46)	25.3 (15-115)
Severity of PV (by Harman's criteria)			
Moderate, n (%)	5 (13.2)	3 (8.3)	8 (10.8)
Severe, n (%)	33 (86.8)	33 (91.7)	66 (89.2)
PDAI score, 0-250			
Mean (SD)	34.1 (29.5)	46.6 (23.6)	40.1 (27.4)
Median (range)	26.0 (3-131)	55.0 (7-106)	33.0 (3-131)
Duration of cutaneous lesions, days			
Mean (SD)	111.3 (274.3)	94.4 (134.0)	103.1 (216.4)
Median (range)	38.5 (0-1590)	50.0 (0-622)	44.0 (0-1590)

Table 1. Baseline demographics and disease characteristics

Duration of mucosal lesions, days			
Mean (SD)	138.7 (131.5)	115.4 (130.1)	127.4 (130.5)
Median (range)	109.0 (0-571)	84.0 (1-391)	94.0 (0-691)

PDAI, Pemphigus Disease Area Index; PV, pemphigus vulgaris.

Table 2. Summary of efficacy endpoints at Month 24

	Rituximab + prednisone (n = 38)	Prednisone alone (n = 36)	Difference (95% Cl)	p-value [#]
Primary endpoint:			61.7%	p<0.0001**
CRoff ≥2 months, n (%)	34 (89.5)	10 (27.8)	(38.4% to 76.5%)*	
Duration of CRoff ≥2 months, median (IQR), days	498.5 (266.0- 527.0)	125.0 (98.0-189.0)	373.5 (N/A)	p=0.0030^
Patients with ≥1 severe or moderate relapse, n (%)	9 (23.7)	18 (50.0)	−26.3% (−46.7% to −2.5%)*	p=0.0229**
CRmin ≥2 months, n (%)	34 (89.5)	12 (33.3)		p<0.0001**

CRoff, complete remission off prednisone therapy; *IQR*, interquartile range; *N/A*, not applicable; CRmin, complete remission on minimal prednisone therapy (prednisone dose \leq 10 mg/day)

* 95% confidence interval is corrected Newcombe interval.

[#]No adjustment for multiplicity was made for any secondary endpoints and the p-values should be interpreted with caution

**p-value is Fisher's exact test with mid-p correction

^p-value is Mann-Whitney U test

Adverse Event	Rituximab + prednisone (n = 38)	Prednisone alone (n = 36)		
Musculoskeletal and connective tissue disorders, patients, n (%)				
Arthralgia	5 (13.2)	6 (16.7)		
Muscle spasms	2 (5.3)	5 (13.9)		
Myalgia	3 (7.9)	4 (11.1)		
Myopathy	2 (5.3)	5 (13.9)		
Intravertebral disc compression	2 (5.3)	2 (5.6)		
Muscle disorder	1 (2.6)	7 (19.4)		
Osteoporosis	1 (2.6)	2 (5.6)		
Musculoskeletal disorder	0	2 (5.6)		
Musculoskeletal pain	2 (5.3)	0		
Osteopenia	0	2 (5.6)		
Psychiatric disorders, patients, n (%)				
Insomnia	8 (21.1)	11 (30.6)		
Depression	7 (18.4)	4 (11.1)		
Agitation	1 (2.6)	6 (16.7)		
Sleep disorder	2 (5.3)	4 (11.1)		
Irritability	2 (5.3)	0		
Infections and infestations, patients, n (%)				
Bronchitis	3 (7.9)	7 (19.4)		
Herpes simplex	5 (13.2)	1 (2.8)		
Urinary tract infection	2 (5.3)	3 (8.3)		
Fungal infection	2 (5.3)	2 (5.6)		
Skin bacterial infection	1 (2.6)	3 (8.3)		
Herpes zoster	2 (5.3)	1 (2.8)		

Table 3. Treatment-related adverse events reported in \geq 5% of patients with PV in either treatment arm up to Month 24.

General disorders and administration site conditions, patients, n (%) 4 (10.5) 6 (16: Asthenia 4 (10.5) 6 (16: Fatigue 3 (7.9) 2 (5.6 Oedema peripheral 0 2 (5.6 Pyrexia 2 (5.3) 0 Xerosis 0 2 (5.6 Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%) 1 Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 5 (13.2) Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) 0 Purpura 1 (2.6) 3 (8.3 Acne 0 3 (8.3 Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 1 1 Termor 1 (2.6) 7 (19. Paraesthesia 1	Conjunctivitis	2 (5.3)	0
Asthenia 4 (10.5) 6 (16: Fatigue 3 (7.9) 2 (5.6) Oedema peripheral 0 2 (5.6) Pyrexia 2 (5.3) 0 Xerosis 0 2 (5.6) Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%) 1 Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) Alopecia 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) Prurpura 1 (2.6) 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Virticaria 2 (5.3) 0 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 1 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.2) 1 (2.6) 4 (11.2) Dizziness 2 (5.3) 0 2 (5.6) 0 2 (5.6)	General disorders and administration site cor	nditions, patients, n (%)	
Fatigue 3 (7.9) 2 (5.6 Oedema peripheral 0 2 (5.6 Pyrexia 2 (5.3) 0 Xerosis 0 2 (5.6 Infusion-related reaction 0 2 (5.7.9) Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 5 (13.2) Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6 Purpura 1 (2.6) 3 (8.3 Acne 0 3 (8.3 Purpura 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Orevous system disorders, patients, n (%) 7 (19.4) 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 7 (19.4) 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 1 (2.6) 4 (11.7) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 0 2 (5.6) 1 (2.6) 4 (11.7) Pizziness 2 (5.3) 0 2 (5.6)	Asthenia	4 (10.5)	6 (16.7
Oedema peripheral 0 2 (5.6) Pyrexia 2 (5.3) 0 Xerosis 0 2 (5.6) Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%) 1 Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) 0 Alopecia 5 (13.2) 0 1 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) 2 (5.3) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) Acne 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 7 (19.4) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.1) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)	Fatigue	3 (7.9)	2 (5.6)
Pyrexia 2 (5.3) 0 Xerosis 0 2 (5.6) Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%) 1 Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) 1 2.6) 5 (13.1) Alopecia 5 (13.2) 0 0 3 (8.3) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) 2 (5.6) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 3 (8.3) Skin disorder 2 (5.3) 0 3 (8.3) Outcaria 0 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 7 (19.4) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.1) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica <td>Oedema peripheral</td> <td>0</td> <td>2 (5.6)</td>	Oedema peripheral	0	2 (5.6)
Xerosis 0 2 (5.6 Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%) Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 5 (13.2) 0 Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) 0 1 <td>Pyrexia</td> <td>2 (5.3)</td> <td>0</td>	Pyrexia	2 (5.3)	0
Injury, poisoning and procedural complications, patients, n (%)Infusion-related reaction22 (57.9)0Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%)1 (2.6)5 (13.4)Alopecia5 (13.2)0Hypertrichosis2 (5.3)2 (5.6)Purpura1 (2.6)3 (8.3)Acne03 (8.3)Pruritus2 (5.3)0Skin striae02 (5.3)Urticaria02 (5.3)Nervous system disorders, patients, n (%)1 (2.6)7 (19.4)Paraesthesia1 (2.6)7 (19.4)Paraesthesia1 (2.6)4 (11.1)Headache2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.1)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.1)Hyperglycaemia04 (11.1)	Xerosis	0	2 (5.6)
Infusion-related reaction 22 (57.9) 0 Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) 5 (13.2) 0 Alopecia 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) 3 (8.3) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) Acne 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) 0 Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.6) 0 Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.1) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) 0 Hyperglycaemia 1 (2.6) 4 (11.1)	Injury, poisoning and procedural complication	ns, patients, n (%)	
Skin and subcutaneous tissue disorders, patients, n (%) Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.2) Alopecia 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3 Acne 0 3 (8.3 Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Urticaria 0 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 7 (19.4) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 7 1 Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Infusion-related reaction	22 (57.9)	0
Skin atrophy 1 (2.6) 5 (13.1) Alopecia 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) Acne 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 0 2 (5.6) Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.3) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Skin and subcutaneous tissue disorders, pati	ents, n (%)	
Alopecia 5 (13.2) 0 Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6 Purpura 1 (2.6) 3 (8.3 Acne 0 3 (8.3 Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6 Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.6) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.1) Headache 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 7 1 (2.6) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.1) Hyperglycaemia 0 2 (5.6)	Skin atrophy	1 (2.6)	5 (13.9
Hypertrichosis 2 (5.3) 2 (5.6) Purpura 1 (2.6) 3 (8.3) Acne 0 3 (8.3) Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Urticaria 2 (5.3) 0 2 (5.6) Mervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.3) 0 Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.1) 4 (11.2) Headache 2 (5.3) 0 2 (5.6) Dizziness 2 (5.3) 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 0 2 (5.6) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.1) Hyperglycaemia 0 4 (11.1)	Alopecia	5 (13.2)	0
Purpura 1 (2.6) 3 (8.3 Acne 0 3 (8.3 Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.3) 0 Urticaria 0 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.3) 0 Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Hypertrichosis	2 (5.3)	2 (5.6)
Acne 0 3 (8.3 Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6 Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.3) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Purpura	1 (2.6)	3 (8.3)
Pruritus 2 (5.3) 0 Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 0 2 (5.3) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.4) Headache 2 (5.3) 0 Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.4) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.4) Hyperglycaemia 0 4 (11.4)	Acne	0	3 (8.3)
Skin disorder 2 (5.3) 0 Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 7 1 Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 1 (2.8) Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Pruritus	2 (5.3)	0
Skin striae 0 2 (5.6) Urticaria 2 (5.3) 0 Nervous system disorders, patients, n (%) 7 (19.4) Tremor 1 (2.6) 7 (19.4) Paraesthesia 1 (2.6) 4 (11.7) Headache 2 (5.3) 1 (2.8) Dizziness 2 (5.3) 0 Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Skin disorder	2 (5.3)	0
Urticaria2 (5.3)0Nervous system disorders, patients, n (%)7Tremor1 (2.6)7 (19.4)Paraesthesia1 (2.6)4 (11.7)Headache2 (5.3)1 (2.8)Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.7)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.7)Hyperglycaemia04 (11.7)	Skin striae	0	2 (5.6)
Nervous system disorders, patients, n (%)Tremor1 (2.6)7 (19.4)Paraesthesia1 (2.6)4 (11.4)Headache2 (5.3)1 (2.8)Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.4)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.4)Hyperglycaemia04 (11.4)	Urticaria	2 (5.3)	0
Tremor1 (2.6)7 (19.4)Paraesthesia1 (2.6)4 (11.4)Headache2 (5.3)1 (2.8)Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.4)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.4)Hyperglycaemia04 (11.4)	Nervous system disorders, patients, n (%)		
Paraesthesia1 (2.6)4 (11.7)Headache2 (5.3)1 (2.8)Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.7)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.7)Hyperglycaemia04 (11.7)	Tremor	1 (2.6)	7 (19.4
Headache2 (5.3)1 (2.8)Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.7)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.7)Hyperglycaemia04 (11.7)	Paraesthesia	1 (2.6)	4 (11.1
Dizziness2 (5.3)0Sciatica02 (5.6)Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%)1 (2.6)4 (11.7)Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.7)Hyperglycaemia04 (11.7)	Headache	2 (5.3)	1 (2.8)
Sciatica 0 2 (5.6) Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) 1 (2.6) 4 (11.7) Type 2 diabetes mellitus 0 4 (11.7)	Dizziness	2 (5.3)	0
Metabolism and nutrition disorders, patients, n (%) Type 2 diabetes mellitus 1 (2.6) 4 (11.7) Hyperglycaemia 0 4 (11.7)	Sciatica	0	2 (5.6)
Type 2 diabetes mellitus1 (2.6)4 (11.1)Hyperglycaemia04 (11.1)	Metabolism and nutrition disorders, patients,	n (%)	
Hyperglycaemia 0 4 (11.7	Type 2 diabetes mellitus	1 (2.6)	4 (11.1
	Hyperglycaemia	0	4 (11.1

	1 (2.6)	2 (5.6)
Endocrine disorders, patients, n (%)	1	
Cushing's syndrome	6 (15.8)	7 (19.4)
Gastrointestinal disorders, patients, n (%)		
Gastritis	1 (2.6)	3 (8.3)
Abdominal pain upper	2 (5.3)	1 (2.8)
nvestigations, patients, n (%)		
Weight increased	3 (7.9)	9 (25.0)
Eye disorders, patients, n (%)		
Cataract	0	5 (13.9)
Glaucoma	1 (2.6)	2 (5.6)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorc	lers natients n (%)	
• •	iers, patients, it (70)	
Dyspnoea exertional	1 (2.6)	3 (8.3)
Dyspnoea exertional Lung disorder	1 (2.6) 1 (2.6)	3 (8.3) 2 (5.6)
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%)	1 (2.6) 1 (2.6)	3 (8.3) 2 (5.6)
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%)	1 (2.6) 1 (2.6) 2 (5.3)	3 (8.3) 2 (5.6) 4 (11.1)
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%) Hypertension Cardiac disorders, patients, n (%)	1 (2.6) 1 (2.6) 2 (5.3)	3 (8.3) 2 (5.6) 4 (11.1)
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%) Hypertension Cardiac disorders, patients, n (%) Angina pectoris	1 (2.6) 1 (2.6) 2 (5.3) 0	3 (8.3) 2 (5.6) 4 (11.1) 2 (5.6)
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%) Hypertension Cardiac disorders, patients, n (%) Angina pectoris Tachycardia	1 (2.6) 1 (2.6) 2 (5.3) 0 2 (5.3)	3 (8.3) 2 (5.6) 4 (11.1) 2 (5.6) 0
Dyspnoea exertional Lung disorder Vascular disorders, patients, n (%) Hypertension Cardiac disorders, patients, n (%) Angina pectoris Tachycardia Neoplasms benign, malignant and unspecifi	1 (2.6) 1 (2.6) 2 (5.3) 0 2 (5.3) ed (incl cysts and polyps), patients, n	3 (8.3) 2 (5.6) 4 (11.1) 2 (5.6) 0 (%)

PV, pemphigus vulgaris.

Table 4. Serious adverse events* by System Organ Class and Preferred Term in patientswith PV up to Month 24.

	Rituximab + prednisone	Prednisone alone
System Organ Class, Preferred Term	(n = 38)	(n = 36)
Patients with ≥1 SAE, n (%)	11 (28.9)	16 (44.4)
Total number of SAEs	26	24
Musculoskeletal and connective tissue disorders, patients, n (%)	5 (13.2)	4 (11.1)
Myopathy	1 (2.6)	2 (5.6)
Lumbar spinal stenosis	0	1 (2.8)
Osteonecrosis	0	1 (2.8)
Tendonitis	0	1 (2.8)
Arthralgia	1 (2.6)	0
Myalgia	1 (2.6)	0
Osteoporotic fracture	1 (2.6)	0
Psoriatic arthropathy	1 (2.6)	0
Total number of events	5	5
Respiratory, thoracic, and mediastinal disorders, patients, n (%)	3 (7.9)	3 (8.3)
Pulmonary embolism	2 (5.3)	2 (5.6)
Dyspnoea	0	1 (2.8)
Nasal septum perforation	1 (2.6)	0
Total number of events	3	3
Infections and infestations, patients, n (%)	3 (7.9)	1 (2.8)
Pneumocystis jirovecii pneumonia	1 (2.6)	1 (2.8)
Infective thrombosis	1 (2.6)	0
Intervertebral discitis	1 (2.6)	0

-316-

Lung infection	1 (2.6)	0
Staphylococcal sepsis	1 (2.6)	0
Total number of events	5	1
Nervous system disorders, patients, n (%)	2 (5.3)	3 (8.3)
Cerebrovascular accident	0	1 (2.8)
Motor dysfunction	0	1 (2.8)
Sciatica	0	1 (2.8)
Headache	1 (2.6)	0
Neuropathy peripheral	1 (2.6)	0
Total number of events	2	3
Vascular disorders, patients, n (%)	2 (5.3)	3 (8.3)
Deep vein thrombosis	0	1 (2.8)
Hypertension	0	1 (2.8)
Phlebitis	0	1 (2.8)
Hypotension	1 (2.6)	0
Venous thrombosis limb	1 (2.6)	0
Total number of events	2	3

PV, pemphiguc vulgaris; SAE, serious adverse event.

* Only those SAEs in a System Organ Class with \geq 2 patients overall are listed. SAE is any adverse event that results in death of a patient, is potentially life-threatening, requires hospitalization (>24 hours) or a prolongation of initial hospitalization, results in a disability or significant prolonged incapacitation, leads to a congenital abnormality or birth defect, or is any other adverse effect judged to be medically significant by the investigator reporting the event.







AE, adverse event; ITT, intention to treat; PF, pemphigus foliaceus, PV, pemphigus vulgaris.

* Withdrawal due to pregnancy.

[†]AEs included corticosteroid-induced myopathy, necrosis of femoral heads, Cushing's

syndrome, psychiatric decompensation, and chorioretinitis.

[‡] One prednisone patient discontinued treatment due to ineffectiveness of treatment (Other)

and withdrew from the study due to SAEs of dyspnoea and oedema.

Treatment Group





110



40775 - 40715 10 10 10 10 10 10

T MONTH 14

+ MORTH 22

Month 24

- Month To

- MORTH I

Month 12

- MONTH @

Nonth

Month

Visit





Mon Month's OTHS

Baseline (PDAI 38) and (b) at Month 4 (PDAI 2) after treatment with rituximab plus prednisone. (c) Oral mucosal involvement in a patient with severe PV before and (d) at Month 2 after treatment with rituximab plus prednisone.

Baseline After Rituximab (a) (b) (c) (d)

Figure 4. Pemphigus vulgaris (PV). (a) Oral involvement in a patient with severe PV at

ANNEXE N°3 :

MODIFICATIONS OF THE BAFF/BAFF-RECEPTOR AXIS IN PATIENTS WITH PEMPHIGUS TREATED WITH RITUXIMAB VERSUS STANDARD CORTICOSTEROIDS REGIMEN.

Hébert V., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Golinski M-L., Petit M., Riou G., Boyer O., Joly, P., et Calbo, S.

En préparation

L'étude RITUX 3 comparant le RTX à la CS dans le traitement du pemphigus a montré une supériorité du RTX avec un faible taux de rechutes à long terme. Une des hypothèses pouvant expliquer les rechutes après RTX dans les maladies auto-immunes serait l'élévation du taux de BAFF sérique induite par la déplétion lymphocytaire B et la sensibilité à cette cytokine des LB auto-réactifs ré-émergents.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'axe BAFF/BAFF-R sur les LB auto-réactifs spécifiques des Dsg et les LB non auto-réactifs chez des patients atteints de pemphigus traités par RTX ou CS afin de comprendre le faible taux de rechute à long terme après RTX.

Nous avons réalisé un suivi longitudinal des taux sériques de BAFF par ELISA chez les patients de l'étude RITUX 3 et étudié l'expression phénotypique du BAFF-R sur les LB auto-réactifs et les LB non auto-réactifs avant et après traitement par RTX ou par CS.

Initialement, les taux sériques de BAFF des patients atteints de pemphigus sont légèrement plus élevés que ceux des donneurs sains. Après chaque perfusion de RTX, les taux sériques de BAFF ont augmenté parallèlement à la déplétion des LB. Après le retour des LB à 36 mois, les taux sériques de BAFF sont restés significativement plus élevés que la valeur initiale. L'analyse phénotypique des LB auto-réactifs et non auto-réactifs montre une diminution de la MFI de BAFF-R suite au traitement par RTX mais uniquement à la surface des LB non auto-réactifs. Étonnamment, à la surface des LB spécifiques des Dsg, la MFI de BAFF-R est restée équivalente à sa valeur initiale. Chez les patients du groupe CS, les taux de BAFF baissaient transitoirement de façon dose-dépendante sans influencer la fréquence des LB. Aucune modification de la MFI de BAFF-R n'a été observée avant er après 12 mois de traitement par la prednisone (doses >20 mg/jour) à la surface les LB auto-réactifs et non auto-réactifs. En conclusion, l'axe BAFF/BAFF-R est fortement impacté par le RTX. Des études suggèrent qu'après fixation du BAFF, le BAFF-R est internalisé, ce qui expliquerait que la MFI soit diminuée. La différence d'expression de BAFF-R selon les sous-populations de LB après le RTX est certainement le reflet d'un mécanisme de maturation différent au sein des LB auto-réactifs pouvant contribuer au maintien de la rémission complète par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé.

Title Page

Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor axis in patients with pemphigus treated with

rituximab versus standard corticosteroids regimen.

Vivien Hébert MD^{1,2}, Maud Maho-Vaillant PhD^{1,2}, Marie-Laure Golinski PhD^{1,2}, Gaëtan Riou MSc¹, Marie Petit PhD¹, Olivier Boyer MD, PhD¹, Sébastien Calbo PhD¹, Pascal Joly MD, PhD^{1,2}

1: INSERM U1234, Normandie University, Rouen, France.

2: Department of Dermatology, Rouen University Hospital and Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Normandie University, Rouen, France.

Abstract

Introduction:

Rituximab (RTX) has been demonstrated to be highly effective in the first-line treatment of pemphigus with especially a low rate of long-term relapse. RTX-induced increase of BAFF could explain relapses after RTX in autoimmune diseases. We studied the BAFF/BAFF-Receptor (BAFF-R) axis on autoreactive LB (DSG+) and non-self-reactive LB (DSG-) in pemphigus patients treated with RTX or corticosteroids (CS).

Methods:

We longitudinally analysed serum BAFF levels by ELISA in 88 patients (45 RTX, 43 CS) and 28 healthy donors (HD). We analysed the transcriptomic and cytometric profiles of BAFF-R expression in DSG+ LB and in DSG- LB in 10 patients before and after RTX or CS, and in 7 healthy donors (HD).

Results:

Pemphigus patients had higher serum BAFF levels at baseline compared to HD: $308 \pm 13 \text{ pg/mL} \text{ vs } 252 \pm 28 \text{ pg/mL}, p=0.037$. Frequencies of DSG+ LBs expressing BAFF-R in qPCR did not vary after RTX (before: 6.3%, after: 10.5%; p=0.2) nor CS (before 6.3%, after 2.5%; p=0.18) as well as the mean fluorescence intensity (MFI) after RTX (before: 2992 ± 258, after: 2688 ± 319, p=0.47) or CS (4100 ± 595, 3927 ± 259, p= 0.32) treatment. BAFF-R protein expression was decreased in DSG- LB after RTX (2537 ± 233.9 vs 1527 ± 169.1, p<0.01) but not in CS arm.

Conclusion:

Decreased BAFF-R protein expression after RTX in DSG- B cells, returning to healthy donors' levels, would not be able anymore to bring the cooperation necessary to autoreactive B cells proliferation to induce a relapse.

Introduction

Pemphigus is a severe autoimmune disease affecting the skin and mucosa, which is characterized by autoantibodies directed against desmosomal adhesion proteins: desmoglein 1 (DSG1) and desmoglein 3 (DSG3).While anti-DSG1 and anti-DSG3 autoantibody deposits play a key role in the pathogenesis of skin and mucosal lesions of pemphigus (Abasq et al. 2009; Cheng et al. 2002; Fitzpatrick and Newcomer 1980; Hebert et al. 2018), the mechanisms by which anti-DSG antibodies are induced remains partially unknown.

The B-cell activating factor (BAFF) from the tumor necrosis factor (TNF) superfamily has been identified as an important factor for B cell survival. It plays an important role in regulating class switch recombination, in the selection of autoreactive B cells, as well as long-lived plasma cells antibody production (Brink 2006; Nagel et al. 2009b; Thien et al. 2004). BAFF exists into two different forms: a transmembrane protein or a soluble protein, which is secreted after cleavage from the cell membrane (Bodmer et al. 2002; Mackay et al. 2003). BAFF is mainly expressed and produced by monocytes, macrophages and dendritic cells (Litinskiy et al. 2002). Three receptors almost exclusively present on B cells have been described: TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), BCMA (B-cell maturation antigen) and BAFF-R (BAFF receptor) (Mackay et al. 2003). The BAFF-R has been identified as the key receptor involved in promoting B cell survival (Gross et al. 2001; Schiemann et al. 2001). BAFF-R is a transmembrane protein expressed on the majority of peripheral blood B (Sims et al. 2005). Binding of BAFF to BAFF-R activates the classical and the noncanonical NF-kB signaling pathways, resulting in the expression of a series of downstream genes that are essential for B cell survival (Claudio et al. 2002; Enzler et al. 2006; Sasaki et al. 2006). Occupation of BAFF-R by BAFF in resting B cells delivers pro-survival signals, particularly to early naive B cell populations (Rodig et al. 2005). In humans, homozygous deletion of the BAFF-R-encoding gene results in severe B lymphopenia caused by the interruption of B cell development at a transitional B cells stage (Warnatz et al. 2009). In contrast, in mice, homozygous deletion of the BAFF-encoding gene stops B cell growing at the stage of transitional B cells (Schiemann et al. 2001), whereas overexpression of BAFF results in the development of autoimmune manifestations close to those found in human systemic lupus erythematosus (Mackay et al. 1999). Moreover, a correlation between BAFF levels and disease severity has been shown in systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), reinforcing the role of B cells in these diseases (Cheema et al. 2001; Zhang et al. 2001).

Rituximab (RTX), a chimeric anti-CD-20 antibody targeting B cells, has demonstrated its efficacy in RA and SLE. However, a high rate of relapses is observed after treatment, therefore needing to repeat infusions of RTX. It has been hypothesized that this high relapse rate after RTX might be due to the increase of serum BAFF levels, which promotes the recovery of auto-reactive B cells, that avoid from competitive elimination, thus leading to the occurrence of a clinical relapse (Lavie et al. 2007; Lesley et al. 2004; Thien et al. 2004). Mechanisms implicated in the control of auto-antibody-mediated autoimmune diseases by RTX are not completely understood. Indeed, antibodies producing cells do not express the CD20 molecule and therefore are not directly targeted by RTX. One has hypothesized that the major efficacy of RTX in pemphigus was related to the almost complete destruction of the B cell pool including preplasma cells producing pathogenic anti-desmoglein IgG antibodies but also by an increased number of IL-10-secreting transitional B cells (Colliou et al. 2013).

Using blood samples collected in pemphigus patients included in a randomized study which compared the first line use of RTX versus a standard high dose corticosteroid (CS) regimen (Joly et al. 2017), we assessed the evolution of BAFF serum levels, and BAFF-R phenotype and mRNA expression in autoreactive DSG-specific B cells and non-autoreactive B cells in pemphigus patients treated with the two above mentioned regimens.

Methods

Princeps study

In the original study, 90 newly-diagnosed pemphigus patients were randomly assigned to receive a standard regimen of CS versus RTX associated with a short-term CS regimen. Patients in the RTX group were treated with the autoimmune regimen (two infusions of 1000 mg of RTX at day 0 and day 15) and a maintenance treatment corresponding to two infusions of 500mg at Month 12 and Month 18. They also received an initial low dose of prednisone, 0.5 to 1mg/kg/d, depending on initial pemphigus severity (moderate versus severe), which was rapidly tapered over 3 to 6 months. Patients assigned in the standard oral CS group were given an initial high dose of prednisone, 1 to 1.5mg/kg/day, with a progressive tapering over 12 to 18 months, depending on initial pemphigus severity.

Patients

Blood samples from RTX treated patients were analysed before (D0) and 36 months after the RTX infusion (M36), after the B lymphocytes return. Blood samples from CS-treated patients were analyzed before, 12 months (M12) and 24 months (M24) after the start of CS therapy in order to have still-treated patients. The pemphigus disease area index (PDAI) was used to assess the pemphigus severity.

We performed a longitudinal follow-up of BAFF sera levels by ELISA in 88 patients (45 treated with RTX, 43 treated with CS) and 28 healthy donors (SD). We analysed the transcriptomic and cytometric profiles of BAFF-R expression in DSG+ LB after single-cell sorting and in DSG- LB in 10 patients before and after RTX or CS, as well as in 7 healthy donors (HD).

Desmoglein-specific B-cell staining

In order to analyze desmoglein 1 and desmoglein 3 specific B cells, PBMCs were extracted from whole venous blood using Ficoll-Hypaque (LymphoprepTM, Oslo, Norway). Then, B cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (InvitrogenTM, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instruction. Then, purified B cells were incubated for 30 min at 4°C with histidine-tagged recombinant DSG1 or DSG3 (30 ng/µl).

First, cells were incubated with Fc Blocking Reagent (eBioscience) prior to staining. For live cell analyses, dead cells were excluded by staining with LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies). Then, the phenotype of B-cells was determined by flow cytometry with anti-human antibodies directed against IgG (BD Biosciences), CD19, CD27,

IgM, BAFF-R and TACI (BD Biosciences). Anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify desmoglein-specific B cells. Data were collected by FACS ARIA III (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software 10 (TreeStar).

a) One-cell sorting and pre-amplification

DSG-specific single B cells were sorted by FACS ARIA III into 96-well plates containing 10μ L Platinum Taq polymerase and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), a mixture of Taqman primer-probes at $0.2\times$ concentration specific for the transcripts of interest (supplementary) and CellsDirect qRT-PCR buffer (Invitrogen). Immediately following cell sorting, samples were centrifuged, incubated at 55 °C for 10 min, and subjected to 20 cycles of PCR (50 °C 15 min then 95 °C for 15 s for the reverse transcription, followed by 20 cycles of 95 °C 15 s and 60 °C 4 min for amplification). Subsequent preamplified single-cell cDNA was stored at -20 °C until analysis.

b) Real-time qPCR

After ¹/₄ dilution in TE buffer, each cDNA sample was then separated into 48 separate reactions for further qPCR using the BioMark 48.48 dynamic array nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.). Briefly, following hydraulic chip priming, 48 preamplified cDNA samples were mixed with a mild detergent loading solution to allow capillary flow, and the samples were added to a 48.48 nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.) along with 38 individual Taqman primer-probe mixtures listed in supplementary Table 1 (Applied Biosystems) specific for individual transcripts of interest. The chip was then thermocycled through 40 cycles and fluorescence in the FAM channel was detected using a CCD camera placed above the chip, normalized by ROX (6-carboxy-X-rhodamine) intensity. One hundred CD19+ cells and no-cell wells were used as positive and negative controls respectively. To limit potentially biased measurement, cells with less than 2 expressed genes among the 5 control genes (HPRT1, B2M, GUSB, TUBB and GAPDH) were excluded from the analysis. Data were analyzed using Real Time PCR Analysis software with or without normalization of the Ct value for each gene using GAPDH as calibrator gene. We considered that the cell expressed the gene if the Ct value was < 40 and if the expression curve was a sigmoid. However, positive control wells containing 100 CD19+ cells showed detectable expression levels of all tested cytokine genes. The amount of RNAs contained in one cell was therefore possibly too low. We analyzed qPCR results in frequency of cytokine gene expressing B cells and in Δ CT value between different groups.

Serum BAFF ELISA

The concentration of BAFF in sera of patients (42-RTX and 26 CS-treated patients) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the DuoSet kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The Baff level was measured at day 0, 90, 180, 365, 730 and M36.

Statistical analysis

GraphPad Prism 7 was used to create the figures. Correlations are assessed using Pearson's rank correlation coefficient. The Wilcoxon paired and unpaired t-test, and the One-way ANOVA with Dunnetts post-test were used. p<0.05 was considered significant.

Results

Measurement of serum BAFF

Using sandwich ELISA, we measured the levels of BAFF in the sera of 88 patients with a newly diagnosed and untreated pemphigus (73 pemphigus vulgaris (PV) and 15 pemphigus foliaceus (PF)), and 37 healthy donors. Serum BAFF levels (mean+/- SD) were significantly higher in pemphigus patients at baseline than healthy donors ($308 \pm 13 \text{ pg/mL}$ and $252 \pm 28 \text{ pg/mL}$, p=0.037) (Figure 1A). We did not evidence any correlation between baseline serum BAFF levels and the PDAI pemphigus severity score (r = 0.16; p = 0.53) (Figure 1B).

We then measured longitudinally serum BAFF levels during the follow-up of patients in both treatment groups (RTX versus standard CS regimen) and determined simultaneously the percentage of CD19+ peripheral blood B cells among total lymphocytes.

Figure 2 shows a strong inverse evolution between the number of blood CD19+ B cells and serum BAFF levels in patients from the RTX group. Indeed, serum BAFF levels significantly increased after each RTX infusion (Day 1, Month 12 and Month 18) while the number of blood B-cells dropped down dramatically (Figure 2A). Interestingly serum BAFF levels decreased between Month 9 and Month 12, and at Month 36, corresponding to partial and complete recovery of blood B-cells, respectively.

In patients from the standard CS group, we observed a transient but significant decrease of serum BAFF levels during the first three months of treatment (273.2 pg/ml vs 194.2 pg/ml, p=0.0002), corresponding to the time during which patients received the highest doses of prednisone (Figure 2B). Serum BAFF levels then progressively increased from Month 3 to Month 36 (273.2 pg/ml vs 388 pg/ml) (p<0.0001) compared to baseline level, during tapering of prednisone doses and after stopping CS.

Transcriptomic and phenotypic analyses of BAFF-R on patients' blood B cells before and after treatment

Ten patients from the RTX group, 10 patients from the CS group, and 7 healthy donors were used for these analyses. Samples were collected at baseline and at the Month 36 evaluation in patients from the RTX group. We studied samples collected at baseline and at the M12 evaluation in patients from the CS group for two reasons: i) many patients from the CS group have been secondarily treated with RTX due to persistent disease activity and no patients from this group were already treated with RTX at this date ii) patients still had medium to high-dose of corticosteroids at this date. Since 3 out of 10 patients from the CS group had persistent

disease activity at the Month 12 evaluation, we then compared the results of transcriptomic and phenotypic analyses in this latter group.

Assessment of autoreactive B cells

We first analysed mRNA expression of the BAFF-receptor in one-cell sorted DSG-specific autoreactive B cells collected from 10 patients at baseline, and after RTX or standard CS treatment. The percentage of DSG-specific blood B cells with detectable BAFF-R mRNA did not vary significantly after treatment both in the RTX group (12/115, 10.5%) and in the standard CS group (3/120, 2.5%), compared to baseline (12/191, 6.3%; p=0.20 and p=0.18, respectively) (data not shown).

Then, we measured the mean fluorescence intensity (MFI) of BAFF-R on autoreactive B cells using flow cytometry. In accordance with the absence of variation of BAFF-R mRNA expression in autoreactive DSG+ B-cells after treatment, we did not observe any significant variation of BAFF-R proteomic expression on autoreactive B cells between samples collected at baseline and those collected after treatment, both in patients from the RTX group (2992 \pm 258.vs 2688 \pm 319; p=0.46) nor in those treated by CS alone (4754 \pm 407 vs 4771 \pm 715; p=0.22), whichever the patients' clinical status after treatment was (complete remission versus disease activity) (Figures 3A and 3B).

Expression of BAFF-R mRNA is decreased in non-autoreactive B cells after RTX

To explain the surprising absence of relapse in most patients after RTX whereas they had persistent high BAFF levels with unchanged transcriptomic expression and proteomic expression of BAFF-R after treatment, we performed proteomic analyses on non-autoreactive B cells, hypothesizing that the effect of RTX on non-autoreactive B-cells could lead to a regulator effect on autoreactive B-cells.

The mean fluorescence intensity of BAFF-R in non-autoreactive B cells measured by flow cytometry decreased significantly after RTX from 2537 ± 234 at baseline to 1527 ± 169 at Month 36 (p=0.004); this latter value being even lower than that observed in HD (3126 ± 305 ; p=0.006) (Figure 4A). However, MFI did not vary significantly in CS-treated patients between samples collected at baseline and those collected at Month 12, regardless of whether patients had persistent disease activity or were in CR (Figure 4B).

Discussion

The present study suggested the role / involvement of the BAFF/BAFF-R axis on B cells in the long-term efficacy of RTX in pemphigus patients as previously suggested in other autoimmune diseases, such as RA and SLE (Becerra et al. 2017; de la Torre et al. 2010; Lan et al. 2012). It has been suggested that increased BAFF serum level might decrease the threshold for autoreactive B cell survival and expansion, thus promoting autoantibody production.

We first found from a large sample of 90 pemphigus sera, that baseline BAFF serum levels of pemphigus patients were significantly higher than those measured in HD, which was not observed in the study by Asashima et al (Asashima et al. 2006).

Evolution of BAFF serum levels was inversed the number of circulating B cells in pemphigus patients, as previously reported in other autoimmune diseases (Kreuzaler et al. 2012). Two mechanisms have been suggested to explain increased BAFF level after RTX treatment in rheumatic arthritis (Lavie et al. 2007): first, a mechanistic depletion of BAFF-binding B cells; second, a depletion of BAFF receptors which is followed by a positive transcriptional regulation of BAFF in monocytes.

Interestingly this elevation of BAFF serum level was only observed in patients from the RTX group. Indeed, conversely, we observed a transient decrease of BAFF serum levels in patients from the standard CS regimen group, which was mainly observed at the initiation of treatment when patients received high doses of prednisone. Then, we observed a re-increase of BAFF serum levels during tapering of prednisone doses.

We found that RTX did not modify the BAFF/BAFF-R axis on re-emerging autoreactive B cells, as demonstrated by the stable expression of BAFF-R mRNA in PCR analysis, and BAFF-R expression by flow cytometry on autoreactive desmoglein-specific B cells between samples collected at baseline and at Month 36 after RTX treatment. Thus, effect of RTX on BAFF/BAFF-R axis from auto-reactive B cells hardly explained the long-term remission.

Surprisingly, we observed that the high expression of BAFF-R on the surface of nonautoreactive B cells from pemphigus patients decreased after RTX treatment to levels close to those observed in healthy donors. This modulation of the BAFF/BAFF-R axis on re-emerging non-autoreactive B cells seems likely related to a RTX effect, since we did not observe these modifications in patients treated with CS alone, regardless of whether they were in complete remission or still with an active disease.
Our findings suggest that the activation of non-autoreactive B cells at the onset of pemphigus, related to proteomic BAFF-R expression, might facilitate the pathogenicity of autoreactive B cells. Furthermore, the decrease of BAFF-R expression induced by RTX on reemerging non autoreactive B cells from pemphigus patients might decrease the binding of BAFF to these cells despite the presence of high BAFF serum levels, and consequently their activation and capacity to bring cooperation for autoreactive B cell proliferation and pathogenicity (Hertl et al. 2011; Mouquet et al. 2008; Nagel et al. 2009) but also T cells.

Our work has some limitations. First, we were not able to perform transcriptomic and cytometric analyses in relapsing patients from the RTX group, since most of them relapsed during the year after the initial cycle of RTX (Joly et al. 2017) and therefore had very low numbers of circulating B cells, not allowing to sort autoreactive B cells.

Despite the fact that our technique allowed to sort DSG1 and DSG3 B cells, we had to pool DSG1 and DSG3 autoreactive B cells in qPCR analyses, due to the very low number of sorted cells.

We performed qPCR on one-cell sorted B cells only in autoreactive B cells because of the very low number of these cells in the patients' peripheral blood even before RTX. Thus, the one-cell sorting technique allowed us to precisely determine the proportion of autoreactive B cells with detectable BAFF-R mRNA, and the level of expression on each cell. We didn't practice transcriptomic analyses on one-cell sorted non-autoreactive B cells since we thought that the weak number of cells we could sort wouldn't be representative to this very larger population.

Finally, we did not sort autoreactive B cells depending on their surface immunoglobulins (IgM or IgG) due to the very low frequency of autoreactive B cells in peripheral blood (<0.1% of total B cells), in particular in frozen blood samples. However, to the best of our knowledge no study has demonstrated various levels of BAFF-R expression according to B cells differentiation stages.

Overall this study suggests the involvement of the BAFF/BAFF-R axis in the long-lasting efficacy of RTX in pemphigus patients. In particular, RTX decreases the BAFF-R expression on non-autoreactive B cells, which might not be able in turn to cooperate with autoreactive B cells to induce their proliferation and pathogenicity.

Acknowledgements

We acknowledge the Center for Human Immunology at Institut Pasteur for providing access to Biomark Fluidigm technology and for their help.

Footnotes

1 This study was supported by funding from INSERM, Normandy University Rouen and Rouen University Hospital, Department of Dermatology, France

2 Abbreviations used in this paper:

BAFF: B-cell activating factor; BAFF-R: BAFF-Receptor, CS: corticosteroids, DSG: Desmoglein ; HD: Healthy Donors; RTX: Rituximab ; SLE: Systemic Lupus Erythematosus ; RA: Rheumatoid Arthritis

3 The authors declare no conflicting financial interests

References

Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch. Dermatol. 2009;145(5):529–35

Asashima N, Fujimoto M, Watanabe R, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, et al. Serum levels of BAFF are increased in bullous pemphigoid but not in pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. 2006;155(2):330–6

Becerra E, De La Torre I, Leandro MJ, Cambridge G. B cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis relapsing after rituximab: expression of B cell-activating factor-binding receptors on B cell subsets. Clin. Exp. Immunol. 2017;190(3):372–83

Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem. Sci. 2002;27(1):19–26

Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. Semin. Immunol. 2006;18(5):276-83

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2001;44(6):1313–9

Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. Br. J. Dermatol. 2002;147(2):261–5

Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. Nat. Immunol. 2002;3(10):958–65

Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. Sci. Transl. Med. 2013;5(175):175ra30

Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, Otero DC, Widhopf GF, Anzelon-Mills A, et al. Alternative and classical NFkappa B signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease. Immunity. 2006;25(3):403–15

Fitzpatrick RE, Newcomer VD. The correlation of disease activity and antibody titers in pemphigus. Arch. Dermatol. 1980;116(3):285–90

Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. Immunity. 2001;15(2):289–302

Hebert V, Boulard C, Houivet E, Duvert Lehembre S, Borradori L, Della Torre R, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. J. Invest. Dermatol. 2018;

Hertl M, Bernard P, Borradori L. Rituximab for Severe Mucous Membrane Pemphigoid: Safe Enough to Be Drug of First Choice? Arch. Dermatol. 2011;147(7):855–6

Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet Lond. Engl. 2017;389(10083):2031–40

Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, Birmelin J, Rizzi M, Grimbacher B, et al. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2012;188(1):497–503

Lan L, Han F, Chen J. Efficacy and safety of rituximab therapy for systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2012;13(9):731–44

Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg J, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. Ann. Rheum. Dis. 2007;66(5):700–3

Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu H-B, et al. Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. Immunity. 2004;20(4):441–53

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. 2002;3(9):822–9

Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu. Rev. Immunol. 2003;21:231–64

Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L, Jacquot S, Lemercier B, Lim A, et al. B-Cell Depletion Immunotherapy in Pemphigus: Effects on Cellular and Humoral Immune Responses. J. Invest. Dermatol. 2008;128(12):2859–69

Nagel A, Hertl M, Eming R. B-Cell-Directed Therapy for Inflammatory Skin Diseases. J. Invest. Dermatol. 2009a;129(2):289-301

Nagel A, Podstawa E, Eickmann M, Müller H-H, Hertl M, Eming R. Rituximab Mediates a Strong Elevation of B-Cell-Activating Factor Associated with Increased Pathogen-Specific IgG but Not Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2009b;129(9):2202–10

Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. Hum. Pathol. 2005;36(10):1113–9

Sasaki Y, Derudder E, Hobeika E, Pelanda R, Reth M, Rajewsky K, et al. Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. Immunity. 2006;24(6):729–39

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. Science. 2001;293(5537):2111–4

Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood. 2005;105(11):4390–8

Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, et al. Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. Immunity. 2004;20(6):785–98

de la Torre I, Moura RA, Leandro MJ, Edwards J, Cambridge G. B-cell-activating factor receptor expression on naive and memory B cells: relationship with relapse in patients with rheumatoid arthritis following B-cell depletion therapy. Ann. Rheum. Dis. 2010;69(12):2181–8

Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009;106(33):13945–50

Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcón GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2001;166(1):6–10

Figure and legends



Figure 1: BAFF level in serum of pemphigus patients.

Panel A: Comparison of serum BAFF levels between healthy donors and pemphigus patients at baseline. Panel B: Correlation between the baseline PDAI pemphigus severity score and serum BAFF levels in newly diagnosed pemphigus patients. Means are compared using the Wilcoxon unpaired t-test. *p <0.05. Correlations are assessed using Pearson's rank correlation coefficient.



Figure 2: Course of CD19⁺ B cells frequencies and serum BAFF level from pemphigus patients, according to treatment regimens.

Panel A: Determination of mean percentage of CD19⁺ B cells (red curve) among lymphocytes by flow cytometry (n=18) and mean serum BAFF levels (blue curve) measured by ELISA in patients treated with Rituximab (n=45). Arrows correspond to rituximab infusions. Panel B: Determination of mean percentage of CD19⁺ B cells (red curve) among lymphocytes by flow cytometry (n=18) and mean serum BAFF levels (blue curve) measured by ELISA in patients treated with standard corticosteroids regimen (n=43). Means are compared using one-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test compared to baseline: *p <0.05, **p <0.01 ***p <0.001.



Figure 3: Phenotypic analyses of BAFF-R on autoreactive B cells of pemphigus patients before and after treatments.

Panel A: Left: example of MFI of BAFF-R expression measured by flow cytometry on CD19⁺DSG⁺ B cells in one patient treated with rituximab: red area: before treatment; blue area: Month 36 after treatment. Right: Mean fluorescence intensity (MFI) of BAFF-R expression measured by flow cytometry on CD19⁺ DSG⁺B cells in 11 patients treated with rituximab. Panel B: Left: example of MFI of BAFF-R on CD19⁺ DSG⁺ B cells expression measured by flow cytometry in one patient treated with corticosteroids: red area: before treatment; blue area: Month 12 after treatment. Right: MFI of BAFF-R on CD19⁺ DSG⁺ B cells expression measured by flow cytometry in 11 patients treated with corticosteroids for 12 months. Means are compared using the Wilcoxon paired t-test.



Figure 4: Phenotypic analyses of BAFF-R on non-autoreactive B cells of pemphigus patients before and after treatments.

Panel A: Left: example of MFI of BAFF-R expression measured by flow cytometry on $CD19^+ DSG^- B$ cells in one patient treated with rituximab: red area: before treatment; blue area: Month 36 after treatment. Right: Mean fluorescence intensity (MFI) of BAFF-R expression measured by flow cytometry on $CD19^+ DSG^- B$ cells in 11 patients treated with rituximab. Panel B: Left: example of MFI of BAFF-R on $CD19^+ DSG^- B$ cells expression measured by flow cytometry in one patient treated with corticosteroids: red area: before treatment; blue area: Month 12 after treatment. Right: MFI of BAFF-R on $CD19^+ DSG^- B$ cells expression measured by flow cytometry in 11 patients treated with corticosteroids for 12 months. Means are compared using the Wilcoxon paired t-test**p <0.01.

ANNEXE N°4 :

CD11C⁺ B CELLS ARE MAINLY MEMORY CELLS PRONE TO DIFFERENTIATE INTO ANTIBODY-SECRETING-CELLS

Golinski M-L., Demeules M., Derambure C., Riou G., <u>Maho-Vaillant M.</u>, Boyer O., Joly P. et Calbo S.

En préparation

Notre équipe a identifié le marqueur membranaire CD11c chez un sous-groupe de LB incapables de produire de l'IL-10 (Lin et al., 2014). Cette population de LB CD11c⁺ a été décrite comme augmentée dans de nombreuses MAI telles que la sclérose en plaques (Claes et al., 2016) ou la polyarthrite rhumatoïde (Rubtsov et al., 2011).

L'objectif de cette étude est de mieux caractériser cette sous-population de LB.

Nous avons étudié le phénotype et le transcriptome des LB CD11c⁺ chez des donneurs sains et effectué des tests fonctionnels *in vitro*. Enfin, nous avons étudié cette souspopulation dans le pemphigus.

Nos données ont démontré que les LB CD11c⁺ constituent une sous-population distincte des LB et enrichie en LB mémoire sur-exprimant les gènes impliqués dans l'activation et la présentation antigénique. Les LB CD11c⁺ ont une capacité à se différencier plus rapidement en ASC suggérant un stade plus avancé dans la différenciation plasmocytaire. Enfin, les patients atteints de pemphigus présentent initialement une fréquence de LB CD11c⁺ augmentée qui diminue après traitement par RTX.

Par conséquent, notre analyse des LB CD11c⁺ présentant des propriétés d'activation permet d'identifier une population de LB pouvant contribuer à la production d'IgG dans le pemphigus et qui pourrait représenter une nouvelle cible pour l'immunothérapie. Title Page

CD11c⁺ B-cells are mainly memory cells prone to differentiate into antibody-secretingcells

Marie-Laure Golinski^{1, 2}, Mélanie Demeules¹, Céline Derambure³, Gaëtan Riou¹, Maud Vaillant^{1,2}, Olivier Boyer^{1,4}, Pascal Joly^{1,2}, Sébastien Calbo¹

- 1: INSERM U1234, Normandy University, Rouen
- 2: Rouen University Hospital, Department of Dermatology, Rouen, France
- 3: INSERM U1245, Normandy University, Rouen
- 4: Rouen University Hospital, Department of Immunology, Rouen, France

Keywords: CD11c, activated B cells, autoimmune disease.

Summary

 $CD11c^+$ B cells are not only a feature of autoimmunity. From healthy donors' blood, we show that $CD11c^+$ B cells are mainly memory B cells prone to differentiate into antibody secreting cells that accumulate with age, independently of gender.

Abstract

CD11c⁺ B-cells are detected in the blood of healthy individuals, but they have been reported to be increased in autoimmune diseases. We aimed to characterize CD11c⁺ B cells from healthy donors by flow cytometry, microarray analysis, in vitro functional assays, and by measuring their frequency in patients with pemphigus, a rare skin autoimmune diseases. Here we report that CD11c⁺ B cells are a distinct subpopulation of B cells, enriched in the memory subpopulation even if their phenotype is heterogeneous, with overexpression of genes involved in B cell activation and antigen presentation. Upon activation, CD11c⁺ B cells can differentiate into antibody-secreting-cells and CD11c could be up-regulated in CD11c⁻ B cells. Finally, we showed that patients with pemphigus, an autoimmune disease mediated by B cells, have a decreased frequency of CD11c⁺ B-cell after treatment, relative to baseline. Our findings could help to identify a B-cell population that may represent novel targets for immunotherapy.

Introduction

Integrins are a family of heterodimeric cell adhesion receptors with function in cell migration, survival, and proliferation (Schittenhelm et al., 2017). CD11c (ITGAX gene) is the integrin αX chain protein, which combines with the $\beta 2$ chain (CD18; ITGB2 gene). The CD11c/CD18 complex binds complement iC3b coated particles to induce phagocytosis (Rosen and Law, 1990), cell adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4 and VCAM-1) (Blackford et al., 1996; Ihanus et al., 2007), LPS (Ingalls and Golenbock, 1995), collagen and fibrinogen (Garnotel et al., 2000; Loike et al., 1991). CD11c is abundantly expressed on monocytes, granulocytes, on tissue macrophages, on a subset of dendritic cells and at low level on neutrophil, but can be expressed as well on a subset of B cells, T cells and NK cells, with expression level varying from dim to bright (Kamp et al., 2012). Recently, CD11c⁺ B cells were reported to be expanded in autoimmune disease like rheumatoid arthritis (RA) (Rubtsov et al., 2011), Sjogren's syndrome (Saadoun et al., 2013), multiple sclerosis (Claes et al., 2016) and systemic lupus erythematosus (SLE) (Wang et al., 2018), or after malarial infection (Weiss et al., 2009). With age, in mice and in women with RA, CD11c⁺ B cells accumulate and are thus named age-associated B cells (ABC) (Rubtsov et al., 2011). However, CD11c⁺ B cells are found in young healthy individual as well (Lin et al., 2014). This broad range of conditions could explain why cell surface expression of CD11c⁺ B cells has been reported to be heterogeneous and could be: CD27⁺ memory cell (Rubtsov et al., 2011), double negative IgD⁻CD27⁻ (Weiss et al., 2009), CD21^{low} (Saadoun et al., 2013) and T-bet⁺ (Li et al., 2016; Wang et al., 2018) or T-bet-, at least in mice (Du et al., 2019). In addition, we reported previously that following TLR9 and BCR stimulation, CD11c⁺ B cells from healthy donors (HD) were unable to secrete IL10 (Lin et al., 2014), while IL10 is one of the highest mRNA expressed found in $CD11c^+ B$ cells from SLE patient (Wang et al., 2018). These broad range of phenotype could reflect their state of activation depending on the disease characteristics or the age.

In this study, to characterize more precisely $CD11c^+$ B cells from HD, we compare the phenotype, the frequency correlated with age, the gene expression profile, the mRNA cytokines expressed and the differentiation into plasma cells for $CD11c^+$ versus $CD11c^-$ B cells. Altogether, our study demonstrates that CD11c expression is enriched in memory B cells, even if CD11c expression was detected on every B cells subpopulation tested, which explains their highest ability to differentiate into antibody secreting cells. Moreover, we report an increase of the frequency of $CD11c^+$ B cells from blood in Pemphigus, an autoantibody mediated disease targeting the skin and the mucous membranes, which decreases following treatment. Finally,

-349-

we show that CD11c upregulation is under the control of B cell receptor (BCR) stimulation but antagonized by TLR co-stimulation.

Materials and methods

Phenotyping of PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats obtained via the blood bank using Ficoll-Paque density gradient centrifugation (GE Healthcare). Phenotype analysis were performed with the cytometer FortessaTM (Becton Dickinson) using the following markers: LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Invitrogen), CD19-PE-Cy7 (clone Hib19, eBioscience), CD11c-PE or APC (clone Bu15, Biolegend), IgA-VioBright-FITC (clone IS11-8E10, Miltenyi), CD27-BV421 (clone M-T271, Becton Dickinson), IgD-AF700 (clone IA6-2, Becton Dickinson), CD38-PerCP-Cy5.5 (clone HIT2, Becton Dickinson), CD24-PE-CF594 (clone ML5, Becton Dickinson), IgG-BV510 (clone G18-145, Becton Dickinson), IgM-BV605 (clone G20-127, Becton Dickinson), CD138-BV711 (clone MI15, Becton Dickinson), CD45-BV785 (clone HI30, Sony) and CD20-APC (clone 2H7, Sony).

In order to confirm microarray datas, PBMC from 5 different HD were labeled with the following antibodies: CD19-PeCy7, CD11c-PE or APC, CD1c-BV421 (clone L161, Biolegend), CD58-PeCy5 (clone TS2/9, Biolegend), CD84-PE (clone CD84.1.21, Biolegend), CD27-BV421, CD86-BV510 (clone IT2.2, Biolegend), CD95-FITC (clone DX2, Biolegend), CD6-FITC (clone BL-CD6, Biolegend), CD200-BV605 (clone OX104, Biolegend), CD80-BV650 (clone 2D10, Biolegend), CD21-PE (clone HB5, eBioscience) CD274-BV711 (clone 29E.2A3, Biolegend) and CD68-PerCP-Cy5.5 (clone Y1/821, Biolegend). All cytometry data were analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc). Fluorescence-minus-one controls were used to compensate all flow cytometry data (Tung et al., 2007). Twenty-eight patients who participated in the Ritux 3 clinical trial were included in the present study (ClinicalTrials.gov number, NCT00784589).

Isolation of CD11c⁺ B cells

B cells were isolated from PBMC using Dynabeads Untouched Human B cells kit (Life Technologies) following the manufacturer's instruction. More than 90% of the isolated cells were CD19⁺. B cells were suspended at 10.10⁶ cells per ml in cold buffer and further stained with LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), anti-CD19 Pe-Cy7 (clone HIB19, Biolegend) and anti-CD11c APC (clone BU15, Biolegend). CD11c⁺ and CD11c-CD19⁺ B cells were sorted using BD FACSAria III 4-Laser (BD Biosciences) (Fig. S2).

In vitro culture of B cells

CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells were cultured at a cell density of 1.106 cells per ml in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin (all reagents from ThermoFisher scientific). B cells were left unstimulated or stimulated with 3µg/ml CpG-B 2006 (InvivoGen), 10µg/ml Goat Anti-Human IgA IgG IgM (H+L) (anti-Ig; Jackson ImmunoResearch Laboratories) or 1µg/ml R848 for 48 h at 37oC with 5% CO2. For plasmocytes differentiation and antibody production assay, CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells were cultured at a cell density of 2.105 cells per ml in above media and were stimulated with 6µg/ml CpG-B 2006, 50ng/ml IL-21 and Staphylococcus Aureus Cowan I cells (SAC, 1X; Pansorbin cells, Calbiochem) for 7 days at 37oC with 5% CO2, unless precise. Quantity of IgM and IgG secreted were measured by ELISA (READY-SET-GO! Kit, eBioscience).

RNA preparation

Total RNAs from CD11c⁺ or CD11c⁻ B cells of 15 HD (5 donors for transciptome analysis and 10 donors for qPCR) were extracted with RNeasy Mini kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen). The quality and quantity of isolated mRNAs were assessed using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and the Nanodrop device (Thermo Scientific). Only RNA samples with a minimal RNA integrity number of 7 were used for subsequent experiments. All RNA samples had a RIN $\geq 8.2 \pm 0.4$.

Microarrays

Whole human genomic DNA microarrays were used to perform one-colored gene expression profiling (4x44K Whole Human Genome, Agilent Technologies). One hundred ng for each CD11c+ or CD11c- B cells sample from 5 HD were labeled by Cyanine-3 according to the manufacturer's instructions (Low Input QuickAmp Labeling Kit, Agilent Technologies). Hybridization was performed at 65°C for 17 hours using hybridization kit (Agilent Technologies). After wash steps, microarrays were scanned with a 5 μ M pixel size using the DNA Microarray Scanner GB (Agilent Technologies). Image analysis and extraction of raw were performed with Feature Extraction Software 10.5.1.1 (Agilent Technologies). For normalization process, data were shift to 75 percentile and baseline transformed by median off all samples. Only spots which passed these quality controls on 100% of arrays in at least one of two conditions (CD11c⁺ or CD11c⁻) were selected for further analysis. Hierarchical clustering was performed with Pearson coefficient metric and Wards linkage to build the transcripts and sample dendrograms. Data were in agreement with the guidelines for Minimum Information About a Microarray Experiment and were deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Data are accessible using the following accession number: GSE112515. Non-uniform spots and saturated spots or spots with intensities below the background were not taken into account.

Functional analysis of microarrays

Data from transcriptomic analysis were analyzed with GeneSpring GX V.13.0 (Agilent Technologies). Paired Student's t-test (p-value < 0.05) with Benjamini Hochberg correction to check the False Discovery Rate (FDR) was used to determine the statistical significance in gene expression levels between CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells. The Gene Ontology (GO) analysis was used to investigate the biological processes, molecular function or cellular localization enriched in the transcripts list showing a significant fluctuation in gene expression between CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells. P value was computed by standard hypergeometric distribution. The GeneSpring Single Experiment Analysis (SEA) bio-informatics tool was used for computational analysis to identify potential curated canonical pathways with setting parameters (reactome and GenMAPP for pathway source), which are enriched in the differentially expressed transcripts list, using WikiPathways database (http://www.wikipathways.org). The significance of the association between the genes and the pathways was measured by Fisher's exact test (minimal number of entities in pathways ≥ 6 and p value ≤ 0.001). Text mining was performed with GeneSpring GX V.13.0 (direct interactions with relation score \geq 9 and relation types chosen (binding, expression, member, metabolism, promoter binding, protein modification, regulation, transport)).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Three nanograms of each RNA sample were retro-transcribed and pre-amplified in 96-wells plate containing 0.2µL Platinum Taq polymerase and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), a mixture of Taqman primer-probes specific for the transcripts of interest (Table S2) and 5µL CellsDirect qRT-PCR buffer (Invitrogen). After centrifugation, samples were incubated at 50°C for 15 min for the reverse transcription, followed by 20 cycles of 95°C 15 s and 60°C 4 min for amplification. Subsequent pre-amplified cDNA was stored at -20°C until analysis. After ¼ dilution in TE buffer, each cDNA sample was then separated into 48 separate reactions for further qPCR using the BioMark 48.48 dynamic array nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.) as described in (Hebert et al., 2019). Wells with no-RNA were used as negative controls. Data were analyzed using Real Time PCR Analysis software with normalization of the Ct value

for each gene using the mean of 5 housekeeping genes (GAPDH, β 2-M, TUBB, GUSB and HPRT1) as calibrator. We considered that gene was expressed if Ct value was < 40 and expression curve was a sigmoid. To compare expression level between samples, a standard curve was first created with a pool of cDNA from all samples. From this pool, serial dilutions were performed and qPCR values were assigned arbitrary values (6 points ranging from 100 to 0.4). Level of gene expression for samples were obtained using this standard curve.

Statistical analyses

All experiments were performed using at least three different cell cultures or blood donors in independent experiments. GraphPad Prism 7 was used to create the figures. Student's t-test and the Wilcoxon paired t-test were used to assess normally distributed data and non-normally distributed data respectively. One-way ANOVA with correction by Bonferonni's post-test, two-way ANOVA with correction by Sidak's post-test, and one-way ANOVA with Dunnetts post-test were used. p<0.05 was considered significant.

Results

Phenotyping of human CD11c+ B cell in blood of healthy individuals

CD11c⁺ B cells phenotype were studied by flow cytometry from blood of healthy individuals, in an age group between 20 and 70 years and with an equivalent number of men and women. CD11c expression's level is equivalent on monocyte and on B cell, fluctuating from dim to bright (Fig. 1a) and the percentage of CD19⁺CD11c⁺ varies from 2.9 to 54.7% (Fig. 1a and S1b; mean 18.7±14.7, n=30). CD11c⁺CD27⁺ B cells have been described to accumulate in aged women with RA (Rubtsov et al., 2011). In our study, CD11c⁺ B cells frequency is significantly different for HD belonging to different groups of age (Fig. 1b; age 20-35: mean $6.8 \pm 2.9\%$, age 35-50: mean 13.3 \pm 3.3%, age 50-70: mean 35.2 \pm 13.8%, p<0.0001) and there is a positive correlation between the frequency of $CD11c^+$ B cells and the age (p <0.0001; Pearson correlation r = 0.85) but this is independent of gender (data not shown). By using a 10 colours phenotyping approach, CD11c⁺ B cells are significantly enriched in the switched memory population (CD27⁺IgD⁻: mean 24.4 \pm 12.2% for CD11c⁻ versus mean 61.7 \pm 9.1% for CD11c⁺, p<0.0001) and in the unswitched memory population (CD27⁺IgD⁺: mean $5.7 \pm 3.3\%$ for CD11c⁻ versus mean 16.1 \pm 5.4% for CD11c⁺, p<0.0001) (Fig. 1c and 1d). CD11c⁺ B cells proportion is decreased in the naïve (CD27⁻IgD⁺: mean $48 \pm 12.7\%$ for CD11c⁻ versus mean $11.9 \pm 6.9\%$ for CD11c⁺, p<0.0001) and in the double negative population (CD27⁻IgD⁻: mean $21.9 \pm 9.7\%$ for CD11c⁻ versus mean 10.3 $\pm 6.9\%$ for CD11c^{+,} p<0.0001). No significant frequency differences are observed for plasmablast (CD38⁺⁺CD24⁻: mean $0.5 \pm 0.7\%$ versus mean $0.3 \pm 0.4\%$, p>0.1) and for transitional B cell population expressing CD11c or not $(CD24^{hi}CD38^{hi}: mean 1.1 \pm 1.1\% versus mean 2.3 \pm 2.3\%, p=0.8596, n=30).$

Among CD11c⁺ B cells, a small population, bright for CD19 and CD11c can be observed (mean $1.6 \pm 1.1\%$; range 0.4-5%, n=30, Fig. S1a and b). Interestingly, by comparison with the frequency of CD11c⁺ cells, CD11c^{hi} population is enriched in the naïve (mean 23.7 ± 18.5%, p<0.0001) and the unswitched memory population (mean 30.2 ± 13.4%, p<0.0001), and decreased in the switched memory population (Fig. S1c; mean 37.8 ± 17.9%, p<0.0001), suggesting a retrograde control of CD11c expression following B cell ontogeny and differentiation. No significant difference was observed between CD11c^{hi} and CD11c⁺ frequency for the transitional, the double negative and the plasmablast population (respectively mean $1.5 \pm 1.6\%$, $8.8 \pm 8.4\%$ and $0.6 \pm 1.1\%$). To note, CD11c^{hi} B cells have a higher proportion of larger cells than the CD11c⁺ and the CD11c⁻ B cells (Fig S1d). Therefore, CD11c is detected in every B cell subpopulation analysed suggesting a role in every stage of mature B cell

development with however an enrichment in antigen-experienced B cells, which accumulate with age, independently of gender.

Gene expression profile

To better define the cellular characteristics of $CD11c^+$ B cells, we next conducted a microarray analysis of $CD11c^+$ versus $CD11c^-$ B cells from 5 HD blood. After negative selection using magnetic bead, purified B cells from buffy coat were sorted based on CD11c expression using BD FACS Aria III. Purity of $CD11c^+$ and $CD11c^-$ B cells was checked after each sorting and was mean 95.3% (± 3.4%) and mean 99.3% (± 0.4%) respectively (Fig. S2).

In order to identify the differentially expressed genes (DEG) between paired CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells, total RNA were hybridized on whole human genome microarrays, by one-color technology and analyzed with GeneSpring GX V.13.0 (Agilent Technologies). After elimination of spikes and flagged probes, 19,905 probes which passed the quality filters were detected in all samples. Out of 19,905 transcripts, a fold change cut-off of 2 between CD11c⁺ and CD11c⁻ samples identified 1894 transcripts. In order to highlight the most discriminant transcripts, we reduce the transcripts' list to 654 by applying a fold change cut-off of 3. After paired t-test with Benjamini–Hochberg correction for multiple testing (p < 0.05), 643 DEG were significantly identified. The hierarchical clustering for the 643 DEG results in a perfect separation of CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells (Fig. S3a). These results show that CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells are extremely different according to gene expression profiles. After duplicate probes, pseudogenes and uncharacterized locis removal, 307 DEG are up-regulated and 205 are down-regulated in CD11c⁺ compared to CD11c⁻ B cells (Fig. S3b and table S1).

GO analysis was performed with the 512 DEG and identified 145 biological process which are mainly regulation of cell activation (GO:0050865; p=7.44.10-12), regulation of multicellular organismal process (GO:0051239; p=5.41.10-11), regulation of immune system process (GO:0002682; p=1.83.10-9), regulation of cell adhesion (GO:0030155; p=1.49.10-8) and response to stimulus (GO:0050896; p=2.25.10-9). In order to find molecular functions enriched in these DEG set, Wiki and KEGG pathways analysis were performed using the SEA tool from GeneSpring software and DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009). Pathways related to TLR signaling (WP1449-45049, p=4.2.10-4; WP75-46210, p=0.001; KEGG 04620, p=0.029) (Fig. 2), inflammatory response (WP453-41201, p=1.02.10-5), cell adhesion molecules (KEGG 04514, p=0.021), FoxO signaling pathway (KEGG 04068, p=0.034) and cytokine signaling pathway (KEGG 04060, p=0.04) were listed. Therefore, $CD11c^+$ B cells have a clear distinctive gene expression profile related to active immune response.

Differential expression of CD1c, CD58, CD68, CD84, CD86, CD27, CD274, Fas and CD200 on human CD11c⁺ B Cells.

Out of 512 DEG, we selected 12 transcripts coding for cell surface receptors: CD6 and CD200 are under-expressed, and ITGAX (CD11c), CD1c, CD84, CD68, CD27, Fas (CD95), CD80, CD58, CD274 and CD86 are over-expressed in CD11c⁺ B cells. Principal Component Analysis (PCA) (Component 1 = 81.48% and Component 2 = 9.48% of total variance) (Fig. 3a) and hierarchical clustering (Fig. 3b) perform with this minimal combination of 12 transcripts are sufficient to perfectly discriminate CD11c⁺ from CD11c⁻ B cells.

We then evaluated by flow cytometry if these 12 markers could discriminate CD11c⁺ from CD11c⁻ B cells as suggested by the microarray data. We find that CD11c⁺ B cells from PBMC overexpressed CD86, CD58, CD95, CD27, CD68, CD84 and CD1c in comparison with CD11c⁻ B cells (Fig. 3c), even if expression level for each marker is heterogeneous, which suggests a CD11c⁺ B cells sub-population specific level of expression. On the other hand, CD200 expression is lower for a fraction of CD11c⁺ B cells compared to CD11c⁻ B cells (Fig. 3d). No differences are observed for CD274, CD80 and CD6 which are weakly expressed by B cells (Fig. 3c and 3d). Therefore, differences observed at the mRNA expression level between CD11c⁺ B cells is confirmed at the protein level for 8 (CD86, CD58, CD95, CD27, CD68, CD84, CD1c and CD200) out of 11 markers, but expression of these markers are not strictly associated with the CD11c⁺ B cells population. However, text mining from bibliographic data performed with NLP algorithm shows that 9 out of 12 cell surface receptors (CD11c, CD1c, CD27, CD58, CD68, CD80, CD86, CD95 and CD274) are connected and form a functional network associated with CD11c (Fig. 4).

Cytokine profile of CD11c+ B Cells

In order to characterize the cytokines expressed by CD11c+ and CD11c⁻B cells, we analyzed the expression of 25 cytokines known to be secreted by B cells, in addition of 5 housekeeping genes, 7 surface markers and 1 transcription factor (Table S2), using Biomark HD real time PCR. Sorted B cells from 10 new HD, different from the 5 HD investigated in the microarray studies, were analyzed. EBI3, IL7, IL1 β , IL12p40, IFN γ , Baff and IL10 are found significantly upregulated, while IL6, IL15, IL23p19 and BCMA are found significantly downregulated in ex vivo purified CD11c⁺ B cells (Fig. 5a and b). qPCR results confirm the significant differential

expression results obtained by microarray for EBI3 and IL6 with a fold change > 3 (Table S1), and for IL7, IL15 and IL23p19 with a fold change > 2 (data not show). No significant differences are observed between CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells for the following genes: April, TNF α , IL1RA, IL12p35, TNF β , Trail, TGF β 2, CD19, Taci and BAFF-R (data not shown). IL2, IL5, IL9, IL13, IL17A, IL17F, IL27p28 and IL21 mRNA were not detected by qPCR.

The surface marker's genes CD27, CD11b and CD11c (p<0.001) as well as the transcription factor IRF5 (p<0.05) were also significantly overexpressed in CD11c⁺ B cells (Fig. 5c), which confirm microarray data for CD27 and CD11c with a fold change > 3 (Table S1), and for CD11b and IRF5 with a fold change > 2 (data not show). Although these qPCR results on new donors' sample confirm largely the microarray data, cytokines' genes overexpressed in CD11c⁺ B cells are pro inflammatory (IFN γ , EBI3, IL1 β , IL12p40), anti-inflammatory (EBI3, IL10), but play a role in B cells survival (IL7, Baff, IL10), activation and differentiation (IL1 β , IFN γ) as well as in isotype switching (EBI3, IFN γ , IL10) (Lund, 2008; Stone et al., 2019; Vazquez et al., 2015).

Differentiation of CD11c⁺ B Cells into Plasma Cells

CD11c⁺ B cells are enriched in the memory sub-population and overexpressed IRF5 which is involved plasma cells differentiation in mice and human (De et al., 2017; Lien et al., 2010). Therefore, in order to assess their ability to differentiate into antibodies secreting cells, $CD11c^+$ and $CD11c^-$ were cultured with or without stimulation (CPG + SAC + IL21) for 7 days. Plasmablasts and plasmocytes differentiation were evaluated by flow cytometry by CD27⁺CD38⁺CD138⁻ and CD27⁺CD38⁺CD138⁺ expression, respectively (Fig. 6a) (De et al., 2017). Mean 31 % (± 10%) CD11c+ B cells differentiate into plasmablasts versus mean 7% (± 2.7%) for CD11c⁻ B cells (n=6; p<0.05), and mean 8% (\pm 2.6%) CD11c⁺ B cells differentiate into plasmocytes versus mean 1% (\pm 0.2%) for CD11c⁻ B cells (n=6; p<0.04). Interestingly, even for a longer stimulation time of 9 days, no more CD11c⁻ B cells upregulate CD138 and differentiate into plasmocytes (data not show). On the opposite, for a shorter stimulation time of 5 days, mean 29% (± 17.1%) CD11c⁺ B cells differentiate into plasmablasts versus mean 6.3% (\pm 2.4%) for CD11c⁻ B cells, and mean 3.1% (\pm 2.7%) CD11c⁺ B cells differentiate into plasmocytes versus 0% (\pm 0%) for CD11c⁻ B cells (n=3; p>0.3, data not show). Then, IgM and IgG secretion were measured by ELISA. After 7 days of stimulation, CD11c⁻ B cells secrete 1.3 time less IgM and 2.8 time less IgG than CD11c⁺ B cells (Fig. 5c; for IgM, CD11c⁻: mean 18.6 ± 9.5 ng/ml; CD11c⁺: mean 24.5 \pm 6 ng/ml, n=7, p=0.011; for IgG, CD11c⁻: mean 0.6 \pm 0.3 ng/ml; CD11c⁺: mean 1.7 \pm 0.3 ng/ml, n=7, p=0.0002). As early as after 5 days of stimulation, CD11c⁻ B cells secrete 2.7 time less IgM and 1.4 time less IgG than CD11c⁺ B cells (for IgM, CD11c⁻: mean 10 ± 5.8 ng/ml; CD11c⁺: mean 27.1 ± 10.3 ng/ml, n=4, p=0.014; for IgG, CD11c⁻: mean 1 ± 0.5 ng/ml; CD11c⁺: mean 1.4 ± 0.3 ng/ml, n=4, p=0.0093). Without stimulation, neither CD11c⁻ nor CD11c⁺ B cells upregulate CD138 (data not shown) nor produce IgM or IgG (Fig. 6c). Therefore, upon stimulation, CD11c⁺ B cells are prone to differentiate into antibody secreting cells, especially plasmocytes, with a higher frequency of immunoglobulin class switched, which is probably due to the higher frequency of memory B cells in the CD11c⁺ B cells subpopulation.

Higher frequency of CD11c+ B cells in Pemphigus patients before treatment

CD11c⁺ B cells have been associated with autoimmune diseases (Claes et al., 2016; Rubtsov et al., 2011; Saadoun et al., 2013; Wang et al., 2018). Pemphigus is an autoimmune disease affecting skin and mucous membranes, with pathogenic autoantibodies directed against desmogleins 1 and 3 (Dsg1 and Dsg3). We therefore evaluated the frequency of CD11c⁺B cells in patients with active pemphigus vulgaris (PV) in comparison to HD. Patients with active PV have not a significant higher frequency of CD11c⁺B cells (p>0.05) than HD (Fig. 7a). However, Patients' age range from 19 to 79 years old, and Fig. 1b shows a significant difference of $CD11c^+ B$ cells between age groups. We therefore compared $CD11c^+ B$ cells per age groups and found that patients with active PV have a significant higher frequency of CD11c⁺ B cells than HD in age group 20-35 and 50-70, but not for the age group 35-50 (Fig. 7b). High frequency of CD11c⁺ B cells has been associated to high auto antibody titre (Jenks et al., 2018; Wang et al., 2018). For patients with active PV, percentage of CD11c⁺ B cells is not correlated to anti-Dsg1 or anti-Dsg3 antibodies titre in serum (Fig. 7c). We recently showed that first-line Rituximab treatment allowed achieving an 89% rate of complete remission (CR) off therapy at month 24 in pemphigus patients (Joly et al., 2017). Patients were then evaluated at month 36 when B cells were detectable in blood. Interestingly, PV patients in incomplete remission have a higher frequency of CD11c⁺ B cells than before treatment, while 11/14 patients in complete remission have a decreased frequency of CD11c⁺ B cells than before treatment at day 0 (Fig. 7d). Interestingly, 2 out 3 PV patient with a higher frequency of CD11c⁺ B cells than before treatment relapse few months after analysis. Therefore, CD11c⁺ B cells frequency increases during active pemphigus, decreases after healing and may increase as an indicator of disease activity.

Upregulation of CD11c upon BCR stimulation

We next addressed if CD11c⁻ B cells could upregulate CD11c upon activation. Purified CD11c⁻ B cells were cultured without stimulation or with different stimulus: CpG (TLR9 agonist), anti-Ig, CPG + anti-Ig, R848 (TLR7/8 agonist), R848 + anti-Ig for 48 hours. CD11c expression was measured by qPCR and flow cytometry. TLR9 or TLR7 stimulation does not upregulated CD11c, while BCR stimulation upregulate CD11c at the protein and mRNA level (Fig. 8a and b). Interestingly, the combine stimulation TLR + anti-Ig inhibit CD11c upregulation induced by BCR stimulation alone, at the protein and mRNA level for TLR9, while only at the protein level for TLR7. Therefore, CD11c upregulation is controlled by BCR stimulation but can be counteracted by TLR7 or TLR 9 co-stimulation.

Discussion

An unusual B cell subset characterized by CD11c expression has been described to be enriched in patients with autoimmune diseases as RA (Rubtsov et al., 2011), Sjogren's syndrome (Saadoun et al., 2013), multiple sclerosis (Claes et al., 2016) and SLE (Wang et al., 2018), as well as during infections or in aged individuals (Rubtsov et al., 2011; Weiss et al., 2009). This broad range of condition could explain why markers used to characterize this population have varied. Moreover, these B cells can be found in healthy controls as well (Lin et al., 2014). In our study, we aim to characterize CD11c⁺ B cells from HD blood.

We were able to confirm in our study that the percentage of CD11c⁺ B cells increased with age regardless of gender (Fig. 1b), as in mice in which CD11c⁺ B cells accumulate and are named ABC (Rubtsov et al., 2011). Phenotypic analysis show that the CD11c⁺ B subpopulation is significantly enriched in switched and unswitched memory B cells, while CD11c⁻ B cells are mainly naive or double negative B cells (Fig. 1d), thus confirming Rubtsov but not Wang's data (Rubtsov et al., 2011; Wang et al., 2018). However, by following Wang's gating strategy on CD11c^{hi} B cells, we could observe a significant decrease of switched memory, a significant increase of unswitched memory and naïve B cells in comparison with CD11c⁺ B cells but not the double negative B cells as Wang reported, which could be specifically expanded in SLE (Fig. S1) (Wang et al., 2018). On the other hand, we show that CD11c is expressed by every B cell subpopulation analyzed and CD11c⁺ B cells do not have a distinct phenotypic marker. This is why, in order to identify a unique surface marker and transcription signature, a microarray analysis was performed between CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells purified from 5 HD.

CD11c⁺ B cells are extremely different from CD11c⁻ B cells with 512 DEG with a fold change above 3. However, none of the cell surface markers coding gene found differentially expressed by microarray can strictly discriminate CD11c⁺ from CD11c⁻ B cells by flow cytometry because of their heterogeneous expression (Fig. 3c). To note, CD11c⁺ B cells are often characterized by low or negative expression of CD21 (Claes et al., 2016; Rubtsov et al., 2011). Interestingly, gene expression of CD21 was found downregulated in CD11c⁺ B cells with only a 2.3-fold change (p=0.0045) and was not included in our analysis. However, CD21 expression analyzed by FACS revealed that less than 10% of CD19⁺CD11c⁺ were CD21^{low/-} in blood of HD (data not shown).

In addition, wikipathways and GO analyses identify in CD11c⁺ B cells an enrichment in cell activation and adhesion, TLR signaling and inflammatory response. Indeed, CD80 and CD86 costimulatory molecule expression are increased in CD11c⁺ B cells from HD, at the mRNA

level, that was confirmed at the protein level for CD86 (Fig. 3c). This result is supported by studies showing that expression of costimulatory molecules increase in ABCs (Claes et al., 2016; Rubtsov et al., 2011; Rubtsov et al., 2015; Wang et al., 2018; Wehr et al., 2004). Interestingly, CD200 is downregulated on CD11c⁺ B cells (Fig. 3d), which by binding to CD200-R can immunosuppress monocyte (Jenmalm et al., 2006), while CD58 is upregulated, which by binding to CD2 results in adhesion and activation of T cells (Leitner et al., 2015).

Moreover, TLR7 signaling has been shown to be crucial for CD11c⁺ B cells development in mice (Rubtsov et al., 2011; Rubtsov et al., 2013) and TLR9 was upregulated in CD11c⁺ B cells of SLE patients (Wang et al., 2018). Here, we demonstrated that TLR7/8 or TLR9 stimulation of purified CD11c- B cells was not sufficient to upregulated CD11c expression (Fig. 8). On the other hand, upregulation was more efficient by BCR stimulation. Surprisingly, combine stimulation BCR + TLR inhibit CD11c expression at the protein and mRNA level for TLR9, and only at the protein level for TLR7 stimulation. Therefore, if TLR signaling is an important signaling pathways as highlighted by the microarray analysis, TLR signaling does not seem to be crucial for CD11c upregulation on human peripheral B cells.

Interferon regulatory factor (IRF) 5 is a transcription factor that can induce IFNy mRNA transcription (Barnes et al., 2001) and regulates IgG class switching in B cells (De et al., 2017; Savitsky et al., 2010). qPCR analysis showed IRF5 gene overexpression by CD11c⁺ B cells (Fig. 5c). This result is in agreement with a study conducted in mice showing that IRF5 participates in the emergence of ABCs in systemic autoimmunity (Manni et al., 2018). Activation of TLR7 and 9 induce IRF5 translocation in nucleus, thus leading to the IFN and other pro-inflammatory cytokine genes transcription (Manni et al., 2018). Indeed, we have shown a significant increase in IFN γ gene expression as well as IL1 β , IL7, IL12p40 (Fig. 5a). IL7, BAFF and April play an important role in the B cells development and survival (Vazquez et al., 2015). Moreover, an excess of BAFF has been linked to the development of autoimmune disorders that are thought to be due to the inappropriate survival of highly self-reactive B cells (Kalled, 2005; Mackay et al., 1999; Schneider et al., 1999; Thien et al., 2004). On the other hand, transcriptomic and qPCR analyses shows EBI3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) gene expression levels increase in CD11c⁺ B cells (Fig. 5a), which is a subunit of the cytokine IL27 (Pflanz et al., 2002). Interestingly, IL-27 and IFNy can induce B cell intrinsic T-bet expression which regulate Ig class switching and is required for formation of long-lived antibody secreting cells (Stone et al., 2019; Yoshimoto et al., 2004).

Similarly to what has been described in SLE patients by Wang et al., gene expression levels of IL6 are decreased and the IL10 gene expression is increased in CD11c⁺ compared to CD11c⁻ B cells (Fig. 5) (Wang et al., 2018). Although IL6 is a pro-inflammatory cytokine, it has nevertheless been demonstrated in mice that lack of IL6 can lead to immune defects (Bao and Cao, 2014; Samoilova et al., 1998). IL10 is known for its anti-inflammatory properties but it helps as well B cells differentiation and survival. Moreover, we reported previously that IL10 secretion from HD CD11c⁺ B cells following TLR9 and BCR stimulation was not detected (Lin et al., 2014), suggesting that IL10 could be all consumed by B cells activated and differentiating into antibody secreting cells. IL21 is important as well for B cell differentiation (Recher et al., 2011), and IL21R was reported to be upregulated in CD11c⁺ B cells from SLE patients (Wang et al., 2018). In our study, IL21R and IL21 are not a DEG and IL21 was not detected by qPCR.

Furthermore, TBX21 gene encoding the T-bet protein is overexpressed in CD11c⁺ B cells, confirming data from several studies particularly in mice, which have demonstrate that ABC express high levels of CD11c and the transcription factor T-bet (Barnett et al., 2016; Hao et al., 2011; Isnardi et al., 2010; Rubtsova et al., 2017; Rubtsova et al., 2013). Although the transcription factor T-bet is not usually expressed by B cells (Cruz-Guilloty et al., 2009; Townsend et al., 2004), several studies demonstrate that it has a role in Ig class switching (Liu et al., 2003; Peng et al., 2002). Moreover, Rubtsov et al. showed that CD11c⁺ T-bet⁺ B cells were more effective in presenting Ag than other B cells subpopulations in vitro and in vivo in elderly mice (Rubtsov et al., 2015).

Previous described features of $CD11c^+$ B cells that we do not confirm in our study may be the consequence of the disease, not the intrinsic properties of these cells. Although it is difficult to conclude on the pro-inflammatory profile of $CD11c^+$ B cells, there is evidence of increased gene expression of cytokines involved in survival and differentiation into antibody secreting cells. $CD11c^+$ B cells could therefore be activated cells, with an increased antigenic presentation capacity, and prone to differentiate to plasma cells. These hypothesis is supported by our results showing a higher ability of $CD11c^+$ B cells to differentiate into plasma cells (defined by CD138 expression) compared to $CD11c^-$, remaining at the plasmablast state ($CD27^+CD38^{++}$) (Fig. 6). However, we did not correlate the auto antibodies titers in pemphigus patients with the frequency of $CD11c^+$ B cells (Fig. 7c) which suggests that others factors influence antibodies secretion. Interestingly, we observe that upon treatment, frequency of $CD11c^+$ B cells decrease for pemphigus patients in remission but raise for patients in relapse (Fig. 7d). In summary, our study characterizes the $CD11c^+$ B cells in healthy humans. CD11c is expressed by every B cell subpopulation but it is enriched in the memory one, which are antigen experienced cells, with a superior capacity for plasmocytes differentiation and Ig secretion. The accumulation of $CD11c^+$ B cells, which therefore occurs naturally with age, could promote the emergence of autoimmunity.

Acknowledgements

We acknowledge the Center for Human Immunology at Institut Pasteur for providing access to Biomark Fluidigm technology and for their help. We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for writing assistance and review of the manuscript in English.

Footnotes

1 This study was supported by funding from INSERM, Normandy University Rouen and Rouen University Hospital, Department of Dermatology, France

2 Abbreviations used in this paper:

HD: Healthy Donors; RA: Rheumatoid Arthritis; SLE: Systemic Lupus Erythematosus; ABC: Age-Associated B cells; BCR: B Cell Receptor; DEG: Differentially Expressed Genes; PV: Pemphigus Vulgaris;

3 The authors declare no conflicting financial interests.

References

Bao, Y., and X. Cao. 2014. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. J Autoimmun 55:10-23.

Barnes, B.J., P.A. Moore, and P.M. Pitha. 2001. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. J Biol Chem 276:23382-23390.

Barnett, B.E., R.P. Staupe, P.M. Odorizzi, O. Palko, V.T. Tomov, A.E. Mahan, B. Gunn, D. Chen, M.A. Paley, G. Alter, S.L. Reiner, G.M. Lauer, J.R. Teijaro, and E.J. Wherry. 2016. Cutting Edge: B Cell-Intrinsic T-bet Expression Is Required To Control Chronic Viral Infection. J Immunol 197:1017-1022.

Blackford, J., H.W. Reid, D.J. Pappin, F.S. Bowers, and J.M. Wilkinson. 1996. A monoclonal antibody, 3/22, to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: evidence that ICAM-1 is a ligand for CD11c/CD18. Eur J Immunol 26:525-531.

Claes, N., J. Fraussen, M. Vanheusden, N. Hellings, P. Stinissen, B. Van Wijmeersch, R. Hupperts, and V. Somers. 2016. Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients. J Immunol 197:4576-4583.

Cruz-Guilloty, F., M.E. Pipkin, I.M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M.G. Lichtenheld, Y. Groner, and A. Rao. 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. J Exp Med 206:51-59.

De, S., B. Zhang, T. Shih, S. Singh, A. Winkler, R. Donnelly, and B.J. Barnes. 2017. B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation. Front Immunol 8:1938.

Du, S.W., T. Arkatkar, H.M. Jacobs, D.J. Rawlings, and S.W. Jackson. 2019. Generation of functional murine CD11c(+) age-associated B cells in the absence of B cell T-bet expression. Eur J Immunol 49:170-178.

Garnotel, R., L. Rittie, S. Poitevin, J.C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F.X. Maquart, A. Randoux, and P. Gillery. 2000. Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). J Immunol 164:5928-5934.

Hao, Y., P. O'Neill, M.S. Naradikian, J.L. Scholz, and M.P. Cancro. 2011. A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. Blood 118:1294-1304.

Hébert, V., Petit, M., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Riou, G., Derambure, C., Boyer, O., Joly, P., and Calbo, S. (2019b). Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen. Front. Immunol. 10, 1794.

Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4:44-57.

Ihanus, E., L.M. Uotila, A. Toivanen, M. Varis, and C.G. Gahmberg. 2007. Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. Blood 109:802-810.

Ingalls, R.R., and D.T. Golenbock. 1995. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. J Exp Med 181:1473-1479.

Isnardi, I., Y.S. Ng, L. Menard, G. Meyers, D. Saadoun, I. Srdanovic, J. Samuels, J. Berman, J.H. Buckner, C. Cunningham-Rundles, and E. Meffre. 2010. Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. Blood 115:5026-5036.

Jenks, S.A., K.S. Cashman, E. Zumaquero, U.M. Marigorta, A.V. Patel, X. Wang, D. Tomar, M.C. Woodruff, Z. Simon, R. Bugrovsky, E.L. Blalock, C.D. Scharer, C.M. Tipton, C. Wei, S.S. Lim, M. Petri, T.B. Niewold, J.H. Anolik, G. Gibson, F.E. Lee, J.M. Boss, F.E. Lund, and I. Sanz. 2018. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. Immunity 49:725-739 e726.

Jenmalm, M.C., H. Cherwinski, E.P. Bowman, J.H. Phillips, and J.D. Sedgwick. 2006. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. J Immunol 176:191-199.

Joly, P., M. Maho-Vaillant, C. Prost-Squarcioni, V. Hebert, E. Houivet, S. Calbo, F. Caillot, M.L. Golinski, B. Labeille, C. Picard-Dahan, C. Paul, M.A. Richard, J.D. Bouaziz, S. Duvert-Lehembre, P. Bernard, F. Caux, M. Alexandre, S. Ingen-Housz-Oro, P. Vabres, E. Delaporte, G. Quereux, A. Dupuy, S. Debarbieux, M. Avenel-

Audran, M. D'Incan, C. Bedane, N. Beneton, D. Jullien, N. Dupin, L. Misery, L. Machet, M. Beylot-Barry, O. Dereure, B. Sassolas, T. Vermeulin, J. Benichou, P. Musette, and d. French study group on autoimmune bullous skin. 2017. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet 389:2031-2040.

Kalled, S.L. 2005. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. Immunol Rev 204:43-54.

Kamp, V.M., J. Pillay, J.W. Lammers, P. Pickkers, L.H. Ulfman, and L. Koenderman. 2012. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. J Leukoc Biol 92:1011-1020.

Leitner, J., D. Herndler-Brandstetter, G.J. Zlabinger, B. Grubeck-Loebenstein, and P. Steinberger. 2015. CD58/CD2 Is the Primary Costimulatory Pathway in Human CD28-CD8+ T Cells. J Immunol 195:477-487.

Li, H., F. Borrego, S. Nagata, and M. Tolnay. 2016. Fc Receptor-like 5 Expression Distinguishes Two Distinct Subsets of Human Circulating Tissue-like Memory B Cells. J Immunol 196:4064-4074.

Lien, C., C.M. Fang, D. Huso, F. Livak, R. Lu, and P.M. Pitha. 2010. Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 107:4664-4668.

Lin, W., D. Cerny, E. Chua, K. Duan, J.T. Yi, N.B. Shadan, J. Lum, M. Maho-Vaillant, F. Zolezzi, S.C. Wong, A. Larbi, K. Fink, P. Musette, M. Poidinger, and S. Calbo. 2014. Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. J Immunol 193:2258-2266.

Liu, N., N. Ohnishi, L. Ni, S. Akira, and K.B. Bacon. 2003. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. Nat Immunol 4:687-693.

Loike, J.D., B. Sodeik, L. Cao, S. Leucona, J.I. Weitz, P.A. Detmers, S.D. Wright, and S.C. Silverstein. 1991. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. Proc Natl Acad Sci U S A 88:1044-1048.

Lund, F.E. 2008. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. Curr Opin Immunol 20:332-338.

Mackay, F., S.A. Woodcock, P. Lawton, C. Ambrose, M. Baetscher, P. Schneider, J. Tschopp, and J.L. Browning. 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp Med 190:1697-1710.

Manni, M., S. Gupta, E. Ricker, Y. Chinenov, S.H. Park, M. Shi, T. Pannellini, R. Jessberger, L.B. Ivashkiv, and A.B. Pernis. 2018. Regulation of age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity. Nat Immunol 19:407-419.

Nicolas, B., J. Pascal, G. Marie-Laure, C. Natacha, L. Annick, L. Anis, R. Gaetan, C. Frederique, B. Philippe, B. Christophe, D. Emmanuel, C. Guillaume, D. Anne, H. Michael, C. Sebastien, and M. Philippe. 2019. B-cell depletion induces a shift in self antigen specific B-cell repertoire and cytokine pattern in patients with bullous pemphigoid. Sci Rep 9:3525.

Peng, S.L., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher. 2002. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. Proc Natl Acad Sci U S A 99:5545-5550.

Pflanz, S., J.C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, J.L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T.K. McClanahan, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, and R.A. Kastelein. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. Immunity 16:779-790.

Recher, M., L.J. Berglund, D.T. Avery, M.J. Cowan, A.R. Gennery, J. Smart, J. Peake, M. Wong, S.Y. Pai, S. Baxi, J.E. Walter, U. Palendira, G.A. Tangye, M. Rice, S. Brothers, W. Al-Herz, H. Oettgen, H. Eibel, J.M. Puck, F. Cattaneo, J.B. Ziegler, S. Giliani, S.G. Tangye, and L.D. Notarangelo. 2011. IL-21 is the primary common gamma chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. Blood 118:6824-6835.

Rosen, H., and S.K. Law. 1990. The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement. Curr Top Microbiol Immunol 153:99-122.

Rubtsov, A.V., K. Rubtsova, A. Fischer, R.T. Meehan, J.Z. Gillis, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2011. Tolllike receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. Blood 118:1305-1315. Rubtsov, A.V., K. Rubtsova, J.W. Kappler, J. Jacobelli, R.S. Friedman, and P. Marrack. 2015. CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs. J Immunol 195:71-79.

Rubtsov, A.V., K. Rubtsova, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2013. TLR7 drives accumulation of ABCs and autoantibody production in autoimmune-prone mice. Immunol Res 55:210-216.

Rubtsova, K., A.V. Rubtsov, J.M. Thurman, J.M. Mennona, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2017. B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. J Clin Invest 127:1392-1404.

Rubtsova, K., A.V. Rubtsov, L.F. van Dyk, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2013. T-box transcription factor Tbet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E3216-3224.

Saadoun, D., B. Terrier, J. Bannock, T. Vazquez, C. Massad, I. Kang, F. Joly, M. Rosenzwajg, D. Sene, P. Benech, L. Musset, D. Klatzmann, E. Meffre, and P. Cacoub. 2013. Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjogren's syndrome-associated lymphoproliferation. Arthritis Rheum 65:1085-1096.

Samoilova, E.B., J.L. Horton, B. Hilliard, T.S. Liu, and Y. Chen. 1998. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. J Immunol 161:6480-6486.

Savitsky, D.A., H. Yanai, T. Tamura, T. Taniguchi, and K. Honda. 2010. Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus. Proc Natl Acad Sci U S A 107:10154-10159.

Schittenhelm, L., C.M. Hilkens, and V.L. Morrison. 2017. beta2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. Front Immunol 8:1866.

Schneider, P., 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, and J. Tschopp. 1999. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 189:1747-1756.

Stone, S.L., J.N. Peel, C.D. Scharer, C.A. Risley, D.A. Chisolm, M.D. Schultz, B. Yu, A. Ballesteros-Tato, W. Wojciechowski, B. Mousseau, R.S. Misra, A. Hanidu, H. Jiang, Z. Qi, J.M. Boss, T.D. Randall, S.R. Brodeur, A.W. Goldrath, A.S. Weinmann, A.F. Rosenberg, and F.E. Lund. 2019. T-bet Transcription Factor Promotes Antibody-Secreting Cell Differentiation by Limiting the Inflammatory Effects of IFN-gamma on B Cells. Immunity 50:1172-1187 e1177.

Thien, M., T.G. Phan, S. Gardam, M. Amesbury, A. Basten, F. Mackay, and R. Brink. 2004. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. Immunity 20:785-798.

Townsend, M.J., A.S. Weinmann, J.L. Matsuda, R. Salomon, P.J. Farnham, C.A. Biron, L. Gapin, and L.H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. Immunity 20:477-494.

Tung, J.W., K. Heydari, R. Tirouvanziam, B. Sahaf, D.R. Parks, and L.A. Herzenberg. 2007. Modern flow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med 27:453-468, v.

Vazquez, M.I., J. Catalan-Dibene, and A. Zlotnik. 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. Cytokine 74:318-326.

Wang, S., J. Wang, V. Kumar, J.L. Karnell, B. Naiman, P.S. Gross, S. Rahman, K. Zerrouki, R. Hanna, C. Morehouse, N. Holoweckyj, H. Liu, T. Autoimmunity Molecular Medicine, Z. Manna, R. Goldbach-Mansky, S. Hasni, R. Siegel, M. Sanjuan, K. Streicher, M.P. Cancro, R. Kolbeck, and R. Ettinger. 2018. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet (+) B cells in SLE. Nat Commun 9:1758.

Wehr, C., H. Eibel, M. Masilamani, H. Illges, M. Schlesier, H.H. Peter, and K. Warnatz. 2004. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. Clin Immunol 113:161-171.

Weiss, G.E., P.D. Crompton, S. Li, L.A. Walsh, S. Moir, B. Traore, K. Kayentao, A. Ongoiba, O.K. Doumbo, and S.K. Pierce. 2009. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. J Immunol 183:2176-2182.

Yoshimoto, T., K. Okada, N. Morishima, S. Kamiya, T. Owaki, M. Asakawa, Y. Iwakura, F. Fukai, and J. Mizuguchi. 2004. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. J Immunol 173:2479-2485.

Figure and legends



Figure 1: Phenotyping of human CD11c+ B cells.

PBMCs are stained with anti-CD45, CD19, CD11c, CD27, CD38, CD24 and IgD. Dead cells are excluded by Live/Dead staining and blood lymphocyte population is gated to determine the percentage of different B cells subsets. (a) Expression level, proportion of CD19⁺ B cells expressing CD11c and gating strategy are shown to study CD19⁺CD11c⁻ and CD19⁺CD11c⁺. (b) Percentage of CD11c⁺ B cells for donors between 20 to 35, 35 to 50, and 50 to 70 years old (n=10 for each group). Significant difference is determined by one-way ANOVA with correction by Bonferonni's multiple comparison test. Correlation of percentage of CD11c+ B cells with age of donors, for woman (open circle) and male (black square) is assessed using Pearson's rank correlation coefficient (p<0.0001, R2=0.6276). (c) CD27, IgD, CD24 and CD38 expression in subpopulation CD19⁺CD11c⁻ and CD19⁺CD11c⁺, (d) and proportion of transitional B cells (CD24^{hi}CD38^{hi}), naïve (CD27⁻IgD⁺), switched memory (CD27⁺IgD⁻), unswitched memory (CD27⁺IgD⁺), double negative (CD27⁻IgD⁻) and plasmablast (CD38⁺⁺CD24⁻) for n= 30 HD are shown. Significant difference was determined by two-way ANOVA with correction by Sidak's multiple comparison test. ***p<0,001, ****p<0,0001.



Figure 2: Regulation of toll-like receptor signaling pathway (Homo sapiens) (WP1449 45049 WikiPathway).

In the 643 differentially expressed mRNA between CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells, there was significant enrichment of mRNA involved in TLR signaling pathway (p value = 4.2.10-4). The p value was determined by standard hypergeometric distribution. This enrichment involved 21 mRNA (12 mRNA for fold change >2 (yellow), and 9 mRNA for fold change >3 (orange)). Arrows indicate if genes are upregulated (red) or downregulated (green).


Figure 3: Minimal combination of 12 cell surface markers perfectly discriminate CD11c+ from CD11c- B cells.

(a) Principal component analysis of 10 samples (paired CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells from 5 HD) performed with gene expression level (fold change) of the 12 mRNA corresponding to cell surface markers among the 512 transcripts differentially expressed between CD11c⁺ (red dots) and CD11c⁻ (blue dots) B cells. Component 1: 81.48%; component 2: 9.48%. (b) Hierarchical clustering shows that minimal combination of 12 transcripts is sufficient to perfectly discriminate CD11c⁺ from CD11c⁻ B cells. (c) and (d) FACS analysis of CD11c⁺ (red histograms) and CD11c⁻ (blue histograms) is performed to validate this combination of markers at the protein level (one representative result of three independent experiments is presented).



Figure 4: gene network analysis showing association between DEG.

Text mining performed with NLP algorithm shows that 9 out of 12 cell surface receptors are connected. Circles with + and - symbols represent positive and negative regulations respectively. Symbols (blue, red and purple squares, triangles and circles) shows different modes of relations like binding, expression and regulation.



Figure 5: Cytokine profile of CD11c+ B cells.

(a) Quantitative PCR analysis of CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells from 10 HD is performed to measure EBI3, IL7, IL1 β , IL12p40, IFN γ , Baff, IL10, (b) IL6, IL15, IL23p19, BCMA, (c) CD27, CD11b, CD11c and IRF5 gene expression levels. Relative expression levels of transcripts were normalized with mean expression of 5 housekeeping genes (HPRT1, β 2M, GUSB, TUBB and GAPDH). Bar graphs show mean ± SEM of relative expression. Means are compared using the Wilcoxon paired t-test: *p <0.05; **p <0.01.



Figure 6: CD11c+ B cells differentiate into antibody secreting cells.

To evaluate their ability to differentiate into antibodies secreting cells, purified CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells were cultured with or without stimulation (CPG + SAC + IL21). Cells and supernatants are analyzed at day 7. (a) Gating strategy is shown to study plasma cells (CD38⁺CD27⁺) and plasmocytes (CD38⁺CD138⁺) (one representative result of 3 independent experiments is presented). (b) Bar graphs show mean \pm SEM of % CD38⁺CD27⁺ and % CD38⁺CD138⁺. Significant differences are determined using student's t-test (n=3; *p<0.05). (c) IgG and IgM secretion are measured by ELISA (n=7). Bar graphs show mean \pm SEM of quantity of antibodies (ng/ml). Significant difference is determined by two-way ANOVA with correction by Sidak's multiple comparison test. *p <0.05; ***p<0.001.



Figure 7: Higher frequency of CD11c+ B cells in blood of pemphigus patients before treatment.

(a) Percentage of CD19⁺CD11c⁺ B cells for HD (n=52) and PV patients (n=28) is determined as in figure 1. Means are compared using the Wilcoxon paired t-test and are non-significate. (b) Percentage of CD19⁺CD11c⁺ B cells for HD and PV patients are compared for different age groups: 20 to 35, 35 to 50, and 50 to 70 years old (n=10 for HD per each group; n=7, n=9 and n=12 for PV per respective groups). Significant difference is determined by two-way ANOVA with correction by Sidak's multiple comparison test. *p <0.05; ****p<0.0001. (c) Correlations between anti-Dsg1 or anti-Dsg3 antibodies and CD11c⁺CD19⁺ B cells percentage are assessed using Pearson's rank correlation coefficient. (p value ns, R2=0,0007809 for anti-Dsg1; p value ns, R2= 0,03692 for anti-Dsg3) (d) PV patients were separated in incomplete or complete remission 36 months after treatment; Percentage of CD11c⁺CD19⁺ B cells is measured by flow cytometry for each PV patients before and after treatment. Significant differences are determined using Wilcoxon's t-test are non-significate.



Figure 8: Upregulation of CD11c upon BCR stimulation.

CD11c expression was measured after defined stimulation on purified CD11c⁻ B cells (a) by flow cytometry (one representative result of 3 independent experiments is presented) and (b) by qPCR (n=4). Bar graphs show mean \pm SEM of relative CD11c expression. Means are compared using one-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test: *p <0.05, **p <0.01.



Figure Supplemental 1: Phenotyping of CD19^{hi}CD11c^{hi} B cell in blood of healthy individuals

PBMCs are stained similarly as in Figure 1 (a) Gating strategy is shown to study percentage of CD19^{hi}CD11c^{hi}. (b) Percentage of CD11c⁺ and CD11c^{hi} B cells in blood of HD are shown (n=30). (c) Proportion of transitional B cells (CD24^{hi}CD38^{hi}), naïve (CD27⁻IgD⁺), switched memory (CD27⁺IgD⁻), unswitched memory (CD27⁺IgD⁺), double negative (CD27⁻IgD⁻) and plasmablast (CD38⁺⁺CD24⁻) for CD11c⁺ and CD11c^{hi} B cells are shown. Significant difference was determined by two-way ANOVA with correction by Sidak's multiple comparison test. ****p<0.0001 (d) Forward scatter histograms overlay for CD19⁺CD11c⁻ (grey), CD19⁺CD11c⁺ (dark grey) and CD19⁺CD11c^{hi} (black) is shown. Line represents gating strategy to determine Geo Mean fluorescence intensity, which are respectively 0.98, 10.8, 11.3, x 10⁴.



Figure Supplemental 2: Sorting of CD11c+ and CD11c- B cells.

Purified B cells by negative selection using magnetic beads were stained with Live/Dead dye, anti-CD19 PerCP and anti-CD11c APC antibodies. CD11c⁺ and CD11c⁻ CD19⁺ B cells were sorted using FACS Aria III. Purity of CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells was checked after each sorting.



Figure Supplemental 3: Gene expression profiling of CD11c+ and CD11c- B cells.

Ten samples of CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells from 5 different HD were hybridized on 4×44 K whole human genome microarrays. (a) Volcano plot resulting from the paired t-test with the Benjamini–Hochberg correction for estimation of the false discovery rate (p < 0.05 and fold change 3). Six hundred and forty-three differentially expressed transcripts between CD11c+ and CD11c⁻ B cells are identified. Fold change (FC) is the ratio of relative abundance of transcripts in CD11c⁺ versus CD11c⁻ B cells. (b) Hierarchical clustering (Pearson coefficient metric and Wards linkage) is used to obtain the transcripts and sample dendrograms, resulting in a perfect separation of CD11c⁺ and CD11c⁻ B cells samples. Three hundred and seven transcripts were up-regulated and 205 down-regulated.