



**HAL**  
open science

# Étude longitudinale des anticorps dans le pemphigus

Marie Petit

► **To cite this version:**

Marie Petit. Étude longitudinale des anticorps dans le pemphigus. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR056 . tel-03517520

**HAL Id: tel-03517520**

**<https://theses.hal.science/tel-03517520>**

Submitted on 7 Jan 2022

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

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



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Etude longitudinale des anticorps dans le pemphigus.**

**Présentée et soutenue par  
MARIE PETIT**

**Thèse soutenue le 07/10/2021  
devant le jury composé de**

MME VALERIE GOUILLEUX-GRUART	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE JAMIN	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE BRET. OCCIDENTALE UBO	Rapporteur du jury
MME EMILIE CAMBERLEIN	MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE NANTES	Membre du jury
MME SOPHIE CANDON	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. DENIS JULIEN	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD	Membre du jury
M. PASCAL JOLY	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par PASCAL JOLY, PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE, MALADIES  
NEUROMUSCULAIRES ET THERAPIES REGENERATRICES**

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse le Pr. Pascal Joly et mon co-encadrant de thèse le Dr. Sébastien Calbo pour m'avoir offert la possibilité de pouvoir réaliser cette thèse. Merci Sébastien d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir soutenu dans ce projet malgré mes moments de doute. Merci M. Joly de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour votre gentillesse et pour vos conseils avisés tout au long de cette thèse.

Merci également à Marie-Laure, Maud et Vivien pour leur aide et leurs conseils pour les expérimentations. Merci Maud et Marie-Laure pour avoir accepté de corriger une partie de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le Pr. Olivier Boyer pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses conseils éclairés.

Je remercie le Dr. Christophe Jamin et le Dr. Valérie Gouilleux-Gruart d'avoir gentiment accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi que le Dr. Emilie Camberlein, le Pr. Denis Jullien et le Pr. Sophie Candon d'avoir accepté d'être examinateur.

J'aimerais également remercier le laboratoire Glyco-Mev pour l'accueil et l'aide apportée dans ce projet de thèse et plus particulièrement le Pr. Muriel Bardor, Marie-Laure Wallet-Balieu et Carole Burel pour leur gentillesse et leur expertise. Je remercie également la plateforme PISSARO, et en particulier le Dr. Philippe Chan pour l'aide et les conseils concernant la spectrométrie de masse, ainsi que Damien Schappman de la plateforme PRIMACEN et le Pr. Thierry Lecroq du laboratoire LITIS pour l'aide en imagerie cellulaire et en analyse bio-informatique.

Un grand merci à tous mes collègues doctorants (Mélanie, Parvin, Baptiste, Marion, Charlotte, Marie, Audrey, Léa, Laurine, Allan et Henri), à la meilleure technicienne de laboratoire Justine et au Grand Chercheur Romain pour le soutien moral, les fous rires et les soirées en dehors du labo. Un merci plus particulier à Mel, Romain, Bapeutiste, Cha-cha et Queen Dark Marie pour avoir accepté de relire ce manuscrit et au bureau des Toupoutous pour avoir subi avec le sourire ces derniers mois de rédaction. Merci pour les chansons idiotes, les wesh en pagaille, les batailles de gifs et les mèmes réconfortants. Restez stables les amis !

Un autre grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire INSERM U1234 pour ces 4 années de thèse qui auraient été bien différentes sans vous. Merci pour votre gentillesse, vos conseils bienveillants et votre bonne humeur à toutes épreuves. Un merci tout particulier à Chantal pour m'avoir aidé à organiser et à gérer tout le côté administratif de cette fin de thèse (SYGAL ne nous aura pas aidé !) ainsi qu'à Laurent, Cata et Christophe pour toute l'aide et les conseils sur les manips.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse. Merci Maman de m'avoir écouté te parler pendant des heures de mes problèmes de manips et d'avoir accepté de corriger ce manuscrit. Merci Papa, Dimitri, Justine, Elyas et Nora, vous m'avez plus souvent donné de l'énergie pour finir cette thèse que vous ne l'imaginez. Merci Chloé pour ton soutien depuis la 1<sup>ère</sup> année de licence et pour toutes les soirées resto/détente. Merci Mélanie et Justine pour les week-ends Uber et brunch à parler jusqu'au milieu de la nuit.

Un grand merci à tous pour cette expérience qui m'aura fait grandir tant intellectuellement qu'émotionnellement. Je ne suis définitivement plus la même personne qu'avant mon arrivée ici et c'est en grande partie grâce à chacun d'entre vous.

# Table des matières

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
RESUME	8
ABSTRACT	10
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	17
I. Le système immunitaire	19
1. Le système immunitaire inné	19
A. Les barrières anatomiques et physiologiques	20
B. L'immunité innée humorale	20
C. L'immunité innée cellulaire	22
2. Le système immunitaire adaptatif	27
II. La tolérance immunologique	28
1. La tolérance centrale	29
A. La tolérance centrale dans le thymus	29
B. La tolérance centrale dans la moelle osseuse	30
2. La tolérance périphérique	31
A. La tolérance périphérique des lymphocytes T	31
B. La tolérance périphérique des lymphocytes B	34
III. Les maladies auto-immunes	34
1. Prévalence et facteurs des maladies auto-immunes	34
2. La physiopathologie des maladies auto-immunes	35
3. Les dermatoses bulleuses auto-immunes	37
IV. Les acteurs des maladies auto-immunes	37
1. Les lymphocytes T	37
A. Le récepteur aux cellules T	38
B. Les lymphocytes T cytotoxiques	41
C. Les lymphocytes T <i>helper</i>	41
D. Les lymphocytes T dans le pemphigus	44

2.	Les lymphocytes B	44
A.	Le récepteur aux cellules B	44
B.	Ontologie des lymphocytes B	50
C.	Les lymphocytes B mémoires	52
D.	Les plasmocytes	53
E.	Les lymphocytes B dans le pemphigus	54
3.	Les anticorps	54
A.	Structure d'un anticorps	54
B.	Les isotypes	55
C.	Les sous-classes d'immunoglobulines G	57
D.	Les fonctions effectrices des immunoglobulines G	60
E.	Les anticorps dans le pemphigus	63
V.	La <i>N</i> -glycosylation des anticorps	64
1.	Définition de la <i>N</i> -glycosylation	65
2.	Les sites de <i>N</i> -glycosylation de la partie Fc des anticorps	68
3.	La <i>N</i> -glycosylation des IgG en condition physiologique	70
A.	La <i>N</i> -glycosylation de la partie Fc	70
B.	La <i>N</i> -glycosylation de la partie Fab	73
4.	Les modifications extracellulaires de la <i>N</i> -glycosylation	74
5.	La <i>N</i> -glycosylation des IgG dans les maladies auto-immunes	75
VI.	Un modèle de maladies auto-immune induite par les auto-anticorps : le pemphigus	77
1.	L'épidémiologie	77
2.	La physiopathologie du pemphigus	78
A.	Les antigènes du pemphigus : les desmoglénines	78
B.	La clinique et l'histologie des différents pemphigus	80
C.	Les autres antigènes du pemphigus	84
3.	Les facteurs de risques	84
A.	Les facteurs génétiques	84
B.	Les facteurs environnementaux	85
4.	Les différents traitements	85
A.	Les corticostéroïdes systémiques	85
B.	Le Rituximab : traitement par déplétion des LB	86

C. Les autres traitements	87
5. La pathogénicité des aAc dans le pemphigus	88
OBJECTIFS	91
RESULTATS	93
Première partie : Etude longitudinale des immunoglobulines G dans le pemphigus	94
I. Résultats complémentaires	118
1. Matériels et méthodes	118
A. Sérum et purification des immunoglobulines G	118
B. Analyse de la N-glycosylation des immunoglobulines G par spectrométrie de masse	119
C. Analyse statistique	119
2. Résultats	119
3. Conclusions	120
II. Conclusions de la partie I	122
Deuxième partie : Etude longitudinale des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléine 3 dans le pemphigus	123
I. Etude longitudinale de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3	124
1. Mise au point du protocole de purification des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par chromatographie d'affinité	124
2. Mise au point du test de pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par immunofluorescence	125
A. Matériels et méthodes	125
B. Détermination de la quantité d'immunoglobulines G anti-desmogléines 3 nécessaire pour induire une pathogénicité <i>in vitro</i>	126
3. Résultats de l'étude longitudinale de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par immunofluorescence	127
4. Conclusions	131
II. Etude longitudinale du répertoire des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 de patients atteints de pemphigus par analyse protéomique	131
1. Méthode d'analyse du répertoire des immunoglobulines G anti-desmogléines 3	131
2. Digestion de l'anticorps monoclonal anti-desmogléine 3 AK23 par différentes enzymes de restriction : trypsine, chymotrypsine, LysC, AspN et GluC	134
3. Digestion des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 d'un patient atteint de	

pemphigus en phase active par différentes enzymes de restriction : trypsine, LysC et AspN	139
4. Conclusions	141
III. Etude longitudinale de la <i>N</i> -glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par protéomique dans le pemphigus, avant et après traitement	141
1. Mise au point du protocole d'étude de la <i>N</i> -glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par spectrométrie de masse	142
2. Résultats de l'étude de la <i>N</i> -glycosylation des IgG anti-DSG3	144
3. Conclusions	145
IV. Conclusions de la partie II	145
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	146
Première partie : Etude longitudinale des immunoglobulines G dans le pemphigus	147
I. Lien entre la <i>N</i> -glycosylation et la pathogénicité des immunoglobulines G	147
II. Identification de <i>N</i> -glycanes spécifiques du pemphigus	150
III. Perspectives	151
Deuxième partie : Etude longitudinale des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléines 3 dans le pemphigus	152
I. Comparaison de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 et celle des immunoglobulines G	152
II. Etude longitudinale du répertoire des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par protéomique dans le pemphigus, avant et après traitement	153
III. Etude longitudinale de la <i>N</i> -glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 dans le pemphigus	154
IV. Perspectives	155
CONCLUSION	157
BIBLIOGRAPHIE	159
ANNEXES	182

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE INNE ET ADAPTATIF	20
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT DES LYMPHOCYTES T ET DES LYMPHOCYTES B AUTO-REACTIFS DE LA TOLERANCE CENTRALE ET LEUR ENGAGEMENT DANS LA PERIPHERIE.	29
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE SUPPRESSION ACTIVE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS	33
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE ENTRE LES LYMPHOCYTES T ET LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES	38
FIGURE 5 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA LIAISON ENTRE LE RECEPTEUR AUX CELLULES T ET LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE PRESENTANT LE PEPTIDE	39
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU REARRANGEMENT GENIQUE D'UNE IMMUNOGLOBULINE	40
FIGURE 7 : STRUCTURE D'UN BCR	45
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA RECOMBINAISON SOMATIQUE ET DE LA COMMUTATION ISOTYPIQUE	47
FIGURE 9 : ORGANISATION DES SEGMENTS DE GENES DES DIFFERENTES CHAINES D'IMMUNOGLOBULINE	50
FIGURE 10 : ONTOGENESE DES LYMPHOCYTES B	52
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINE G (IgG)	57
FIGURE 12 : STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES G4 (IgG4)	60
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES RECEPTEURS AUX FRAGMENT FC GAMMA	62
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECYCLAGE DES IMMUNOGLOBULINES G PAR LE RECEPTEUR FC NEONATAL	63
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA O-GLYCOSYLATION ET DE LA N-GLYCOSYLATION DE GLYCOPROTEINES HUMAINES	65
FIGURE 16 : BIOSYNTHESE DES N-GLYCANES DANS LA VOIE SECRETRICE	67
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SITES DE GLYCOSYLATION EN FONCTION DES ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINE	70
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA GLYCOSYLATION DES IMMUNOGLOBULINES G	71
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CLASSIFICATION DES N-GLYCANES EN FONCTION DE LEUR NIVEAU DE GALACTOSYLATION	72
FIGURE 20 : MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES IMMUNOGLOBULINES G EN FONCTION DU VIEILLISSEMENT ET DES MALADIES	75
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU DESMOSOME	79
FIGURE 22 : PHOTOGRAPHIE ET HISTOLOGIE DE LA PEAU D'UN PATIENT ATTEINT DE PEMPHIGUS FOLIACE	81
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DE LA PEAU	81
FIGURE 24 : PHOTOGRAPHIE ET HISTOLOGIE DE LA PEAU D'UN PATIENT ATTEINT DE PEMPHIGUS VULGAIRE CUTANEOMUQUEUX	82
FIGURE 25 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA THEORIE DE LA COMPENSATION	83
FIGURE 26 : RESULTATS DE LA COMPARAISON DES STRUCTURES DE N-GLYCANES ENTRE LES IgG DE DONNEURS SAINS ET CELLES DE PATIENTS EN PHASE ACTIVE	120
FIGURE 27 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MATURATION DES N-GLYCANES DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET L'APPAREIL DE GOLGI	121
FIGURE 28 : GAMME D'IMMUNOGLOBULINE G ANTI-DESMOGLEINE 3 AFIN DE DETERMINER LA QUANTITE D'AUTO-ANTICORPS NECESSAIRE POUR INDUIRE UNE PATHOGENICITE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE	127
FIGURE 29 : ÉVOLUTION DES VALEURS ELISA DES ANTICORPS ANTI-DSG1 (VERT) ET ANTI-DSG3 (ORANGE) ET COURBE DE PREDNISOLONE DES PATIENTS.	128
FIGURE 30 : ÉTUDE LONGITUDINALE DE LA PATHOGENICITE DES IMMUNOGLOBULINES G (IgG) ANTI-DESMOGLEINE 3 (DSG3) PAR IMMUNOFLOUORESCENCE CHEZ TROIS PATIENTS ATTEINTS DE PEMPHIGUS VULGAIRE	129
FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODOLOGIE D'ÉTUDE DU REPERTOIRE PUBLIEE PAR CHEN <i>ET AL.</i>	132
FIGURE 32 : TAUX DE RECOUVREMENT DE LA SEQUENCE DE LA CHAÎNE LOURDE DE L'IMMUNOGLOBULINE G MURINE ANTI-DESMOGLEINE-3 HUMAINE AK23 PAR LES PEPTIDES GENERES APRES DIGESTION DE L'AC PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION (LysC, TRYPSINE, CHYMOTRYPSINE, AspN ET GLUC) ET SEQUENCES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	136
FIGURE 33 : TAUX DE RECOUVREMENT DE LA SEQUENCE DE LA CHAÎNE LEGERE DE L'IMMUNOGLOBULINE G MURINE ANTI-DESMOGLEINE-3 HUMAINE AK23 PAR LES PEPTIDES GENERES APRES DIGESTION PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION (LysC, TRYPSINE,	

CHYMOTRYPSINE, ASPN ET GLUC) SEQUENCES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	138
FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA LOCALISATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES GENEREES PAR LE CHEVAUCHEMENT DE PEPTIDES OBTENUS APRES DIGESTION PAR LES 3 ENZYMES DE RESTRICTION SELECTIONNEES (TRYPSINE, LYSC ET ASPN) SUR LA PARTIE VARIABLE DE AUTO-ANTICORPS	140
FIGURE 35 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE OPTIMISE D'ANALYSE DES IMMUNOGLOBULINES G ANTI-DESMOGLEINE 3 PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	143
FIGURE 36 : SPECTRES DE MASSE DE N-GLYCANES ISSUS D'IMMUNOGLOBULINE G OU D'IMMUNOGLOBULINE G ANTI-DESMOGLEINE 3	145

# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PROPRIETES DES ISOTYPES ET DES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES.....	55
TABLEAU 2 : LES SITES DE GLYCOSYLATION DES ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINES.....	69

# RESUME

Le pemphigus est une maladie auto-immune associée à la présence d'auto-anticorps pathogènes reconnaissant des protéines d'adhésion de la peau appelées desmogléines 1 et 3. Le caractère pathogène des anticorps a été démontré par l'observation de pemphigus néonataux chez des nouveaux nés dont la mère était atteinte de pemphigus et par des expériences de transfert passif chez la souris. Néanmoins, lors d'une précédente étude clinique menée par le laboratoire, la présence d'auto-anticorps a été détectée chez certains patients en rémission complète. Pour comprendre ce phénomène, nous avons étudié longitudinalement la pathogénicité des immunoglobulines G et des immunoglobulines G anti-desmogléine 3, qui sont les auto-anticorps les plus fréquemment présents chez les patients après traitement. Divers phénomènes peuvent être à l'origine de modifications de la pathogénicité des anticorps tels que leur répertoire ou leur *N*-glycosylation. En effet, des études ont démontré que la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléine 3 était dépendante de l'épitope reconnu. De plus, dans un grand nombre de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux systémique, des modifications de la *N*-glycosylation des immunoglobulines G et des auto-anticorps ont été identifiées, indiquant un lien entre la *N*-glycosylation et la pathogénicité des anticorps.

Pour tester notre hypothèse d'absence de pathogénicité des anticorps chez les patients en rémission, nous avons étudié la *N*-glycosylation des immunoglobulines G sériques. Tout d'abord, nous avons établi un lien entre la pathogénicité des anticorps et leur *N*-glycosylation *in vitro*. La digestion de l'anticorps monoclonal anti-desmogléine 3 AK23 ou des immunoglobulines G de patients par la neuraminidase afin de retirer les acides sialiques entraîne une diminution de leur activité pathogène. Puis, la pathogénicité et la *N*-glycosylation des immunoglobulines G circulantes ont été analysées longitudinalement chez des patients traités par corticostéroïdes qui maintenaient des titres élevés d'immunoglobuline G anti-desmogléine 3 tout au long de l'étude, même lorsqu'ils étaient en rémission clinique. Nous montrons que la pathogénicité des anticorps n'est pas toujours associée à l'état clinique des patients. En effet, une bonne corrélation entre le statut clinique et la pathogénicité des immunoglobulines G est observée aux temps précoces (phase active et 6 mois après traitement), tandis que la persistance d'une activité pathogène des IgG *in vitro* au cours de

l'évolution même chez les patients en rémission clinique semble être prédictif de la rechute. Un profil particulier de *N*-glycosylation est observé chez les patients comparés aux donneurs sains. Néanmoins ce profil n'est pas lié au statut clinique des patients puisqu'il est conservé au cours du temps même quand les patients sont en rémission. En conclusion, les propriétés pathogènes des IgG ne semblent pas être dues à des variations des *N*-glycanes présents sur les IgG au cours de l'évolution du pemphigus.

Les auto-anticorps étant responsables des symptômes cliniques de la maladie, la deuxième partie de cette thèse est focalisée sur l'étude des immunoglobulines G anti-desmogléine 3. Leur pathogénicité a été testée longitudinalement, aux mêmes temps que pour les immunoglobulines G sériques, et une corrélation a été observée avec le statut clinique. De plus, la pathogénicité de ces auto-anticorps permet également d'anticiper l'apparition de symptômes cliniques.

# ABSTRACT

Pemphigus is an autoimmune disease associated with the presence of pathogenic autoantibodies recognizing skin adhesion proteins called desmogleins 1 and 3. The pathogenicity of the pemphigus antibodies has been demonstrated by the observation of neonatal pemphigus in newborns of mothers with pemphigus and by passive transfer experiments in mice. Nevertheless, in a previous clinical study, we detected the presence of autoantibodies in some patients in complete remission. This observation is surprising since one would expect these patients to relapse. To understand this phenomenon, we studied longitudinally the pathogenicity of immunoglobulin G and anti-desmoglein 3 immunoglobulin G, which are the autoantibodies most frequently found in patients after treatment. Various phenomena may be responsible for changes in the pathogenicity of antibodies such as their repertoire or *N*-glycosylation. Studies have shown that the pathogenicity of anti-desmoglein-3 immunoglobulin G is dependent on the recognized epitope. Furthermore, in many autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus, changes in *N*-glycosylation of immunoglobulin G and autoantibodies have been identified, indicating a link between *N*-glycosylation and antibody pathogenicity.

To test our hypothesis of non-pathogenicity of antibodies in patients in remission, we studied the *N*-glycosylation of serum immunoglobulin G. First, we linked antibody pathogenicity to its *N*-glycosylation *in vitro*. Digestion of the anti-desmoglein 3 monoclonal antibody AK23 or patients' immunoglobulin G with neuraminidase to remove sialic acids results in a decrease in their pathogenic activity. Then, pathogenicity and *N*-glycosylation of circulating immunoglobulin G were analyzed longitudinally in corticosteroid-treated patients who maintained high titers of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G throughout the study, even when in clinical remission. We show that antibody pathogenicity is not always associated with the clinical status of patients. Indeed, a good correlation between clinical status and immunoglobulin G pathogenicity is observed at early time points (active phase and 6 months after treatment), while the persistence of *in vitro* IgG pathogenic activity during the course of the disease even in patients in clinical remission seems to be predictive of relapse. A particular

N-glycosylation profile is observed in patients compared to healthy donors. However, this profile is not related to the clinical status of the patients since it is preserved over time even when the patients are in remission. In conclusion, the pathogenic properties of IgG do not seem to be due to variations in the N-glycans present on IgG during the course of pemphigus.

As autoantibodies are responsible for the clinical symptoms of the disease, the second part of this thesis is focused on the study of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G. Their pathogenicity was tested longitudinally, at the same time as for serum immunoglobulin G, and a correlation was observed with the clinical status. Moreover, the pathogenicity of these autoantibodies also allows anticipating of the appearance of clinical symptoms.

# LISTE DES ABREVIATIONS

aAc : Auto-anticorps

Ac : Anticorps

ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* ou Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AID : *Activation induced cytidine deaminase*

AIRE : *Autoimmune regulator*

ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Asn : Asparagine

ATP : Adénosine triphosphate

BAFF : *B cell activation factor of the tumor necrosis factor family*

Bcl-6 : *B cell CLL/ lymphoma 6*

BCR : *B cell receptor* ou récepteur aux cellules B

C : Gène constant

CD : *Cluster of differentiation*

CDC : Cytotoxicité dépendante du complément

CDR : *Complementarity determining region* ou region hypervariable

CH : *Constant heavy chain* ou domaine constant de la chaîne lourde

CLRs : *C-type lectin receptor* ou récepteur de lectine de type C

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTLA-4 : *Co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

CXCR5 : *CXC chemokine receptor 5*

D : Diversité

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern* ou motif moléculaire associé aux dommages

DAPI : *Di aminido phenyl indol*

DC : Cellules dendritique

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Dol-P : *Dolichol-phosphate* ou phosphate de dolichol

DSC : Desmocolline

DSG : Desmogléine

EC : Ectodomaine

Fab : *Fragment antigen-binding*

Fc : Fragment cristallisable

Fc $\gamma$ R : Récepteur gamma au fragment cristallisable des anticorps

FEZF2 : *FEZ family zinc finger 2*

Foxp3 : *Forkhead box P3*

FR : Région *framework* ou région germinale de la partie variable de l'anticorps

Fuc : Fucose

Gal : Galactose

GalNAc : *N*-acétylgalactosamine

Glc : Glucose

GlcNAc : *N*-acétylglucosamine

HLA : *Human leukocyte antigen* ou antigène des leucocytes humains

HMG : *High-mobility group protein*

HSP27 : *Heat shock protein 27*

ICOS : *Inducible T-cell costimulator*

IDO : *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

IF : Immunofluorescence

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ITAM : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM : *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

J : Jonction

κ : kappa

λ : lambda

LAG3 : *Lymphocyte-activation gene 3*

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LTFh : Lymphocyte T *helper* folliculaire

LTh : Lymphocyte T *helper*

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MAI : Maladie auto-immune

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time Of Flight*

Man : Mannose

MAP : *Mitogen-activated protein*

mTEC : *Medullary thymic epithelial cell* ou cellule épidermique thymique médullaire

NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells*

NF $\kappa$ B : *Nuclear factor-kappa B*

NHEJ : *Non homologous DNA end-joining* ou jonction d'extrémités non homologues

NLR : *NOD (nucleotide oligomerization domain) like receptors* ou récepteur de type NOD

NK : Cellules *natural killer*

p38MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinase*

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern* ou motif moléculaire associé aux pathogènes

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells* ou Cellules mononucléées sanguines périphériques

PD-1: *Programed death receptor 1*

PF : Pemphigus foliacé

PV : Pemphigus vulgaire

RAG : *Recombination activating gene*

RLR : *RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) like receptor* ou récepteur cytoplasmique de type RIG-I

ROR $\gamma$ t : *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T*

SAP : *Signalling lymphocyte activation molecular associated protein*

Sia : Acide sialique

SDS-PAGE : *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis* ou électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

Sia : Acide sialique

Siglec : *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*

SPCA1 : *Secretory pathway Ca(2+) -ATPase pump type 1*

SVF : Sérum de veau foetal

T-bet : *T-box transcription factor*

TCR : *T cell receptor* ou récepteur à l'antigène des cellules T

TGF : *Transcription growth factor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TLR : *Toll-like receptors* ou récepteurs de type Toll

V : Variable

# **INTRODUCTION**

Dans cette introduction, nous reprendrons les bases du système immunitaire en détaillant de façon succincte le système immunitaire inné, initiateur des premières réponses immunes, puis le système immunitaire adaptatif. Nous présenterons ensuite la tolérance immunologique et les maladies auto-immunes (MAI) résultant d'une rupture de cette tolérance. Nous présenterons alors les acteurs cellulaires de ces MAI : les lymphocytes T (LT) et B (LB) avant de nous intéresser à l'acteur majeur du propos de cette thèse : les anticorps (Ac). Une fois les bases immunologiques posées, nous présenterons le processus de *N*-glycosylation et son rôle sur les Ac et dans les MAI. Nous détaillerons ensuite une MAI dermatologique rare à auto-anticorps (aAc), le pemphigus, modèle d'étude de cette thèse. Pour finir, nous parlerons en détails des aAc du pemphigus et de leur rôle dans la pathologie.

## **I. Le système immunitaire**

Le système immunitaire est le système biologique responsable de la défense de l'organisme contre les pathogènes extérieurs. Il a évolué au cours du temps, de façon synergique aux micro-organismes pathogènes, afin de protéger notre organisme contre les diverses attaques (Chaplin, 2010). La faculté principale du système immunitaire est sa capacité à reconnaître un pathogène envahissant, une toxine ou un allergène. La première théorie permettant d'expliquer ce mécanisme a été celle de discrimination entre le soi et le non-soi (Janeway and Medzhitov, 2002). Néanmoins, elle a été remise en question de par son incapacité à expliquer certains mécanismes comme la grossesse. Une nouvelle théorie portée par P. Matzinger a alors émergé où la faculté du système immunitaire à reconnaître un pathogène serait due, non pas à sa nature de non-soi, mais à sa nature de danger. Cette théorie suggère alors que le système immunitaire serait plus sensible aux dommages qu'au non-soi, et que ces mécanismes d'action seraient engagés *via* la réception de signaux d'alarme provenant des tissus lésés (Matzinger, 2002). Le système immunitaire est composé de deux parties appelées systèmes immunitaires inné et adaptatif qui se différencient par la vitesse et la spécificité de leur réaction (Parkin and Cohen, 2001).

### **1. Le système immunitaire inné**

Le système immunitaire inné détecte la présence de micro-organismes et initie les mécanismes d'élimination des menaces potentiellement infectieuses (Brubaker *et al.*, 2015). Cette réponse est rapide mais non-spécifique, ce qui peut parfois mener à la dégradation de tissus sains (Parkin and Cohen, 2001). Elle est constituée de différents mécanismes de défense tels que les barrières physiques, l'immunité innée humorale, ainsi que l'immunité innée cellulaire (Figure 1) (Chaplin, 2010).

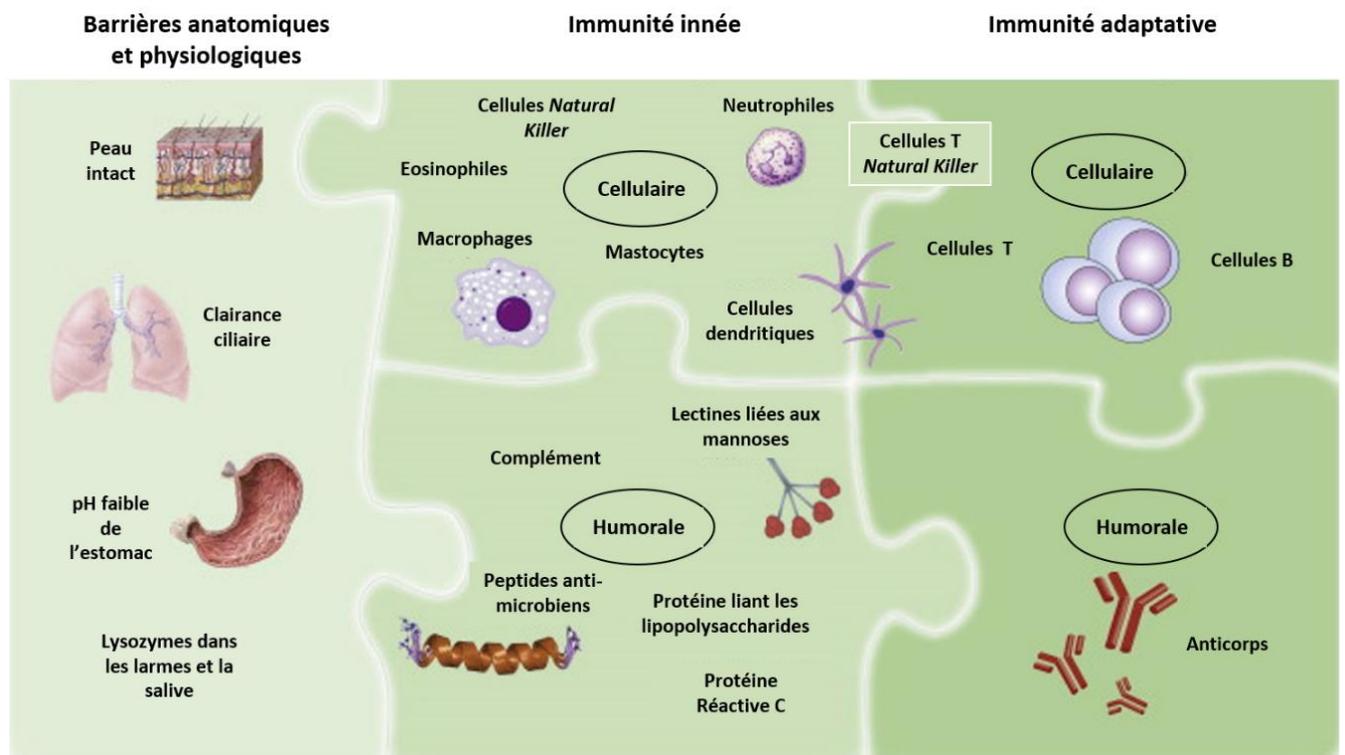


Figure 1 : Représentation schématisée des différents acteurs du système immunitaire inné et adaptatif

Le système immunitaire inné est composé de trois parties : 1) Les barrières anatomiques et physiologiques composées de la peau et des muqueuses, de la clairance ciliaire, du pH faible de l'estomac et des lysozymes présents dans les larmes et la salive ; 2) L'immunité innée humorale composée du complément, de la protéine liant les lipopolysaccharides, de la protéine réactive C, des peptides anti-microbiens et des lectines liées aux mannoses ; 3) l'immunité innée cellulaire composée des cellules « Natural Killer », des neutrophiles, des éosinophiles, des macrophages, des mastocytes et des cellules dendritiques. Le système immunitaire adaptatif est composé de deux parties : 1) La partie humorale composée des anticorps ; 2) La partie cellulaire composée des cellules T et B. Les cellules T « Natural Killer » sont situées entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

D'après Turvey and Broide, 2010.

### A. Les barrières anatomiques et physiologiques

Ces barrières représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. On y retrouve la peau, les muqueuses avec les mécanismes de clairance mucociliaire de l'appareil respiratoire, le pH faible de l'estomac et les sécrétions telles que les larmes ou la salive (Figure 1). La susceptibilité accrue aux infections des patients ayant subi des brûlures cutanées sévères démontre qu'un système immunitaire intact n'est pas suffisant pour compenser une dégradation des barrières anatomiques et physiologiques (Turvey and Broide, 2010).

### B. L'immunité innée humorale

L'immunité innée humorale est composée de protéines solubles et de molécules

bioactives présentes dans les fluides biologiques ou relâchées par les cellules (Chaplin, 2010). Parmi elles, les plus importantes sont :

- Les protéines du système du complément

Il est considéré comme la première ligne de défense contre les attaques extérieures. Il agit comme un système de surveillance immunitaire capable de discriminer les tissus sains, les débris cellulaires, les cellules apoptotiques et les intrusions d'éléments étrangers à l'organisme (Ricklin *et al.*, 2010). Ce système est composé de protéines plasmatiques synthétisées dans le foie et de récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules (Kolev *et al.*, 2014). Plus d'une trentaine de protéines différentes ont été identifiées comme participant à l'activité du complément (Walport, 2001). Ces protéines s'activent en cascade afin d'opsoniser, c'est-à-dire de marquer la membrane des pathogènes afin qu'ils soient reconnus par les cellules phagocytaires, et d'induire une série de réponses inflammatoires qui aideront les cellules du système immunitaire adaptatif à combattre l'infection et à maintenir l'homéostasie. Le système du complément peut être initié par trois voies différentes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (Merle *et al.*, 2015). La voie classique est activée par la reconnaissance d'immunoglobuline (Ig) M ou G tandis que la voie des lectines est activée par la reconnaissance de résidus mannoses présents à la surface des pathogènes. En revanche, la voie alterne est activée lors de la reconnaissance de structure d'origine bactérienne. Toutes ces voies mènent à la création du complexe d'attaque membranaire terminal composé de différentes protéines du complément qui va former un pore dans la membrane plasmique et causer la mort de la cellule (Noris and Remuzzi, 2013).

- La protéine liant les lipopolysaccharides

Cette protéine soluble est présente dans le sang et est associée à la phase aigüe de l'inflammation. Elle va reconnaître les lipopolysaccharides de type bactérien, et plus particulièrement ceux provenant des bactéries à Gram-négative, et va favoriser la reconnaissance de celles-ci par les cellules immunitaires innées (Fenton and Golenbock, 1998).

- La protéine réactive C

Il s'agit également d'une protéine plasmatique présente lors de la phase aigüe de l'inflammation. En présence de calcium, cette protéine va se lier à des polysaccharides

présents sur les microorganismes et va initier la voie classique du complément (Sproston and Ashworth, 2018).

- Les peptides anti-microbiens

Une partie de la fonction antimicrobienne du système immunitaire inné est médiée par des peptides de type cationique qui agissent contre les bactéries à Gram-négative et à Gram-positive ainsi que contre les champignons, les parasites et certains virus (Hancock and Lehrer, 1998). Ils vont induire la mort bactérienne *via* la perturbation de la membrane cellulaire microbienne (van 't Hof *et al.*, 2001). Chez l'Homme, ces peptides sont présents dans les leucocytes mais peuvent également être sécrétés par de nombreux épithéliums au niveau de la peau ou des muqueuses (Ganz, 2003). Ce sont des molécules importantes pour les mécanismes de l'inflammation, de l'activation immune et de la cicatrisation (Yang *et al.*, 2004).

### C. L'immunité innée cellulaire

#### **a) Les récepteurs reconnaissant les motifs moléculaires**

Afin d'activer les cellules de l'immunité innée, une reconnaissance des pathogènes *via* des motifs moléculaires partagés par de nombreux micro-organismes et toxines mais qui ne sont pas présents chez les mammifères est nécessaire (Chaplin, 2010). Charles Janeway Jr. fut le premier à proposer le modèle de la reconnaissance des motifs moléculaires. Selon lui, l'immunité innée possède deux caractéristiques : la capacité à discriminer les molécules soi des molécules du non-soi et les signaux de danger (non-soi infectieux *versus* non-soi inoffensif) ainsi que la capacité à activer le système immunitaire adaptatif (Heil and Land, 2014; Janeway, 2013). La détection de pathogènes est ainsi réalisée *via* ces récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires qui vont permettre la surveillance des espaces extracellulaires et intracellulaires (Brubaker *et al.*, 2015).

Il existe deux types de motifs moléculaires reconnus par ces récepteurs :

- Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*)

Les pathogènes expriment de nombreuses molécules appelées PAMPs qui sont essentielles pour leur survie et leur pathogénicité mais qui ne sont pas présentes chez leur

hôte (Kumar *et al.*, 2011). Les PAMPs bactériens sont souvent des composants de la paroi cellulaire (lipopolysaccharides, peptidoglycanes ou lipoprotéines), tandis que la reconnaissance des virus se fait plutôt *via* leurs acides nucléiques (Medzhitov, 2007).

- Les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*)

Plus récemment, il a été identifié des récepteurs aux motifs moléculaires reconnaissant des molécules endogènes libérées par les cellules mourantes telles que l'adénosine triphosphate (ATP) ou l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Takeuchi and Akira, 2010; Vénéreau *et al.*, 2015).

Chez l'Homme, il existe différentes familles de récepteurs reconnaissant ces motifs moléculaires :

- Les récepteurs de type *toll* (TLR : *Toll-like receptors*)

La reconnaissance des pathogènes repose en grande partie sur cette famille de récepteurs qui ont été conservés au cours de l'évolution (Akira and Takeda, 2004). Les récepteurs TLRs sont des protéines transmembranaires. La reconnaissance des PAMPs par ces récepteurs est médiée par la présence de répétitions riches en leucines. A ce jour, 10 TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'Homme (Kawai and Akira, 2010). Les études chez la souris ont démontré que chaque TLR possède une fonction distincte en terme de reconnaissance des PAMPs et de la réponse immune médiée (Akira *et al.*, 2006). Les TLRs sont divisés en deux groupes : ceux exprimés à la surface des cellules et qui reconnaissent les PAMPs dérivés des bactéries, des champignons ou des protozoaires tels que les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 et ceux exprimés exclusivement dans les compartiments endocytiques et reconnaissant les acides nucléiques dérivés de virus ou de bactéries tels que les TLRs 3, 7, 8 et 9 (Kumar *et al.*, 2011).

- Les récepteurs *RIG-I-like* (RLR : *RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) like receptor*)

La famille des RLRs est composée de trois membres qui vont reconnaître les acides ribonucléiques (ARN) provenant de virus présents dans le cytoplasme des cellules infectées. Ils vont permettre la production de cytokines inflammatoires et d'interféron (IFN) de type I dans la plupart des types cellulaires (Kumar *et al.*, 2009).

- Les récepteurs *NOD-like* (NLR : *NOD (nucleotide oligomerization domain)-like receptors*)

Chez l'Homme, la famille NLR est composée de 23 membres. Ces récepteurs sont exprimés par de nombreux types cellulaires incluant les cellules immunitaires et les cellules épithéliales (Franchi *et al.*, 2009). Ils reconnaissent des ligands présents dans le cytoplasme des cellules (Jeong and Lee, 2011). Après reconnaissance des PAMPs, ces récepteurs activent différentes voies intracellulaires telles que celles du *nuclear factor-kappa B* (NFκB) ou des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases qui vont induire la production de cytokines pro-inflammatoires ou l'activation du complexe multiprotéique appelé inflammasome qui initie la mort cellulaire *via* le clivage des caspases (Kumar *et al.*, 2011).

- Les récepteurs aux lectines de type C (CLR : *C-type lectin receptor*)

Les CLR sont une famille de récepteurs transmembranaires caractérisée par la présence de domaines liés aux carbohydrates. Ces récepteurs reconnaissent les carbohydrates provenant des micro-organismes tels que les virus, les bactéries ou les champignons (Takeuchi and Akira, 2010). Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules dendritiques (DC : *dendritic cell*) et vont activer des voies de signalisation qui induisent la production de cytokines régulant les réponses immunitaires adaptatives (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

Ces différentes familles de récepteurs sont exprimées à la surface de certaines cellules de l'immunité innée dites professionnelles telles que les DCs et les macrophages (Kumar *et al.*, 2011) ainsi que sur d'autres cellules de l'immunité innée dites non-professionnelles comme les cellules épithéliales (de Koning *et al.*, 2010; Takeuchi and Akira, 2010). La reconnaissance des motifs moléculaires par ces récepteurs va permettre l'initiation de la réponse inflammatoire (Takeuchi and Akira, 2010).

### ***b) Les cellules de l'immunité innée***

Les cellules de l'immunité innée comprennent de nombreuses cellules d'origine myéloïde ou lymphoïde (Figure 1). Les points communs entre ces cellules sont qu'elles ne possèdent pas de mémoire immunologique, sont originaires du système hématopoïétique, et exercent des fonctions antimicrobienne et de protection des tissus (Gasteiger *et al.*, 2017).

- **Les neutrophiles**

Chez l'homme, les neutrophiles représentent 50 à 70% des leucocytes circulants. Ils sont la première ligne de défense contre les pathogènes infectieux tels que les bactéries, les champignons et les protozoaires (Mayadas *et al.*, 2014). Ils circulent constamment dans l'organisme à la recherche de pathogènes afin de les piéger et les éliminer. Les principales fonctions antimicrobiennes des neutrophiles sont la phagocytose, la dégranulation c'est-à-dire la diffusion dans l'environnement de médiateurs de l'inflammation contenus dans leurs vésicules et la libération de matériel nucléaire sous la forme de piège extracellulaire (Rosales, 2018).

- **Les éosinophiles**

Les éosinophiles représentent 1 à 3% des leucocytes circulants (Rothenberg, 1998). Ce sont des cellules importantes dans les réponses aux infections par les helminthes et les réactions allergiques. Les éosinophiles sont des cellules contenant des granules cytoplasmiques riches en protéines cationiques qui permettent l'activation des réponses inflammatoires chez l'Homme notamment grâce à leur capacité à sécréter des cytokines (Weller and Spencer, 2017).

- **Les mastocytes**

En condition physiologique, les mastocytes ne circulent pas dans le sang (Amin, 2012). Les progéniteurs des mastocytes migrent dans les tissus et se différencient sous l'influence de facteurs de cellules souches et de cytokines (Krystel-Whittemore *et al.*, 2016). Les mastocytes ont une distribution tissulaire étendue et sont principalement retrouvés à l'interface entre l'hôte et l'environnement extérieur, c'est-à-dire aux lieux d'entrée potentiels des agents pathogènes ou de contact avec des substances nocives telles que la peau, les muqueuses respiratoires et le tractus gastro-intestinal (da Silva *et al.*, 2014). Ces cellules sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, incluant la vasodilatation, l'angiogenèse ainsi que l'élimination des bactéries et des parasites (Krystel-Whittemore *et al.*, 2016).

- **Les cellules *Natural Killer* (NK)**

Les cellules NK possèdent diverses fonctions biologiques comme la reconnaissance et la destruction des cellules infectées par un virus ou des cellules néoplasiques. Les cellules NK circulantes restent le plus souvent en phase quiescente, mais leur activation par des cytokines

entraîne une infiltration de ces cellules dans les tissus (Mandal and Viswanathan, 2015). Les cellules NK utilisent plusieurs voies afin de discriminer les cellules dites « normales » des cellules dites « aberrantes ». Une de ces voies consiste en la reconnaissance puis en l'élimination des cellules qui n'expriment pas de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I (Ljunggren and Kärre, 1990).

Les molécules du CMH de classe I et de classe II sont des protéines qui possèdent un rôle central dans l'activation du système immunitaire adaptatif. Leur rôle est de présenter des peptides aussi appelés antigènes (Ag) aux cellules du système immunitaire adaptatif afin de les activer (Wieczorek *et al.*, 2017). Les molécules de CMH de classe I sont exprimées à la surface de la plupart des cellules nucléées et vont présenter des peptides générées à partir de la dégradation de protéines cytosoliques endogènes (Pamer and Cresswell, 1998) tandis que les molécules de CMH de classe II sont exprimées par des cellules immunitaires appelées cellules présentatrices d'Ag (CPA) telles que les DCs, les macrophages ou les LB, et présentent principalement des peptides exogènes (Neefjes *et al.*, 2011; Rock *et al.*, 2016; Wieczorek *et al.*, 2017).

- **Les cellules dendritiques**

Les DCs résident dans la plupart des tissus périphériques et plus particulièrement au niveau des zones d'interface avec l'environnement telles que la peau et les muqueuses (Guermontprez *et al.*, 2002). Ce sont des CPA dites professionnelles qui possèdent la capacité unique d'induire des réponses immunes primaires c'est-à-dire d'activer des cellules de l'immunité adaptative à la suite d'une première rencontre avec un pathogène (Banchereau *et al.*, 2000). La fonction des DCs est de faire la liaison entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif (Collin and Bigley, 2018). Les DCs sont également importantes afin d'induire la tolérance immunologique (notion détaillée dans la partie II de cette introduction) ainsi que la régulation des réponses immunes médiées par les cellules T (Banchereau *et al.*, 2000). En effet, leur rôle dans l'immunité adaptative est de dégrader les protéines extra- et intra-cellulaires et de les présenter *via* leurs molécules de CMH aux LT naïfs (Collin and Bigley, 2018). Elles vont également influencer sur la polarisation des cellules T (Lipscomb and Masten, 2002).

- **Les macrophages**

Les macrophages sont des cellules phagocytaires impliquées dans l'homéostasie

tissulaire *via* la clairance des cellules apoptotiques et l'activation de réponses immunes contre les pathogènes. Elles peuvent être résidentes ou provenir de monocytes circulants (Epelman *et al.*, 2014; Geissmann *et al.*, 2010; Wynn *et al.*, 2013). Les macrophages résidents agissent comme des sentinelles et répondent aux changements physiologiques et aux *stimuli* de l'extérieur. Chez les mammifères adultes, les macrophages sont organisés de telle sorte que chaque cellule occupe son propre territoire au sein des différents tissus (Wynn *et al.*, 2013). Les macrophages tissulaires sont dotés d'une vaste gamme de molécules de détection incluant les récepteurs *scavenger* (récepteurs reconnaissant et dégradant certaines lipoprotéines), les récepteurs aux motifs moléculaires, les récepteurs aux hormones nucléaires et aux cytokines et les molécules d'adhésion (Varol *et al.*, 2015). Les macrophages sont également considérés comme des CPA dites professionnelles qui vont pouvoir présenter des Ag *via* leurs molécules de CMH de classe II et activer les cellules de l'immunité adaptative (Unanue, 1984).

## 2. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire inné constitue la première réponse de l'organisme à la suite d'une rencontre avec un pathogène. Les récepteurs aux motifs moléculaires étant exprimés par de nombreuses cellules, cette réponse se mettra rapidement en place. Néanmoins, du fait de la faible spécificité de la réponse innée, une seconde réponse appelée réponse immunitaire adaptative est parfois nécessaire (Chaplin, 2010). Les réponses immunes adaptatives dépendent de récepteurs spécifiques d'Ag présents à la surface des cellules de l'immunité adaptative (LT et LB) qui sont formés *via* recombinaison somatique de segments géniques (Bonilla and Oettgen, 2010). L'une des principales caractéristiques du système immunitaire adaptatif est sa capacité de « mémoriser » les rencontres précédentes avec des pathogènes afin de pouvoir soit repousser une deuxième invasion, soit éliminer rapidement l'envahisseur récurrent en mobilisant une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace (Cooper and Alder, 2006). Les réponses adaptatives se développent souvent *via* des signaux issus du système immunitaire inné et sont médiées par les LT puis par les LB, deux types cellulaires originaires de la moelle osseuse (Andersen *et al.*, 2006; Chaplin, 2010). Tandis que les LB mûrissent dans la moelle osseuse afin de devenir des cellules productrices d'Ac, les LT vont migrer dans le thymus afin d'y finir leur développement. Après avoir mûries dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus), ces cellules vont ensuite migrer vers les organes dits lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate

afin d'y rencontrer des Ag et, en présence des signaux adéquats, de développer une réponse immunitaire. Tout au long du développement des cellules de l'immunité adaptative, des mécanismes de sélection sont présents afin d'éviter le développement de réponses immunitaires contre des Ag du soi (Bonilla and Oettgen, 2010).

Nous reviendrons plus en détails sur les différentes cellules du système immunitaire adaptatif et sur leur développement dans la partie IV de cette introduction.

## **II. La tolérance immunologique**

Le système immunitaire emploie de nombreux mécanismes effecteurs efficaces afin d'éliminer les pathogènes microbiens ou les substances toxiques et allergiques. Il apparaît essentiel que ces réponses soient capables d'éviter la destruction des tissus sains de l'organisme. Cette capacité à éviter les dommages aux tissus du soi est appelée la tolérance immunologique et peut être définie comme l'absence de réactivité à un Ag du soi, aux Ag du microbiote ou aux Ag d'un tissu étranger en cas de greffe (Bluestone, 2011; Chaplin, 2010).

Le système immunitaire est en équilibre constant entre les phénomènes de tolérance immunologique contre les Ag du soi et les mécanismes d'immunité dirigés contre les agents pathogènes. Lorsque l'équilibre est rompu, c'est-à-dire lors de l'absence de réponses immunes (immunodéficience, cancer) ou d'une réponse inappropriée et excessive (auto-immunité ou allergie), certaines maladies peuvent se déclencher (Kyewski and Klein, 2006).

Les mécanismes de tolérance peuvent être différenciés en deux catégories : ceux appartenant à la tolérance centrale et ceux appartenant à la tolérance périphérique (Figure 2) (Mathis and Benoist, 2004).

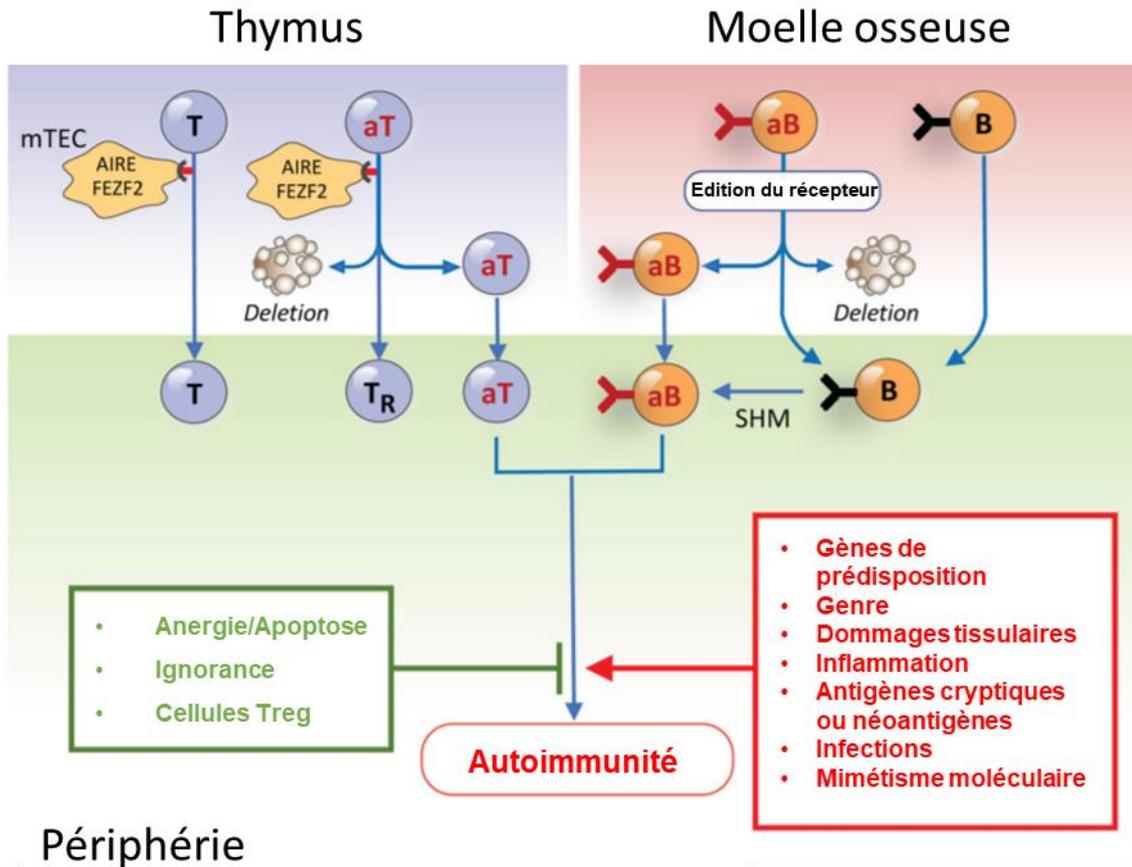


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes d'échappement des lymphocytes T et des lymphocytes B auto-réactifs de la tolérance centrale et leur engagement dans la périphérie.

Dans le thymus, les lymphocytes T sont sélectionnés en fonction de leur reconnaissance antigénique. Le gène Autoimmune regulator permet l'expression de molécules du soi normalement restreintes à des tissus périphériques dans les cellules épidermiques thymiques médullaires (mTEC). Cette expression permet d'éliminer une partie des lymphocytes T auto-réactifs et d'en convertir d'autre en lymphocytes T régulateurs. Néanmoins, une partie des lymphocytes T auto-réactifs vont réussir à quitter le thymus et à rejoindre la périphérie. Dans la moelle osseuse, les mécanismes de contrôle entourant l'édition du récepteur permettent d'éliminer une partie des lymphocytes B auto-réactifs. Néanmoins, certaines cellules parviendront tout de même en périphérie. De plus, des lymphocytes B non-auto-réactifs peuvent également devenir auto-réactifs suite au processus d'hypermutation somatique. Une fois en périphérie, il existe différents mécanismes pour inhiber ces cellules auto-réactives tels que l'apoptose, l'anergie, l'ignorance et les cellules T régulatrices. mTEC : cellules épithéliales médullaires thymiques ; aT : lymphocytes T auto-réactifs ; aB : lymphocytes B auto-réactifs ; TR : lymphocytes T régulateurs ; SHM : processus d'hypermutation somatique

D'après Theofilopoulos et al., 2017.

## 1. La tolérance centrale

La tolérance centrale concerne les LT et les LB immatures lors de leur différenciation dans les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) (Mathis and Benoist, 2004).

### A. La tolérance centrale dans le thymus

Dans le cas des LT, les mécanismes de la tolérance centrale vont éliminer de nombreuses

cellules T potentiellement auto-réactives dans le thymus *via* la sélection négative et vont sélectionner des thymocytes de haute affinité pour le soi afin de devenir des LT régulateurs (LTreg) (Bluestone, 2011).

- La sélection négative

Il existe dans le thymus des cellules appelées cellules épidermiques thymiques médullaires (mTEC : *medullary thymic epithelial cells*) qui expriment des gènes en théorie restreints aux tissus périphériques (Palmer, 2003). Ces cellules sont capables d'exprimer des milliers d'Ag spécifiques aux tissus grâce à l'expression de deux facteurs de transcription : *autoimmune regulator* (AIRE) et *FEZ family zinc finger 2* (FEZF2), permettant ainsi la sélection négative des LT (Anderson and Su, 2016; Cosway *et al.*, 2017; Palmer, 2003; Pitkänen and Peterson, 2003). Les cellules mTECs sont des CPA efficaces qui peuvent induire la délétion des LT auto-réactifs exprimant la molécule CD4 (Palmer, 2003). Un autre rôle fondamental du facteur de transcription AIRE est sa capacité à promouvoir l'anergie thymocytaire, permettant de façonner le répertoire des LTreg (Perniola, 2018).

- La sélection des LTreg

Le développement des LTreg dans le thymus nécessite des interactions de hautes affinités entre le récepteur à l'Ag des cellules T (TCR : *T cell receptor*) et les peptides présentés par le CMH de type II des cellules stromales thymiques. Ces dernières fournissent également des signaux de co-stimulation nécessaires à la différenciation des LTreg (Sakaguchi *et al.*, 2010). Il a également été démontré que la spécificité des TCR pour des auto-Ag est cruciale pour la différenciation des thymocytes en LTreg. En effet, la sélection des LTreg est médiée par un niveau d'auto-réactivité du TCR intermédiaire afin de passer les étapes de sélection négative et positive (Hsieh *et al.*, 2012).

## B. La tolérance centrale dans la moelle osseuse

Pour les LB, la tolérance centrale est composée de mécanismes régulateurs qui se produisent lors des stades de développement précoce des LB dans la moelle osseuse. A ce stade, les LB possèdent un récepteur aux cellules B (BCR : *B cell receptor*) de type IgM mais ne sont pas encore matures (Nemazee, 2017). Les LB subissent de nombreux contrôles au cours de leur maturation notamment au moment de l'édition de leur récepteur (Theofilopoulos *et*

*al.*, 2017). La sélection négative des LB passe par deux mécanismes : la délétion par apoptose ou l'édition du BCR. Lorsqu'un LB immature portant un BCR auto-réactif rencontre son Ag cible, il va entrer dans un état d'anergie de courte durée où les cellules ne pourront pas recevoir de nouvelles stimulations par l'Ag. Les LB auto-réactifs immatures ne pourront être secourus de la délétion qu'en réarrangeant une seconde fois leur BCR, ce phénomène est appelé l'édition du BCR (Sandel and Monroe, 1999). Un des facteurs importants dans la survie des LB transitionnelles et matures est le *B cell activation factor of the Tumor necrosis factor (TNF) family* (BAFF) via sa fixation sur le récepteur BAFF-R (*BAFF receptor*). De plus, une élévation de BAFF sérique est souvent décrite chez des patients atteints de MAI (Mackay *et al.*, 2003; Schneider and Tschopp, 2003). Nous l'avons nous-même retrouvé dans le pemphigus dans une étude présente en annexes (Hébert *et al.*, 2021).

La tolérance centrale va permettre d'éliminer de nombreuses cellules auto-réactives. Néanmoins, certains LT et LB autoréactifs vont échapper aux mécanismes de la tolérance centrale et circuler en périphérie (Theofilopoulos *et al.*, 2017).

## **2. La tolérance périphérique**

La tolérance périphérique agit sur les LT et les LB matures circulant dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires (Mathis and Benoist, 2004).

Le premier mécanisme de tolérance périphérique est le phénomène d'ignorance. Certaines parties de l'organisme appelées sites immuno-privilegiés vont séquestrer leurs Ag derrière des barrières anatomiques (ex : les yeux, le cerveau et les testicules). Les LT et les LB auto-réactifs reconnaissant ces Ag ne seront pas activés car ils ne pourront pas entrer en contact avec leurs Ag cibles. Néanmoins, la séquestration de ces Ag peut être rompue notamment lors de la destruction de ces tissus et conduire à l'apparition de maladies (Theofilopoulos *et al.*, 2017).

### **A. La tolérance périphérique des lymphocytes T**

Les mécanismes de tolérance périphérique limitent l'activation des LT matures auto-réactifs après leur sortie du thymus. Ces cellules T auto-réactives peuvent être tolérisées par anergie ou délétion clonale (Bluestone, 2011).

Les mécanismes de tolérance périphérique des LT sont les suivants :

- L'anergie

L'anergie est le phénomène où des LT matures sont incapables de répondre à une stimulation suite à la rencontre avec un Ag en absence de co-stimulation (Fathman and Lineberry, 2007). Les cellules ayant migrées récemment du thymus vers la périphérie présentent une susceptibilité augmentée à l'anergie en absence d'inflammation. Le statut anergique est contrôlé par des molécules régulant négativement le signal TCR proximal (Theofilopoulos *et al.*, 2017). La voie de co-stimulation *Cluster of Differentiation* (CD) 28/B7 (B7 = CD80/CD86) est très importante afin de prévenir l'induction de l'anergie (Schwartz, 2003). En effet, l'engagement du TCR en l'absence d'une co-stimulation médiée par la liaison de la molécule CD28 présente à la surface du LT et des molécules B7 présentes à la surface des CPA n'active pas la voie du *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) mais celle des MAP kinases ce qui empêche la transcription du gène codant l'interleukine (IL)-2. Les molécules de stimulation telles que CD28 ne sont exprimées qu'en présence de signaux inflammatoires (Wells, 2009). Pour finir, l'anergie est un état de longue durée qui est, entre autres, associé à des défauts dans la progression du cycle cellulaire. Il n'est réversible qu'en présence de forts *stimuli* (Fathman and Lineberry, 2007).

- La suppression active

Certains LT CD4<sup>+</sup> anergiques possédant un phénotype et un programme d'expression génique distincts peuvent se convertir en LTreg. Ces LTreg vont alors induire l'anergie ou l'inhibition des LT CD4<sup>+</sup> afin maintenir l'homéostasie immunitaire. Ils agissent sur les LT auto-réactifs afin d'inhiber l'auto-immunité et permettent également de modérer l'inflammation en agissant sur les LT effecteurs activés (Theofilopoulos *et al.*, 2017; Vignali *et al.*, 2008). Les LTreg représentent approximativement 10% des LT CD4<sup>+</sup> périphériques. Ils sont caractérisés par l'expression du récepteur à l'IL-2 CD25 et du facteur de transcription *Forkhead box P3* (Foxp3) (Hsieh *et al.*, 2012).

Les LTreg possèdent différents mécanismes leur permettant d'inhiber les cellules auto-réactives (Figure 3). Par ordre hiérarchique, le premier de ces mécanismes est la privation en IL-2 des LT effecteurs *via* la forte expression de CD25 par les LTreg (de la Rosa *et al.*, 2004). Le second mécanisme est la trogocytose, c'est-à-dire le transfert de protéines membranaires d'une cellule à une autre. Les LTreg vont ainsi acquérir les molécules B7 fonctionnelles

présentes à la surface des DCs. Ce phénomène va permettre aux LTreg d'empêcher la fonction activatrice des DCs et donc de limiter les réponses immunitaires (Gu *et al.*, 2012). Le troisième mécanisme des LTreg est leur sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, le *transcription growth factor* (TGF)- $\beta$  et l'IL-35. Ils vont également être capables d'utiliser la cytolyse *via* la sécrétion de granzymes A et de perforines ou de perturber le métabolisme des cellules cibles en les privant d'IL-2 ou en sécrétant de l'adénosine (Vignali *et al.*, 2008). De plus, les LTreg sont également caractérisés par l'expression de CD39 et de CD73 à leur surface, des molécules participant à leur activité immunosuppressive (Deaglio *et al.*, 2007). Le dernier mécanisme des LTreg pour inhiber l'auto-réactivité est leur capacité à obliger les DC à produire l'enzyme *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) *via* l'interaction entre la molécule *co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) présente sur les LTreg et les molécules B7 présentes sur les DCs. Cette enzyme permet la production de métabolites pro-apoptotiques *via* la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel, menant à la suppression des LT effecteurs (Mellor and Munn, 2004; Vignali *et al.*, 2008).

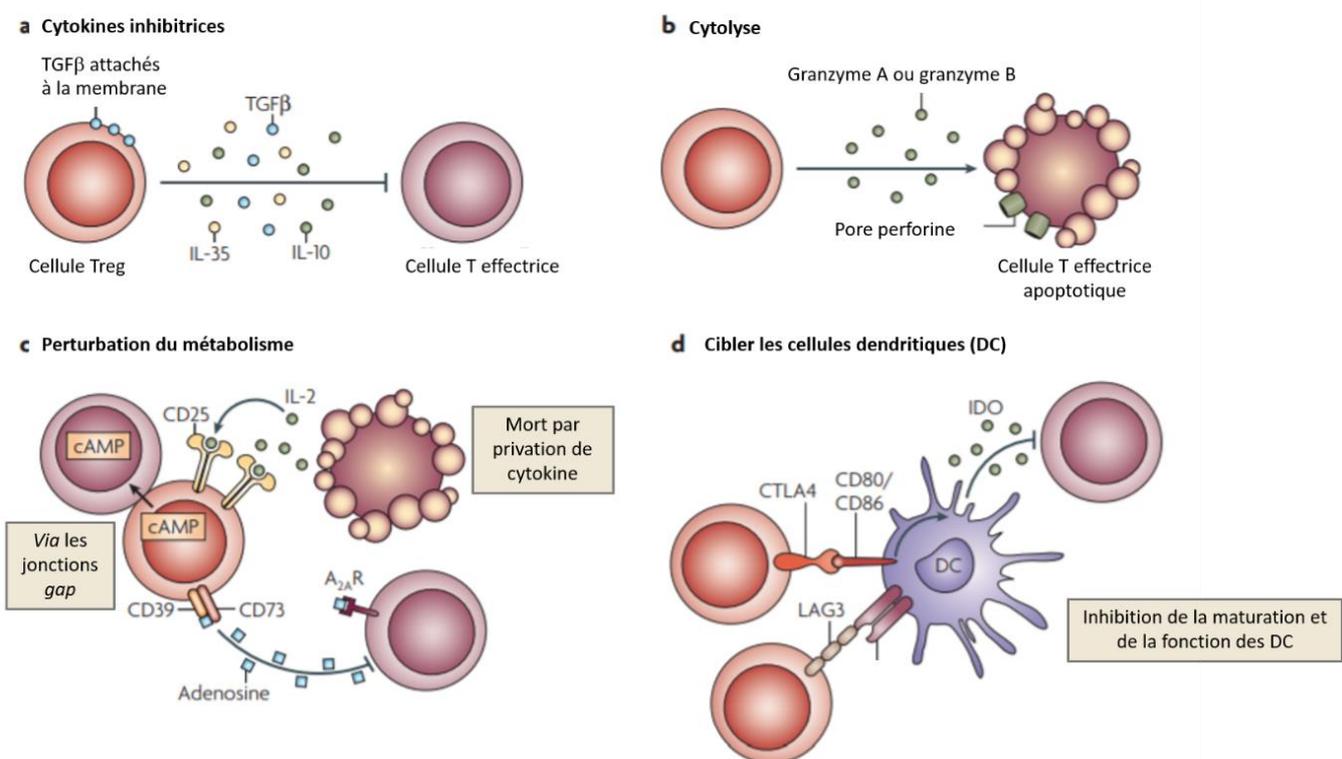


Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes de suppression active des lymphocytes T régulateurs

a) Les cytokines inhibitrices : les lymphocytes T régulateurs vont sécréter des cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- $\beta$ . Ces cytokines seront captées par les cellules T effectrices et vont bloquer leurs activités. b) La cytolyse : les

*lymphocytes T régulateurs sont capables de cytolyse via la sécrétion de granzymes et de perforines qui seront captées par les lymphocytes T effecteurs. c) La perturbation du métabolisme : les lymphocytes T régulateurs vont perturber le métabolisme des lymphocytes T effecteurs en les privant d'IL-2 ou en sécrétant de l'adénosine. d) Cibler les cellules dendritiques : les lymphocytes T régulateurs vont également agir sur les cellules dendritiques via les protéines transmembranaires co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) et lymphocyte-activation gene 3 (LAG3). La liaison de CTLA-4 sur les molécules B7 présentes sur les cellules dendritiques va entraîner la libération d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui sera captée par les lymphocytes T effecteurs. cAMP = adénosine monophosphate cyclique, CD = Cluster of différenciation, CTLA-4 = co-stimulatory molecule cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, IDO = indoleamine 2,3-dioxygénase, IL = interleukine, LAG3 = lymphocyte-activation gene 3, TGF $\beta$  = Transforming growth factor  $\beta$ .*

*D'après Vignali et al., 2008.*

## B. La tolérance périphérique des lymphocytes B

Les LB porteurs d'une IgM de surface migrent dans les organes lymphoïdes secondaires afin de finir leur développement. Les mécanismes de tolérance périphérique vont alors se mettre en place afin de réguler la survie et l'activation des LB après leur sortie de la moelle osseuse (Nemazee, 2017). En absence de signaux fournis par les LT ou de signaux inflammatoires, un LB auto-réactif va soit devenir anergique ou apoptotique soit devenir tolérant. Dans le cas de réponses T-indépendantes, cette tolérance passe par des co-récepteurs inhibiteurs du BCR appelés *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins* (Siglec) (Duong *et al.*, 2010; Macauley *et al.*, 2013). Il existe également des mécanismes complémentaires consistant soit à masquer une partie des sites de liaison des BCR auto-réactifs des LB anergiques par des glycanes soit à supprimer l'auto-réactivité des LB par hypermutation somatique (Sabouri *et al.*, 2014). Néanmoins, ces mécanismes sont réversibles dû à la nécessité de répondre à des virus ou à des micro-organismes qui porteraient des épitopes similaires à ceux du soi (Nemazee, 2017).

## III. Les maladies auto-immunes

Lorsque les mécanismes de tolérance centrale et périphérique sont inefficaces, les cellules auto-réactives ne sont alors ni éliminées ni inhibées. Dans certains cas, cette auto-réactivité peut mener à l'apparition de MAI (Theofilopoulos *et al.*, 2017).

### 1. Prévalence et facteurs des maladies auto-immunes

Les MAI ont une haute prévalence dans la population (entre 7 et 9%) néanmoins, chaque MAI va posséder ses propres incidences et prévalences (Theofilopoulos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Il existe plus d'une centaine de MAI distinctes, certaines étant spécifiques d'organe telles que le diabète de type I ou les dermatoses bulleuses auto-immunes tandis que d'autres,

appelées MAI systémiques telles que le lupus érythémateux systémique ou la polyarthrite rhumatoïde, vont entraîner de nombreuses dysfonctions dans différents organes (Choi *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2018; Katsarou *et al.*, 2017; Patrício *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Dans la plupart des MAI, des facteurs de risques ont pu être mis en évidence : une prévalence majoritairement plus importante chez les femmes que chez les hommes, un âge de début caractéristique de la maladie, une augmentation de la prévalence chez les apparentés au premier degré et d'autant plus chez les jumeaux monozygotes démontrant une origine au moins partiellement génétique (Ngo *et al.*, 2014; Wahren-Herlenius and Dörner, 2013; Wang *et al.*, 2015). Néanmoins, la plupart des MAI ne sont pas monogéniques et vont, au contraire, posséder plusieurs facteurs génétiques tels que l'haplotype du CMH (Wang *et al.*, 2015). Même chez les jumeaux monozygotes, la prévalence n'est pas de 100%, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs tels que l'épigénétique ou l'environnement (Quintero-Ronderos and Montoya-Ortiz, 2012). Parmi les facteurs environnementaux figurent les produits chimiques toxiques, les infections, certains composants alimentaires, la cigarette ou la prise d'antibiotiques (Vojdani, 2014). On peut également citer le cas des mimétismes moléculaires, c'est-à-dire lorsque des déterminants antigéniques de micro-organismes vont posséder des homologies avec des Ag de l'hôte. Ce mécanisme permet aux micro-organismes de se protéger contre le système immunitaire de l'hôte et peut également mener au déclenchement de MAI (Blank *et al.*, 2007).

## **2. La physiopathologie des maladies auto-immunes**

Dans les MAI, les lésions tissulaires sont médiées par des réponses immunitaires contre un ou plusieurs Ag du soi. Ces réponses vont persister dans le temps car elles seront incapables d'éliminer l'auto-Ag et seront même amplifiées par l'apport constant d'auto-Ag. Les lésions tissulaires peuvent être médiées par les différents acteurs du système immunitaire adaptatif tels que les LT ou les aAc (Charles A Janeway *et al.*, 2001a).

Les réponses adaptatives sont majoritairement initiées par l'activation de LT spécifiques de l'Ag (Charles A Janeway *et al.*, 2001a). Après la rencontre avec leur Ag, les LT dits *helper* (LTh) (nous reverrons cette notion dans la partie IV de cette introduction) vont subir une différenciation programmée qui permettra de polariser les réponses immunes. Ainsi, les LTh naïfs pourront se différencier en plusieurs sous-types dont les LTh1 sécrèteur d'IFN- $\gamma$ , les LTh2

sécréteurs d'IL-4 et les LTh17 sécréteurs d'IL-17 (Ivanova and Orekhov, 2015; Murphy and Reiner, 2002). Lorsque la tolérance immunologique est rompue, le type de réponse immune contre un auto-Ag et son intensité seront déterminés par la prédominance d'un sous-groupe de LTh. Les LTh1 vont produire des cytokines pro-inflammatoires et activer des mécanismes effecteurs médiés soit par les LT cytotoxiques soit par les cellules NK et les macrophages pro-inflammatoires tandis que les LTh17 entraînent une inflammation chronique des tissus pouvant aboutir à une défaillance des organes. Les LTh2 ont été longtemps décrit comme participant à la production d'Ig et la commutation isotypique mais il semblerait que ce rôle soit plutôt à attribuer aux LTh folliculaires (LTFh) (Gensous *et al.*, 2018; Ruiz-Argüelles, 2013; Yasuda *et al.*, 2019). Les LTFh sont une sous-population de LTh spécialisés dans l'interaction avec les LB et dans la régulation de la réponse Ac (Gensous *et al.*, 2018). Les LTFh fournissent des signaux aux LB ayant déjà rencontrés leur Ag afin que ces derniers prolifèrent, changent d'isotype par commutation isotypique et augmentent leur spécificité pour l'Ag *via* le processus d'hypermutation somatique (Pallikkuth *et al.*, 2017).

Certaines réponses auto-immunes peuvent être médiées par des aAc dirigés contre des Ag présents à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire, ce qui va causer des lésions tissulaires. Les aAc peuvent également causer des lésions *via* la formation de complexes immuns composés d'aAc et d'auto-Ag. Ces mécanismes sont notamment observés chez les patients atteints de MAI systémiques (Charles A Janeway *et al.*, 2001a). En revanche, dans les MAI spécifiques d'organe, les aAc se lient directement à l'organe cible et lui induisent des lésions (Elkon and Casali, 2008). Les premiers aAc ont été découverts à la fin des années 1940 dans le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde. Dans les deux cas, il a été démontré que ces aAc contribuaient à la pathogénèse de la maladie. On sait à présent que les aAc jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse de nombreuses MAI et qu'ils peuvent induire à la fois une inflammation systémique et des dommages tissulaires (Suurmond and Diamond, 2015).

Dans certaines MAI, les aAc peuvent être présents avant l'apparition des premiers symptômes et servir de biomarqueurs permettant un diagnostic et une intervention thérapeutique précoce (Elkon and Casali, 2008). Néanmoins, afin de pouvoir détecter ces aAc, l'Ag cible doit être connu. Durant les 50 dernières années, d'importants progrès ont été réalisés dans la recherche des Ag cibles des MAI notamment *via* l'utilisation des aAc comme

sondes (Rosen and Casciola-Rosen, 2016).

Un groupe de maladies dont les Ag cibles ont été très bien caractérisés et qui nous intéresse particulièrement est celui des dermatoses bulleuses auto-immunes et en particulier le pemphigus.

### **3. Les dermatoses bulleuses auto-immunes**

Les dermatoses bulleuses sont une variété de MAI de la peau qui sont caractérisées par la présence de bulles ou de cloques (Patrício *et al.*, 2009). Ce groupe de MAI est composé de différentes maladies telles que le pemphigus, les pemphigoïdes bulleuse et cicatricielle, la dermatite herpétiforme et la dermatose à IgA linéaire (Bickle *et al.*, 2002). Dans ces MAI, il a été démontré que la cause de la maladie était les aAc dirigés contre des protéines d'adhérence de la peau (Patel *et al.*, 2017).

Parmi ce groupe de maladies, nous allons nous intéresser plus particulièrement au pemphigus. Il s'agit d'une maladie cutanéomuqueuse caractérisée par la présence d'aAc de type IgG contre des protéines d'adhésion cellulaire de la peau appelées desmogléines (DSG) (Patrício *et al.*, 2009). La première cible du pemphigus a été identifiée par Koulu *et al.* en 1984 comme étant la DSG1 puis Amagai *et al.* ont identifié la DSG3 comme étant une autre cible des aAc dans le pemphigus en 1991 (Amagai *et al.*, 1991; Koulu *et al.*, 1984). Récemment, d'autres aAc dirigés contre diverses cibles telles que les desmocollines (DSC) (autres protéines d'adhésion cellulaire de la peau), la pompe calcique *secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase pump type 1* (SPCA1) ou plusieurs sous-types de récepteurs muscariniques et nicotiques ont été identifiés (Amber *et al.*, 2018).

## **IV. Les acteurs des maladies auto-immunes**

Dans cette partie, nous allons détailler les différents acteurs des MAI et leur implication dans la physiopathologie du pemphigus.

### **1. Les lymphocytes T**

Les LT sont un des composants majeurs des réponses immunes adaptatives *via* leur rôle central dans l'élimination des pathogènes et la surveillance des tumeurs (Gaud *et al.*, 2018). Les LT initient et régulent la réponse immune à un Ag donné. Ces réponses immunes débutent

lorsque le TCR reconnaît un Ag présenté par une molécule de CMH (Samelson and Klausner, 1988). Contrairement aux Ig circulantes ou au récepteur des cellules B (BCR) qui peuvent reconnaître les Ag dans leur forme native (la structure des Ig circulantes et du BCR sera détaillée dans la partie IV.2), le TCR des LT reconnaît des peptides provenant d'Ag qui ont été dégradés puis présentés à la surface des CPA. Cette présentation de l'Ag au TCR passe respectivement par le CMH de classe I pour les LT cytotoxiques (exprimant le corécepteur CD8) et par le CMH de classe II pour les LTh (exprimant le corécepteur CD4) (Figure 4) (Alcover *et al.*, 2018).

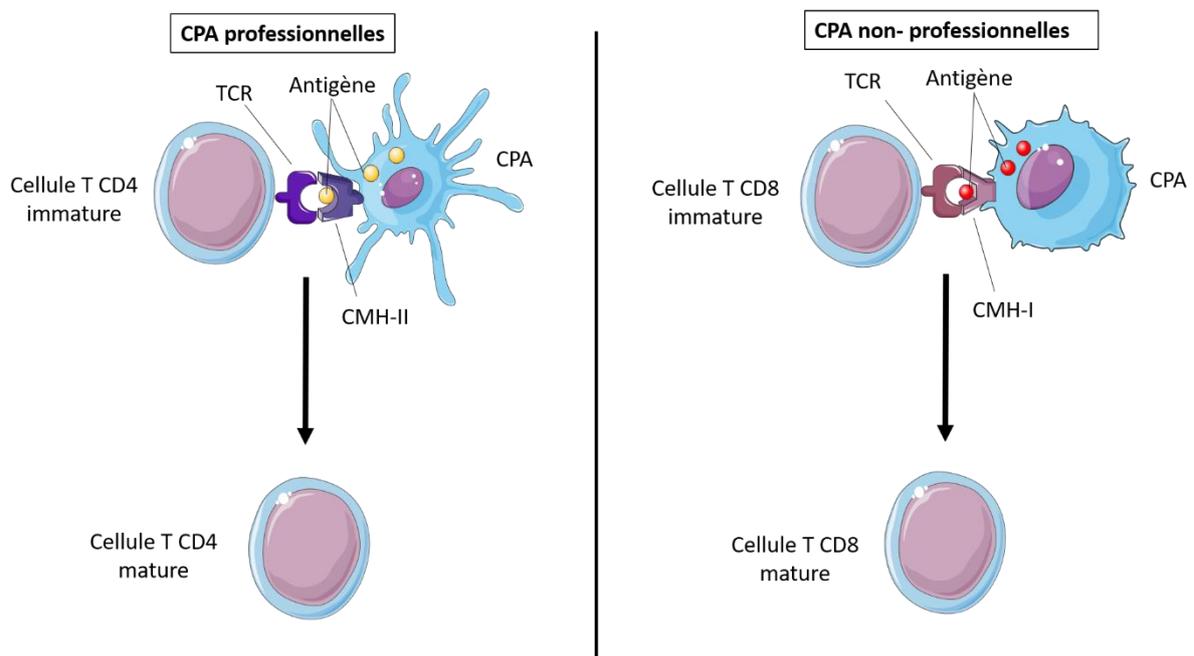


Figure 4 : Représentation schématique de la reconnaissance antigénique entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrice d'antigène (CPA) professionnelles présentent les peptides via la molécule complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II aux lymphocytes T helper exprimant le co-récepteur CD4. Ces peptides sont dérivés de protéines extracellulaires ou de protéines du soi dégradées par la voie endosomale. Les CPA non-professionnelles présentent des peptides générés à partir de la dégradation de protéines cytosoliques via la molécule de CMH de classe I aux lymphocytes T cytotoxiques exprimant le co-récepteur CD8.

Utilisation de Servier Art Medical.

### A. Le récepteur aux cellules T

Le principal médiateur de l'activation des LT est le TCR. Chaque TCR est unique et est responsable de la spécificité de chaque LT à son Ag cible (Pennock *et al.*, 2013). Le TCR est une molécule hétérodimérique constitué de deux sous-unités appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces sous-unités sont composées de domaines d'Ig constants et variables dont les *complementarity determining regions* (CDR), aussi appelées régions hypervariables, représentent la surface de liaison au

complexe CMH-peptide présent à la surface de la CPA (Alcover *et al.*, 2018; Rudolph and Wilson, 2002). Le TCR va se lier au complexe CMH-peptide afin que les CDR1 et 2 se lient à la molécule de CMH tandis que le CDR3 se lie au peptide (Figure 5). La reconnaissance du TCR est très sensible pour un petit nombre de ligands parmi des milliers de complexes CMH-peptide différents, mais elle est souvent hautement spécifique pour une combinaison CMH-peptide particulière (Germain and Stefanová, 1999). L'expression de surface du TCR se fait en association, et est dépendante, de la molécule CD3 (Kuhns *et al.*, 2006). Ces deux molécules forment un complexe où la molécule CD3 permet la transduction du signal provenant de l'interaction entre le peptide et le TCR (Clevers *et al.*, 1988).

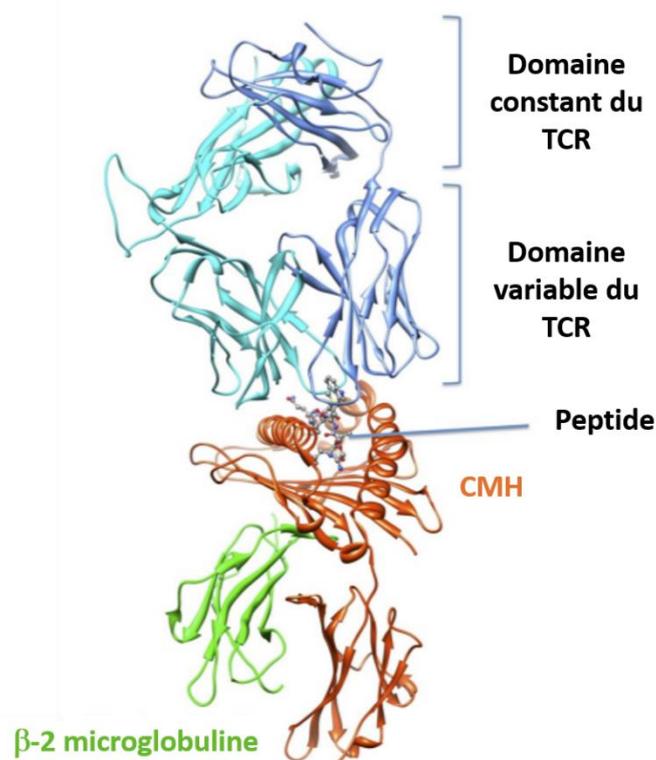


Figure 5 : Structure cristallographique de la liaison entre le récepteur aux cellules T et le complexe majeur d'histocompatibilité présentant le peptide

Le récepteur aux cellules T est composé de deux chaînes composées de deux domaines d'immunoglobuline : un domaine constant et un domaine variable. Le domaine variable du récepteur aux cellules T est composé des deux parties variables des deux chaînes d'immunoglobuline. La molécule du complexe majeur d'histocompatibilité couplé à la  $\beta$ -2 microglobuline va présenter le peptide au domaine variable du récepteur aux cellules T. TCR = T cell receptor, CMH = complexe majeur d'histocompatibilité.

D'après Zoete et al., 2013.

Le TCR est généré par recombinaison des séquences d'ADN durant le développement des LT dans le thymus (Pennock *et al.*, 2013). Les exons codant pour la région variable du TCR sont assemblés à partir des segments géniques nommés variable (V), diversité (D) et jonction (J)

via un phénomène de recombinaison. Cette recombinaison, appelée recombinaison VDJ, est un processus qui se produit uniquement dans les lymphocytes en développement au niveau de zones géniques possédant des séquences particulières appelées séquence signal de recombinaison conservée (Bassing *et al.*, 2002). La recombinaison VDJ est constituée de deux protéines spécifiques des lymphocytes : les protéines *recombination activating gene* (RAG) 1 et 2, qui coopèrent avec des facteurs de flexion de l'ADN non-spécifiques aux lymphocytes, et la protéine *high-mobility group* (HMG) 1A ou 1B, afin d'effectuer le clivage de l'ADN au niveau des séquences signales (Roth, 2014) (Figure 6). Après clivage, les protéines RAG vont retenir temporairement l'ADN sous la forme de complexes. Les extrémités codantes sont les premières à se dissocier de ces complexes, tandis que les extrémités signales restent étroitement liées aux protéines RAG. A l'intérieur de ces complexes, l'ADN clivé va passer en phase de jonction au cours de laquelle les extrémités d'ADN seront réorganisées, traitées et réparées (Schatz and Swanson, 2011). Cette étape se fait via le processus de *nonhomologous DNA end-joining* (NHEJ) (Figure 6). Il s'agit de la principale voie de réparation des cassures de type double-brin de l'ADN dans les cellules somatiques des eucaryotes multicellulaires (Ma *et al.*, 2002).

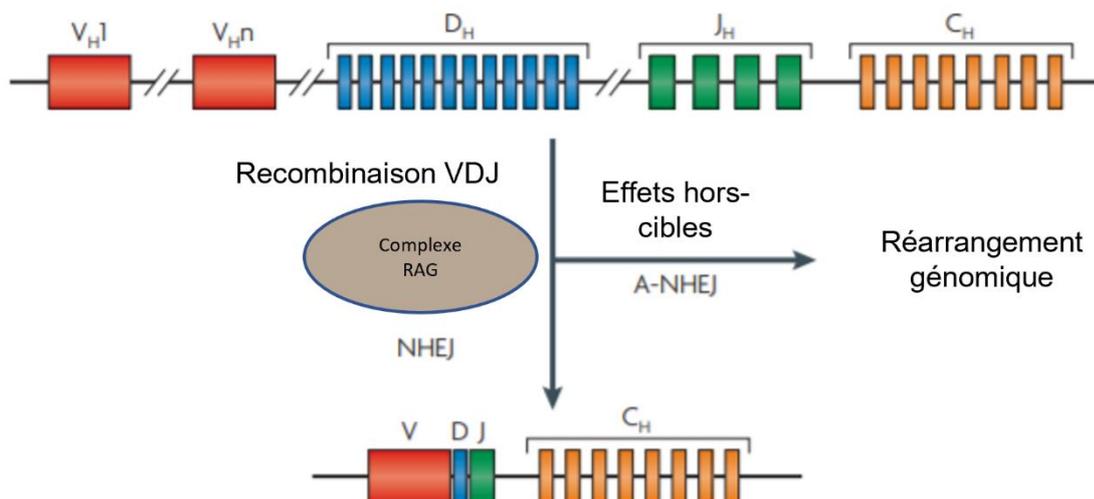


Figure 6 : Représentation schématique du réarrangement génique du TCR

Le domaine variable de chaque chaîne d'immunoglobuline est codé via un réarrangement génique appelé réarrangement VDJ tandis que le domaine C est codé par des exons individuels. La recombinaison VDJ débute par la formation du complexe RAG qui va induire une coupure dans l'ADN double brin. Cette cassure va être réparée par le processus de réparation de l'ADN appelé Non-Homologous End-Joining (NHEJ).

D'après Mani and Chinnaiyan, 2010.

Après la recombinaison d'un TCR fonctionnel, les LT dits naïfs vont émerger du thymus.

Ils sont alors capables de migrer à travers les tissus lymphoïdes secondaires et la circulation périphérique, mais ne sont pas encore capable de produire une réponse efficace en cas d'infection. Pour cela, l'activation du LT impliquant de nombreuses molécules présentes à la surface du LT et des CPA est nécessaire (Pennock *et al.*, 2013).

L'affinité du TCR pour sa cible est plus faible que celui des Ig. Néanmoins, en condition physiologique, des interactions simultanées entre plusieurs TCR membranaires présents sur les LT et les complexes CMH-peptide présents à la surface des CPA stabilisent les interactions TCR-ligand. De plus, il existe différentes molécules qui renforcent cette interaction telles que les co-récepteurs CD4 et CD8, les protéines d'adhésion et de co-signalisation (Alcover *et al.*, 2018). Lorsque ces molécules vont se lier à la molécule de CMH, cela va stabiliser l'interaction entre le LT et la CPA (Pennock *et al.*, 2013).

#### B. Les lymphocytes T cytotoxiques

Les LT matures vont exprimer soit le co-récepteur CD4 soit le co-récepteur CD8. Le rôle des LT cytotoxiques exprimant le co-récepteur CD8 est de monitorer toutes les cellules du corps et de détruire celles qui seront considérées comme une menace pour l'intégrité de l'hôte telles que les cellules infectées par un pathogène intracellulaire ou les cellules cancéreuses (Andersen *et al.*, 2006). Pour amorcer la réponse des LT cytotoxiques, la coopération des LTh CD4<sup>+</sup> est indispensable (Keene and Forman, 1982).

#### C. Les lymphocytes T helper

Après engagement du TCR par le complexe CMH-peptide approprié et déclenchement de l'expansion clonale, les LTh subissent rapidement une différenciation programmée. Ce processus de différenciation peut entraîner des réponses immunitaires hautement polarisées dans le cas d'infections chroniques, telles que les infections parasitaires. En revanche, dans le cas de réponses immunitaires aiguës, une réponse plus hétérogène est le plus souvent observée (Murphy and Reiner, 2002)

- **Les LTh1**

Les LTh1 permettent d'éliminer les pathogènes intracellulaires et sont également connues pour être associés à l'auto-immunité spécifique d'organe (Luckheeram *et al.*, 2012). Ces cellules produisent divers cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  (Mosmann *et al.*, 1986; Szabo

*et al.*, 2003). L'IFN- $\gamma$  va agir sur les phagocytes tels que les macrophages et augmenter leur activité phagocytaire tandis que l'IL-2 va favoriser la prolifération des LT cytotoxiques (Luckheeram *et al.*, 2012). L'IL-12, provenant des cellules phagocytaires hématopoïétiques activées (monocytes, macrophages, neutrophiles) et des cellules dendritiques, est une cytokine essentielle pour la différenciation en LTh1 (Trinchieri *et al.*, 2003). Le facteur de transcription responsable de la différenciation des LT naïfs en LTh1 est *T-box transcription factor* (T-bet). Il va permettre l'activation de gènes qui permettront la différenciation en LTh1 mais également de gènes qui supprimeront le développement d'autres lignées cellulaires telles que les LTh2 (Afkarian *et al.*, 2002).

- **Les LTh2**

Les LTh2 permettent l'élimination des parasites extracellulaires mais ont également un rôle dans l'induction et la persistance de maladies telles que l'asthme ou les allergies (Luckheeram *et al.*, 2012). Ces cellules produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13 (Mosmann *et al.*, 1986; Szabo *et al.*, 2003). L'IL-4 est majoritairement impliquée dans les mécanismes d'allergie tandis que l'IL-13 participe à l'immunité antiparasitaire et active, avec l'IL-5, les éosinophiles induisant l'asthme allergique (Luckheeram *et al.*, 2012). La différenciation en LTh2 est associée à l'expression du facteur de transcription GATA-3 (Zhu *et al.*, 2006).

- **Les LTh17**

Les LTh17 sont responsables de l'immunité contre les bactéries et les champignons mais sont également souvent retrouvés dans les MAI spécifiques d'organes où elles induisent une forte inflammation des tissus. Ces cellules sécrètent différentes cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 ou l'IL-22 (Korn *et al.*, 2009; Luckheeram *et al.*, 2012). L'IL17 induit la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui assureront le chimiotactisme des cellules immunitaires vers le site d'inflammation tandis que l'IL-21 permet l'activation des LT, la différenciation des LB en plasmocytes et l'activation des cellules NK. Pour finir, l'IL-22 possède un rôle de protection des tissus et de défense contre les bactéries (Luckheeram *et al.*, 2012). La différenciation des LT en LTh17 dépend du facteur de transcription *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T* (ROR $\gamma$ t) induit par les cytokines IL-6 et IL-23 (Li *et al.*, 2018).

- **Les LTreg**

Comme vu précédemment, les LTreg jouent un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunologique périphérique. Ces cellules sont définies par leur expression membranaires des molécules CD4 et CD25 et la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'IL-35 (Chen *et al.*, 2003; Luckheeram *et al.*, 2012). Leur différenciation en LTreg se fait *via* le facteur de transcription Foxp3 et la cytokine TGF- $\beta$  (Li *et al.*, 2007; Luckheeram *et al.*, 2012). La majorité de ces cellules sont produites dans le thymus mais une partie d'entre elles vont se différencier en LTreg à partir de LT naifs périphériques (Chen *et al.*, 2003). Les mécanismes d'action de ces cellules ont été détaillées précédemment dans la partie II.

- **Les LTFh**

Il existe également une population spécialisée de LTh située dans les organes lymphoïdes et plus précisément dans le centre germinatif appelée LTFh (Luckheeram *et al.*, 2012; Pallikkuth *et al.*, 2017). Ces cellules jouent un rôle fondamental dans la médiation de l'immunité humorale *via* leur interaction avec les LB (Luckheeram *et al.*, 2012). Ce sont également des cellules essentielles à la formation du centre germinatif, au développement et à la maturation de l'affinité de la plupart des Ac à haute affinité et des LB mémoires (Crotty, 2014). Ces cellules sont caractérisées par leur expression du récepteur *CXC chemokine Receptor 5* (CXCR5) mais elles expriment également le *programed death receptor 1* (PD-1), le *signalling lymphocyte activation molecular associated protein* (SAP), l'IL-21 et le *Inducible T-cell costimulator* (ICOS) (Crotty, 2011). La différenciation des LTFh nécessite la présence de DCs activées par des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques d'Ag naïfs suivi par une interaction avec des LB. Les LTFh vont ensuite augmenter leur expression de molécules de costimulation telles qu'ICOS et le ligand de CD40 et sécréter les cytokines IL-21 et IL-4 qui jouent un rôle essentiel dans la réponse des LB (Pallikkuth *et al.*, 2017). La différenciation des LTFh dépend de l'expression du facteur de transcription *B cell CLL/ lymphoma 6* (Bcl6) (Crotty, 2011). Durant une réponse immune, ces cellules vont envoyer des signaux aux LB ayant déjà rencontrés leurs Ag présents dans le centre germinatif afin qu'ils prolifèrent, commutent de classe et subissent le phénomène d'hypermutation somatique. Cela va permettre la génération de plasmocytes à longue durée de vie et de LB mémoires (Pallikkuth *et al.*, 2017).

#### D. Les lymphocytes T dans le pemphigus

Les patients atteints de pemphigus possèdent des LTh spécifiques de la DSG circulants. Ces LT CD4<sup>+</sup> prolifèrent lorsque les peptides antigéniques de la DSG leur sont présentés par des CPA *via* les molécules d'Ag des leucocytes humains (HLA) de classe II restreintes DRB1\*0402 ou \*1401 (Lin *et al.*, 1997). La réponse T va polariser la production d'Ac anti-DSG. Une prédominance de LTh1 est associée à la présence d'IgG1 tandis qu'une prédominance de LTh2 est associée à la présence d'IgG4 (les isotypes d'Ig seront détaillés dans la parties IV.3) (Hammers and Stanley, 2016). D'autres populations de LT ont également été observées dans le pemphigus. En effet, la proportion de LTreg circulants chez les patients atteints de pemphigus a été démontrée comme étant réduite comparée aux donneurs sains tandis que les LTh17 et les LTFh sont augmentés chez les patients (Pan *et al.*, 2015; Sugiyama *et al.*, 2007).

Pour finir, l'implication des LT cytotoxiques dans la physiopathologie du pemphigus a été peu étudiée. Leur fonction dans la physiopathologie reste incertaine bien que certaines études aient validé leur implication *via* des expériences de transfert passif (Giurdanella *et al.*, 2013).

## 2. **Les lymphocytes B**

Les LB possèdent de nombreuses fonctions immunologiques telles que la production d'Ac, la présentation d'Ag et la production de cytokines (Mauri and Bosma, 2012). L'activation des LB est médiée par la liaison de l'Ag au BCR, ce qui initie la cascade de signalisation intracellulaire menant à l'internalisation de l'Ag, sa préparation et sa présentation aux LT (Treanor, 2012). La réponse Ac des LB nécessite généralement une reconnaissance du même Ag à la fois par les LB et les LT. Les LT vont ensuite aider les LB à devenir des cellules sécrétrices d'Ac aussi appelées plasmocytes (Parker, 1993).

#### A. Le récepteur aux cellules B

Le BCR est une glycoprotéine membranaire appartenant à la superfamille des Ig (Harpaz and Chothia, 1994). Les Ig sont de larges molécules (150 kDa) composées de deux chaînes différentes de polypeptides. La première, composée d'environ 50 kDa, est appelée chaîne lourde ou chaîne H et la deuxième de 25 kDa est appelée chaîne légère ou chaîne L. Chaque Ig est composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Des ponts disulfures relient les deux chaînes lourdes ensemble ainsi que chaque chaîne légère à une chaîne lourde

(Figure 7) (Charles A Janeway *et al.*, 2001b). Chacune de ces chaînes est constituée d'un domaine amino-terminal (N-terminal) dit variable (V) et d'un ou plusieurs domaines carboxy-terminal (C-terminal) dit constant (C). Les chaînes légères ne contiennent qu'un seul domaine constant tandis que les chaînes lourdes en contiennent entre 3 et 4 selon les isotypes (Schroeder and Cavacini, 2010). Dans le cas des BCR, la chaîne lourde possède également un court domaine intracellulaire composé de trois acides aminés : lysine, valine, lysine. Le BCR ne contient pas de motifs de signalisation mais il est lié à un hétérodimère contenant des motifs d'activation appelés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (Treonor, 2012). De plus, les chaînes lourdes ayant trois domaines constants possèdent une région supplémentaire dite charnière située entre le premier et le deuxième domaine constant (Figure 7). La longueur de cette région dite charnière va influencer sur la flexibilité de la molécule d'Ig (Schroeder and Cavacini, 2010). Chez chaque molécule d'Ig, les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont les mêmes, ce qui permet à l'Ig de présenter deux sites de reconnaissance à l'Ag identiques et qui pourront ainsi lier simultanément deux mêmes structures (Charles A Janeway *et al.*, 2001b).

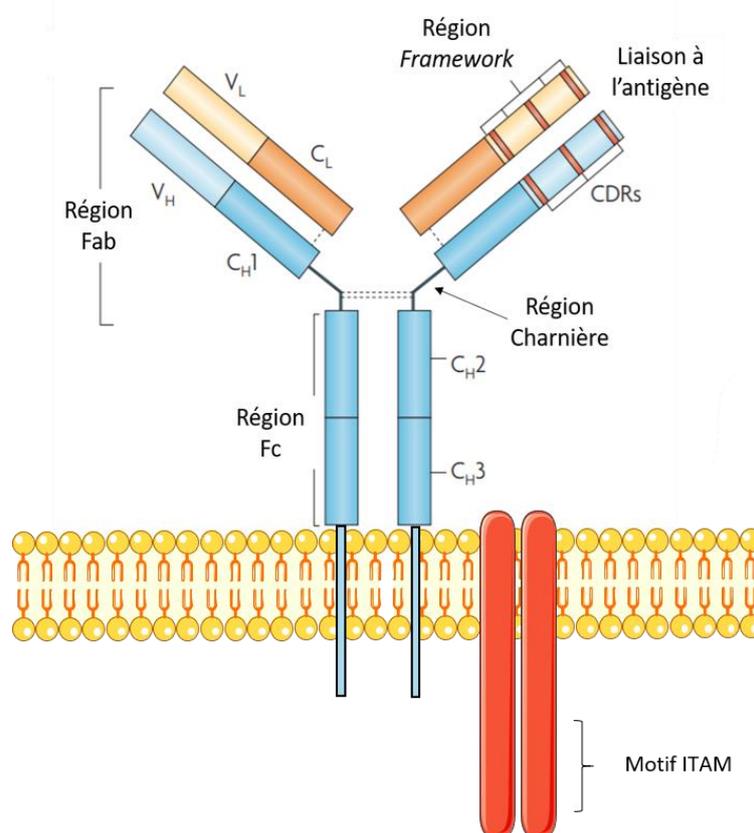


Figure 7 : Structure d'un récepteur aux cellules B

Un récepteur aux cellules B est une immunoglobuline membranaire composée de quatre chaînes : deux chaînes dites lourdes (H) et deux chaînes dites légères (L) reliées entre elles par un pont disulfure. Une immunoglobuline est composée de plusieurs parties : un domaine N-terminal aussi appelé partie variable (V), une région charnière située entre le premier et le deuxième domaine constant et plusieurs domaines C-terminal appelée partie constante (C). Dans le cas du BCR, une partie intracellulaire courte composée de 3 acides aminés (lysine/valine/lysine) est également présente. Ces parties sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs parties. La partie variable est divisée en trois complémentarité déterminant regions (CDR) et en quatre régions dites framework, obtenue via la recombinaison des gènes V et J pour les chaînes légères et des gènes V, D et J pour les chaînes lourdes. Un hétérodimère accompagne le BCR portant des motifs de signalisation.

D'après Hansel et al., 2010, utilisation de Servier Art Medical.

- L'organisation et le réarrangement géniques des Ig

Les chaînes légères et les chaînes lourdes sont codées par des familles de gènes différentes situées sur des chromosomes distincts (Schroeder and Cavacini, 2010). Comme pour le TCR des LT, la partie variable du BCR des LB est générée *via* le processus de recombinaison VDJ au cours du développement précoce. Elle est réalisée par assemblage somatique de segments de gènes tandis que la partie constante est codée par des exons individuels (Figure 8) (Chaudhuri and Alt, 2004; Dudley *et al.*, 2005).

Chaque domaine variable est composé de CDR qui sont séparés les uns des autres par quatre régions relativement constantes appelées *frameworks* (FR) (Figure 7) (Lee *et al.*, 1992). Les six CDR sont responsables de la reconnaissance à l'Ag tandis que la partie constante va induire les fonctions effectrices (I *et al.*, 2013). Les exons variables de la chaîne lourde d'Ig sont majoritairement codés par le segment VH de la lignée germinale, qui contient deux des trois CDR. Le troisième CDR sera formé par la liaison des régions VH, DH et JH (Figure 8). L'association aléatoire des différents segments géniques est donc une source de diversité somatique. Enfin, il existe également un phénomène de diversification des jonctions D vers J et V vers D lors de la recombinaison VDJ par la délétion ou l'ajout de nucléotides lors de la recombinaison (Jung *et al.*, 2006). Une fois la recombinaison effectuée, les LB immatures vont exprimer une IgM de surface (Bradl *et al.*, 2003).

Au cours de leur maturation, les LB vont subir deux formes de modification génétiques de leur Ig : l'hypermutation somatique et la commutation isotypique (Figure 8) (Dudley *et al.*, 2005). L'hypermutation somatique permet d'introduire des mutations ponctuelles dans les régions variables des *loci* d'Ig afin de sélectionner les BCR qui possèdent une affinité forte pour l'Ag cible (Dudley *et al.*, 2005; Methot and Di Noia, 2017). La commutation isotypique, quant à elle, permet d'exprimer un Ac ayant la même spécificité antigénique mais avec une fonction effectrice modifiée puisque l'Ac aura changé d'isotype. Ce mécanisme permet une

recombinaison d'ADN entre les régions dites *switch* qui sont situées en amont de tous les gènes CH. La commutation isotypique survient très rapidement après une infection ou une immunisation (Stavnezer and Schrader, 2014). L'hypermutation somatique et la commutation isotypique sont deux mécanismes essentiels pour produire des réponses immunes humorales de forte affinité qui sont adaptées à un pathogène particulier et sont capables d'éliminer l'infection (Methot and Di Noia, 2017). Ces deux mécanismes sont initiés par l'enzyme *Activation Induced Cytidine Deaminase* (AID) dans les réponses dépendantes des LTFh au sein du centre germinatif (Figure 8) (Cattoretti *et al.*, 2006).

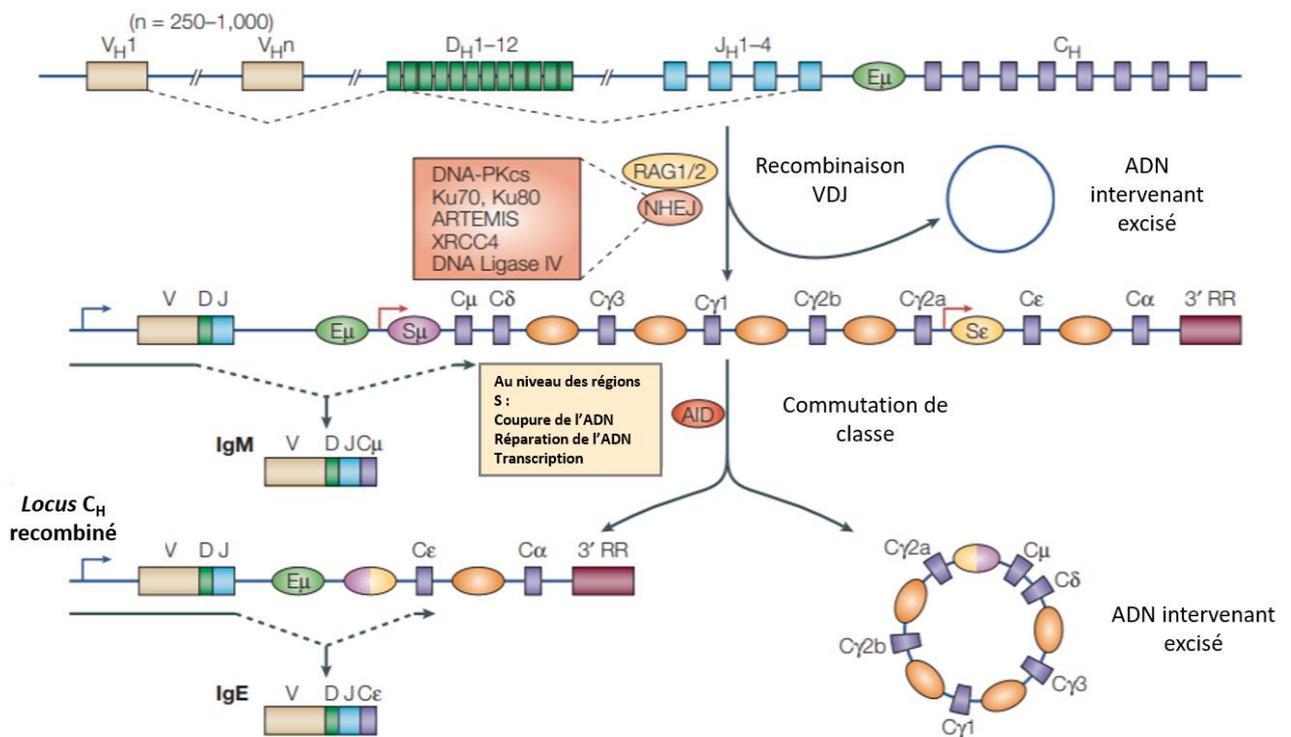


Figure 8 : Représentation schématique de la recombinaison somatique et de la commutation isotypique

Le domaine variable de chaque chaîne d'immunoglobuline est codé via un réarrangement génique appelé réarrangement V(D)J tandis que le domaine C est codé par des exons individuels. La recombinaison VDJ débute par la formation du complexe RAG qui va induire une coupure dans l'ADN double brin. Cette cassure va être réparée par le processus de réparation de l'ADN Non-Homologous End-Joining (NHEJ). Puis, l'immunoglobuline va subir une commutation isotypique via l'enzyme Activation Induced Cytidine Deaminase (AID). Le processus de réarrangement implique le clivage des séquences signal de recombinaison présentes dans l'ADN, qui flanquent les segments de gènes de réarrangement, par le complexe gène 1 activant la recombinaison RAG1/RAG2. La jonction des extrémités de l'ADN nécessite des protéines du complexe NHEJ, dont Ku70, Ku80, ARTEMIS, la protéine 4 de réparation croisée aux rayons X (XRCC4), l'ADN ligase IV et la sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PKcs). La transcription à travers le locus est conduite par un promoteur en amont du segment VDJ réarrangé (flèche bleue), qui facilite la synthèse d'une chaîne lourde  $\mu$ . Celle-ci s'associe ensuite à une chaîne légère, formant ainsi une molécule d'IgM, qui s'affiche à la surface d'un LB. Par la suite, des isotypes secondaires sont produits par commutation isotypique, un processus qui échange la région constante de la chaîne lourde (CH) avec un ensemble de gènes de région constante en aval (ici, commutation isotypique vers IgE). Cette réaction de délétion-recombinaison implique la génération de cassures d'ADN au niveau des régions de commutation (S) suivie de la réparation de l'ADN. Cela conduit à un

*réarrangement du locus CH et à la suppression de la séquence intermédiaire. Les cytokines stimulent la transcription (flèches rouges) à travers le gène CH et déterminent l'isotype de l'immunoglobuline vers lequel le lymphocyte B va basculer.*

*D'après Chaudhuri and Alt, 2004.*

- La chaîne lourde

Le système de réarrangement de la chaîne lourde comporte les gènes V, D et J et se nomme réarrangement VDJ (Schroeder and Cavacini, 2010). Le *locus* de la chaîne lourde se situe sur le chromosome 14 et s'organise avec des groupes séparés de segments géniques VH, DH et JH ainsi que des gènes CH (Figure 9) (Charles A Janeway *et al.*, 2001c). Le *locus* de la chaîne lourde contient 123 segments VH classifiables en sept familles différentes dont 79 sont des pseudogènes. Sur les 44 segments VH possédant un cadre de lecture ouvert, 39 sont exprimés sous forme de protéines de chaînes lourdes et 1 sous forme d'ARN messager (ARNm), tandis que les 4 autres ne se trouvent pas dans l'ADN complémentaire d'Ig (Matsuda *et al.*, 1998). Il existe également 27 segments géniques D et 6 segments géniques J (Corbett *et al.*, 1997). Le *locus* de la chaîne lourde contient également une série de régions C disposées l'une après l'autre dont chacune d'elles correspond à un isotype différent. En général, une cellule n'exprime qu'une région C à la fois, en commençant par l'IgM. L'expression d'autres isotopes, tels que les IgG, peut se faire par commutation isotypique (Charles A Janeway *et al.*, 2001c).

La recombinaison commence avec la liaison des segments géniques D et J suivi par la liaison de l'élément V à la partie N-terminale du segment DJ. Le segment génique V contient les régions FR-1, -2 et -3, le CDR-1 et -2 et la partie N-terminale du CDR-3. Le segment génique D va former le milieu du CDR-3 tandis que le segment génique J contient la partie C-terminale du CDR-3 et la région FR-4. L'assortiment aléatoire d'un des 39 segments géniques V avec un des 27 segments géniques D et un des 6 segments géniques J va générer plus de  $10^4$  combinaisons VDJ différentes. L'imprécision des processus de jonction et la variation dû à l'addition de nucléotides permet la génération de CDR-H3 de longueur et de structures variables. En somme, c'est plus de  $10^{10}$  chaînes lourdes différentes qui peuvent être produites au cours du réarrangement VDJ (Schroeder and Cavacini, 2010).

- La chaîne légère

Il existe deux chaînes légères différentes appelées kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ). Le système de réarrangement formant la chaîne légère ne comporte que les gènes V et J et se nomme

réarrangement VJ (Collins and Watson, 2018). Après une recombinaison réussie de la chaîne lourde de l'Ig, les *loci* de la chaîne légère des Ig procèdent à un réarrangement. Les premières tentatives ont lieu au niveau du *locus* Ig  $\kappa$ , et si un réarrangement fonctionnel n'est pas obtenu, le *locus* Ig  $\lambda$  subit alors une recombinaison (González *et al.*, 2007).

- La chaîne  $\kappa$

Le *locus* de la chaîne  $\kappa$  est situé sur le chromosome 2. Les segments géniques codant la chaîne légère sont organisés ainsi : le groupe de segments de gènes  $V\kappa$  est suivi du groupe de segments de gènes  $J\kappa$ , puis d'un seul gène  $C\kappa$  (Figure 9) (Charles A Janeway *et al.*, 2001c). La chaîne légère  $\kappa$  comprend de nombreux segments géniques  $V\kappa$ , groupés en sept familles et cinq segments géniques  $J\kappa$  (González *et al.*, 2007). Chez l'Homme, le domaine variable de la chaîne légère  $\kappa$  est assemblé par l'épissage des segments géniques  $V\kappa$  aux segments géniques  $J\kappa$ . Le segment du gène  $V\kappa$  code les CDR-1 et -2, tandis que le CDR-3 est le produit de l'union V-J. Dans la protéine mature, les CDR des chaînes lourdes et légères sont juxtaposés pour former le site de liaison à l'Ag (Lee *et al.*, 1992).

- La chaîne  $\lambda$

Le *locus* de la chaîne  $\lambda$  est situé sur le chromosome 22 (Kawasaki *et al.*, 1997). Il est constitué d'un groupe de 32 segments de gènes  $V\lambda$  suivi de quatre ensembles de segments géniques  $J\lambda$ , chacun étant lié à un seul gène  $C\lambda$  (Figure 9) (Charles A Janeway *et al.*, 2001c; Schroeder and Cavacini, 2010). La chaîne  $\lambda$  est moins exprimée que la chaîne  $\kappa$  avec un rapport 2 : 1 en faveur de la chaîne  $\kappa$  (Charles A Janeway *et al.*, 2001b).

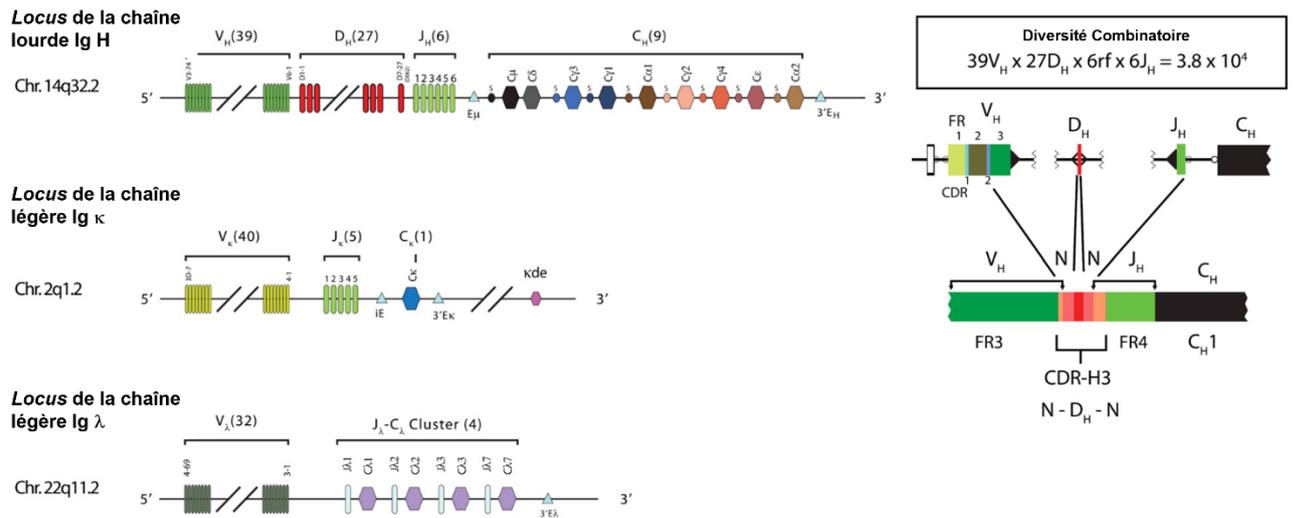


Figure 9 : Organisation des segments de gènes des différentes chaînes d'immunoglobuline

La chaîne lourde de l'immunoglobuline est composée de 39 segments variables ( $V_H$ ) situés après l'extrémité 5', suivi de 27 segments Diversité ( $D_H$ ), de 6 segments jonction ( $J_H$ ) et de 9 segments constants ( $C_H$ ) situés juste avant l'extrémité 3'. La chaîne légère  $\kappa$  est composée de 40 segments variables ( $V_\kappa$ ) situés après l'extrémité 5', suivi de 5 segments jonction ( $J_\kappa$ ) et d'un unique segment constant ( $C_\kappa$ ) situé juste avant l'extrémité 3'. La chaîne légère  $\lambda$  est composée de 32 segments variables ( $V_\lambda$ ) situés après l'extrémité 5', suivi de 4 clusters  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  situés juste avant l'extrémité 3'.

D'après Schroeder and Cavacini, 2010.

En conclusion, les variations somatiques dans les CDR-3, le réarrangement combiné de chaque segment génique et l'association entre les chaînes lourdes et légères permet d'obtenir un répertoire d'Ac pré-immun de plus de  $10^{16}$  Ac différents (Schroeder and Cavacini, 2010).

## B. Ontologie des lymphocytes B

Le développement précoce des LB a lieu dans la moelle osseuse. Il est caractérisé par un réarrangement ordonné des *loci* de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'Ig afin de former le BCR (LeBien and Tedder, 2008). Les premiers précurseurs de LB sont les cellules pro-B (Figure 10). Ces cellules n'expriment pas de BCR car leurs *loci* d'Ig n'ont pas encore été recombinés. Ainsi, l'engagement dans la voie des LB précède la recombinaison génique de l'Ac et est indépendant du BCR (Meffre *et al.*, 2000). Ces cellules vont ensuite devenir des cellules pré-B exprimant une chaîne lourde  $\mu$  (Melchers, 2005). Le processus de recombinaison des Ig commence dans les cellules pro-B avec l'assemblage des segments géniques V, D et J en un exon codant la région variable d'une chaîne lourde d'Ig. Si ce réarrangement aboutit à la synthèse d'une chaîne lourde d'Ig transmembranaire fonctionnelle, la cellule pro-B se développe alors en une cellule pré-B. Ces cellules vont ensuite réarranger leur *locus* de la chaîne légère des Ig et, à condition qu'elles produisent une chaîne légère capable de s'apparier

avec la chaîne lourde déjà produite, se développent en cellules B immatures exprimant une IgM de surface (Bradl *et al.*, 2003). C'est au stade de LB immatures que le BCR est testé, pour la première fois, pour sa réactivité contre les auto-Ag. Cette étape détermine si le B immature et son BCR seront sélectionnés dans le répertoire des LB périphériques. La tolérance centrale va éliminer les LB immatures nouvellement générés qui réagissent avec un auto-Ag dans l'environnement de la moelle osseuse. Ce processus est considéré comme le premier point de contrôle de la tolérance des LB (Pelanda and Torres, 2012). Les LB ayant survécu à cette sélection négative vont ensuite sortir de la moelle osseuse et rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Ils vont par la suite atteindre le stade de LB folliculaires qui est caractérisé par l'expression commune d'une IgM et d'une IgD de surface (LeBien and Tedder, 2008). Les LB folliculaires naïfs sont ensuite activés par les LTFh présents dans les organes lymphoïdes et vont migrer vers le centre germinatif afin de finir leur maturation (Basso and Dalla-Favera, 2015; Pillai and Cariappa, 2009). Dans le centre germinatif, les LB vont subir diverses modifications telles qu'une expansion clonale, une commutation isotypique, le phénomène d'hypermutation somatique au niveau des gènes variables et une sélection des BCR possédant une affinité augmentée pour leur épitope antigénique unique *via* le phénomène de maturation de l'affinité (LeBien and Tedder, 2008). Ce processus résulte en la génération de LB mémoires et de plasmocytes sécrétant des Ac de haute affinité qui neutralisent de façon efficace les pathogènes (De Silva and Klein, 2015). Il existe deux types différents de plasmocytes : ceux à durée de vie courte et ceux à durée de vie longue (Figure 10) (Nutt *et al.*, 2015).

On appelle LB naïfs les LB situés entre les stades de développement folliculaire (expression simultanée d'une IgM et d'une IgD de surface) et l'entrée dans le centre germinatif après la première rencontre avec l'Ag (Figure 10) (Basso and Dalla-Favera, 2015).

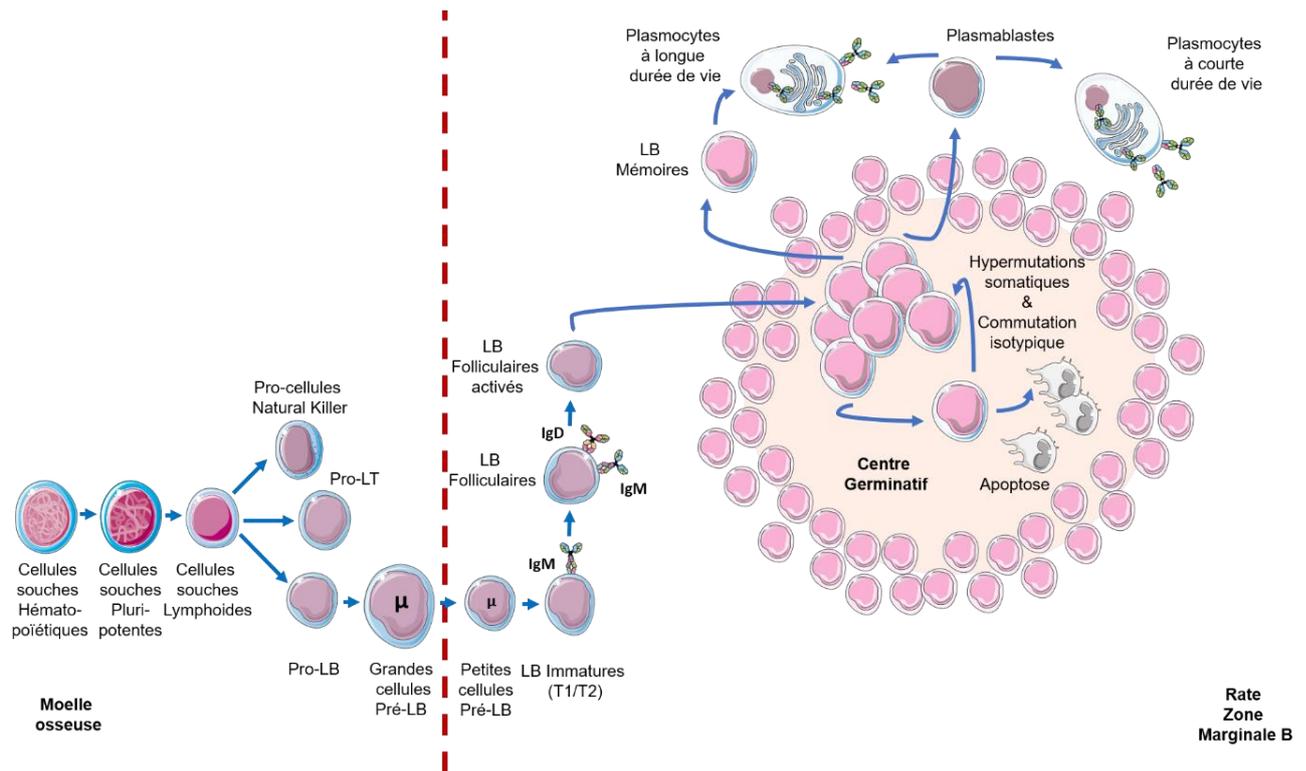


Figure 10 : Ontogénèse des lymphocytes B

Les cellules souches hématopoïétiques vont devenir des cellules souches pluripotentes puis des cellules souches lymphoïdes. Ces dernières vont ensuite donner naissance à trois lignées cellulaires : les pro-cellules natural killer, les pro-lymphocytes T (LT) ou les pro-lymphocytes B (LB). Les pro-LB vont devenir des grandes cellules pré-LB qui vont se transformer en petites cellules pré-LB et sortir de la moelle osseuse pour aller dans la zone marginale B de la rate. Ces petites cellules pré-LB deviennent alors des LB immatures exprimant une immunoglobuline M (IgM) de surface puis des LB folliculaires exprimant à la fois une IgD et une IgM. Une fois activés, ces LB folliculaires vont entrer dans le centre germinatif afin de finir leur maturation. Ils vont alors subir une expansion clonale qui sera suivie d'une commutation isotypique et d'une hypermutation somatique des gènes variables. Par la suite, une sélection des récepteurs aux cellules B possédant une affinité augmentée pour l'antigène est réalisée. Puis, une deuxième sélection a lieu dans le centre germinatif. Seuls les LB ayant reçu un signal de survie par les cellules dendritiques à la suite de la reconnaissance de l'Ag présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II survivront. Les LB matures vont ensuite sortir du centre germinatif sous forme de LB mémoires ou de plasmablastes qui pourront devenir des plasmocytes sécréteurs d'anticorps à courte ou à longue durée de vie.

D'après LeBien and Tedder, 2008, utilisation de Servier Art Medical.

### C. Les lymphocytes B mémoires

Les LB mémoires sont des LB ayant déjà rencontrés l'Ag, exprimant des Ig de hautes affinités et qui peuvent se différencier en plasmocytes en cas de deuxième exposition à l'Ag (De Silva and Klein, 2015). Ces LB ont reçu des signaux de développement de la part des LTFh tels que l'IL21 et le ligand de CD40 afin d'acquérir leur statut de mémoire (Crotty, 2019; Kurosaki *et al.*, 2015). Le développement des LB mémoires T-dépendant a lieu dans le centre germinatif où ils vont subir différents processus tels que l'expansion clonale, l'hypermutation somatique, la sélection de l'affinité et la commutation isotypique. Après avoir quitté le centre germinatif, les LB mémoires vont circuler parmi les organes lymphoïdes secondaires. Certains

des LB mémoires vont devenir des cellules résidentes de la rate. La plupart des LB qui quittent le centre germinatif expriment des isotypes d'Ig commutés. Les réponses T-indépendantes induisent des réponses mémoires faibles et de courte durée de vie (Ahmed and Gray, 1996).

De plus, il existe une hétérogénéité au sein des LB mémoires. En effet, l'origine, la fonction et la longévité des LB mémoires semblent différer suivant l'isotype de l'Ig exprimée à la surface de ces cellules. Les LB mémoires IgM<sup>+</sup> vont proliférer et pourront ensuite entrer dans le centre germinatif. Les LB mémoires IgG<sup>+</sup> et IgA<sup>+</sup> vont se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes sécréteurs d'Ac. En revanche, les LB mémoires IgE<sup>+</sup> n'ont jamais été détectés *in vivo* en condition physiologique (Kurosaki *et al.*, 2015).

#### D. Les plasmocytes

La génération d'Ac est une partie importante de la réponse immune. Les Ac sont produits par des populations rares de LB différenciés appelés plasmablastes et plasmocytes (Nutt *et al.*, 2015). Les plasmocytes représentent moins de 1% des cellules présentes dans les organes lymphoïdes mais sont responsables de la production de la totalité des Ac circulants. Ces cellules possèdent une morphologie, un profil d'expression génique et une durée de vie différentes de leurs précurseurs (Fairfax *et al.*, 2008).

La production des cellules sécrétrices d'Ac en réponse à un Ag de manière LT-dépendante se fait en deux étapes (Nutt *et al.*, 2015). La première étape, aussi appelée réponse extra-folliculaire, est responsable de la production rapide d'Ac après la rencontre avec l'Ag. À la suite de la reconnaissance de l'Ag par le BCR, le LB va migrer dans les zones riches en LT présentes dans les organes lymphoïdes secondaires où il va interagir avec les LT activés par le même Ag. Lorsqu'un LT reconnaît un Ag présenté par un LB, les deux cellules vont s'expandre. Le LB, devenu alors plasmablaste, va ensuite sortir de la zone T aussi appelée follicule (MacLennan *et al.*, 2003). Ces cellules vont subir une commutation isotypique mais sont généralement de faible affinité. De plus, elles possèdent une durée de vie courte (Figure 10) (Shlomchik and Weisel, 2012).

Certains LB vont de nouveau entrer dans le follicule où ils vont continuer de proliférer et vont former une structure appelée centre germinatif au sein desquels ont lieu les phénomènes d'hypermutation somatique et de sélection basée sur l'affinité (Shlomchik and Weisel, 2012; Victora and Nussenzweig, 2012). Durant cette phase, les LB vont se différencier

soit en plasmocytes soit en LB mémoires à longue durée de vie (Figure 10) (Shlomchik and Weisel, 2012).

A chaque génération, seule une faible proportion des LB en division deviendra des cellules sécrétrices d'Ac. En fonction de la force de la stimulation initiale et de la présence d'une stimulation continue, la division peut cesser et entraîner la mort de la plupart des cellules B même si une proportion de LB mémoires et de cellules sécrétrices d'Ac à longue durée de vie peut être conservée (Nutt *et al.*, 2015).

#### E. Les lymphocytes B dans le pemphigus

Le pemphigus étant une maladie médiée par les aAc, le rôle des LB dans cette maladie est donc important. Des LB spécifiques de la DSG sont détectables à la fois dans les lésions de la peau et dans la circulation sanguine (Maho-Vaillant *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2017). Nous avons précédemment montré dans une étude menée par le laboratoire que les LB spécifiques de la DSG détectés dans le sang des patients possédaient un phénotype mémoire avec une expression plus importante de CD27 et d'IgG membranaires que la population totale de LB (Maho-Vaillant *et al.*, 2021).

### **3. Les anticorps**

#### A. Structure d'un anticorps

Tous les Ac possèdent deux domaines fonctionnels : un qui confère une spécificité à l'Ag appelé le *Fragment antigen-binding* (Fab) et un qui médie les fonctions de l'Ac, appelé le Fragment cristallisable (Fc) (Figure 7). Chaque Ig possède deux domaines Fab et un domaine Fc, ce qui génère une molécule en forme de Y qui peut exister sous forme de monomère ou de multimère (Lu *et al.*, 2018). Le domaine Fab est la partie de l'Ac permettant la reconnaissance des Ag. Il est composé de la chaîne légère au complet ainsi que du domaine variable et du premier domaine constant de la chaîne lourde (CH1). La partie Fc est quant à elle constituée des autres domaines constants de chaque chaîne lourde (CH : *constant heavy chain*). Le domaine Fab est également divisé en deux parties : la partie variable composée du domaine variable de la chaîne légère ainsi que du domaine variable de la chaîne lourde et la partie constante composée des domaines constants des chaînes lourdes et légères (Schroeder and Cavacini, 2010).

## B. Les isotypes

Les gènes constants de la chaîne lourde sont au nombre de 9 :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (Figure 9) (Honjo, 1983). Ces gènes constants sont composés d'une série d'exons dont chacun va coder pour un domaine séparé, une région charnière ou une région terminale. Au cours du développement des LB et en réponse à une stimulation antigénique et à la réception de signaux cytokiniques émis par les LT, la recombinaison entre la région C $\mu$  et une autre région C va s'activer. Cette recombinaison se réalise sans altération de la séquence de la région variable et est accompagnée de la perte de segments d'ADN au niveau des gènes constants (Figure 8) (Honjo, 1983; Schroeder and Cavacini, 2010). Chaque isotype possède différentes propriétés telles que la taille, la fixation au complément, la liaison aux récepteurs au fragment Fc (FcR) et la réponse à l'Ag. Le choix de l'isotype dépendra de l'Ag et des voies de signalisation activées (Schroeder and Cavacini, 2010).

Isotype	% dans le Sérum	Structure	Fixation du complément	Opsonisation	Fixation aux récepteurs de la partie Fc
IgG	75	Monomère	+	+++	Fc $\gamma$ R
IgG1	67% des IgG	Monomère	Oui	Oui	I, II, III
IgG2	22% des IgG	Monomère	Oui	Oui	II
IgG3	7% des IgG	Monomère	Oui	Oui	I, II, III
IgG4	4% des IgG	Monomère	Non	Non	I, II
IgM	10	Pentamère	+++	+	
IgA	15	Monomère, dimère	-	-	Fc $\alpha$ R
IgD	<0,5	Monomère	-	-	Fc $\delta$ R
IgE	<0,01	Monomère	-	-	Fc $\epsilon$ R I, II

Tableau 1 : Propriétés des isotypes et des sous-classes d'immunoglobulines

D'après Schroeder and Cavacini, 2010.

- Les IgM

Les IgM sont les premiers Ac produits durant une réponse immune. Elles sont divisées en deux catégories appelées IgM naturelles et immunes (Ehrenstein and Notley, 2010). La désignation d'Ac naturels est donnée aux Ac circulants chez un individu sain qui ont été produits en l'absence de stimulation antigénique spécifique. Ces IgM sont polyréactives mais possèdent une faible affinité pour un large éventail d'Ag (Coutinho *et al.*, 1995). Cette faible affinité est compensée en partie par le fait que les IgM sont sécrétées sous forme pentamérique. Cette structure multimérique leur permet d'augmenter leur avidité et d'activer

de façon forte le complément (Boes, 2000). Les IgM immunes, quant à elles, sont sécrétées à la suite d'une exposition avec un pathogène et sont Ag-spécifiques (Ehrenstein and Notley, 2010). Les IgM fonctionnent en opsonisant l'Ag afin d'entraîner son élimination et de permettre la fixation du complément (Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgD

Les IgD circulantes sont présentes en très faible quantité dans le sérum et possèdent une demi-vie faible du fait de la sensibilité de la molécule à la protéolyse, notamment au niveau de sa région charnière (Schroeder and Cavacini, 2010). Elles se lient aux basophiles, aux mastocytes, aux monocytes, aux neutrophiles et aux DCs myéloïdes *via* le récepteur Fc $\delta$ R présent à la surface de ces cellules (Chen and Cerutti, 2011). Les cellules vont alors induire la production de facteurs antimicrobiens, inflammatoires et stimulateurs des LB, ce qui contribue à la surveillance immune (Chen and Cerutti, 2010).

- Les IgA

Les IgA sont présentes à faible concentration et sous forme de monomère dans le plasma, le liquide cébrospinal et les fluides intestinaux. Néanmoins, les IgA sont majoritairement présentes sous formes dimériques appelées IgA sécrétoires (Woof and Mestecky, 2005). Les IgA sécrétoires ont une forme moléculaire différente des IgA présentes dans la circulation ou dans les tissus et évoluent dans les environnements séparant l'intérieur du corps du monde extérieur riche en *stimuli* antigéniques telles que les muqueuses (Corthésy, 2013). Ces dimères sont formés par la liaison de deux monomères d'IgA *via* une chaîne appelée chaîne J qui n'est retrouvée que dans les Ig polymériques telles que les IgM et les IgA (Koshland, 1985).

Chez l'homme, il existe deux sous-classes d'IgA appelées IgA1 et IgA2 qui sont issus de deux gènes différents. La différence majeure entre les deux sous-classes se situe dans la région charnière qui est plus importante chez les IgA1, ce qui les rend sensible à la dégradation par les protéases (Schroeder and Cavacini, 2010; Woof and Kerr, 2006). Les IgA2, protégées de la digestion par les protéases, sont ainsi la sous-classe majoritaire dans les sécrétions muqueuses alors que 90% des IgA sériques sont des IgA1 (Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgE

Les IgE sont l'isotype d'Ig qui possède la plus faible abondance *in vivo* et ses taux sont étroitement régulés. De plus, c'est également l'isotype avec la plus faible demi-vie (Wu and Zarrin, 2014). Néanmoins, il s'agit d'une Ig importante qui est associée aux réponses contre les parasites de type helminthes ainsi qu'aux réactions d'hypersensibilité et d'allergie (Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgG

Les IgG sont l'isotype le plus fréquent d'Ig. De plus, il s'agit de l'une des protéines les plus abondantes dans le sérum humain. Cet isotype peut être subdivisé en quatre sous-classes possédant une homologie de séquence de plus de 90% et qui sont numérotées en fonction du classement de leurs taux sériques : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (Konecny, 2018; Vidarsson *et al.*, 2014). Il existe néanmoins de profondes différences entre ces sous-classes. En effet, chacune d'entre elles possède un profil unique concernant la fixation à l'Ag, la formation de complexes immuns, l'activation du complément, l'activation des cellules effectrices ainsi que le transport placentaire (Rispen and Vidarsson, 2014). Ces différences sont principalement situées dans la région constante de la chaîne lourde (principalement en CH1 et CH3) (Schroeder and Cavacini, 2010).

### C. Les sous-classes d'immunoglobulines G

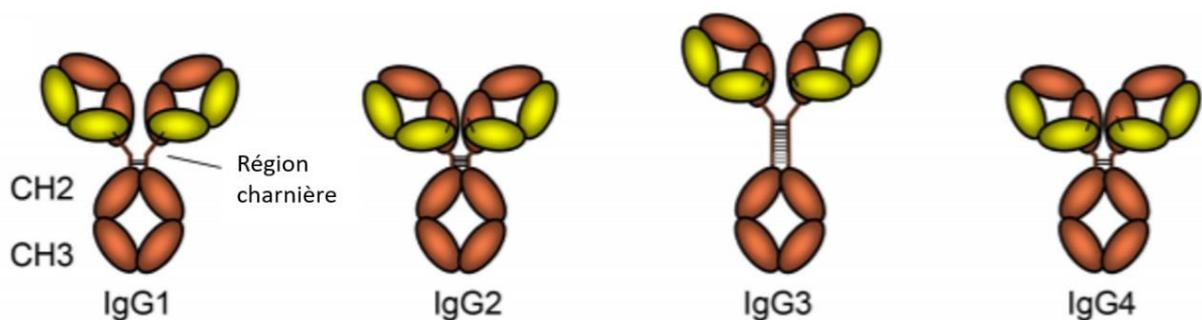


Figure 11 : Représentation schématique des différentes sous-classes d'immunoglobuline G

Les sous-classes d'immunoglobuline G (IgG) possèdent des différences structurales situées au niveau des zones de liaison entre les chaînes lourdes et légères, de la longueur de la région charnière et du nombre de ponts disulfures reliant les deux chaînes lourdes.

D'après Vidarsson et al., 2014.

- Les IgG1

Les réponses Ac contre un Ag induisent principalement la production d'IgG1. Par conséquent, en condition physiologique, les IgG1 sont la sous-classe la plus abondante dans le sérum (Vidarsson *et al.*, 2014). Les IgG1 sont assez flexibles au niveau de leur région charnière (Roux *et al.*, 1997) (Figure 11). De plus, elles fixent relativement bien le complément puisqu'il s'agit de la deuxième sous-classe la plus affine pour la molécule C1q. Les IgG1 se lient aux trois classes de récepteurs FcγR : FcγRI, FcγRII et FcγRIII. Pour finir, cette sous-classe est généralement induite en réponse à des Ag de type protéique (Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgG2

Les réponses IgG contre les Ag de type polysaccharidique bactérien sont presque entièrement restreintes aux IgG2 (Vidarsson *et al.*, 2014). Les IgG2 sont le sous-type d'IgG dont la région charnière est la moins flexible (Roux *et al.*, 1997) (Figure 11) et qui fixent le moins bien le complément. De plus, cette sous-classe ne se fixe qu'aux récepteurs FcγRII (Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgG3

Les IgG3 sont généralement induites suite à la reconnaissance d'Ag de nature protéique (Schroeder and Cavacini, 2010). Ils possèdent une demi-vie courte et sont particulièrement efficaces dans l'induction des fonctions effectrices (Vidarsson *et al.*, 2014). Les IgG3 sont la sous-classe d'IgG la plus flexible du fait de la longueur de leur région charnière (Figure 11) et celle qui fixe le mieux le complément. Ils vont également fixer les trois classes de FcγR (Roux *et al.*, 1997; Schroeder and Cavacini, 2010).

- Les IgG4

Les IgG4 sont la sous-classe d'IgG la moins représentée dans le sérum en situation physiologique (5% des IgG) (Koneczny, 2018). Elles sont souvent produites après une exposition répétée ou de longue durée à un Ag sans infection (Vidarsson *et al.*, 2014). Cette sous-classe est généralement induite en réponse à des Ag de nature polysaccharidique ou dans le cas de MAI à aAc telles que le purpura thrombocytopénique thrombotique ou le pemphigus (Koneczny, 2018; Schroeder and Cavacini, 2010). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous porterons un intérêt particulier à cette sous-classe.

Les IgG4 ont une région charnière relativement flexible (Figure 11). Elles vont venir fixer les récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII et sont la seule sous-classe d'IgG à ne pas fixer le complément (Roux *et al.*, 1997; Schroeder and Cavacini, 2010). Ce phénomène est dû à un changement en acide aminé d'une proline en sérine en position 331 dans la région CH2 par rapport aux trois autres sous-classes (Lu *et al.*, 2007). Il existe d'autres différences entre les IgG1 et les IgG4 qui vont influencer sur les fonctions effectrices des IgG4 comme le changement en acide aminé d'une leucine en phénylalanine en position 234 dans la région CH2 qui est essentielle pour la liaison aux Fc $\gamma$ R (Tao *et al.*, 1993). Ainsi, les IgG4 possèdent une affinité plus faible pour le récepteur Fc $\gamma$ RI (Canfield and Morrison, 1991). De plus, la présence d'une sérine en position 228 de la chaîne lourde des IgG4 rend leur région charnière plus flexible, permettant la formation de ponts disulfures au sein de la même chaîne lourde plutôt qu'entre les deux chaînes lourdes (Figure 12A) (Schuurman *et al.*, 2001). Cela permet l'apparition d'un phénomène nommé *Fab-Arm Exchange* où des chaînes lourdes de différentes IgG4 vont se dissocier l'une de l'autre et se recombiner entre elles en condition réductrice (Figure 12B) (Davies *et al.*, 2013; Koneczny *et al.*, 2017). Les Ac résultant de ce phénomène sont bispécifiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent fixer deux Ag différents au lieu de deux Ag du même type. Ce phénomène semble se produire de façon spontanée chez l'Homme en condition physiologique puisque d'après certaines études plus de 99% des IgG4 humaines seraient bispécifiques (Koneczny, 2018). Le processus *Fab-Arm Exchange* engendre également des Ac hybrides pour leur chaîne légère. Ainsi, en condition physiologique, entre 21 et 33% des IgG4 sont des hybrides  $\kappa/\lambda$  (Figure 12C) (Young *et al.*, 2014).

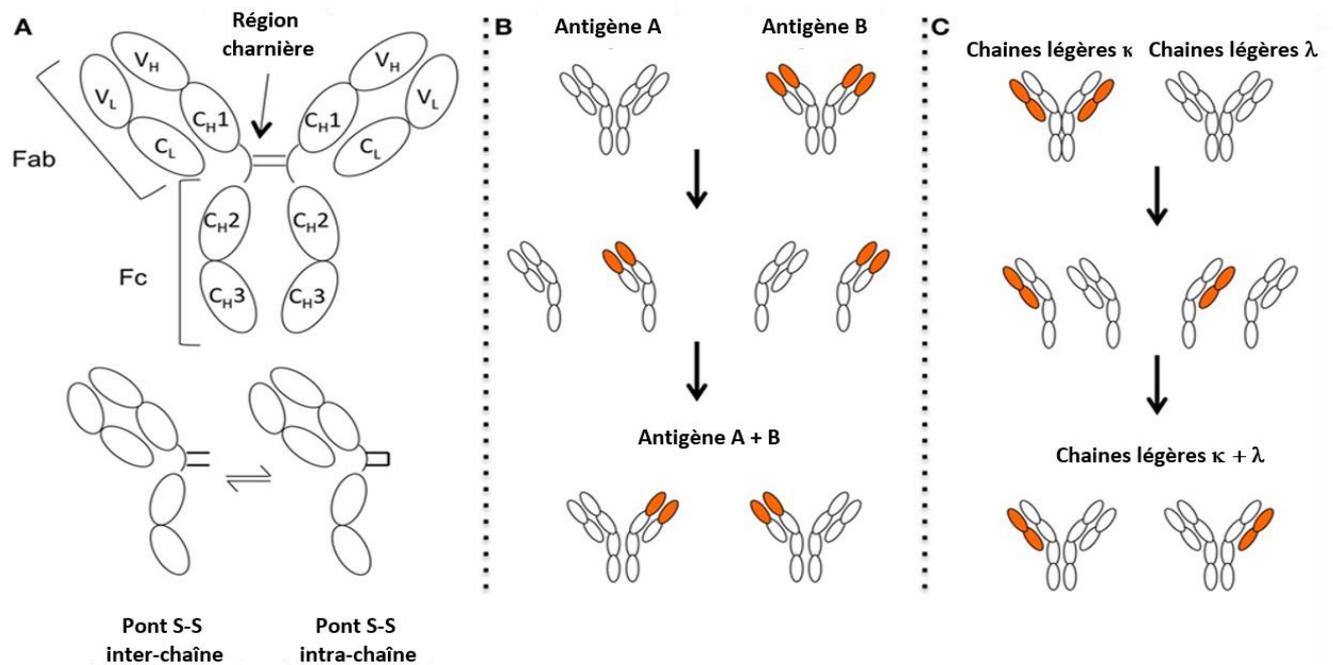


Figure 12 : Structure des immunoglobulines G4

A. Grâce à la mutation P228S, les immunoglobulines G4 (IgG4) possèdent une meilleure flexibilité stéréométrique qui leur permet de former des ponts disulfures au sein de la même chaîne lourde (ponts disulfures intra-chaînes) plutôt qu'entre les deux chaînes lourdes de la région, les ponts disulfures inter-chaînes). B. Avec la réduction des interactions non-covalentes entre les chaînes lourdes de la région, les deux demi-anticorps peuvent se dissocier et se recombinaient avec les autres demi-anticorps générés dans un processus appelé Fragment antigen-binding-Arm Exchange. C. Les IgG4 peuvent arborer, grâce au Fragment antigen-binding-Arm Exchange, à la fois une chaîne légère  $\kappa$  et une chaîne légère  $\lambda$ .

D'après Koneczny, 2018.

Les IgG4 sont connues comme jouant un rôle protecteur notamment dans les modèles d'exposition chronique à un allergène (Trampert *et al.*, 2018). Lors des réponses immunes de type allergique, les LTh2 sont responsables *via* la production d'IL-4 et d'IL-13 d'induire la sécrétion des IgE et des IgG4 par les LB (Meiler *et al.*, 2008). De plus, la présence d'IL-10 par les LTreg entraîne une diminution de la commutation isotypique vers les IgE et une augmentation de la production d'IgG4. Les IgG4 semblent avoir un effet protecteur contre les Ac des autres sous-classes d'IgG *via* un phénomène de compétition pour l'Ag alors qu'ils n'exercent aucune fonction effectrice (Koneczny, 2018).

#### D. Les fonctions effectrices des immunoglobulines G

Une des fonctions effectrices clé des Ac est la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) qui se met en place lorsque la molécule du complément C1q se lie avec le domaine Fc de l'Ac (Schroeder and Cavacini, 2010). Le mécanisme d'action du complément ayant déjà été commenté dans la partie immunité innée (cf. partie I.1.B), nous n'y reviendrons pas dans cette

partie.

Une autre fonction effectrice médiée par les Ac est la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Schroeder and Cavacini, 2010). L'ADCC est induite lorsque les Fc $\gamma$ R présents sur les cellules effectrices innées telles que les cellules NK sont engagés par le domaine Fc de l'Ac lié à sa cible (Ag tumoraux, viraux ou bactériens) (van Erp *et al.*, 2019; Gómez Román *et al.*, 2014). Cette interaction va mener à la libération de granules cytotoxiques contenant des perforines et des granzymes qui vont entraîner la mort de la cellule infectée (van Erp *et al.*, 2019). Ces récepteurs sont exprimés à des degrés différents sur de nombreuses cellules hématopoïétiques et sur d'autres cellules comme les cellules endothéliales. En revanche, ils ne sont pas exprimés par les LT (Schroeder and Cavacini, 2010).

Il existe trois classes de Fc $\gamma$ R chez l'Homme : les Fc $\gamma$ RI (CD64), les Fc $\gamma$ RII (CD32) et les Fc $\gamma$ RIII (CD16) (Burton and Woof, 1992; Nimmerjahn and Ravetch, 2006) (Figure 13). Les récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII possèdent chacun deux isoformes appelées A et B (Schroeder and Cavacini, 2010). Ces récepteurs sont connus pour induire de nombreuses fonctions protectrices contre les agents infectieux (Burton and Woof, 1992). Chaque classe de récepteurs va posséder sa propre affinité pour les Ac. Les Fc $\gamma$ RI sont très affins pour la partie constante des Ac mais possèdent une spécificité restreinte à l'isotype tandis que les récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII possèdent une affinité plus faible pour la région Fc des IgG mais vont fixer plus d'isotypes (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Les récepteurs Fc $\gamma$ RI sont les seuls récepteurs à fixer les IgG monomériques tandis que les récepteurs Fc $\gamma$ RII sont spécifiques des complexes d'IgG1 et d'IgG3 (Burton and Woof, 1992). Ces récepteurs vont posséder différentes fonctions protectrices contre les pathogènes qui ont été reconnu par des Ac. En effet, ces récepteurs peuvent induire la phagocytose, l'ADCC et l'explosion oxydative c'est-à-dire une libération de dérivés réactifs de l'oxygène (Burton and Woof, 1992).

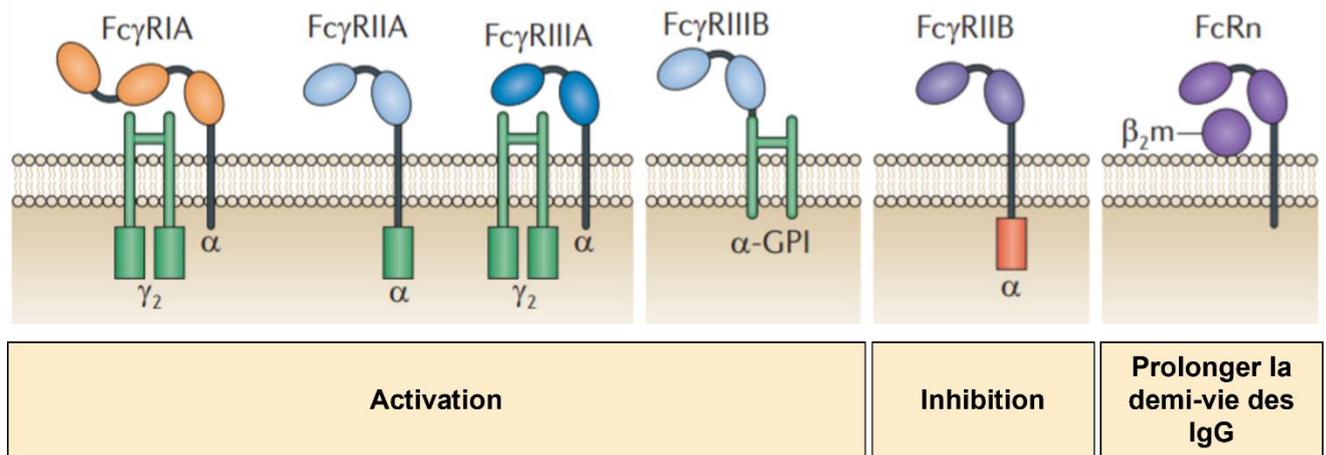


Figure 13 : Représentation schématique des récepteurs au fragment Fc gamma

Il existe trois classes de récepteurs au fragment Fc gamma ( $Fc\gamma R$ ) chez l'Homme : les  $Fc\gamma RI$  (CD64), les  $Fc\gamma RII$  (CD32) et les  $Fc\gamma RIII$  (CD16). Les récepteurs  $Fc\gamma RII$  et  $Fc\gamma RIII$  possèdent chacun deux isoformes appelées A et B. Les  $Fc\gamma R$  peuvent également être classés en deux catégories : les récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs. Le seul récepteur inhibiteur chez l'Homme est le  $Fc\gamma RIIB$ . Les autres récepteurs, à l'exception du récepteur  $Fc\gamma RIIB$  qui est ancré à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol ( $\alpha$ -GPI), activent des voies de signalisation via leurs régions cytoplasmiques. Il existe un autre type de récepteur qui participe à l'immunité innée appelé récepteur Fc néonatal ( $FcRn$ ). Ce récepteur permet de prolonger la demi-vie des IgG dans le sérum en les protégeant de la dégradation lysosomale.  $\alpha$ -GPI = glycosylphosphatidylinositol,  $\beta_2$ -m =  $\beta_2$ -microglobuline,  $Fc\gamma R$  = récepteurs au fragment Fc gamma.

D'après Schwab and Nimmerjahn, 2013.

Les  $Fc\gamma R$  peuvent également être classés en deux catégories : les récepteurs activateurs exprimant des motifs ITAM et des récepteurs inhibiteurs présentant des motifs appelés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) dans leur séquence d'acides aminés (Ravetch and Lanier, 2000). Le seul récepteur inhibiteur chez l'Homme est le  $Fc\gamma RIIB$ . Les autres récepteurs, à l'exception de  $Fc\gamma RIIB$  qui est ancré à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol, activent des voies de signalisation à travers les ITAM contenus dans leurs régions cytoplasmiques (Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

Il existe un autre type de récepteur qui participe à l'immunité innée appelé récepteur Fc néonatal ( $FcRn$ ) (Schroeder and Cavacini, 2010). Ce récepteur permet de prolonger la demi-vie des IgG dans le sérum en les protégeant de la dégradation lysosomale (Figure 14) (Martins *et al.*, 2016; Roopenian and Akilesh, 2007). Ce mécanisme se fait *via* un changement de pH au sein des endosomes acides (Oganesyan *et al.*, 2014). Dans la plupart des types cellulaires, les  $FcRn$  sont retrouvés dans des vésicules intracellulaires telles que les endosomes précoces et de recyclage ou des tubules de tri (Sokolosky and Szoka, 2015). Son expression à la surface des cellules est limitée. Le pH faible présent à l'intérieur des endosomes entraîne la formation

de complexes FcRn/ligand qui seront soit recyclés soit dégradés. Lorsque les complexes sont exportés à la surface par transcytose, le pH physiologique entraîne la libération du ligand du FcRn. En revanche, les protéines qui ne se fixent pas au FcRn subiront une dégradation protéolytique (Martins *et al.*, 2016). Néanmoins, les FcRn sont saturables et une fois que le taux d'IgG a atteint un seuil, elles sont dégradées par les lysosomes (Schroeder and Cavacini, 2010).

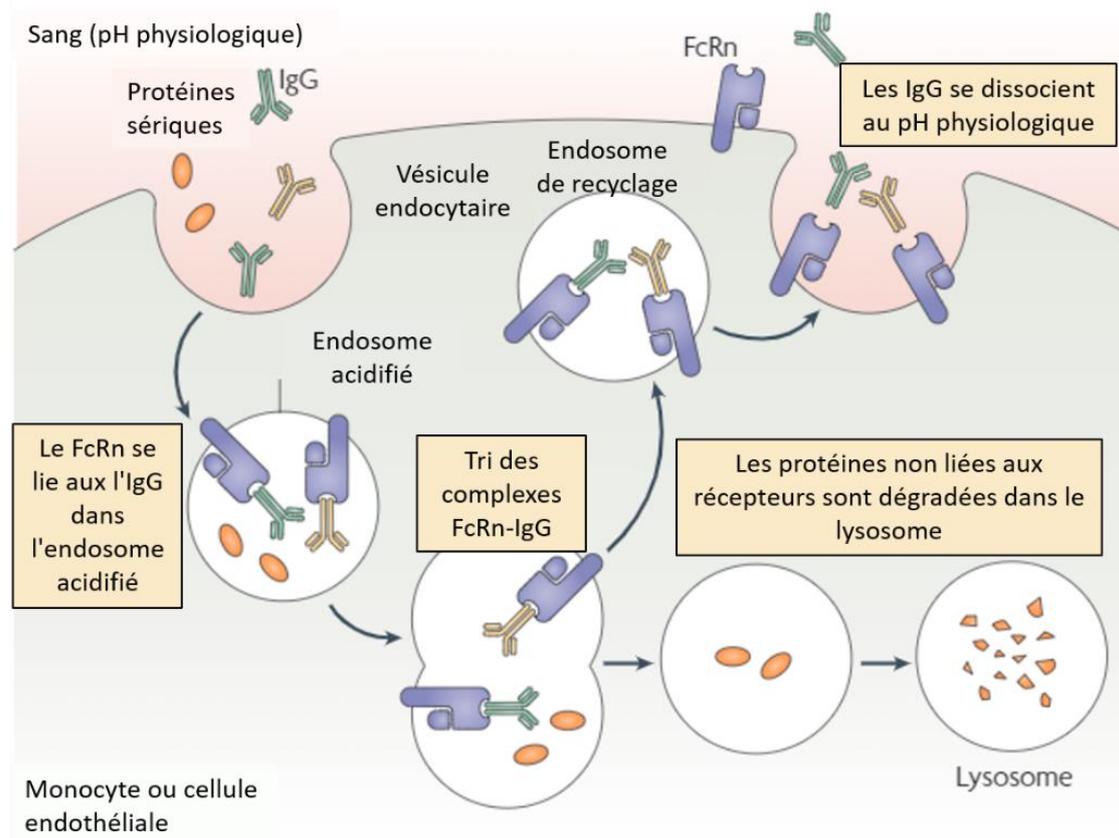


Figure 14 : Représentation schématique du recyclage des immunoglobulines G par le récepteur Fc néonatal

Les protéines sériques dont les immunoglobulines G (IgG) subissent la dégradation lysosomale. Le pH faible présent à l'intérieur des endosomes entraîne la formation de complexes FcRn/IgG qui seront soit recyclés soit dégradés. Lorsque les complexes sont exportés à la surface par transcytose, le pH physiologique entraîne la libération des IgG. Les protéines qui ne se fixent pas au FcRn subiront une dégradation protéolytique.

D'après Roopenian and Akilesh, 2007.

### E. Les anticorps dans le pemphigus

Il a été démontré que le phénotype clinique du pemphigus était associé au profil d'aAc anti-DSG (Amagai *et al.*, 1999). Les aAc du pemphigus sont pathogéniques, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire seuls la maladie. Cela a été confirmé par des expériences de transfert passif chez la souris et l'observation de pemphigus néonataux chez des nouveaux nés dont les

mères étaient atteintes de pemphigus (Anhalt *et al.*, 1982; Kardos *et al.*, 2009). Les aAc anti-DSG3 sont principalement d'isotype IgG avec une pré-dominance en IgG4 (Funakoshi *et al.*, 2012). Comme détaillé précédemment, cette sous-classe d'IgG possède des caractéristiques structurelles et fonctionnelles suggérant des effets anti-inflammatoires et l'induction de tolérance (Trampert *et al.*, 2018). Les IgG4 vont donc induire la pathogénicité *via* d'autres mécanismes que les fonctions effectrices. Il a été démontré que les aAc anti-DSG3 inhibaient la trans-interaction entre les DSG3 notamment en induisant le regroupement de DSG3 à la surface des cellules menant à une endocytose de la protéine (Heupel *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2012). De plus, grâce à l'action directe de cette pathogénicité, des tests de pathogénicité des Ac *in vitro* ont pu être développés (Ishii *et al.*, 2005).

## V. La N-glycosylation des anticorps

La glycosylation est une modification post-traductionnelle ubiquitaire des protéines. Les structures de glycanes possèdent de nombreux rôles biologiques et physiologiques tels que le repliement et le contrôle qualité des protéines (Moremen *et al.*, 2012). Il existe deux types de glycosylation : la N-glycosylation et la O-glycosylation (Figure 15). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à la N-glycosylation qui est la glycosylation principale des Ac (Gudelj *et al.*, 2018a). De nombreuses études ont démontré l'implication de la N-glycosylation des Ac dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique ou la sclérose en plaques (Seeling *et al.*, 2017). Néanmoins, aucune étude n'a analysé l'implication de la N-glycosylation des Ac dans le pemphigus, bien qu'étant une MAI médiée par les aAc.

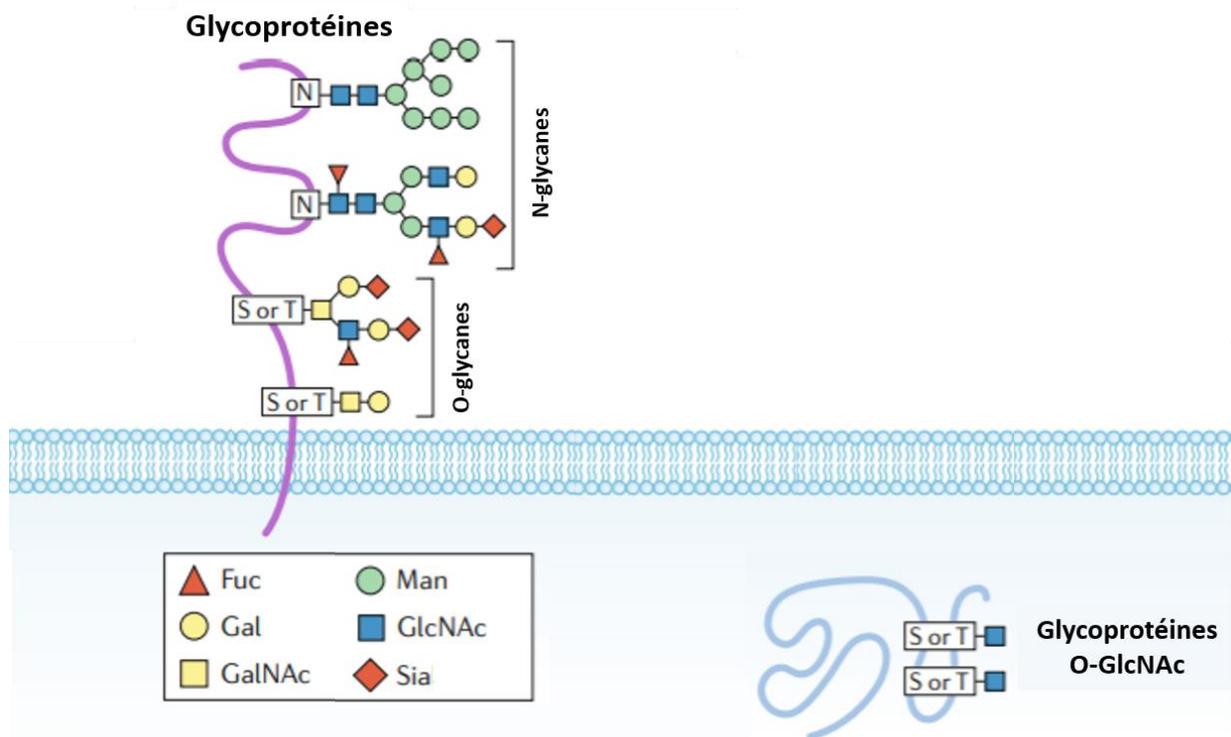


Figure 15 : Représentation schématique de la O-glycosylation et de la N-glycosylation de glycoprotéines humaines

Les glycanes peuvent être liés de façon covalente aux protéines et aux lipides. Les N-glycane et O-glycane sont des glycanes où les chaînes glycaniques sont liées soit à un atome d'azote soit à un atome d'oxygène sur des acides aminés spécifiques de la protéine. Les N-glycane sont attachés à une asparagine via l'atome d'azote situé dans le groupement amine-terminal de l'acide aminé. Cette asparagine est située au niveau d'un motif consensus de N-glycosylation Asparagine-X-sérine/thréonine/cystéine (où le X peut être n'importe quel acide aminé excepté une proline). Ces structures de type N-glycane complexes sont composées d'un core glycanique contenant deux résidus GlcNAc et trois mannoses. Les O-glycane sont des structures oligosaccharidiques qui vont s'attacher à un atome d'oxygène du groupe hydroxyle-terminal d'une sérine ou d'une thréonine. S = Sérine, T = Thréonine, N = Asparagine, Fuc = Fucose, Gal = Galactose, GalNAc = N-acétylgalactosamine, Man = Mannose, GlcNAc = N-acétylglucosamine, Sia = acide sialique.

D'après Reily et al., 2019.

## 1. Définition de la N-glycosylation

La N-glycosylation correspond à l'addition d'une structure oligosaccharidique sur une protéine par une liaison N-osidique de type  $\beta$  à l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une asparagine (Asn) venant du site consensus Asn-X-sérine/thréonine/cystéine où X peut être n'importe quel acide aminé excepté une proline (Moremen *et al.*, 2012; Reily *et al.*, 2019; Stanley *et al.*, 2015). Environ 70% des protéines sécrétées ou membranaires présentes chez les eucaryotes possèdent ce site consensus et 70% de ces sites portent un N-glycane (Stanley *et al.*, 2015).

La N-glycosylation commence sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique par la formation d'un précurseur oligosaccharidique qui est lié à un phosphate de dolichol (Dol-P :

*Dolichol-phosphate*; acide gras présent dans la membrane du réticulum endoplasmique) (Reily *et al.*, 2019). Ce précurseur oligosaccharidique est synthétisé par l'addition successive de 2 résidus *N*-acétylglucosamines (GlcNAc) et 5 résidus mannoses (Man) aboutissant à une structure intermédiaire de type  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (Schwarz and Aebi, 2011). Le précurseur est ensuite retourné afin de faire face à la lumière du réticulum endoplasmique (Reily *et al.*, 2019). Puis, ce précurseur oligosaccharidique est prolongé dans la lumière du réticulum endoplasmique par l'addition successive de 4 résidus mannoses et de 3 résidus glucoses (Glc) jusqu'à atteindre, dans les cellules de mammifère, la structure finale de type  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Figure 16) (Schwarz and Aebi, 2011). Une fois l'oligosaccharide complètement assemblé sur l'ancre lipidique Dol-P, il est transféré en bloc sur l'Asn du site consensus des protéines durant leur translocation dans le réticulum endoplasmique (Stanley *et al.*, 2015). La glycoprotéine ainsi formée va ensuite subir différentes modifications dans le réticulum endoplasmique impliquant une élimination des résidus glucoses par des  $\alpha$ -glucosidases ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) dans le cadre du processus de contrôle qualité. Une fois modifiée, la glycoprotéine va sortir du réticulum endoplasmique et entrer dans l'appareil de Golgi, organe dans lequel les *N*-glycanes vont être maturés séquentiellement lors du passage de la glycoprotéine dans les différentes saccules golgiennes (Reily *et al.*, 2019). Dans les saccules *cis* de l'appareil de Golgi, les *N*-glycanes présents seront découpés dans un premier temps par des  $\alpha$ -mannosidases I afin de réduire le nombre de mannoses ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) avant que la glycoprotéine soit transférée dans le *medial*-Golgi. Une fois dans le *medial*-Golgi, la synthèse des *N*-glycanes hybrides et complexes s'initie par l'action d'une *N*-acétylglucosaminyltransférase appelée GlcNAc-TI qui va ajouter un résidu GlcNAc au précurseur oligosaccharidique ( $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ). La maturation des *N*-glycanes continue par l'action des  $\alpha$ -mannosidases II qui vont retirer deux résidus mannoses supplémentaires ( $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ). Une fois cette étape réalisée, un second résidu GlcNAc est ajouté au *core* des *N*-glycanes *via* l'action de la GlcNAc-TII. Le *core* final des *N*-glycanes possède une structure de type  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Les *N*-glycanes complexes et hybrides peuvent également posséder une GlcNAc bissectrice qui sera fixé au *core* *via* la GlcNAc-TIII. D'autres ajouts de sucre au *core* du *N*-glycane vont permettre d'augmenter la diversité des *N*-glycanes présents sur les IgG tels que l'ajout d'un fucose au *core* par une fucosyltransférase, l'ajout de galactoses aux GlcNAc du *core* par une galactosyltransférase et l'ajout d'acides sialiques aux galactoses par une sialyltransférase (Stanley *et al.*, 2015). Ces ajouts de sucres déterminent si

la structure finale est classifiée en *N*-glycane oligomannosidique riche en mannose, *N*-glycane hybride ou *N*-glycane complexe (Figure 16). La composition finale d'un *N*-glycane est affectée par les niveaux d'expression des glycosyltransférases, l'accessibilité des sites de *N*-glycosylation de la glycoprotéine et la durée durant laquelle la protéine reste dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. (Reily *et al.*, 2019).

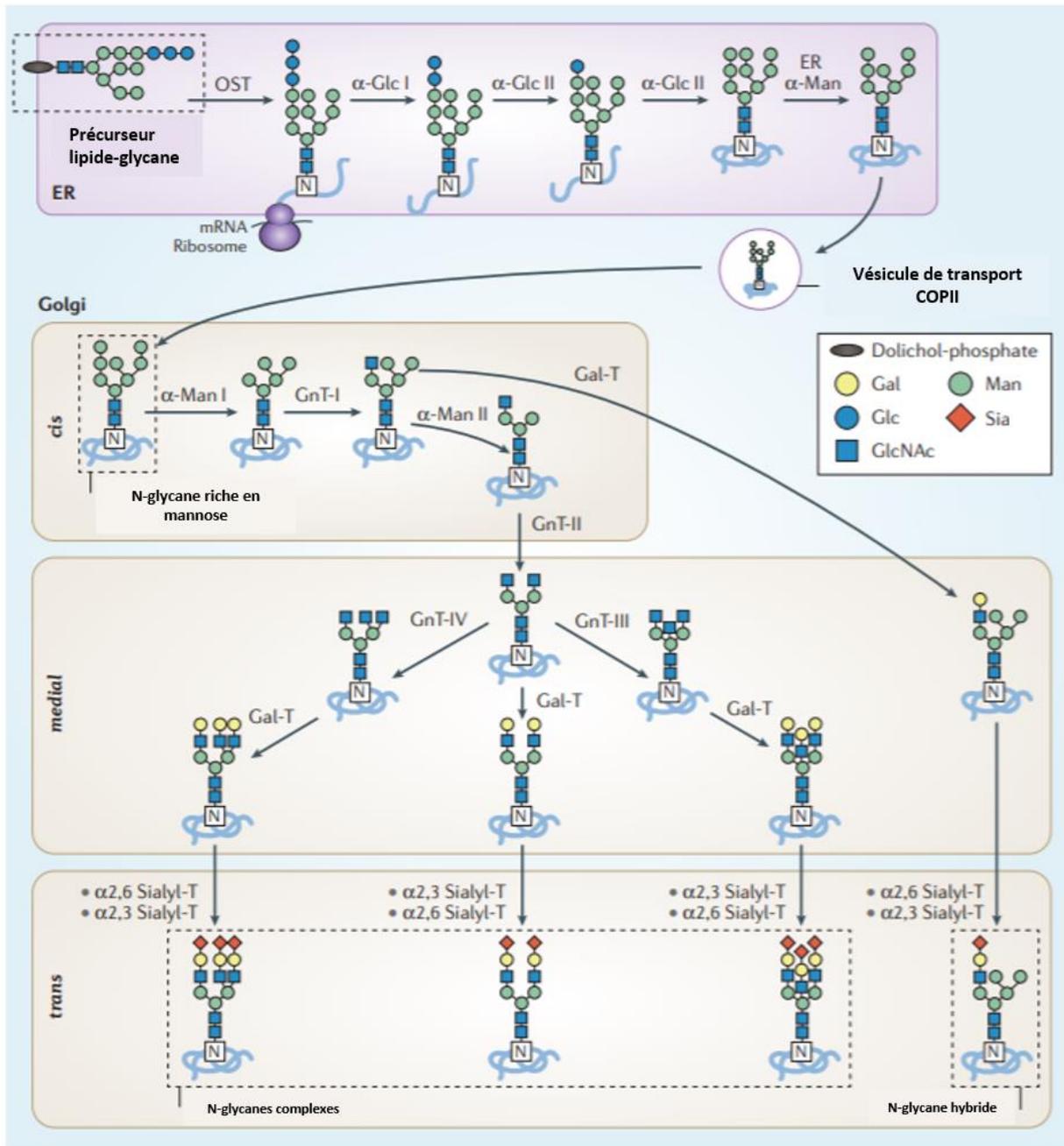


Figure 16 : Biosynthèse des N-glycanes dans la voie sécrétrice

Une fois dans la lumière du réticulum endoplasmique, le précurseur oligosaccharidique ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) qui est lié à une ancre lipidique de type phosphate de dolichol est transféré en bloc par l'oligosaccharyltransférase sur une asparagine du site consensus des protéines sécrétées ou membranaires durant leur translocation dans le réticulum endoplasmique. Le précurseur oligosaccharidique va ensuite subir une élimination des résidus glucoses par des  $\alpha$ -glucosidases ( $\alpha$ -Glc I et II) dans le cadre du

processus de contrôle qualité ( $Man_9GlcNAc_2$ ). La glycoprotéine va alors sortir du réticulum endoplasmique et rentrer dans l'appareil de Golgi, organe dans lequel les N-glycanes vont être maturés séquentiellement lors du passage de la glycoprotéine dans les différents saccules golgiennes. Dans les saccules cis de l'appareil de Golgi, les N-glycanes seront découpés par des  $\alpha$ -mannosidases I afin de réduire le nombre de mannoses ( $Man_5GlcNAc_2$ ). La glycoprotéine est ensuite transférée dans le medial-Golgi où la synthèse des N-glycanes hybrides et complexes s'initie par l'action d'une N-acétylglucosaminyltransférase appelée GlcNAc-TI qui va ajouter un résidu GlcNAc au précurseur oligosaccharidique ( $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ ). La maturation des N-glycanes continue par l'action des  $\alpha$ -mannosidases II qui va retirer deux résidus mannoses supplémentaires ( $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ ). Une fois cette étape réalisée, un second résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) est ajouté au core des N-glycanes via l'action de la GlcNAc-TII ( $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ ). Les glycanes complexes et hybrides peuvent également posséder une GlcNAc bissectrice qui sera fixé au core via la GlcNAc-TIII. D'autres ajouts de sucre au core du N-glycane vont permettre d'augmenter la diversité des N-glycanes présentes sur les IgG tels que l'ajout d'un fucose au core par une fucosyltransférase, l'ajout de galactose aux GlcNAc du core par une galactosyltransférase (Gal-T) et l'ajout d'acide sialique au galactose par une sialyltransférase (Sialyl-T). Ces ajouts de sucres déterminent si la structure finale est classifiée en N-glycane oligomannosidique riche en mannose, N-glycane hybride ou N-glycane complexe.  $\alpha$ -Glc =  $\alpha$ -glucosidases ;  $\alpha$ -Man =  $\alpha$ -mannosidases ; ER= réticulum endoplasmique ; Gal = galactose ; Gal-T = galactosyltransférase ; Glc = glucose ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; GnT = N-acétylglucosaminyltransférase ; Man = mannose ; N= asparagine ; OST = oligosaccharyltransférase ; Sia = acide sialique ; Sialyl-T = sialyltransférase.

D'après Reily et al., 2019.

La formation des N-glycanes complexes dépend de l'action de nombreuses glycosidases et glycosyltransférases qui sont exprimées différemment selon le type cellulaire et l'état physiologique de la cellule. Ainsi, une glycoprotéine mature portera des N-glycanes différents suivant le type et l'état physiologique de la cellule dans lequel elle a été synthétisée (Stanley et al., 2015).

## 2. Les sites de N-glycosylation de la partie Fc des anticorps

Comme évoqué précédemment, les Ig sont des glycoprotéines, c'est-à-dire qu'elles possèdent des glycanes liés à leurs chaînes protéiques. Le nombre de sites de N-glycosylation dépend de l'isotype comme décrit dans le Tableau 2 et la Figure 17 (Schroeder and Cavacini, 2010).

Isotype	Nombre de sites de N-glycosylation	Localisation des sites de N-glycosylation
IgD	3	Asn354 (CH2) Asn445 (CH3) Asn496 (CH3)
IgM	5	Asn171 (CH1) Asn332 (CH2) Asn395 (CH2) Asn402 (CH2)

		Asn563 (CH3)
IgG	1	Asn297 (CH2)
IgA1	2	Asn 263 (CH2) Asn459 (CH3)
IgA2	5	Asn166 (CH1) Asn211 (CH1) Asn263 (CH2) Asn337 (CH2) Asn 459 (CH3)
IgE	7	Asn140 (CH1) Asn168 (CH1) Asn218(CH1) Asn265 (CH2) Asn371 (CH3) Asn383 (CH3) Asn394 (CH3)

*Tableau 2 : Les sites de N-glycosylation des isotypes d'immunoglobulines*

*Chaque isotype d'immunoglobuline possède un nombre et une localisation différents des sites de N-glycosylation sur sa partie constante.*

*D'après Arnold et al., 2007.*

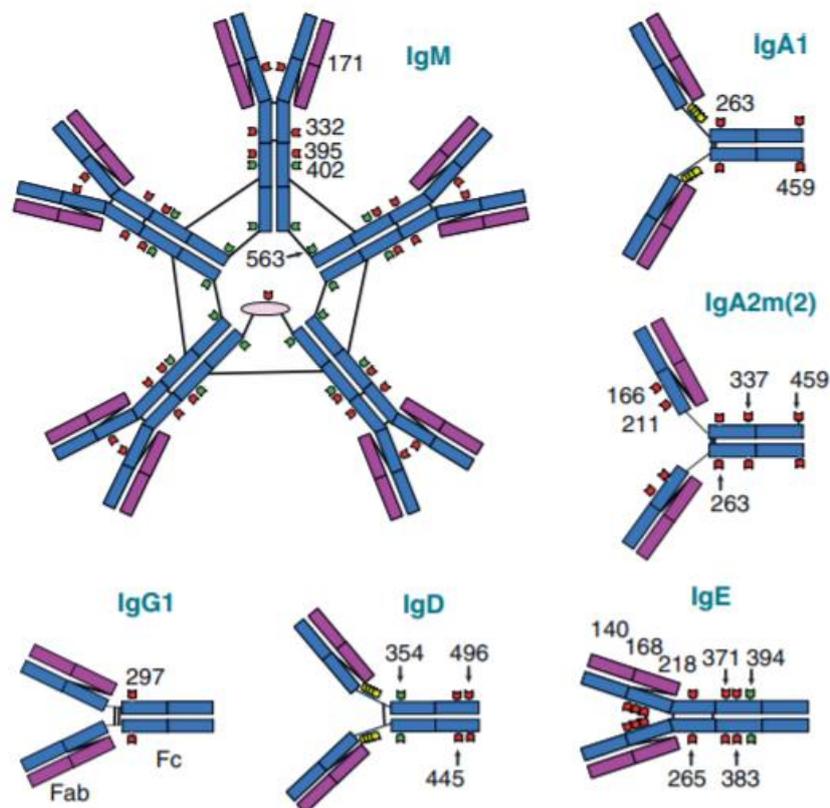


Figure 17 : Représentation schématique des sites de glycosylation en fonction des isotypes d'immunoglobuline

Les immunoglobulines (Ig) M, IgA1, IgA2m(2), IgG1, IgD et IgE sont représentées sous forme schématique où les chaînes légères sont en violet, les chaînes lourdes sont en bleu, les ponts disulfures sont en noir. Les sites de N-glycosylation sont représentés en rouge pour les N-glycanes complexes et en vert pour les N-glycanes oligomannosidiques. Les sites de O-glycosylation présents sur la région charnière sont représentés en jaune.

D'après Arnold et al., 2007.

Pour la suite de cette introduction, nous nous focaliserons uniquement sur la N-glycosylation des IgG, l'isotype principalement impliqué dans les MAI.

### 3. La N-glycosylation des IgG en condition physiologique

#### A. La N-glycosylation de la partie Fc

Les IgG ne possèdent qu'un seul site de N-glycosylation sur leur partie Fc situé sur l'Asn297. Les N-glycanes présents sur la partie Fc influencent la stabilité, la conformation ainsi que les fonctions effectrices de la molécule d'IgG (Gudelj *et al.*, 2018a). La stabilité de l'IgG est dépendante de la présence de N-glycanes puisque la position de ce dernier permet de stabiliser la structure de l'Ig en interagissant avec la poche hydrophobe du domaine Fc (Liu *et al.*, 2006; Schroeder and Cavacini, 2010). Les N-glycanes sont positionnés au niveau d'une

cavité formée par les chaînes polypeptidiques des deux domaines CH2 de l'Ac (Gudelj *et al.*, 2018a). L'analyse cristallographique de la partie Fc des IgG a démontré que le N-glycane est dirigé vers la région d'interface entre le CH2 et le CH3. De plus, il recouvre une grande partie du CH2 avec lequel il interagit par l'intermédiaire des acides aminés hydrophobes (Huber *et al.*, 1976; Krapp *et al.*, 2003). Ces interactions entre le N-glycane et les acides aminés de la partie Fc des IgG permettent également de maintenir la structure de la protéine (Arnold *et al.*, 2007).

L'oligosaccharide présent sur les IgG est très hétérogène et comprend la structure de base GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> sur laquelle peut être ajouté de façon variable un fucose, une GlcNAc bissectrice, des galactoses et des acides sialiques (Figure 18) (Jefferis, 2010). La sialylation (c'est-à-dire le phénomène d'ajout d'acide sialique sur le N-glycane en formation) est un phénomène plutôt rare puisque chez les adultes sains, seuls 10 à 15% des N-glycanes présent en Asn297 possèdent des acides sialiques terminaux (Gudelj *et al.*, 2018a). Ce phénomène est principalement dû à l'emplacement des N-glycanes dans la poche hydrophobe et à l'interaction des résidus galactoses avec celle-ci, rendant l'accès aux galactoses terminaux par les enzymes difficile (Arnold *et al.*, 2007).

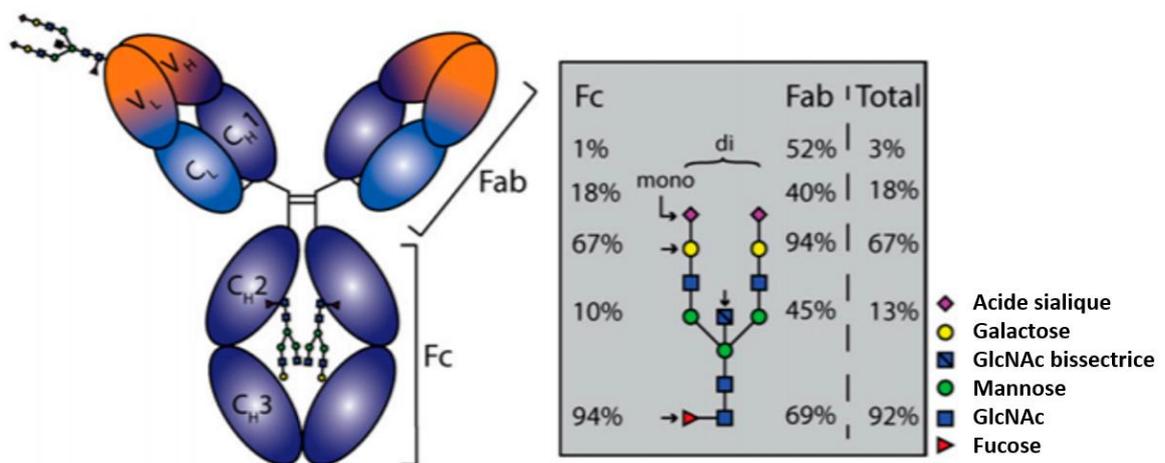


Figure 18 : Représentation schématique de la N-glycosylation des immunoglobulines G

Chaque molécule d'immunoglobuline G (IgG) porte deux glycanes attachés de façon covalente à un site consensus conservé de N-glycosylation présent en asparagine 297. La région Fragment antigen-binding contient également des sites consensus non-conservés. Néanmoins, il est estimé que seul 15 à 20% des molécules d'IgG portent au moins un site de N-glycosylation sur leurs régions variables. L'oligosaccharide présent sur les IgG est hétérogène et comprend la structure de base GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> sur laquelle peut être ajouté de façon variable un fucose, une N-acétylglucosamine bissectrice, des galactoses et des acides sialiques. GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Man = mannose.

D'après van de Bovenkamp *et al.*, 2016.

Les *N*-glycanes présents sur les IgG peuvent être classés suivant leur niveau de galactosylation : G0, G1, et G2, contenant respectivement 0, 1 et 2 résidu(s) galactose(s) (Figure 19). De plus, la structure glycanique peut être modifiée par la présence d'un fucose et/ou d'un ou plusieurs acide(s) sialique(s) supplémentaire(s) (Chung *et al.*, 2014). Les IgG-G0 ne possèdent aucun galactose. Ils représentent environ 35% de l'ensemble total des *N*-glycanes présents sur les IgG sériques humaines. Pour les IgG-G1, un seul résidu galactose terminal est présent sur un des deux bras, le deuxième bras exposant un résidu GlcNAc. Cette forme représente également 35% de l'ensemble des *N*-glycanes présents sur les IgG. Les IgG-G2 représentent environ 16% des *N*-glycanes et les 14% restants représentent les *N*-glycanes sialylés de type G1 et G2. De plus, 70% des *N*-glycanes présents sur les IgG sériques humaines possèdent un *core* fucose (Arnold *et al.*, 2007).

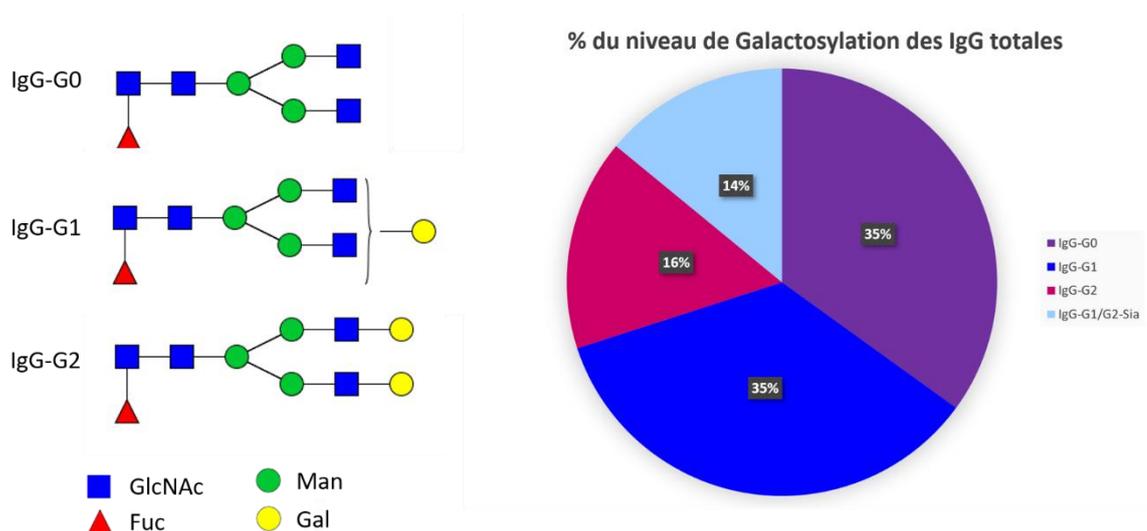


Figure 19 : Représentation schématique de la classification des *N*-glycanes en fonction de leur niveau de galactosylation

Les *N*-glycanes présents sur les immunoglobulines G peuvent être classés suivant leur niveau de galactosylation : G0, G1, et G2, contenant respectivement 0, 1 et 2 résidu(s) galactose(s). Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Man = Mannose, GlcNAc = *N*-acétylglucosamine, Sia = acide sialique.

Les *N*-glycanes associés à la partie Fc des IgG ont été montrés comme affectant la fonction de l'Ac notamment en influant sur la liaison des IgG aux Fc $\gamma$ R présents sur les cellules effectrices (Schroeder and Cavacini, 2010). En effet, la *N*-glycosylation de la partie Fc des IgG est connue pour permettre une activation optimale des Fc $\gamma$ RI, II et III ainsi que du complexe C1 du complément (Jefferis *et al.*, 1998). De plus, lorsque le *N*-glycane est entièrement supprimé, les IgG perdent leur capacité à activer le complément, à se lier aux Fc $\gamma$ R présents sur les macrophages et à induire l'ADCC (Nose and Wigzell, 1983). Le *N*-glycane présent sur la partie

Fc des IgG permet également l'activation du complément par de la voie des lectines qui dépend de la nature des résidus oligosaccharidiques terminaux (Jefferis *et al.*, 1998).

La reconnaissance des IgG par les Fc $\gamma$ R a été démontré comme étant altérée voir abolie si les IgG portaient des *N*-glycanes sans galactose sur leur partie Fc (Jefferis *et al.*, 1998). De plus, l'activité ADCC, où les Ag recouverts d'Ac vont activer les cellules effectrices et aboutir à la mort de la cible, est sensible à la composition du *N*-glycane présent sur les IgG puisqu'elle est déterminée par la liaison des IgG aux Fc $\gamma$ R (Schroeder and Cavacini, 2010). Il a été démontré que l'absence de fucose sur le *core* entraînait une amélioration de l'activité ADCC *via* une meilleure liaison au récepteur Fc $\gamma$ R11A (Kanda *et al.*, 2007). De plus, une hypergalactosylation ainsi qu'une augmentation en GlcNAc bissectrice entraîne également une augmentation de l'activité ADCC (Hodoniczky *et al.*, 2005; Thomann *et al.*, 2016). Enfin, une augmentation de la sialylation des *N*-glycanes entraînent une diminution de l'activité ADCC dû à une diminution de la liaison de l'Ac au récepteur Fc $\gamma$ R11A (Raju, 2008).

L'activité de CDC médiée par le complément est également dépendante de la *N*-glycosylation de la partie Fc des IgG. En effet, les IgG sans galactose terminal sur leur *N*-glycane ont été décrit comme pouvant activer le complément par la voie alterne et la voie des lectines (Gudelj *et al.*, 2018a). En revanche, la présence d'acide sialique sur la partie Fc des IgG diminue l'efficacité de ces Ac à induire la CDC en bloquant la liaison entre la partie Fc et le C1q (Quast *et al.*, 2015).

Au niveau du recyclage des IgG, la glycosylation des IgG ne modifie pas la liaison au FcRn puisque les IgG glycosylés et déglycosylés se fixent de manière égale sur ce récepteur (Liu *et al.*, 2011).

#### B. La *N*-glycosylation de la partie Fab

La région Fab de 15 à 20% des IgG contient au moins un site de *N*-glycosylation sur leurs régions variables (Gudelj *et al.*, 2018a). Ces sites sont généralement absents du répertoire des LB naïfs et sont formés lors des processus d'hypermutation somatique ayant lieu lors des réponses immunes spécifiques d'Ag (van de Bovenkamp *et al.*, 2016; Gudelj *et al.*, 2018a). Ces sites de *N*-glycosylation peuvent apparaître à la fois sur la chaîne légère et sur la chaîne lourde au sein des régions CDR ou *framework* (van de Bovenkamp *et al.*, 2016).

Les *N*-glycanes présents sur la partie Fab ont été décrits comme étant des structures complexes hautement sialylées (Bondt *et al.*, 2014). En effet, les *N*-glycanes présents sur la partie Fab sont plus riches en GlcNAc bisectrices, galactoses et acide sialique que ceux présents sur la partie Fc tandis qu'ils présentent moins de *core* fucose (Figure 14). Cela est principalement dû à la meilleure accessibilité du site de *N*-glycosylation sur la partie Fab par les glycosyltransférases (van de Bovenkamp *et al.*, 2016). De plus, des structures particulières, riches en mannoses, sont également retrouvées sur les *N*-glycanes de la partie Fab (Bondt *et al.*, 2014).

Différentes études ont démontré que la présence de *N*-glycanes sur les domaines variables peut augmenter ou diminuer l'affinité de la liaison à l'Ag (Coloma *et al.*, 1999; Leibiger *et al.*, 1999; Wallick *et al.*, 1988). Ces *N*-glycanes vont également modifier la demi-vie des Ac et leur capacité à s'accumuler dans différents organes (Coloma *et al.*, 1999). De plus, la *N*-glycosylation de la partie Fab possède également un rôle dans la capacité des Ac à s'agréger et/ou à précipiter ainsi que dans la modulation de la formation de complexes immuns (van de Bovenkamp *et al.*, 2016).

#### **4. Les modifications extracellulaires de la *N*-glycosylation**

Les glycosyltransférases (enzymes catalysant le transfert d'un sucre sur une protéine) résident en temps normal dans l'appareil de Golgi. Néanmoins, certaines études ont démontré qu'elles pouvaient également circuler dans le sang. Les plaquettes vont jouer un rôle important dans ce phénomène en compartimentalisant les glycosyltransférases et en les relâchant après activation afin de remodeler les *N*-glycanes présents à la surface des cellules (Lee-Sundlov *et al.*, 2017). Actuellement, peu d'études ont évalué l'impact de ces glycosyltransférases circulantes sur la *N*-glycosylation des IgG. Néanmoins, il a été démontré chez la souris que la sialylation des IgG pouvait être régulée par le foie et les plaquettes *via* la libération dans la circulation sanguine de transférases et de donneurs de sucres nucléotidiques (CMP-acide sialique) (Jones *et al.*, 2016).

En revanche, aucune étude n'a décrit la présence de glycosidases extracellulaires pouvant modifier les *N*-glycanes après sortie de la protéine de l'appareil de Golgi.

## 5. La N-glycosylation des IgG dans les maladies auto-immunes

La N-glycosylation des IgG plasmatiques d'une personne saine est très stable sur des périodes de plusieurs années (Gornik *et al.*, 2009; Hennig *et al.*, 2016). En revanche, elle peut varier avec l'âge (Krišćić *et al.*, 2014), la grossesse (van de Geijn *et al.*, 2009; Rook *et al.*, 1991) et la ménopause (Engdahl *et al.*, 2018). De nombreuses modifications de la N-glycosylation des IgG sont également observées lors de maladies et notamment lors de MAI (Gudelj *et al.*, 2018a) (Figure 20).

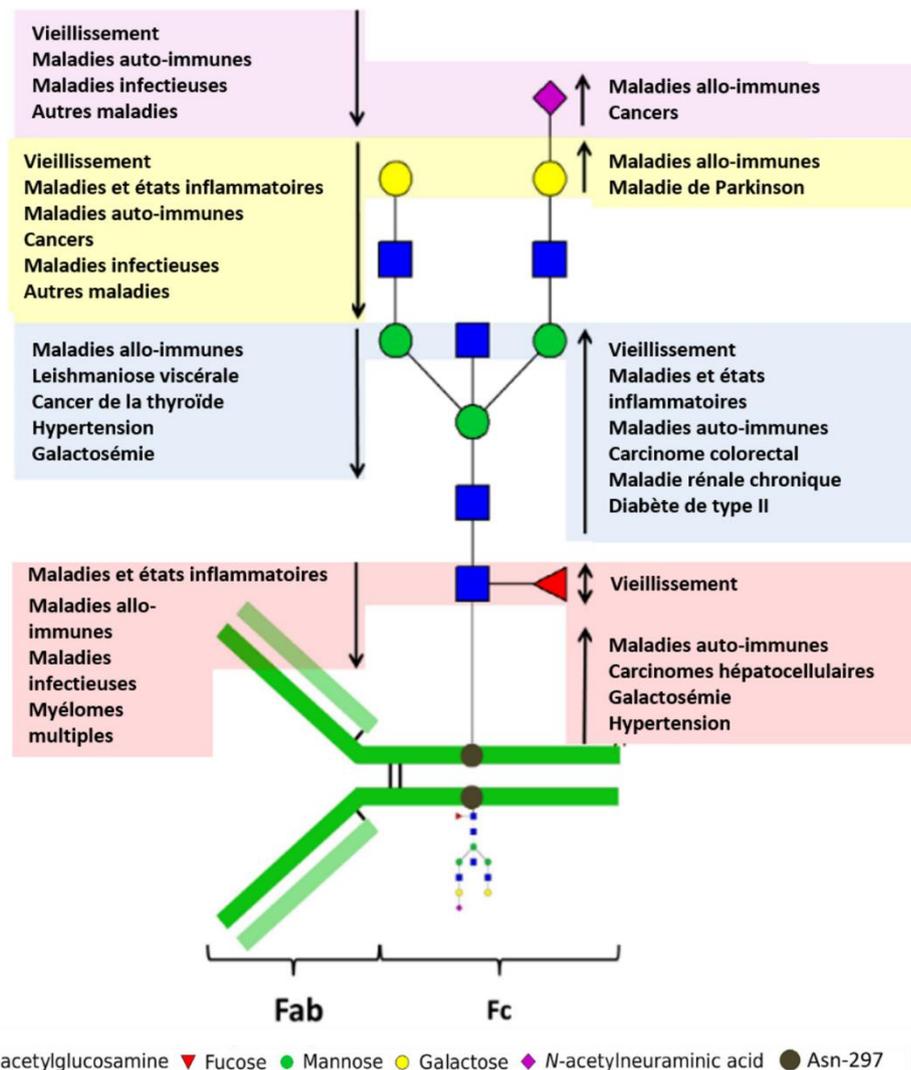


Figure 20 : Modification de la N-glycosylation des immunoglobulines G en fonction du vieillissement et des maladies

Les proportions des N-glycanes présents sur la partie Fc des immunoglobulines G (IgG) au cours du vieillissement ou chez des patients souffrant de maladie par rapport aux témoins en bonne santé et/ou en cas de maladie active par rapport à l'état de rémission sont représentées dans cette figure. La partie gauche de la figure (flèches vers le bas) résume les diminutions de N-glycosylation tandis que les augmentations de N-glycosylation sont décrites dans la partie de droite (flèches vers le haut). Les résidus de monosaccharides sont codés par couleur conformément à la réglementation internationale (Neelamegham *et al.*, 2019).

D'après Gudelj *et al.*, 2018a.

Une diminution de la galactosylation des IgG est observée chez des patients atteints de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde (*Gindzienska-Sieskiewicz et al., 2007; Gudelj et al., 2018b; Parekh et al., 1985*), le lupus érythémateux systémique (*Bond et al., 1997; Vučković et al., 2015*), le syndrome de Sjögren (*Bond et al., 1996, 1997*), la vascularite systémique associée aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) (*Holland et al., 2006; Wuhrer et al., 2015*), certaines maladies céliaques (*Cremata et al., 2003*), les myosites (*Perdivara et al., 2011*) ainsi que l'anémie hémolytique auto-immune (*Sonneveld et al., 2017*). De plus, une diminution de la sialylation des IgG est observée chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (*Gudelj et al., 2018b; Parekh et al., 1985*), de granulomatose avec polyangéite (*Espy et al., 2011; Wuhrer et al., 2015*), de lupus érythémateux systémique (*Vučković et al., 2015*) et d'anémie hémolytique auto-immune (*Sonneveld et al., 2017*). La fucosylation est, quant à elle, diminuée sur les IgG de patients atteints de lupus érythémateux systémique (*Vučković et al., 2015*) ou de MAI de la thyroïde (*Martin et al., 2020*) mais est augmentée sur les IgG de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (*Gińdzińska-Sieśkiewicz et al., 2016; Su et al., 2020*). Pour finir, une diminution de la présence de GlcNAc bissectrice est observée sur les IgG provenant de patients atteints de granulomatose avec polyangéite (*Wuhrer et al., 2015*) et d'anémie hémolytique auto-immune (*Sonneveld et al., 2017*) tandis qu'une augmentation est retrouvée sur les IgG de patients atteints de lupus érythémateux systémique (*Vučković et al., 2015*).

La plupart des études portent sur la *N*-glycosylation des IgG sériques mais certaines études se sont intéressées plus spécifiquement aux aAc. Dans la polyarthrite rhumatoïde, la *N*-glycosylation des Ac anti-protéines citrullinées a été étudiée et comparées à celle des IgG sériques. Une diminution de la galactosylation et de la sialylation sont observées chez les aAc (*Rombouts et al., 2015; Scherer et al., 2010*). Chez les patients atteints de granulomatose avec polyangéite, la comparaison de la *N*-glycosylation des anticorps anti-protéinases 3 avec celle des IgG sériques a montré une diminution de la galactosylation, la sialylation et la présence de GlcNAc bissectrice sur les aAc (*Wuhrer et al., 2015*). La *N*-glycosylation des aAc a également été étudiée chez des patients atteints d'anémie hémolytique auto-immune. Les IgG anti-globules rouges présentent une galactosylation et un taux de GlcNAc bissectrices diminué ainsi qu'une sialylation augmentée par rapport aux IgG sériques (*Sonneveld et al., 2017*). La *N*-glycosylation des IgG anti-histone a été étudiée chez des patients atteints de lupus

érythémateux systémique et elle présente un profil plutôt asialylé (Magorivska *et al.*, 2016).

Ces études spécifiques des aAc semblent indiquer que ces derniers présentent un profil de *N*-glycosylation différent de celui des IgG sériques. Dans la polyarthrite rhumatoïde, l'étude de la *N*-glycosylation des aAc permet même de prédire l'apparition de la maladie jusqu'à 3 mois avant le début des symptômes cliniques (Rombouts *et al.*, 2015). En revanche, dans la vascularite systémique associée aux ANCA, c'est l'étude de la *N*-glycosylation des IgG sériques qui permet de prédire la réactivation de la maladie et non l'étude des aAc des patients (Kemna *et al.*, 2017).

La *N*-glycosylation des Ac a été étudiée dans de nombreuses MAI à aAc. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude de la *N*-glycosylation des IgG et des aAc dans le pemphigus, qui est un modèle de MAI médiée par les aAc.

## **VI. Un modèle de maladies auto-immune induite par les auto-anticorps : le pemphigus**

Le mot pemphigus dérive du grec *pemphix* signifiant cloque ou bulle. Il décrit un groupe de MAI dermatologiques rares provoquant la formation chronique de bulles sur l'épithélium de la peau et/ou des muqueuses des personnes atteintes. Cette maladie est causée par la production d'aAc majoritairement d'isotype IgG contre des protéines responsables de l'adhésion entre les cellules constitutives de l'épiderme appelées kératinocytes. Le pemphigus peut être classé en deux formes majeures : le pemphigus vulgaire (PV) et le pemphigus foliacé (PF) (Kasperkiewicz *et al.*, 2017).

### **1. L'épidémiologie**

L'incidence du pemphigus en Europe se situe entre 0,5 et 8/million d'habitant par an selon les études. Cette forte variation d'incidence dépend de la localisation géographique et des groupes ethniques. Même si le pemphigus touche tous les groupes ethniques, il est plus fréquent chez les juifs ashkénazes. Communément, le PV est le sous-type de pemphigus le plus reporté cliniquement. En effet, d'après les données épidémiologiques, deux tiers des patients sont diagnostiqués comme étant atteints de PV. Le PF, quant à lui, est répertorié de façon sporadique partout dans le monde (Alpsoy *et al.*, 2015). Il existe également une forme

endémique du PF appelé *fogo selvagem* retrouvé chez des habitants de zones rurales brésiliennes (Culton *et al.*, 2008).

Le pemphigus se manifeste particulièrement entre 40 et 60 ans mais peut également se manifester chez les personnes âgées et les enfants (Kneisel and Hertl, 2011). Il a également, comme pour beaucoup de MAI, une prévalence plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Shah *et al.*, 2015). Si le pemphigus n'est pas traité, il va progresser, entraînant une mortalité de 50% des patients deux ans après le diagnostic et de 100% au bout de 5 ans. Grâce aux traitements par les corticostéroïdes, les médicaments cytotoxiques, les immunosuppresseurs et/ou les agents immunobiologiques possédant des effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs, le taux de mortalité est actuellement de 5 à 15% (Mimouni *et al.*, 2008). Néanmoins, il n'existe que peu de données sur le taux de mortalité et sur ses causes parmi les patients atteints de pemphigus comparé à la population générale (Alpsoy *et al.*, 2015).

## **2. La physiopathologie du pemphigus**

### **A. Les antigènes du pemphigus : les desmoglénines**

Les principales cibles des aAc présents chez les patients atteints de pemphigus ont été identifiées depuis plusieurs années comme étant les DSG. Les DSG sont des glycoprotéines transmembranaires du desmosome impliquées dans l'adhésion cellulaire entre les kératinocytes épidermiques (Figure 21) (Hammers and Stanley, 2016).

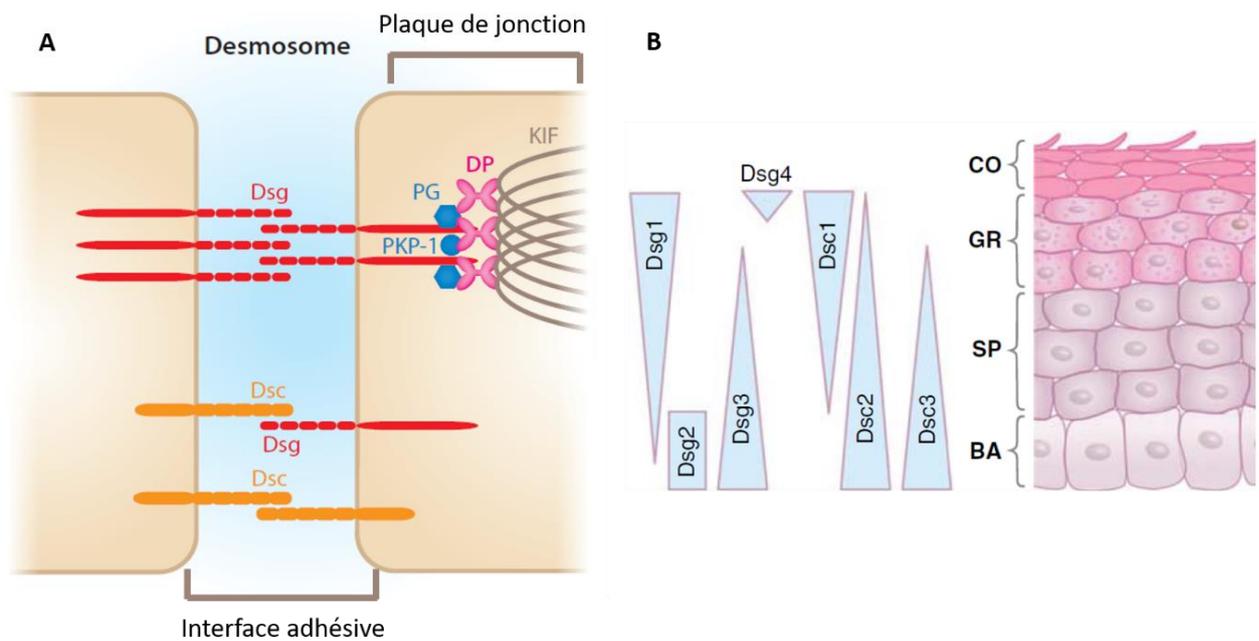


Figure 21 : Représentation schématique de l'organisation du desmosome

A) Les desmoglérines (DSG) et les desmocollines (DSC) forment l'interface adhésive du desmosome. Les plakoglobines, les plakophilines, les desmoplakines et les filaments intermédiaires de kératine forment la plaque de jonction intracellulaire du desmosome. B) L'expression des DSG et des DSC est différente en fonction de la couche épidermique. La DSG1 et la DSC1 sont principalement exprimées dans la couche granuleuse puis leurs expressions diminuent dans la couche épineuse. La DSG4 est uniquement exprimée dans les premières couches de la couche granuleuse. La DSG2 est quant à elle uniquement exprimée dans la couche basale. Les DSG3, DSC2 et DSC3 sont exprimées majoritairement dans la couche basale puis leurs expressions diminuent dans la couche épineuse. La DSG3 et le DSC3 sont exprimées de façon faible dans les couches profondes de la couche granuleuse tandis que la DSC2 est exprimée dans la totalité de la couche granuleuse. Dsg = desmoglérine ; Dsc = desmocolline ; PG = plakoglobine ; PKP-1 = plakophiline-1 ; DP = desmoplakine ; KIF = filament intermédiaire de kératine ; BA = couche basale ; SP = couche épineuse ; GR = couche granuleuse ; CO = couche cornéenne.

D'après Green and Simpson, 2007 et Hammers and Stanley, 2016.

Le desmosome est une jonction adhésive intracellulaire ayant un rôle important dans les tissus qui subissent un stress mécanique régulier tels que le myocarde, la vessie, les muqueuses gastro-intestinales et la peau (Delva *et al.*, 2009). Il est composé de 3 grandes familles de protéines : les cadhérines, les protéines armadillo et les plakines (Getsios *et al.*, 2004). Les DSG et les DSC, protéines transmembranaires de la famille des cadhérines, coopèrent afin de former l'interface adhésive du desmosome qui est située entre deux kératinocytes (Figure 21). Il existe 4 isoformes de la DSG (DSG1-4) et 3 isoformes de la DSC (DSC1-3). Au niveau intracellulaire, les protéines armadillo telles que les plakoglobines et les plakophilines vont venir se fixer au niveau des queues cytoplasmiques des cadhérines (Green and Simpson, 2007). La desmoplakine, protéine de la famille des plakines, va interagir d'un côté avec les plakoglobines et les plakophilines et de l'autre avec les filaments de kératine. La liaison des desmoplakines avec les filaments de kératine permet la formation de la plaque

interne du desmosome (Figure 21) (Delva *et al.*, 2009).

Ce schéma moléculaire varie en fonction du type cellulaire et de la localisation dans les couches de l'épiderme, principalement concernant l'apparence et de la taille du desmosome. En effet, les épithéliums simples expriment uniquement la paire DSG2/DSC2. Alors que les épithéliums complexes, comme l'épiderme, expriment essentiellement les DSC1/3 et les DSG1/3 avec des niveaux bas de DSG2/DSC2 dans les couches basales et de la DSG4 dans les couches granulaire et cornéenne (Figure 21) (Green and Simpson, 2007).

La première cible du pemphigus à avoir été identifiée par Koulu *et al.* en 1984 est l'auto-Ag du PF : la DSG1 (Koulu *et al.*, 1984). Puis, en 1991, Amagai *et al.* ont identifié la DSG3 comme cible du PV (Amagai *et al.*, 1991).

#### B. La clinique et l'histologie des différents pemphigus

Histologiquement, le pemphigus est caractérisé par une perte d'adhésion cellulaire *via* un processus appelé acantholyse, c'est-à-dire la séparation des kératinocytes entre eux (Hammers and Stanley, 2016; Schmidt *et al.*, 2019). Dans le PF, seule la peau des patients présente des lésions. Les premières lésions se manifestent par l'apparition de bulles plates et fragiles qui peuvent survenir n'importe où sur la surface de la peau (Hammers and Stanley, 2016). Elles émergent couramment dans les zones dites séborrhéiques telles que le scalpe ou les régions pré-sternale et intra-scapulaire (Kneisel and Hertl, 2011). Ces bulles vont se briser alors qu'elles sont encore petites et vont se transformer en plaques érythémateuses (plaques caractérisées par une rougeur plus ou moins étendue) hyperkératosiques (augmentation significative de la kératinisation) et en croûtes squameuses (écailleuses) (Figure 22). La forme endémique du PF possède les mêmes symptômes cliniques que la forme sporadique. (Pollmann *et al.*, 2018).

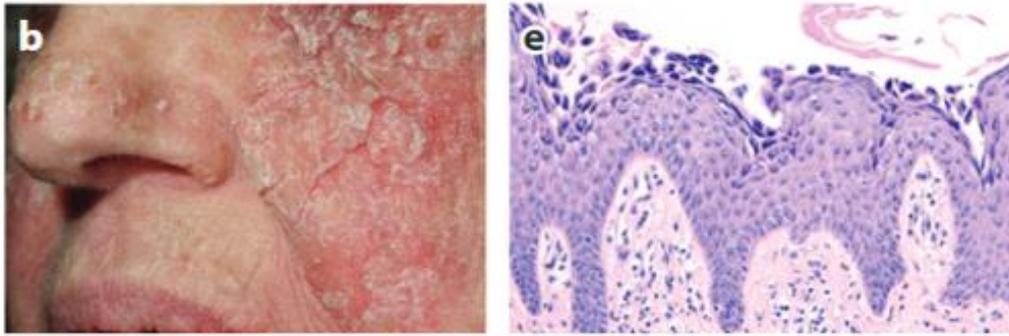


Figure 22 : Photographie et histologie de la peau d'un patient atteint de pemphigus foliacé

La peau du patient présente des érosions dues à la présence de bulles fragiles qui se sont brisées. Au niveau histologique, la perte d'adhésion cellulaire, aussi appelé acantholyse, se produit dans l'épiderme supérieur.

D'après Hammers and Stanley, 2016.

Dans le PF, l'acantholyse a lieu dans l'épiderme supérieur, au-dessous de la couche cornéenne (*stratum corneum*) ainsi que dans ou sous la couche granuleuse (*stratum granulosum*) (Figure 23) (Hammers and Stanley, 2016).

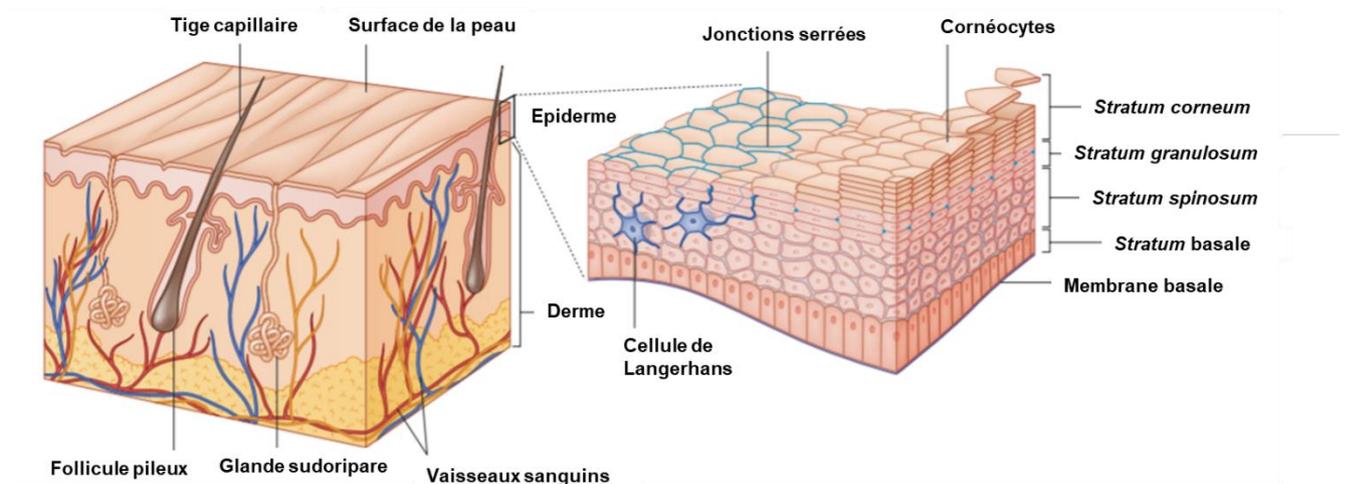


Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation de la peau

Organisation des couches de la peau de l'extérieur vers l'intérieur :

- Surface de la peau
- Epiderme : *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, *stratum basale* et membrane basale
- Dermis contenant les follicules pileux, les glandes sudoripares et les vaisseaux sanguins

D'après Someya and Amagai, 2019.

Dans le PV, les membranes muqueuses sont principalement affectées avec ou sans lésion de la peau (Hammers and Stanley, 2016). Les premiers symptômes de la maladie, dans 70% des cas, sont des érosions très douloureuses et persistantes, en particulier de la

muqueuse orale. L'atteinte d'autres muqueuses comme la muqueuse nasale, la muqueuse laryngo-œsophagienne, la muqueuse génitale, la muqueuse anale et la muqueuse conjonctivale est également possible (Kneisel and Hertl, 2011). Les patients affectés présentent des difficultés à s'alimenter, à avaler et à parler. Lorsqu'il présente des lésions sur la peau, le PV se manifeste par l'apparition de bulles lâches qui vont se briser rapidement et se transformer en zones d'érosion dites « craquantes » qui se soignent lentement et qui ont tendance à s'étendre. Ces lésions sont retrouvées sur le tronc des patients et plus particulièrement sur les zones cutanées séborrhéiques (Figure 24) (Pollmann *et al.*, 2018).

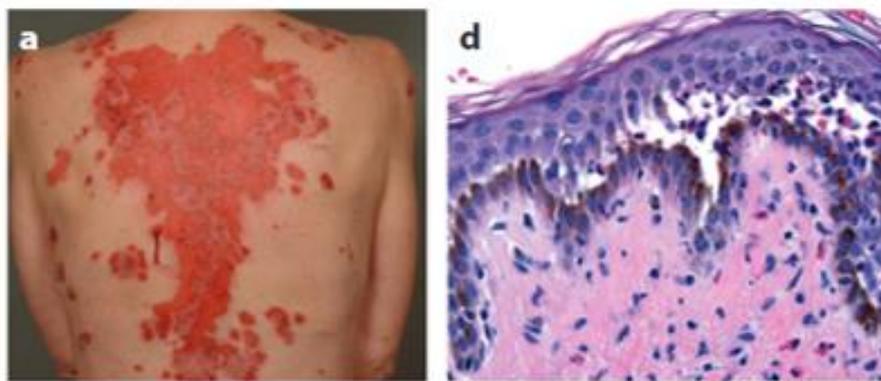


Figure 24 : Photographie et histologie de la peau d'un patient atteint de pemphigus vulgaire cutanéomuqueux

La peau du patient présente des zones d'érosion dues à la présence de bulles lâches qui se sont brisées. Au niveau histologique, la perte d'adhésion cellulaire aussi appelé acantholyse se produit dans la couche de cellules basales.

D'après Hammers and Stanley, 2016.

Dans le PV, l'acantholyse est présente dans la couche de cellules basales c'est-à-dire la première couche de cellules reposant sur la membrane basale (matrice extracellulaire séparant le derme de l'épiderme) ainsi que dans la couche de cellules située directement au-dessus (Figure 23). Cela va résulter en la formation de bulles suprabasales. Les kératinocytes basaux vont perdre leur adhésion cellule-cellule (mais pas cellule-membrane basale) et vont prendre une forme cuboïde à rectangulaire, formant ainsi une rangée ayant l'aspect de « pierres tombales » (Hammers and Stanley, 2016).

Les sites de formation des bulles entre le PV et le PF sont différents. Ceci peut s'expliquer par la théorie de la compensation qui suggère que la formation des bulles est le résultat de la perte de la fonction adhésive d'un isoforme de la DSG (Amagai and Stanley, 2012). L'Ag des aAc du PF, la DSG1, est principalement exprimé dans l'épiderme supérieur tandis que l'Ag des aAc du PV, la DSG3, est présent plus profondément dans l'épiderme (Figure 25). Ainsi, les aAc

du PF altèrent la fonction de l'épiderme supérieur où la DSG3 y est peu exprimée mais pas la fonction de l'épiderme profond où l'adhésion est maintenue par la DSG3. De plus, la DSG1 est peu exprimée dans les muqueuses, d'où l'absence de bulles au sein des muqueuses des patients atteints de PF. Au contraire, les aAc du PV ciblant uniquement la DSG3 affectent uniquement les couches profondes de l'épiderme où la présence de DSG3 y est importante, on parle alors de PV muqueux. Dans les cas où les patients atteints possèdent à la fois des aAc anti-DSG1 et anti-DSG3, des bulles vont apparaître sur toutes les couches de l'épiderme et des muqueuses, on parle alors de PV cutanéomuqueux (Kitajima, 2014).

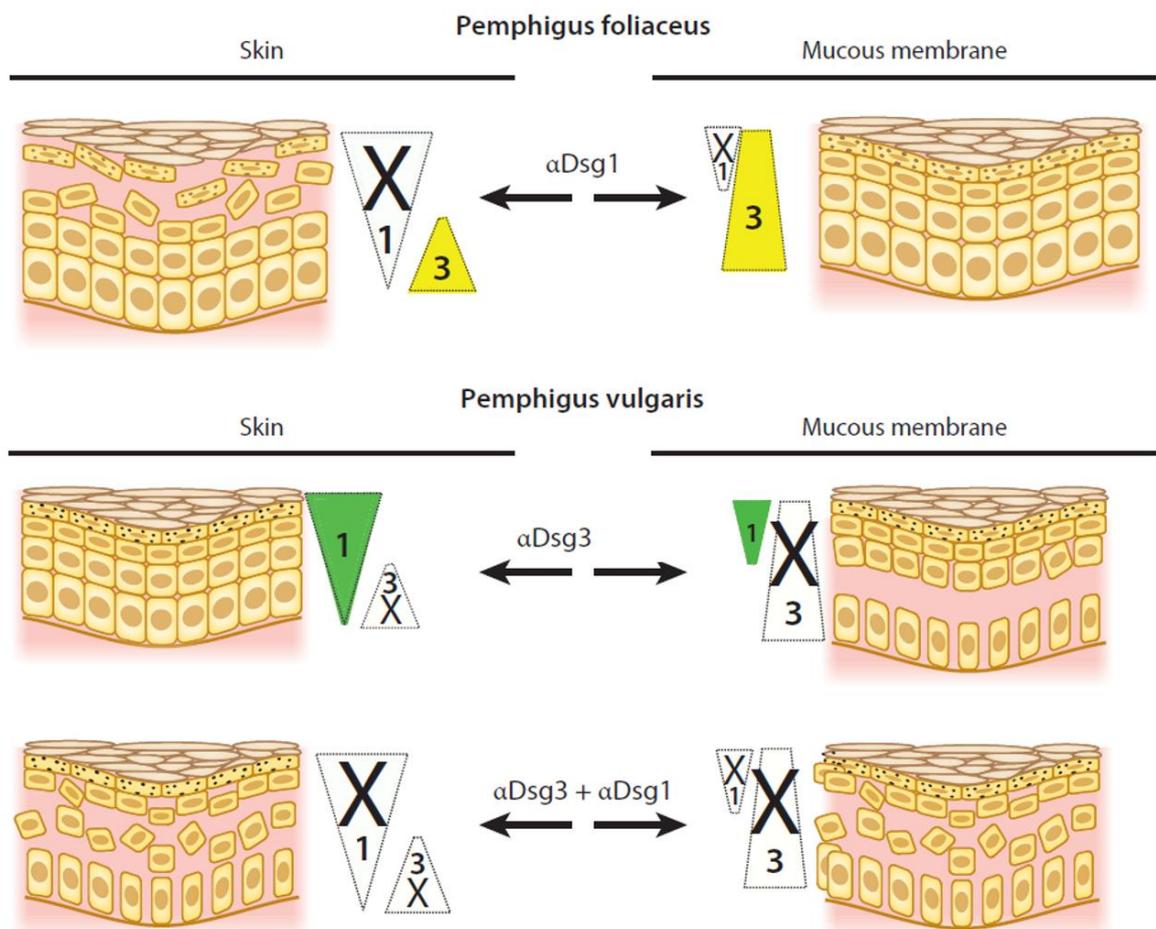


Figure 25 : Représentation schématique de la théorie de la compensation

1 signifie desmogléine (DSG) 1 et 3 signifie DSG3. L'antigène du pemphigus foliacé, la DSG1, est principalement exprimé dans l'épiderme supérieur tandis que l'antigène du pemphigus vulgaire, la DSG3, est présent plus profondément dans l'épiderme. Dans toute zone où la fonction de DSG1 ou de DSG3 a été désactivée et où l'autre DSG n'est pas présente pour compenser, une bulle (représentée par la perte d'adhérence cellule-cellule) se produit.

D'après Hammers and Stanley, 2016.

### C. Les autres antigènes du pemphigus

De nombreuses études ont démontré que les DSG1 et 3 étaient les Ag majeurs du pemphigus. Néanmoins, certaines observations, telles que l'absence de corrélation entre le titre en IgG anti-DSG et l'activité de la maladie chez certains patients ou l'hétérogénéité de la maladie, semblent indiquer la présence et l'importance des aAc ne ciblant pas les DSG (Di Lullo *et al.*, 2019). En effet, différentes études protéomiques ont identifié de nombreux aAc chez les patients atteints de PV ayant un rôle dans la physiologie ou l'adhésion cellulaire des kératinocytes. Ces aAc ciblent différentes protéines telles que les DSC1 et 3, plusieurs sous-types de récepteurs à l'acétylcholine muscarinique et nicotinique, des protéines mitochondriales, certaines molécules de HLA, la peroxydase thyroïdienne et la protéine hSPCA1 ou  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase codée par l'ATP2C1 (Amber *et al.*, 2018). Cependant, d'après une étude menée par le laboratoire, il semblerait que ces autres aAc dans le pemphigus nécessitent d'être associés afin d'induire des symptômes cliniques. Ainsi, les anti-DSG restent les aAc principaux de cette maladie (papier en cours d'écriture).

## 3. Les facteurs de risques

### A. Les facteurs génétiques

Il existe de nombreuses preuves démontrant l'implication de facteurs génétiques dans le pemphigus. Dans le cas des formes sporadiques de pemphigus, il est assez rare que plus d'un membre de la famille ne soit atteint (Kasperkiewicz *et al.*, 2017). En revanche, la fréquence d'aAc circulants chez les apparentés de patients atteints de pemphigus est plus importante que chez les donneurs sains. Néanmoins ces aAc sont principalement de sous-classes d'IgG différentes de celles des aAc retrouvés chez les patients (Torzecka *et al.*, 2007).

Une association entre l'haplotype HLA et le pemphigus a été démontrée par sérologie, génotypage et séquençage. Les allèles HLA-DR4 (DRB1\*0402 et \*0406 respectivement présents chez les juifs ashkénazes et les populations asiatiques) et DR14 (DRB1\*1401 et \*1405 respectivement présents dans les population européennes et asiatiques) confèrent une forte susceptibilité au pemphigus (Yan *et al.*, 2012).

## B. Les facteurs environnementaux

Les facteurs génétiques à eux-seuls ne suffisent pas à expliquer la survenue du pemphigus. Des facteurs environnementaux semblent également intervenir. Certains médicaments contenant des groupements thiols (pénicillamine ou captopril) peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de lésions de type *pemphigus-like*. Le pemphigus déclenché par la présence de médicaments diffère cliniquement, histologiquement ainsi que dans sa pathogenèse du PV (Ruocco *et al.*, 2013). D'autres facteurs environnementaux sont encore à l'étude tels que les virus (Herpes virus), les facteurs alimentaires et les stress physiologiques ou psychologiques (Kasperkiewicz *et al.*, 2017).

La forme endémique du PF a été démontrée comme étant associée à une cross-réactivité entre l'auto-Ag reconnu par les aAc du patient et une protéine contenue dans la salive du phlébotome (mouche des sables), insecte répandu dans certaines régions du Brésil. L'exposition fréquente à la morsure de ces insectes entraînent l'apparition d'aAc dirigés contre la protéine contenue dans la salive des insectes qui vont cross-réagir avec l'auto-Ag. De plus, ce phénomène est augmenté par la prédisposition génétique de certains individus vivants dans ces zones endémiques de PF. On appelle ce phénomène l'extension épitopique (Qian *et al.*, 2012).

## 4. Les différents traitements

### A. Les corticostéroïdes systémiques

Les glucocorticoïdes sont le traitement le plus utilisé dans le cas des MAI et des maladies inflammatoires grâce à leurs effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (Bereshchenko *et al.*, 2018). Ils vont agir soit de façon génomique, c'est-à-dire en modifiant la transcription ou la demi-vie des ARNm, soit de façon non-génomique *via* les récepteurs cytosolique ou membranaire des glucocorticoïdes (Stahn *et al.*, 2007). Les glucocorticoïdes agissent sur de nombreuses cellules afin de réguler l'expression de gènes contrôlant le métabolisme cellulaire, la croissance, la différenciation et l'apoptose (Bereshchenko *et al.*, 2018). Ils possèdent également des effets sur le système immunitaire. En effet, ils vont entraîner une inhibition de l'expression de cytokines pro-inflammatoires tout en induisant l'expression de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages (Cain and Cidlowski, 2017).

Plusieurs études ont démontré que les glucocorticoïdes avaient un effet sur la glycosylation sérique. En effet, une étude menée chez le rat a démontré que les corticostéroïdes circulants contrôlaient l'expression de la sialyltransférase, l'enzyme responsable de la sialylation (Maguire *et al.*, 1998). Leur implication dans la régulation de la glycosylation de protéines de la phase aiguë de l'inflammation a également été démontré chez le rat (Pos *et al.*, 1988). Néanmoins, aucune étude n'a démontré de changement de la N-glycosylation des IgG après traitement par corticostéroïdes. Une étude a même établie qu'il n'y avait pas d'association entre la modification de la N-glycosylation des IgG chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique et le traitement par corticostéroïdes (Lauc *et al.*, 2013).

Les corticostéroïdes sont le traitement de référence du pemphigus depuis plus de 50 ans. Néanmoins, la majorité des décès sont causés non pas par la maladie en elle-même, mais par des effets secondaires liés aux corticostéroïdes à usage systémique prolongé (Sinha *et al.*, 2015). Dans une étude menée par le laboratoire, nous avons démontré que les corticostéroïdes permettaient une chute du titre d'aAc anti-DSG1 et anti-DSG3 permettant à 34% des patients d'atteindre une rémission complète sans traitement au bout de 2 ans (Joly *et al.*, 2017). Actuellement, le mode d'action des corticostéroïdes systémiques n'a toujours pas été complètement établi. Il existe de nombreuses preuves démontrant que des doses élevées de corticostéroïdes contrôlent l'acantholyse *via* des actions directes sur les kératinocytes. En effet, Nguyen *et al.* ont démontré que les corticostéroïdes induisaient une augmentation de la synthèse et une modification post-traductionnelle des molécules d'adhésion des kératinocytes incluant les DSG (Nguyen *et al.*, 2004).

#### B. Le Rituximab : traitement par déplétion des LB

Du fait des effets secondaires importants causés par l'utilisation des corticostéroïdes systémiques, de nouvelles stratégies de traitement ont été mises en place. Celle qui semble la plus prometteuse consiste en la déplétion des LB par un Ac monoclonal chimérique dirigé contre la molécule CD20 appelé Rituximab (MabThera®). Le CD20 est une molécule exprimée spécifiquement à la surface des LB en cours de développement et des LB mémoires. En revanche, il n'est pas exprimé par les plasmocytes (Sinha *et al.*, 2015).

Une étude menée par notre laboratoire a démontré que l'utilisation du Rituximab en

première intention complétée par des corticostéroïdes à court terme permettait d'obtenir une rémission complète chez 89% des patients au bout de 24 mois contre 34% chez les patients traités par corticostéroïdes seuls (Joly *et al.*, 2017).

Une précédente étude réalisée au sein de notre laboratoire a également mis en évidence la disparition des LB jusqu'à 6 à 9 mois après traitement par Rituximab. Au retour de ces LB, il a été démontré qu'ils possédaient un phénotype caractéristique des LB dits transitionnels (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>). De plus, après traitement par Rituximab, une augmentation de la proportion de LB naïfs (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) est observée au retour des LB alors que la proportion des LB mémoires (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) est diminuée par rapport à la répartition des populations observées avant traitement (Colliou *et al.*, 2013).

### C. Les autres traitements

D'autres stratégies de traitement ont également été mises en place afin de traiter les patients atteints de pemphigus :

- Les traitements immunosuppresseurs

Ces traitements sont principalement utilisés comme adjuvant des traitements par corticostéroïdes systémiques. La majorité des études s'accordent à dire que le bénéfice de ces agents immunosuppresseurs vient de leur capacité d'épargne cortisonique qui permet de réduire l'apparition d'effets secondaires liés à l'utilisation de corticostéroïdes (Sinha *et al.*, 2015).

- Les immunoglobulines intraveineuses

Les préparations d'Ig intraveineuses sont composées principalement d'IgG intactes avec une distribution des sous-classes identiques à un sérum humain sain. Elles sont préparées à partir de plasma de donneurs sains combinés et sont utilisées dans les déficits immunitaires en prévention des infections et dans les pathologies induites par les aAc. Elles ont différents modes d'action tels que la modulation de l'expression et de la fonction des FcR, le blocage de l'activation du complément et des actions sur l'activation, la différenciation et les fonctions des LB et LT (Kazatchkine and Kaveri, 2001).

- Plasmaphérèse/immunoabsorption

La plasmaphérèse et l'immunoabsorption fonctionnent toutes les deux par une élimination physique des Ig du plasma afin d'éliminer les auto-Ac présents chez les patients atteints de pemphigus. La plasmaphérèse consiste à dépléter toutes les protéines du plasma de façon non-spécifique (Ac, albumine, hormones, etc.) tandis que l'immunoabsorption consiste à dépléter spécifiquement les Ig (Sinha *et al.*, 2015). Malheureusement, ces techniques déplètent l'ensemble des Ig, ce qui augmente la susceptibilité à une infection (Langenhan *et al.*, 2014).

- Immunothérapie à cellules T

L'activation des LT auto-réactifs est nécessaire à la production d'aAc dans les MAI bulleuses de la peau telles que le pemphigus (Chow *et al.*, 2005). Une étude menée par Ellebrecht *et al.* en 2016 a démontré que des LT modifiés pour exprimer la DSG3 présentaient une cytotoxicité spécifique contre les LB exprimant un BCR anti-DSG3. Ce nouvel outil permettrait ainsi de cibler les LB auto-réactifs dans les MAI induites par les aAc (Ellebrecht *et al.*, 2016).

## **5. La pathogénicité des aAc dans le pemphigus**

Les aAc des patients atteints de pemphigus sont dits pathogéniques c'est-à-dire qu'ils sont à l'origine des symptômes cliniques retrouvés chez les patients. Les premières preuves de cette pathogénicité sont l'observation de pemphigus néonataux chez des nouveaux nés dont la mère était atteinte de pemphigus (Kardos *et al.*, 2009). La peau des nouveaux nés exprimant majoritairement la DSG3, ces derniers présentaient principalement des lésions cutanées et moins fréquemment des lésions muqueuses. Les symptômes disparaissent majoritairement au bout de 3 semaines, lorsque les Ig de la mère étaient éliminées naturellement de l'organisme de l'enfant. C'est ce qu'on appelle un transfert passif d'Ac (Zhao *et al.*, 2016). La deuxième preuve de la pathogénicité des aAc provient d'expériences menées chez la souris. Ces expériences consistaient au transfert passif des IgG circulantes de patients atteints de pemphigus à des souris qui développaient par la suite des symptômes similaires à ceux décrits chez les patients (Anhalt *et al.*, 1982). Ces expériences ont confirmé la pathogénicité des aAc et ont démontré qu'elle était dose-dépendante. Il a été démontré que, dans le pemphigus, la partie Fab des aAc était suffisante pour induire la maladie (Rock *et al.*, 1990). Cela semble démontrer que les effets induits par la partie Fc des Ac ne sont pas

nécessaires dans la physiopathologie de la maladie, c'est-à-dire que les Ac seraient les seuls médiateurs de l'acantholyse (Hammers and Stanley, 2016).

La DSG est composée de plusieurs ectodomaines (EC) : EC1 à EC5. Les aAc reconnaissant ces différents ectodomaines ne possèdent pas le même caractère pathogénique. En effet, seuls les IgG dirigées contre les domaines EC1, EC2 et EC4 permettent de induire une acantholyse chez les souris (Amagai *et al.*, 1992; Zenzo *et al.*, 2012). Les domaines N-terminaux (EC1 et EC2) des DSG sont responsables de la liaison entre les deux protéines et la formation de l'adhésion cellulaire entre les kératinocytes. Par conséquent, les aAc dirigés contre ces domaines empêchent directement l'adhésion cellulaire (Sekiguchi *et al.*, 2001).

Différentes études ont démontré que les IgG anti-DSG réduisaient la trans-interaction des DSG *via* des mécanismes cellulaires dépendant de la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) ou par encombrement stérique (Heupel *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2012). Lorsque les aAc anti-DSG3 se fixent sur leurs cibles, cela va initier une cascade de signalisation au sein des kératinocytes. La *Heat Shock Protein 27* (HSP27) et la p38MPAK sont alors rapidement phosphorylées, menant à une réorganisation du cytosquelette (Berkowitz *et al.*, 2005). En effet, suite à la phosphorylation de p38MAPK puis celle de HSP27, les filaments intermédiaires de kératine vont se rétracter et l'actine va se réorganiser menant à l'internalisation de la DSG et à la perte d'adhésion entre les kératinocytes (Jolly *et al.*, 2010)

Chez les patients atteints de pemphigus, l'utilisation des gènes VH semble être limitée mais ne s'avère pas liée à la pathogénicité des aAc. En revanche, une séquence consensus a été retrouvée dans le CDR3 de la chaîne lourde des aAc de nombreux patients (acide aspartique/acide glutamique-X-X-X-tryptophane, où X peut être n'importe quel acide aminé). Il semblerait que la présence du tryptophane joue un rôle important dans la perturbation de l'adhésion entre les DSG (Yamagami *et al.*, 2010). Une étude récente a démontré que le répertoire des aAc anti-DSG sériques était plus polyclonal que celui des LB. De plus, les LB codent pour des aAc qui ne sont pas sécrétés dans le sérum (Chen *et al.*, 2017). Cette étude démontre l'importance d'étudier directement les aAc et non les LB.

De nombreux facteurs semblent influencer la pathogénicité des aAc dans le pemphigus en plus de leur répertoire. Dans une étude parallèle à cette thèse, nous avons démontré que les isotypes des aAc jouaient sur la pathogénicité des Ac. En effet, un effet pathogène

cumulatif a été observé lorsque plusieurs sous-classes d'IgG étaient présentes dans le sérum des patients. Ces observations sont cohérentes avec le fait que certains patients qui gardaient des taux élevés d'IgG4 anti-DSG3 après traitement ne rechutaient pas. Nous avons également démontré que les IgG3 anti-DSG3 seuls étaient capables d'induire l'acantholyse, ce qui n'est pas toujours le cas des IgG4 anti-DSG3. En effet, la pathogénicité des IgG4 est dose-dépendante, c'est-à-dire que des quantités faibles d'aAc ne sont pas suffisantes pour induire une acantholyse (papier en cours d'écriture).

*In vivo*, la *N*-glycosylation des Ac a également été montrée comme influant sur leur pathogénicité. En effet, une étude effectuée dans la polyarthrite rhumatoïde a démontré que la modification du profil de *N*-glycosylation des IgG (principalement une baisse du taux d'acides sialiques) était corrélée avec l'apparition de la maladie (Pfeifle *et al.*, 2017). De nombreuses études ont démontré des modifications de la *N*-glycosylation chez des patients atteints de MAI, établissant un lien entre la *N*-glycosylation des Ac et le statut clinique des patients (Bond *et al.*, 1996, 1997; Gindzienska-Sieskiewicz *et al.*, 2007; Gudelj *et al.*, 2018b; Holland *et al.*, 2006; Parekh *et al.*, 1985; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhler *et al.*, 2015). Aucune étude n'a jusqu'à présent mis en évidence de corrélation entre la *N*-glycosylation des Ac et le pemphigus. Dans le cadre où certains patients atteignent la rémission alors qu'ils possèdent des aAc, nous cherchons à comprendre quels phénomènes sont impliqués dans la modification de la pathogénicité de ces aAc.

# OBJECTIFS

Le caractère pathogène des aAc dans le pemphigus a été confirmé par des expériences de transfert passif chez la souris et par l'observation de pemphigus néonataux chez des nouveaux nés dont la mère était atteinte de pemphigus (Anhalt *et al.*, 1982; Kardos *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016). Néanmoins, dans une étude clinique menée par le laboratoire sur une cohorte de patients traités soit par corticostéroïdes, soit par Rituximab, la présence d'aAc restait détectable à des titres relativement importants chez certains patients en rémission complète (Joly *et al.*, 2017; Maho-Vaillant *et al.*, 2021). A la suite de cette contradiction entre le statut clinique de ces patients et leur titre en aAc, nous avons cherché à comprendre pourquoi ces patients ne rechutaient pas alors qu'ils possédaient des titres forts en aAc. Une de nos hypothèses était que les aAc des patients en rémission n'étaient plus pathogènes et ne pouvaient donc pas induire la maladie.

Des changements de pathogénicité des aAc peuvent être causés par différents phénomènes tels qu'un changement de répertoire. En effet, des études ont démontré que la reconnaissance épitopique des IgG anti-DSG3 déterminait leur pathogénicité. Les IgG reconnaissant les ectodomains 1, 2 et 4 de la DSG3 sont capables d'induire une acantholyse contrairement à ceux reconnaissant les ectodomains 3 et 5 (Amagai *et al.*, 1992; Zenzo *et al.*, 2012). Des changements de la *N*-glycosylation ont été décrits comme pouvant modifier également la pathogénicité de l'Ac en altérant la fixation des IgG sur les FcγR ou en modifiant l'affinité de l'Ac pour son Ag (Coloma *et al.*, 1999; Leibiger *et al.*, 1999; Schroeder and Cavacini, 2010; Wallick *et al.*, 1988). Ainsi, des modifications de la *N*-glycosylation des IgG sériques et des aAc ont été décrites dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux systémique (Gudelj *et al.*, 2018b; Magorivska *et al.*, 2016; Parekh *et al.*, 1985; Rombouts *et al.*, 2015; Scherer *et al.*, 2010; Vučković *et al.*, 2015)..

Pour tester cette hypothèse de non-pathogénicité des IgG anti-DSG3 chez les patients en rémission, la pathogénicité et la *N*-glycosylation des IgG circulantes a d'abord été analysées longitudinalement chez des patients traités par corticostéroïdes qui maintenaient des titres élevés d'IgG anti-DSG3 tout au long de l'étude. Les IgG ont été analysées en phase active, en phase de rémission (6 mois après traitement) ainsi qu'à 1 et 2 ans après traitement lorsque certains patients rechutent.

Les aAc étant responsables des symptômes de la maladie, la deuxième partie de cette thèse a été focalisée sur leur étude et plus particulièrement sur les IgG anti-DSG3 qui sont les aAc les plus fréquemment retrouvés chez les patients après traitement. Leur pathogénicité a été tout d'abord testée longitudinalement, aux mêmes temps que pour les IgG sériques, puis le développement de méthodes d'analyse de leur répertoire et de leur *N*-glycosylation a été réalisé.

# RESULTATS

# Première partie : Etude longitudinale des immunoglobulines G dans le pemphigus

Le pemphigus est une maladie causée par la production d'aAc majoritairement d'isotype IgG dirigés contre les DSG 1 et 3 (Kasperkiewicz *et al.*, 2017). Ces aAc sont dits pathogènes c'est-à-dire qu'ils sont à l'origine des symptômes cliniques retrouvés chez les patients. Dans une précédente étude clinique menée par le laboratoire sur une cohorte de patients traités soit par corticostéroïdes, soit par Rituximab, une contradiction entre le statut clinique de ces patients et leur titre d'aAc a été observée. En effet, certains patients considérés en rémission complète gardaient des titres d'aAc relativement importants (Joly *et al.*, 2017; Maho-Vaillant *et al.*, 2021).

Afin de comprendre pourquoi ces patients ne rechutent pas alors qu'ils possédaient des titres forts d'aAc, nous avons posé l'hypothèse qu'une modification de la *N*-glycosylation des IgG des patients en rémission pouvait entraîner une perte de la pathogénicité des aAc. En effet, dans un grand nombre de MAI, des modifications de la *N*-glycosylation des IgG ont été relevées chez les patients en phase active comparés aux donneurs sains, indiquant un lien entre *N*-glycosylation et symptômes cliniques (Bond *et al.*, 1996, 1997; Gindzienska-Sieskiewicz *et al.*, 2007; Gudelj *et al.*, 2018b; Holland *et al.*, 2006; Parekh *et al.*, 1985; Vučković *et al.*, 2015). Dans un premier temps, une relation a été faite entre la pathogénicité *in vitro* de l'IgG anti-DSG3 monoclonale AK23 ainsi que des IgG de patients en phase active et leur *N*-glycosylation. Puis, la pathogénicité et la *N*-glycosylation des IgG circulantes provenant de 3 patients traités par corticostéroïdes ont été étudiées longitudinalement (phase active, 6 mois, 1 an et 2 ans après traitement). Ces patients ont été choisis en raison de leur titre élevé d'IgG anti-DSG3 au cours du temps, même lorsqu'ils étaient en rémission clinique.

Article accepté dans le journal MDPI *Biomedicines* :

**Longitudinal pathogenic properties and *N*-glycosylation profile of antibodies  
from patients with pemphigus after corticosteroid treatment**

**Marie Petit**, Marie-Laure Walet-Balieu, Damien Schapman, Marie-Laure Golinski, Carole  
Burel, Marion Barray, Laurent Drouot, Maud Maho-Vaillant, Vivien Hébert, Olivier Boyer,  
Muriel Bardor, Pascal Joly and Sébastien Calbo



Article

# Longitudinal Pathogenic Properties and N-glycosylation Profile of Antibodies from Patients with Pemphigus after Corticosteroid Treatment

Marie Petit <sup>1</sup>, Marie-Laure Walet-Balieu <sup>2</sup>, Damien Schapman <sup>3</sup>, Marie-Laure Golinski <sup>1,4</sup>, Carole Burel <sup>2</sup>, Marion Barray <sup>1</sup>, Laurent Drouot <sup>1</sup>, Maud Maho-Vaillant <sup>1,4</sup>, Vivien Hébert <sup>1,4</sup>, Olivier Boyer <sup>1</sup>, Muriel Bardor <sup>2,5</sup>, Pascal Joly <sup>1,4</sup> and Sébastien Calbo <sup>1,\*</sup>

**Citation:** Petit, M.; Walet-Balieu, M.-L.; Schapman, D.; Golinski, M.-L.; Burel, C.; Barray, M.; Drouot, L.; Maho-Vaillant, M.; Hébert, V.; Boyer, O.; et al. Longitudinal Pathogenic Properties and N-glycosylation Profile of Antibodies from Patients with Pemphigus after Corticosteroid Treatment. *Biomedicines* **2021**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Mario Dell'Agli

Received: 6 August 2021

Accepted: 4 October 2021

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> INSERM U1234, Normandie University, Rouen 76000, France; marie.petit1994@gmail.com (M.P.); marie-laure.golinski@chu-rouen.fr (M.-L.G.); marion.barray@hotmail.com (M.B.); Laurent.Drouot@univ-rouen.fr (L.D.); maud.maho@univ-rouen.fr (M.M.-V.); vivien.hebert@chu-rouen.fr (V.H.); olivier.boyer@chu-rouen.fr (O.B.); Pascal.Joly@chu-rouen.fr (P.J.)
  - <sup>2</sup> EA4358, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale (Glyco-MEV), Normandie University, Rouen 76821, France; marie-laure.walet-balieu@univ-rouen.fr (M.-L.W.-B.); carole.burel@univ-rouen.fr (C.B.); muriel.bardor@univ-rouen.fr (M.B.)
  - <sup>3</sup> PRIMACEN, Normandie University, Rouen 76821, France; damien.schapman@univ-rouen.fr
  - <sup>4</sup> Dermatology Department, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen 76000, France
  - <sup>5</sup> CNRS UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, University of Lille, Lille F-59000, France
- \* Correspondence: sebastien.calbo@univ-rouen.fr; Tel.: +33-2-35-14-85-57

**Abstract:** Pemphigus vulgaris is an autoimmune disease that occurs due to pathogenic autoantibodies that recognize the following epidermal adhesion proteins: desmogleins. Systemic corticosteroids usually decrease the titers of anti-desmoglein autoantibodies and improve patients' conditions. Since modifications of IgG N-glycosylation have been described in some autoimmune diseases, we hypothesized that changes in the pathogenic activity of pemphigus IgG could be related to changes in their N-glycosylation profile. The purpose of this study was to assess, longitudinally, the pathogenicity of pemphigus serum IgG and their N-glycosylation profile during phases of disease activity and clinical remission. The pathogenic activity of serum IgG was measured in vitro on immortalized keratinocytes, by immunofluorescence and dissociation assays, and IgG N-glycans were analyzed by mass spectrometry. We showed (i) a correlation between pemphigus clinical activity and the pathogenicity of serum IgG at baseline and at month 6, while the persistence of the in vitro pathogenic activity of IgG during its evolution, even in patients in clinical remission, seemed to be predictive of relapse; (ii) that modifications of the N-glycan structure were altered the in vitro pathogenicity of patients' autoantibodies; (iii) that the pathogenic properties of pemphigus IgG did not appear to be related to the disparity in IgG N-glycans during the course of pemphigus.

**Keywords:** autoantibodies; pemphigus; pathogenic; glycans

---

## 1. Introduction

Pemphigus vulgaris (PV) is a rare life-threatening autoimmune blistering disease of the skin and mucous membranes, with an estimated 0.6 (in Switzerland) to 10 (in Iran) individuals per 1 million people per year being affected worldwide [1]. PV is characterized by the production of pathogenic autoantibodies targeting desmoglein (DSG) 1 and 3, which are transmembrane glycoproteins of desmosomes that confer cell–cell adhesion within the epidermis [1]. The pathogenicity of circulating IgG antibodies from pemphigus patients has been confirmed by passive transfer experiments in mice [2, 3]. The observation of neonatal PV in newborns of mothers with PV corresponding to a passive transfer in humans, confirmed that autoantibodies are sufficient to cause the disease [4, 5]. Mechanistically, autoantibodies interfere with cell adhesion by steric hindrance of DSG adhesion, or induce DSG internalization either by autoantibody clustering or by cell signaling (mainly Src and p38 MAPK), which contribute to the loss of cell adhesion [6].

Among IgG isotypes, IgG4 is the least represented in the serum of normal individuals, corresponding to 5% of the total IgG [7]. Additionally, IgG4 is not able to activate complement via the classical pathway [8]. In contrast, there is a predominance of the IgG4 subclass in the serum of pemphigus patients, both in the DSG-specific IgG and among the total IgG [9, 10]. IgG1 anti-DSG Ab are also frequently detected, while IgG2 and IgG3 anti-DSG Ab are less frequently detected in patients with active pemphigus [11]. In patients in clinical remission, as in healthy relatives, anti-DSG IgG2 is the most frequently detected IgG subclass, and is sometimes associated with IgG1 or IgG4, while the combination of IgG1 and IgG4 anti-DSG Ab was not observed in any case [12]. Interestingly, altered *N*-glycosylation of IgG4 can activate complement via the lectin pathway in membranous nephropathy [13], as well as in rheumatoid arthritis (RA) [14].

IgG isotypes have a conserved *N*-linked glycosylation site located at Asn297 on the CH2 domain of the Fc region. The *N*-glycans located at this site contribute to the formation of a hydrophobic pocket on the Fc domain, which stabilizes the immunoglobulin structure [15]. The composition of IgG *N*-glycans varies according to the IgG isotype [16]. In particular, variations in terminal sialic acid substitution, galactose, bisecting *N*-acetylglucosamine, and fucosylation of the core have been reported [16]. These modifications of the *N*-glycan structures can affect and modulate antibody functions, such as the binding to Fc receptors on effector cells [17]. In addition to the conserved IgG Fc *N*-glycans, 15 to 25% of serum IgGs contain *N*-glycans within their variable domain. These so-called “Fab *N*-glycans” mainly consist of highly processed, complex-type biantennary *N*-glycans linked to *N*-glycosylation sites that emerge during somatic hypermutation [18]. The amounts and types of *N*-glycans linked to either the Fab or Fc parts of the IgG can vary during specific physiological and pathological conditions. Notably, it has been reported that alterations in IgG and autoantibody *N*-glycosylation were detected in many autoimmune diseases [19]; for instance, a decreased level of IgG galactosylation has been observed in systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease, and anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [20-22]. On the contrary, a high level of IgG

galactosylation and sialylation can induce anti-inflammatory activity, which might explain the persistence of circulating autoantibodies in some patients who are in clinical remission [19].

We previously demonstrated that around half of the PV patients treated with corticosteroids and/or immunosuppressants achieve complete remission off therapy [23, 24]. Nevertheless, some of these patients in complete remission still had detectable anti-DSG antibodies [25]. In the present study, we longitudinally analyzed IgG from PV patients at four different time points, in order to correlate the clinical status of the patients, the *in vitro* pathogenic activity of their serum IgG, and their *N*-glycans profile.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

The human immortalized keratinocyte cell line HaCaT was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) GlutaMAX, high glucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% FCS (fetal calf serum, Eurobio Scientific, Les Ulis, France), 50 U/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### 2.2. Sera and IgG Purification

Pemphigus sera were collected throughout a randomized clinical trial (RITUX 3: ClinicalTrials.gov number, NCT00784589); patients were treated with oral prednisone alone or a combination of rituximab and short-term prednisone regimen [24]. Anti-DSG1 and anti-DSG3 IgG antibody titers were measured by ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany). The mouse monoclonal antibody (mAb) AK23 was purified from AK23 hybridoma culture supernatant, kindly provided by Dr Masayuki Amagai (Keio University, Minato City, Tokyo, Japan). AK23 is an anti-DSG3 mAb generated in a PV mouse model that is pathogenic both *in vitro* and *in vivo* [26, 27]. AK23 mAb or serum IgG from anti-DSG3<sup>+</sup> patients or from healthy donors (HD) were purified by automated protein-G affinity purification on an ÄKTA Start chromatograph using HiTrap<sup>®</sup> Protein G High Performance (GE Healthcare Chicago, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Antibodies

The following antibodies were used in immunofluorescence assays: anti-DSG3 Alexa Fluor 647 (clone: 5H10; Santa Cruz, Dallas, Tx, USA), anti-flotillin-2 (Human Protein Atlas number: HPA001396; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) and then revealed by the secondary antibody Alexa Fluor 488 (Abcam, Cambridge, UK).

### 2.4. *In Vitro* Modification of The *N*-glycans of Purified IgG

For desialylation, 10 µg of AK23 mAb was incubated with 52.5 mU of neuraminidase from *Vibrio cholerae* (Sigma) for 120 h at 37 °C in a 50 mM sodium acetate buffer (pH 5). Enzyme and buffer were removed using Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters with cut-off of 100 kDa (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Fifty micrograms of patient's IgG was incubated with 37.5 mU for 120 h at 37 °C in a 50 mM sodium acetate buffer (pH 5). Enzymatic digestion efficiency was tested by Eastern blot using biotinylated conjugated *Maackia amurensis* lectin II

(MAL II, Bioworld, Dublin, OH, USA) or *Sambucus nigra* lectin (SNA, EBL, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA).

For degalactosylation, 10 µg of AK23 mAb was incubated with 28 mU of β-galactosidase from bovine testes (Sigma) for 72 h at 37 °C in a 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) (complete digestion). Enzyme and buffer were then removed using Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters with cut-off of 100 kDa (Merck Milipore, Burlington, MA, USA). Enzymatic digestion efficiency was tested by Eastern blot using biotinylated conjugated *Erythrina cristagalli* lectin (ECA, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA ).

### 2.5. Eastern Blot

IgG was loaded on a 4–12% SDS-PAGE gel under reducing conditions, transferred to nitrocellulose or PVDF membrane using the iBlot 2 Dry Blotting System (Thermo Fisher) and blocked with PBS–0.1% bovine serum albumin (BSA). Blots were incubated with biotinylated conjugated *Maackia amurensis* lectin II (0.4 µg/mL; MAL II, Bioworld, Dublin, OH, USA) or *Sambucus nigra* lectin (SNA/EBL, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) for sialic acid recognition or biotinylated conjugated *Erythrina cristagalli* lectin (1 µg/mL; ECA, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) for galactose recognition, followed by incubation with streptavidin–protein, DyLight 800 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and detection using an Odyssey scanner (LI-COR Biotechnology LI-COR, Lincoln, NE, USA ). *Sambucus nigra* lectin binds preferentially to sialic acid attached to terminal galactose in α-2,6 while *Maackia amurensis* II appears to bind sialic acid in an α-2,3 linkage.

### 2.6. Dispase-Based Dissociation Assay

HaCaT cells were seeded onto 24-well plates and cultured in DMEM GlutaMAX medium containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 10% FCS to confluence. Subsequently, cells were incubated for 24 h at 37 °C with 10 µg/mL purified AK23 mAb or 62.5 µg/mL purified IgG from PV patients or HD. Cells were then washed with Hanks' buffered saline solution (HBSS) 1× (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) complemented with 3 mM of CaCl<sub>2</sub> and incubated for 25 min with Dispase II (2.4 U/mL, Sigma) at 37 °C to detach them from the bottom of the plate. After washing with HBSS 1× complemented with 3 mM of CaCl<sub>2</sub> and 5% FCS, the cells were stained with crystal violet (Sigma) and a mechanical stress was applied by pipetting the cells 5–10 times with a P1000 pipette. The plates were centrifuged at 300× g at room temperature (RT) for 5 min and the number of cell fragments was counted. A picture of each well was taken with EVOS XL core (Invitrogen, Waltham, MA, USA) microscope ×2 magnification. For this dissociation assay, we systematically used AK23 mAb and IgG from HD as positive and negative controls, respectively. Variation in the total number of fragments obtained with AK23 mAb or IgG from HD was observed from one experiment to another. In order to quantify the pathogenicity of IgG, we developed a score of pathogenicity based on the number of fragments obtained. To create this score, we used the number of fragments obtained after mechanical stress of the layer of keratinocytes incubated with HD IgG and the one obtained after incubation with AK23 mAb or with patient IgG, whichever fragmented the most, as low and high limit of the score, respectively. We used AK23 mAb as the high limit for experiments with only AK23 mAb, but due to

its high pathogenicity, we used patient IgG as the high limit for the other experiments. In our score bar, 0 corresponded to the number of fragments below or equal to those obtained after incubation with IgG from HD; a score of 1 corresponded to the number of fragments between the number of fragments obtained after incubation with IgG from HD and 1/5 of the number of fragments obtained after incubation with AK23 mAb/patient IgG. Scores of 2, 3 and 4 corresponded to the number of fragments between 1/5 and 2/5, 2/5 and 3/5, 3/5 and 4/5 of the number of fragments obtained after incubation with AK23 mAb/patient IgG, respectively. Finally, a score of 5 corresponded to the number of fragments greater than 4/5 of the number of fragments obtained after incubation with AK23 mAb/patient IgG.

### 2.7. Immunofluorescence Assays

HaCaT cell line was seeded on glass coverslips with cell culture chambers (Nun Lab-Tek II Chamber Slide System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and cultured for at least 2 days in DMEM GlutaMAX medium containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 10% FCS and grown to confluence. Cells were treated with either IgG from PV patients' or HD serum for 20 h in DMEM GlutaMAX medium containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> without FCS. After removing the medium and washing with PBS 1× complemented with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> (Eurobio Scientific, Les Ulis, France), the cells were then fixed with ethanol 100% for 10 min at RT. The fixed cells were rinsed and permeabilized with Triton X-100 at 0.3% for 10 min (Sigma). After washing, cells were blocked for 30 min with 1% rat serum in PBS 1× at RT. Fluorescent-labeled antibodies staining DSG3 and flotillin-2, a protein associated with lipid microdomains that interact with desmosome proteins [28], were incubated for 1.5 h in the dark at RT in PBS 1× containing 1% BSA. Finally, coverslips were mounted with ProLong™ Diamond Antifade Mountant containing DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All samples were analyzed with a Leica SP8-UV confocal microscope.

### 2.8. Mass Spectrometry Analysis of IgG N-glycans

First, purified IgGs were deglycosylated by peptide N-glycosidase F (PNGase F, Roche, Bâle, Switzerland) digestion as previously reported [29]. Briefly, for PNGase F digestion, 0.5 mg of IgG was dissolved in 450 µL of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mM) and 50 µL of denaturing buffer containing 0.2% SDS and 100 mM of β-mercaptoethanol. The samples were heated for 10 min at 100 °C for protein denaturation. After cooling down, the digestion was performed with 10 units of PNGase F for 24 h at 37 °C. Finally, deglycosylated IgGs were precipitated by the addition of 4 volumes of ethanol overnight at -20 °C. After precipitation, the samples were centrifugated for 15 min at 4 °C at 11,400× g and the supernatant containing the released N-glycans was retrieved and placed in glass tubes for evaporation using an evaporator under gas flow. Then, the free N-glycans were permethylated as previously described [30]. The permethylated N-glycans were purified using C18 columns (Hypersep™ C18 Cartridges, 200 mg, 3 mL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). First, columns were conditioned by successive washing with 5 mL of methanol, 5 mL of water, 5 mL of acetonitrile and 5 mL of water. Permethylated samples were resuspended in 200 µL of a solution of methanol/water 50/50 (v/v) and were passed over the column. Successive elution with 2 mL of 15% (v/v), 35% (v/v), 50% (v/v) and 75% of acetonitrile

(*v/v*) were performed. Permethylated *N*-glycans were recovered in the 50% and 75% acetonitrile fractions. The resulting samples were dried in a Thermo Fisher SPD111 V SpeedVac® prior to analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization—time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; UltrafleXtreme time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Nd: YAG laser (355 nm wavelength), 2kHz smartbeam™-II [31]).

Samples were prepared for analysis as a mixture with dihydroxybenzoic acid (DHB) used as matrix. This matrix was freshly dissolved in 20 mg/mL of an 80% methanol solution. Permethylated *N*-glycans were solubilized in an acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid 70/30 *v/v*. Samples and matrix were spotted in ratio 1/1 *v/v*. These spectra were recorded in reflectron positive mode with an accumulation of minima 10,000 shots with FlexControl 3.4 software. Mass spectra were acquired using a mass range *m/z* 900–4500 and analyzed with FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Based on the *m/z* ratio and report from the literature on IgG *N*-glycosylation, each ion was associated with an *N*-glycan structure, which were drawn according to the international nomenclature recently updated [32].

To calculate the relative percentage of *N*-glycan intensity, the averages of particular *N*-glycosylation features (galactosylation, fucosylation, sialylation, additional *N*-acetylglucosamine) have been made from different individual *N*-glycan structures and their percentages have been calculated using the sum of the intensity of all the *N*-glycan species in the sample as 100%.

## 2.9. Statistical Analysis

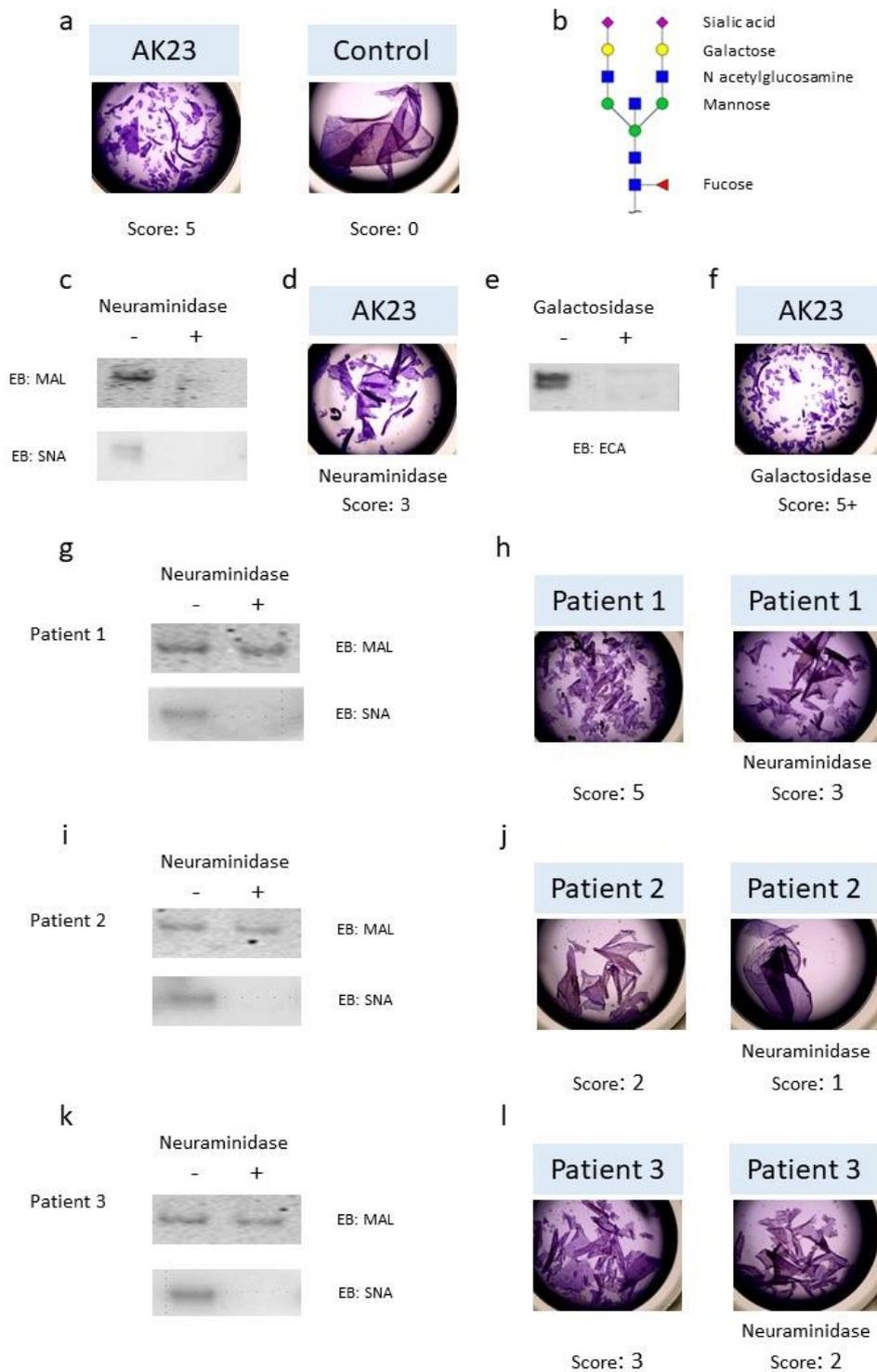
All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using an unpaired, non-parametric, Mann–Whitney test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Role of *N*-glycans in IgG Pathogenic Activity

The incubation of AK23 mAb on cell sheets of HaCaT cells resulted in the dissociation of the cell sheets in small fragments, while the cell sheets incubated with the control IgG from healthy donors (HD) exhibited minimal dissociation (Figure 1a). The typical *N*-glycan structure is shown in Figure 1b, with sialic acid that could be present, or not, on the terminal extremity of the *N*-glycan attached to the IgG. In order to evaluate the role of *N*-glycans in the pathogenic activity of autoantibodies, AK23 mAb was treated sequentially with neuraminidase, in order to remove sialic acids, and then by galactosidase to remove terminal galactose residues. Eastern blot analysis, using *Maackia amurensis* (MAL) or *Sambucus nigra* (SNA) lectin, and *Erythrina cristagalli* (ECA) lectins, showed complete digestion with neuraminidase (Figure 1c) and galactosidase (Figure 1e), respectively. The pathogenic activity of modified AK23 mAb was then measured in vitro on an HaCaT cell sheet. The AK23 mAb with no sialic acid dissociated the cell sheet  $2.05 \pm 0.63$ -fold less than the native AK23 mAb ( $n = 3$ ) (Figure 1d), suggesting that the *N*-glycans present on AK23 mAb could modify its pathogenicity. In contrast, the AK23 mAb with no galactose dissociated the cell sheet more efficiently than the native AK23 mAb (Figure 1f). Purified IgGs, from patients with active pemphigus, were then treated by neuraminidase. Eastern blot analysis with MAL

showed partial digestion, but the use of SNA lectin showed complete digestion in all three of the patients analyzed (Figure 1g, i, k). The sialic acid-depleted patients' IgG dissociated the HaCaT cell sheet less than the patients' native IgG (Figure 1h, j, l). Altogether, these results demonstrated that the *N*-glycans expressed by the patients' IgG modified their pathogenic activity *in vitro*.



**Figure 1.** Pathogenicity of monoclonal antibody AK23 and pemphigus patients' IgG collected during the active phase after the removal of sialic acid and galactose. (a) Monolayers of HaCaT cells were treated with monoclonal antibody AK23 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or with purified IgG (62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from healthy donors for 24 h. Dispase-based dissociation assay and calculation of the score were performed as described in the

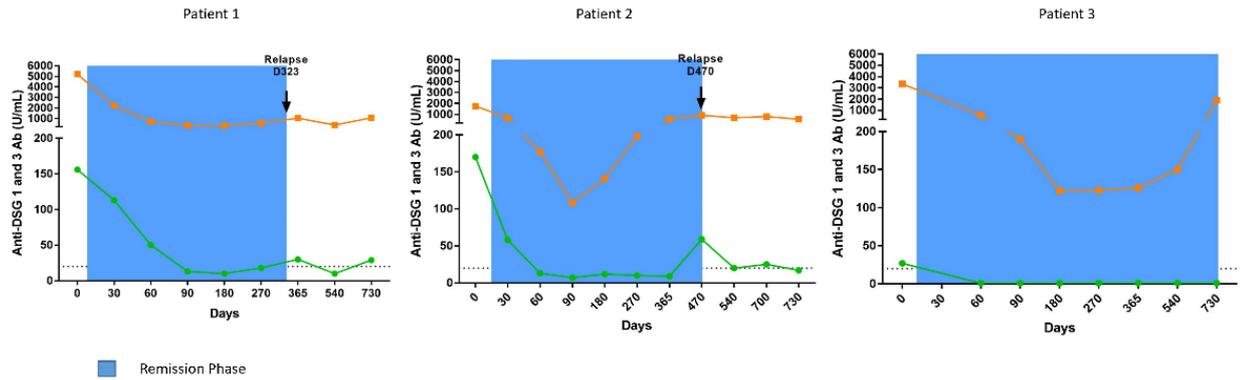
section 2.6. (b) Typical sialylated *N*-glycan structure on IgG bearing a bisecting *N*-acetylglucosamine residue. (c) AK23 were treated by neuraminidase (+) or not (-) to remove sialic acid and digestion was verified by Eastern blot using *Maackia amurensis* lectin (MAL II) or Sambucus nigra lectin (SNA). (d) Monolayers of HaCaT cells were treated with AK23 lacking sialic acid (10 µg/mL). (e) AK23 were treated with galactosidase (+) or not (-) to remove galactose and digestion was verified by Eastern blot using *Erythrina cristagalli* lectin (ECA). (f) Monolayers of HaCaT cells were treated with AK23 lacking galactose (10 µg/mL). One experiment representative of three is shown. Patients' IgG from active phase were treated (+) or not (-) with neuraminidase to remove sialic acid and digestion was verified by Eastern blot (patient 1 in (g), patient 2 in (i) and patient 3 in (k)). Monolayers of HaCaT cells were treated with purified IgG collected during the active phase lacking (right) or not (left) sialic acid (62.5 µg/mL) (patient 1 in (h), patient 2 in (j), patient 3 in (l)). Pictures were taken with EVOS XL core microscope magnification ×2.

### 3.2. Pathogenic Activity of IgG Antibodies from Patients with Pemphigus

Pemphigus sera were collected from a randomized clinical trial, in which 45 patients were treated with corticosteroids. Of these, 11 patients still had detectable anti-DSG3 IgGs at the following time points analyzed: day 0, day 180, day 365, and day 730. Only 7 of these 11 sera were available in sufficient quantity for the experiments. Of the seven patients, two achieved complete remission during the course of the study, and we analyzed one of these two sera (patient 3) because it contained high titers of anti DSG3 Abs. The other five patients were in incomplete remission and relapsed several times. Similarly, we selected the two of these five sera that contained the highest titers of anti-DSG3 Abs (patients 1 and 2). Purified IgGs from three pemphigus patients were studied longitudinally, from day 0 to day 730. The main patients' baseline characteristics are shown in Table 1. All the patients had a mucocutaneous PV. The evolution of corticosteroid doses and anti-DSG antibodies are shown in Supplemental Figure S1 and Figure S2, respectively.

**Table 1.** Baseline characteristics of patients with pemphigus treated with corticosteroids.

Patients	3
Age, mean	69.4
Sex	
Female	2
Male	1
BMI, mean	24.46
Type of pemphigus	
Vulgaris	3
Foliaceus	0
Initial Presentation	
Mucosal	0
Cutaneous	0
Mucocutaneous	3
PDAI score, mean	45.6
Treatment	corticosteroids



All three patients initially had a major drop in anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody levels after the start of treatment, corresponding to between a 91.7% and 100% reduction, relative to the baseline, followed by the progressive re-increase in their anti-DSG3 antibodies before the occurrence of relapses from day 365 to day 730 (Figure 2).

**Figure 2.** Evolution of anti-DSG1 (green) and anti-DSG3 (orange) antibody titers in sera from pemphigus patients treated with corticosteroids. Anti-DSG1 and anti-DSG3 IgG antibody titers were measured by ELISA. Dashed line represents the cut-off values proposed by the manufacturer for anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody ELISA values. The remission phase is indicated in blue.

The *in vitro* pathogenic activity of purified serum IgG was then tested by the following two different *in vitro* methods: the dispase-based dissociation assay, as described above, and using an immunofluorescence assay on the HaCaT cell line. For the latter, the presence of autoantibodies leads to a loss in the detection of DSG3 and a redistribution of the cytoskeleton, as observed with the flotillin-2 staining. IgGs from five HD were used as the control (Figure 3a).

### 3.2.1. Patient 1

The patients' serum collected during the active phase of the disease (at day 0) induced a loss in DSG3 staining by immunofluorescence, a redistribution of flotillin-2, and fragmentation of the cell monolayer, indicating that the serum IgGs were pathogenic (Figure 3b). At day 180, when the patient was in clinical remission, with a 93.7% decrease in anti-DSG3 antibodies, his IgG did not induce fragmentation of the cell layer anymore, and a nice staining of the DSG3 was observed, while a slight redistribution of flotillin-2 was still observed, indicating that the patient's IgGs had lost most of their pathogenic properties. The patient relapsed at day 365, and the immunofluorescence and cell dissociation assays performed at the time of relapse showed that the IgGs were pathogenic again. Finally, the patient's serum IgGs that were collected at the latest evaluation at day 730, when the patient was in clinical remission again, did not show any pathogenic activity, while, surprisingly, the anti-DSG3 IgG ELISA values of the two sera collected at day 365 (relapse) and day 730 (remission) were very close (1040 vs. 1070 IU/mL). This patient further relapsed between day 730 and day 1080, corresponding to the 12-month evaluation after the end of the study.

### 3.2.2. Patient 2

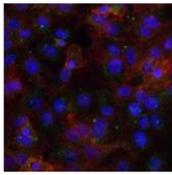
The patient serum IgG collected at the baseline evaluation contained high titers of anti-DSG3 antibodies, and induced disruption of the DSG3 staining and cell layer fragmentation (Figure 3c). At the day 180 evaluation, the anti-DSG3 ELISA values dropped down from 1750 IU/mL at baseline to 141 IU/mL. A slight redistribution of flotillin-2 was still visible, while a certain reappearance of the DSG3 staining was observed, as compared with the baseline serum IgG sample. The patient further relapsed at day 470. The patient serum IgG was collected at day 730 and still had pathogenic activity, which was in accordance with the occurrence of a second relapse between day 730 and day 1080.

### 3.2.3. Patient 3

At baseline, the patient's serum IgGs were pathogenic, as demonstrated by the loss of DSG3 staining, redistribution of flotillin-2, and fragmentation of the cell layer (Figure 3d). At day 180, when the patient was in clinical remission after treatment, the DSG3 staining reappeared and the cell layer was not fragmented anymore, indicating that the IgGs were no longer pathogenic. At days 365 and 730, while the patient was in sustained clinical remission, his serum IgG showed variable signs of *in vitro* pathogenic activity in the cell layer fragmentation test, and DSG3 and flotillin-2 immunofluorescence assays. This patient further relapsed at day 820.

Overall, these results showed a strong correlation between clinical activity, serum anti-DSG3 antibodies titers, and demonstration of the *in vitro* pathogenic activity of serum IgG at the onset of pemphigus, while the achievement of clinical remission under treatment, at month 6, was also strongly correlated with a drop in anti-DSG antibodies, and a loss of the pathogenic activity of patients' IgG. Interestingly, a persistent pathogenicity of serum IgG was observed in patients 2 and 3, who were in clinical remission at the time that their sera were studied, but who further relapsed within a few months after the evaluation of their sera. Finally, no pathogenic activity was detected at the day 730 evaluation of the serum from patient 1, despite persistent high titers of anti-DSG3 antibodies. Unfortunately, no serum from this patient was collected during the period from the day 730 evaluation to the time of relapse, which did not allow us to assess the pathogenic activity of IgGs closer to the time of relapse.

a  
Healthy Donor



Score  
0

b

Patient 1

	D0	D180	D365	D730
Clinical Status	Active phase	Remission on treatment	Relapse on D323	Remission on treatment
Score	5	0	2	0
Anti-DSG3	5217	330	1040	1070

c

Patient 2

	D0	D180	D365	D730
Clinical Status	Active phase	Remission on treatment	Relapse on D470	Remission on treatment
Score	2	2	2	4
Anti-DSG3	1750	141	550	555

d

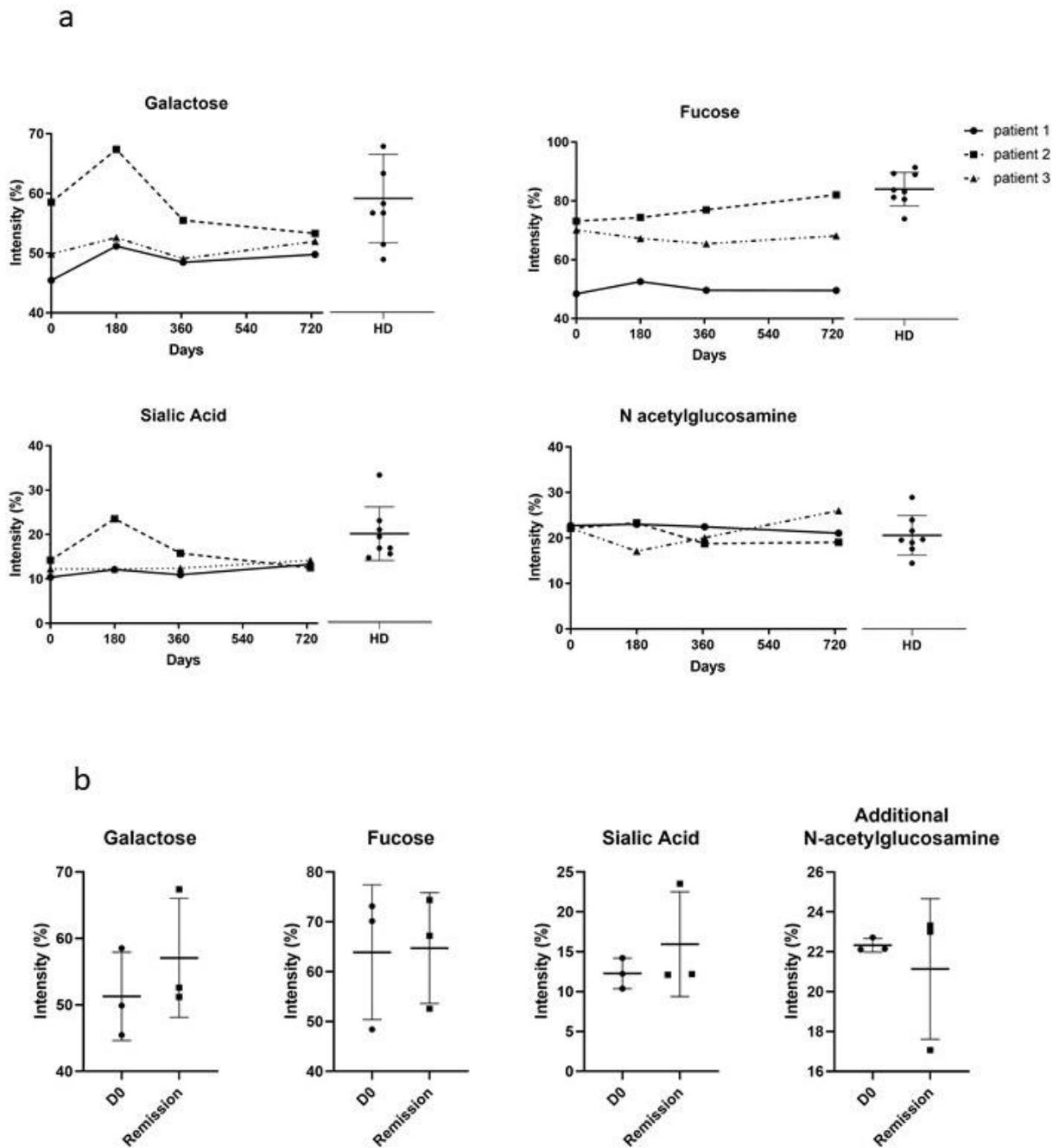
Patient 3

	D0	D180	D365	D730
Clinical Status	Active phase	Remission on treatment	Remission on treatment	Remission off treatment
Score	2	0	0	3
Anti-DSG3	3350	122	126	1900

**Figure 3.** Longitudinal study of IgG pathogenicity. Pathogenicity of IgG from healthy donors (a) and three different pemphigus patients (b–d) were studied longitudinally by dispase-based dissociation assay and immunofluorescence. For the dispase-based assay, monolayers of HaCaT cells were treated with 62.5 µg/mL of purified IgG from healthy donors or pemphigus patients for 24 h. For immunofluorescence, cells were treated with 62.5 µg/mL of purified IgG from healthy donors or pemphigus patients for 20 h. Then cells were fixed and immuno-stained for DSG3 (red) and flotillin-2 (green). DAPI was used for nuclear staining (blue). Healthy donors:  $n = 5$ ; patients:  $n = 3$ . Five images were taken for each condition, in two independent experiments. Pictures were taken with a Leica SP8-UV confocal microscope magnification  $\times 40$ .

### 3.3. IgG *N*-glycosylation Profiles

Because IgG *N*-glycosylation is altered in autoimmune and chronic inflammatory diseases, and modulates the immune response [33], we studied the *N*-glycosylation profiles of purified IgGs from eight HD and three PV patients, and analyzed their evolution during the course of the disease, at day 0, day 180, day 365, and day 730 (Figure 4a). The *N*-glycans on purified IgGs from HD and PV patients were enzymatically released, purified, and permethylated prior to MALDI-TOF MS analysis (Supplemental Figures S2 and S3). Particular attention was paid to the different *N*-glycan structures, including the ones bearing galactose, fucose, sialic acid, and additional *N*-acetylglucosamine residues. First, we longitudinally analyzed the proportion of galactose, fucose, sialic acid, and additional *N*-acetylglucosamine in all the patients. We showed that IgG *N*-glycans varied depending on the patient and their evolution, but that *N*-glycans were relatively stable over the course of pemphigus in each patient, and were in the range of the variation observed in HD (Figure 4a). Second, we compared the relative proportions of the different substitutions (galactose, fucose, sialic acid, and additional *N*-acetylglucosamine) between the samples collected in patients at day 0 (active disease) and at day 180 (clinical remission) (Figure 4b). No significant difference was observed for galactose, fucose, sialic acid, and additional *N*-acetylglucosamine ( $51 \pm 7\%$  vs.  $57 \pm 9\%$ ,  $p = 0.42$ ;  $64 \pm 14\%$  vs.  $65 \pm 11\%$ ,  $p = 0.93$ ;  $12 \pm 2\%$  vs.  $16 \pm 7\%$ ,  $p = 0.40$ ;  $22 \pm 0\%$  vs.  $21 \pm 4\%$ ,  $p = 0.60$ , respectively). Altogether, we did not find evidence for a correlation between the IgG *N*-glycans profile in the active phase and in the remission phase of pemphigus.



**Figure 4.** Study of the *N*-glycan profiles of IgG. (a) Comparison of the IgG galactosylation, fucosylation, sialylation and presence of additional *N*-acetylglucosamine in healthy donors (HD) and pemphigus patients in active phase (D0). (b) Comparison of the IgG galactosylation, fucosylation, sialylation and presence of additional *N*-acetylglucosamine in active (D0) and remission phase of pemphigus patients. HD:  $n = 8$ ; patients:  $n = 3$ .

#### 4. Discussion

In this study, we showed that (i) modifications of the *N*-glycan structure of patients' IgG or the AK23 anti-DSG3 mAb modified its *in vitro* pathogenicity; (ii) IgG *N*-glycans profiles seemed to be relatively stable during the course of pemphigus, and did not seem to be correlated with the *in vitro* pathogenic effects.

Antibody Fc *N*-glycosylation can modify the function of antibodies by determining which Fc receptors they can bind to, in order to recruit effector cells. Modifications in *N*-glycosylation are thus a critical

mechanism for improving the therapeutic efficacy of antibodies, by increasing their effector function, as demonstrated by the increase in the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of non-fucosylated rituximab [34]. Distinct vaccine regimens have been demonstrated to induce different antigen-specific IgG *N*-glycosylation profiles, suggesting that antibody *N*-glycosylation can be modified by various inflammatory signals during B cell priming [35, 36]. A shift in patients' antibodies to a highly inflammatory *N*-glycosylation profile, characterized by galactosylation, has been shown in various autoimmune diseases, such as RA, SLE, and autoimmune vasculitis [20,22,37,38], indicating a pathogenic effect of low galactose levels.

In the present study, we did not observe any major difference in the galactosylation level between patients' IgG and HD IgG, as well for sialic acid, fucose, and *N*-acetylglucosamine, for the duration of the study (Figure 4a). However, a low level of IgG sialylation has been reported in patients with RA and various autoimmune diseases [37-42], while IgG sialic acid has an anti-inflammatory role in RA [37, 38]. Unfortunately, the evolution of these modifications of IgG sialic acid in patients with RA have not been studied after treatment. Similarly, the *N*-glycosylation profile of IgG in other autoimmune diseases has only been studied in patients with active diseases, but not after the start of treatment. Such a longitudinal analysis of the serum IgG *N*-glycome over several years has been reported in HD. It showed that despite the fact that high inter-individual variability was observed, only small changes could be detected in a single person [39]. These findings suggest that the few changes we observed at different time points, in the three patients of our study, were likely related to their clinical status under treatment.

We showed that the *in vitro* pathogenic activity of AK23 mAb and that of the patients' serum IgG were reduced by sialic acid removal, which might appear to be somewhat contradictory to the decreased usage of sialic acid in patients with active autoimmune disease (Figure 1). This discrepancy might be explained by a differential effect *in vivo* and *in vitro*. Indeed, sialylated IgGs have a lower affinity to the Fc receptors that reduce their ability to induce ADCC. Terminal sialylation confers anti-inflammatory effects *in vivo* [40], while, *in vitro*, anti-DSG3 antibodies can directly interfere with cell adhesion by steric hindrance of DSG adhesion or its internalization [6]. Interestingly, AK23 mAb has a putative *N*-glycosylation site in its CDR2, which could affect its affinity to DSG3 following neuraminidase digestion. In addition, the treatment of AK23 with galactosidase restored its pathogenic activity, indicating that the pathogenic activity of AK23 can be modified differently according to the various substitutions in its *N*-glycans. This highly suggests that modifications of the *N*-glycosylation of AK23 may affect its affinity for DSG3, either directly, by modifying the antigen binding site, or indirectly, by modifying the antibody structure [16, 43-45].

We then studied a potential relationship between the *in vitro* pathogenic activity of the patients' IgG, their *N*-glycan profiles, and pemphigus clinical activity. During the acute phase of the disease, clinical severity was well correlated with high titers of anti-DSG3 antibodies, and a strong *in vitro* pathogenic activity of patients' serum IgG (Figure 3). At day 180, at the end of the initial treatment phase, a strong correlation was also observed between the achievement of clinical remission, low titers of anti-DSG3 antibodies, and the decrease or loss of the pathogenicity of serum IgG (Figure 3). Interestingly, pathogenic activity was detected in

two of three sera (patients 2 and 3), while these patients were still in clinical remission, corresponding to a few months before the time at which a relapse occurred. No pathogenic activity was detected at the day 730 evaluation in the serum from patient 1, despite the fact that this serum contained high levels of anti-DSG3 antibodies. Unfortunately, no serum was collected from this patient from the last evaluation at day 730 to the time at which the patient relapsed (Figure 3). There were no differences in the IgG *N*-glycans profiles between the three patients, which allows us to associate the pathogenic activity of purified IgG to a particular *N*-glycans profile (Figure 4a).

Apart from the well-documented changes in IgG Fc *N*-glycosylation during inflammation, *N*-glycans attached to Fab might also have a role in modulating autoantibody activity [18]. Putative *N*-glycosylation sites in the Fab might not always become glycosylated, but Fab *N*-glycosylation has been found to either enhance or prevent antigen binding [43]. In mice, it has been shown that Fab *N*-glycosylation can prevent potentially autoreactive antibodies from becoming autoreactive, by lowering their affinity for self-antigens [46]. However, in patients with RA, the presence of such changes has not been shown to correlate with disease development or the resolution of inflammation [47].

In this study, the changes observed in the activity of AK23 mAb on the keratinocyte cell line were strikingly dependent upon whether the sialic acids or the galactoses were removed. We hypothesize that these observations, in the absence of complement or any Fc receptor-expressing cells, might be related to Fab glycosylation. It would have been of great interest to be able to purify anti-DSG3 antibodies from the patients' sera, in order to compare *N*-glycans associated with the Fc domain or the Fab. Unfortunately, the quantity of *N*-glycans from the anti-DSG3 IgGs recovered from the DSG3 affinity column was not sufficient to obtain an interpretable mass spectrum. The limited quantity of serum available, and the sensitivity of the technic used, did not allow us to successfully perform these experiments on purified anti-DSG autoantibodies.

One limitation of our study is that the assays used to measure the pathogenic activity of autoantibodies were performed *in vitro*, in the absence of complement and Fc receptor-expressing cells, whereas altered *N*-glycosylation can modify the complement pathway [13] or the binding to the Fc receptor [17]. One may hypothesize that the use of an *in vivo* passive transfer neonatal mouse model might have provided different results regarding the relatively stable *N*-glycan profile during the evolution of patients that we evidenced in the present study.

Overall, this study showed that the pathogenic activity of serum IgG from patients with pemphigus was closely correlated with the evolution of clinical lesions during the initial phase of treatment. Thereafter, the persistence or reappearance of the pathogenic activity of serum IgGs in patients in clinical remission seems to be predictive of relapse. The *N*-glycan profile of pemphigus IgG is different from that of HD, but seems to be relatively stable during the evolution, although inter-individual variations could be observed.

**The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1).** Figure S1. Evolution of prednisone doses (mg/day), from D0 to D730. Plain line with circle = patient 1; dashed line with square = patient 2; dotted line with triangle = patient 3. Figure S2. Example of a mass spectrum of IgG Fc *N*-glycan from healthy donor. Blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; green circle, mannose; yellow circle, galactose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid. Glycans are

drawn according to the international nomenclature recently updated [32]. Figure S3. Example of mass spectrum obtained for IgG Fc N-glycans from a pemphigus patient at D0. Blue square, N-acetylglucosamine; red triangle, fucose; green circle, mannose; yellow circle, galactose; purple diamond, N-acetylneuraminic acid that belongs to the sialic acids. Glycans are drawn according to the international nomenclature recently updated [32].

**Author Contributions:** Conceptualization, P.J. and S.C.; methodology, M.P., M.-L.W.-B., M.-L.G., C.B., M.Barray., L.D., M.M.-V. and M.Bardor.; software, M.P., D.S. and S.C.; formal analysis, M.P. and S.C.; writing—original draft preparation, M.P.; writing—review and editing, M.P., M.-L.W.-B., V.H., O.B., M.Bardor., P.J. and S.C.; supervision, P.J. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by INSERM, University of Rouen Normandie and Rouen University Hospital, Department of Dermatology, France.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of ClinicalTrials.gov (NCT00784589, 4 November 2008).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** all data are available upon request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

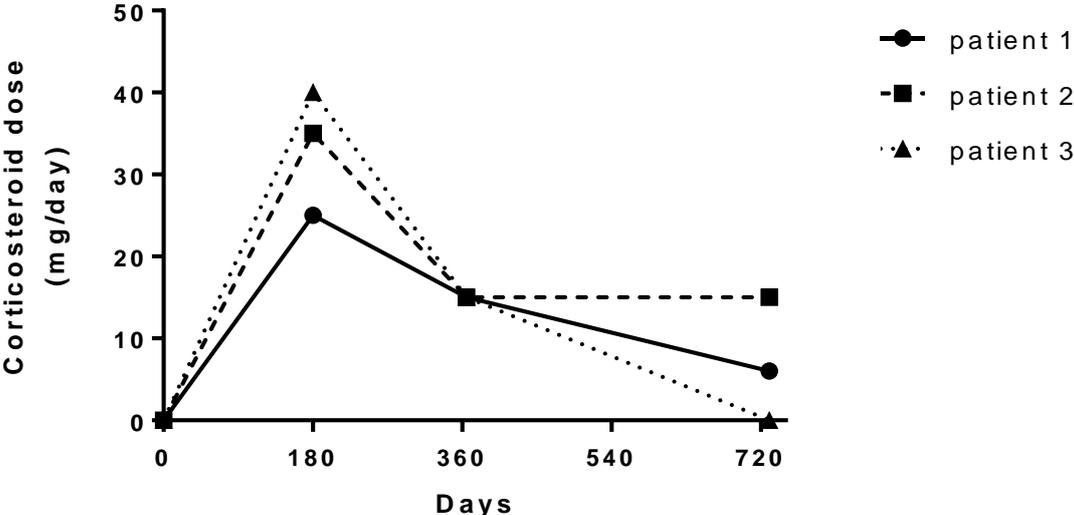
1. Schmidt, E., M. Kasperkiewicz and P. Joly. "Pemphigus." *Lancet* 394 (2019): 882-94. 10.1016/S0140-6736(19)31778-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31498102>.
2. Anhalt, G. J., R. S. Labib, J. J. Voorhees, T. F. Beals and L. A. Diaz. "Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of igg from patients with the disease." *N Engl J Med* 306 (1982): 1189-96. 10.1056/NEJM198205203062001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7040962>.
3. Roscoe, J. T., L. Diaz, S. A. Sampaio, R. M. Castro, R. S. Labib, Y. Takahashi, H. Patel and G. J. Anhalt. "Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to balb/c mice by passive transfer." *J Invest Dermatol* 85 (1985): 538-41. 10.1111/1523-1747.ep12277362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905977>.
4. Drerup, K. and R. Folster-Holst. "Neonatal pemphigus vulgaris." *J Dtsch Dermatol Ges* 18 (2020): 749-53. 10.1111/ddg.14095. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32346956>.
5. Kardos, M., D. Levine, H. M. Gurcan and R. A. Ahmed. "Pemphigus vulgaris in pregnancy: Analysis of current data on the management and outcomes." *Obstet Gynecol Surv* 64 (2009): 739-49. 10.1097/OGX.0b013e3181bea089. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849866>.
6. Hammers, C. M. and J. R. Stanley. "Mechanisms of disease: Pemphigus and bullous pemphigoid." *Annu Rev Pathol* 11 (2016): 175-97. 10.1146/annurev-pathol-012615-044313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907530>.
7. Koneczny, I. "A new classification system for igg4 autoantibodies." *Front Immunol* 9 (2018): 97. 10.3389/fimmu.2018.00097. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29483905>.
8. Schroeder, H. W., Jr. and L. Cavacini. "Structure and function of immunoglobulins." *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010): S41-52. 10.1016/j.jaci.2009.09.046. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176268>.
9. Funakoshi, T., L. Lunardon, C. T. Ellebrecht, A. R. Nagler, C. E. O'Leary and A. S. Payne. "Enrichment of total serum igg4 in patients with pemphigus." *Br J Dermatol* 167 (2012): 1245-53. 10.1111/j.1365-2133.2012.11144.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22803659>.
10. Kricheli, D., M. David, M. Frusic-Zlotkin, D. Goldsmith, M. Rabinov, J. Sulkes and Y. Milner. "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 (2000): 337-42. 10.1046/j.1365-2133.2000.03659.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951142>.
11. Futei, Y., M. Amagai, K. Ishii, K. Kuroda-Kinoshita, K. Ohya and T. Nishikawa. "Predominant igg4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus." *J Dermatol Sci* 26 (2001): 55-61. 10.1016/s0923-1811(00)00158-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323221>.

12. Torzecka, J. D., K. Wozniak, C. Kowalewski, E. Waszczykowska, A. Sysa-Jedrzejowska, H. H. Pas and J. Narbutt. "Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: Coincidental phenomenon with a risk of disease development?" *Arch Dermatol Res* 299 (2007): 239-43. 10.1007/s00403-007-0760-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534636>.
13. Haddad, G., J. M. Lorenzen, H. Ma, N. de Haan, H. Seeger, C. Zaghrini, S. Brandt, M. Kolling, U. Wegmann, B. Kiss, *et al.* "Altered glycosylation of igg4 promotes lectin complement pathway activation in anti-pla2r1-associated membranous nephropathy." *J Clin Invest* 131 (2021): 10.1172/JCI140453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33351779>.
14. Malhotra, R., M. R. Wormald, P. M. Rudd, P. B. Fischer, R. A. Dwek and R. B. Sim. "Glycosylation changes of igg associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein." *Nat Med* 1 (1995): 237-43. 10.1038/nm0395-237. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585040>.
15. Liu, H., G. G. Bulseco and J. Sun. "Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody." *Immunol Lett* 106 (2006): 144-53. 10.1016/j.imlet.2006.05.011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831470>.
16. Arnold, J. N., M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd and R. A. Dwek. "The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins." *Annu Rev Immunol* 25 (2007): 21-50. 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029568>.
17. Shields, R. L., J. Lai, R. Keck, L. Y. O'Connell, K. Hong, Y. G. Meng, S. H. Weikert and L. G. Presta. "Lack of fucose on human igg1 n-linked oligosaccharide improves binding to human fcgamma riii and antibody-dependent cellular toxicity." *J Biol Chem* 277 (2002): 26733-40. 10.1074/jbc.M202069200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986321>.
18. van de Bovenkamp, F. S., L. Hafkenscheid, T. Rispens and Y. Rombouts. "The emerging importance of igg fab glycosylation in immunity." *J Immunol* 196 (2016): 1435-41. 10.4049/jimmunol.1502136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851295>.
19. Seeling, M., C. Bruckner and F. Nimmerjahn. "Differential antibody glycosylation in autoimmunity: Sweet biomarker or modulator of disease activity?" *Nat Rev Rheumatol* 13 (2017): 621-30. 10.1038/nrrheum.2017.146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28905852>.
20. Kemna, M. J., R. Plomp, P. van Paassen, C. A. M. Koeleman, B. C. Jansen, J. Damoiseaux, J. W. Cohen Tervaert and M. Wuhler. "Galactosylation and sialylation levels of igg predict relapse in patients with pr3-anca associated vasculitis." *EBioMedicine* 17 (2017): 108-18. 10.1016/j.ebiom.2017.01.033. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28169190>.
21. Miyoshi, E., S. Shinzaki, H. Fujii, H. Iijima, Y. Kamada and T. Takehara. "Role of aberrant igg glycosylation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Proteomics Clin Appl* 10 (2016): 384-90. 10.1002/prca.201500089. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26427763>.
22. Vuckovic, F., J. Kristic, I. Gudelj, M. Teruel, T. Keser, M. Pezer, M. Pucic-Bakovic, J. Stambuk, I. Trbojevic-Akmacic, C. Barrios, *et al.* "Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the igg glycome." *Arthritis Rheumatol* 67 (2015): 2978-89. 10.1002/art.39273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26200652>.
23. Almugairen, N., V. Hospital, C. Bedane, S. Duvert-Lehembre, D. Picard, A. F. Tronquoy, E. Houivet, M. D'Incan and P. Joly. "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 (2013): 583-8. 10.1016/j.jaad.2013.05.016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850258>.
24. Joly, P., M. Maho-Vaillant, C. Prost-Squarcioni, V. Hebert, E. Houivet, S. Calbo, F. Caillot, M. L. Golinski, B. Labeille, C. Picard-Dahan, *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* 389 (2017): 2031-40. 10.1016/S0140-6736(17)30070-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28342637>.
25. Maho-Vaillant, M., C. Perals, M. L. Golinski, V. Hebert, F. Caillot, C. Mignard, G. Riou, M. Petit, M. Viguier, M. Hertl, *et al.* "Rituximab and corticosteroid effect on desmoglein-specific b-cells and desmoglein-specific t-follicular-helper-cells in pemphigus." *J Invest Dermatol* (2021): 10.1016/j.jid.2021.01.031. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33766510>.
26. Ishii, K., R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto and M. Amagai. "In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 igg autoantibodies in pemphigus vulgaris." *J Invest Dermatol* 124 (2005): 939-46. 10.1111/j.0022-202X.2005.23714.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854034>.
27. Tsunoda, K., T. Ota, M. Aoki, T. Yamada, T. Nagai, T. Nakagawa, S. Koyasu, T. Nishikawa and M. Amagai. "Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3." *J Immunol* 170 (2003): 2170-8. 10.4049/jimmunol.170.4.2170. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574390>.

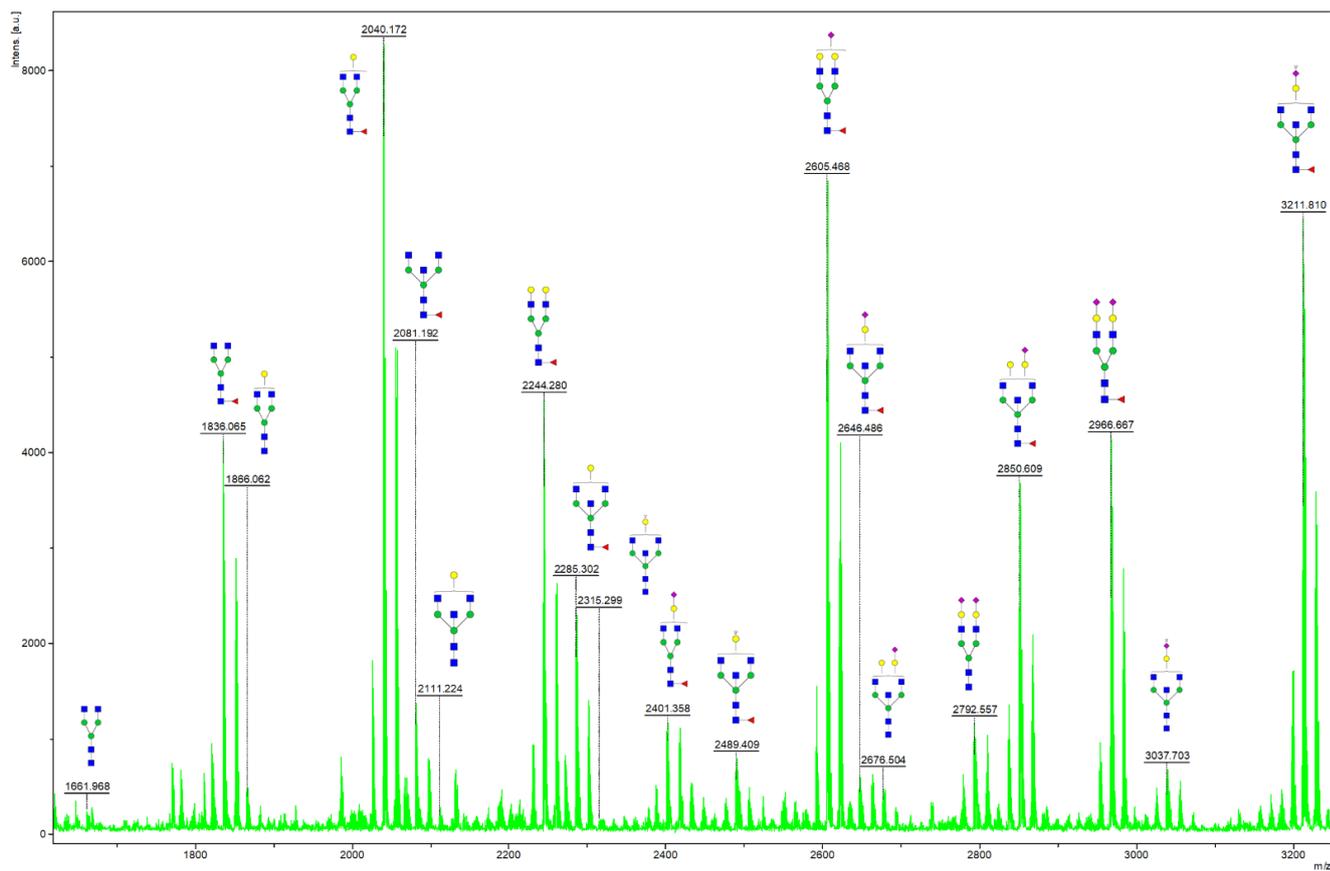
28. Vollner, F., J. Ali, N. Kurrle, Y. Exner, R. Eming, M. Hertl, A. Banning and R. Tikkanen. "Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes." *Sci Rep* 6 (2016): 28820. 10.1038/srep28820. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27346727>.
29. Ho, S. C., M. Bardor, H. Feng, Mariati, Y. W. Tong, Z. Song, M. G. Yap and Y. Yang. "Ires-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing cho cell lines." *J Biotechnol* 157 (2012): 130-9. 10.1016/j.jbiotec.2011.09.023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024589>.
30. Vanier, G., P. L. Lucas, C. Loutelier-Bourhis, J. Vanier, C. Plasson, M. L. Walet-Balieu, P. C. Tchi-Song, I. Remy-Jouet, V. Richard, S. Bernard, *et al.* "Heterologous expression of the n-acetylglucosaminyltransferase i dictates a reinvestigation of the n-glycosylation pathway in chlamydomonas reinhardtii." *Sci Rep* 7 (2017): 10156. 10.1038/s41598-017-10698-z. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860654>.
31. Lucas, P. L., R. Dumontier, C. Loutelier-Bourhis, A. Mareck, C. Afonso, P. Lerouge, N. Mati-Baouche and M. Bardor. "User-friendly extraction and multistage tandem mass spectrometry based analysis of lipid-linked oligosaccharides in microalgae." *Plant Methods* 14 (2018): 107. 10.1186/s13007-018-0374-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534192>.
32. Neelamegham, S., K. Aoki-Kinoshita, E. Bolton, M. Frank, F. Lisacek, T. Lutteke, N. O'Boyle, N. H. Packer, P. Stanley, P. Toukach, *et al.* "Updates to the symbol nomenclature for glycans guidelines." *Glycobiology* 29 (2019): 620-24. 10.1093/glycob/cwz045. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31184695>.
33. Alter, G., T. H. M. Ottenhoff and S. A. Joosten. "Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination." *Semin Immunol* 39 (2018): 102-10. 10.1016/j.smim.2018.05.003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29903548>.
34. Jefferis, R. "Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* 8 (2009): 226-34. 10.1038/nrd2804. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247305>.
35. Mahan, A. E., M. F. Jennewein, T. Suscovich, K. Dionne, J. Tedesco, A. W. Chung, H. Streeck, M. Pau, H. Schuitemaker, D. Francis, *et al.* "Antigen-specific antibody glycosylation is regulated via vaccination." *PLoS Pathog* 12 (2016): e1005456. 10.1371/journal.ppat.1005456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982805>.
36. Selman, M. H., S. E. de Jong, D. Soonawala, F. P. Kroon, A. A. Adegnik, A. M. Deelder, C. H. Hokke, M. Yazdanbakhsh and M. Wuhler. "Changes in antigen-specific igg1 fc n-glycosylation upon influenza and tetanus vaccination." *Mol Cell Proteomics* 11 (2012): M111 014563. 10.1074/mcp.M111.014563. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184099>.
37. Pfeifle, R., T. Rothe, N. Ipseiz, H. U. Scherer, S. Culemann, U. Harre, J. A. Ackermann, M. Seefried, A. Kleyer, S. Uderhardt, *et al.* "Regulation of autoantibody activity by the il-23-th17 axis determines the onset of autoimmune disease." *Nat Immunol* 18 (2017): 104-13. 10.1038/ni.3579. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27820809>.
38. Gudelj, I., P. P. Salo, I. Trbojevic-Akmacic, M. Albers, D. Primorac, M. Perola and G. Lauc. "Low galactosylation of igg associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10years of follow-up." *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864 (2018): 2034-39. 10.1016/j.bbadis.2018.03.018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29572115>.
39. Hennig, R., S. Cajic, M. Borowiak, M. Hoffmann, R. Kottler, U. Reichl and E. Rapp. "Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma n-glycome." *Biochim Biophys Acta* 1860 (2016): 1728-38. 10.1016/j.bbagen.2016.03.035. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038647>.
40. Kaneko, Y., F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch. "Anti-inflammatory activity of immunoglobulin g resulting from fc sialylation." *Science* 313 (2006): 670-3. 10.1126/science.1129594. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888140>.
41. Parekh, R. B., R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, *et al.* "Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum igg." *Nature* 316 (1985): 452-7. 10.1038/316452a0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3927174>.
42. Sonneveld, M. E., M. de Haas, C. Koeleman, N. de Haan, S. S. Zeerleder, P. C. Ligthart, M. Wuhler, C. E. van der Schoot and G. Vidarsson. "Patients with igg1-anti-red blood cell autoantibodies show aberrant fc-glycosylation." *Sci Rep* 7 (2017): 8187. 10.1038/s41598-017-08654-y. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811589>.
43. Coloma, M. J., R. K. Trinh, A. R. Martinez and S. L. Morrison. "Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1-->6) dextran antibody." *J Immunol* 162 (1999): 2162-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973491>.
44. Leibiger, H., D. Wustner, R. D. Stigler and U. Marx. "Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal igg: Structure and influence on antigen binding." *Biochem J* 338 ( Pt 2) (1999): 529-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024532>.
45. Wallick, S. C., E. A. Kabat and S. L. Morrison. "Glycosylation of a vh residue of a monoclonal antibody against alpha (1----6) dextran increases its affinity for antigen." *J Exp Med* 168 (1988): 1099-109. 10.1084/jem.168.3.1099. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2459288>.

46. Sabouri, Z., P. Schofield, K. Horikawa, E. Spierings, D. Kipling, K. L. Randall, D. Langley, B. Roome, R. Vazquez-Lombardi, R. Rouet, *et al.* "Redemption of autoantibodies on anergic b cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014): E2567-75. 10.1073/pnas.1406974111. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821781>.
47. Bondt, A., M. Wuhler, T. M. Kuijper, J. M. Hazes and R. J. Dolhain. "Fab glycosylation of immunoglobulin g does not associate with improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy." *Arthritis Res Ther* 18 (2016): 274. 10.1186/s13075-016-1172-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27887659>.

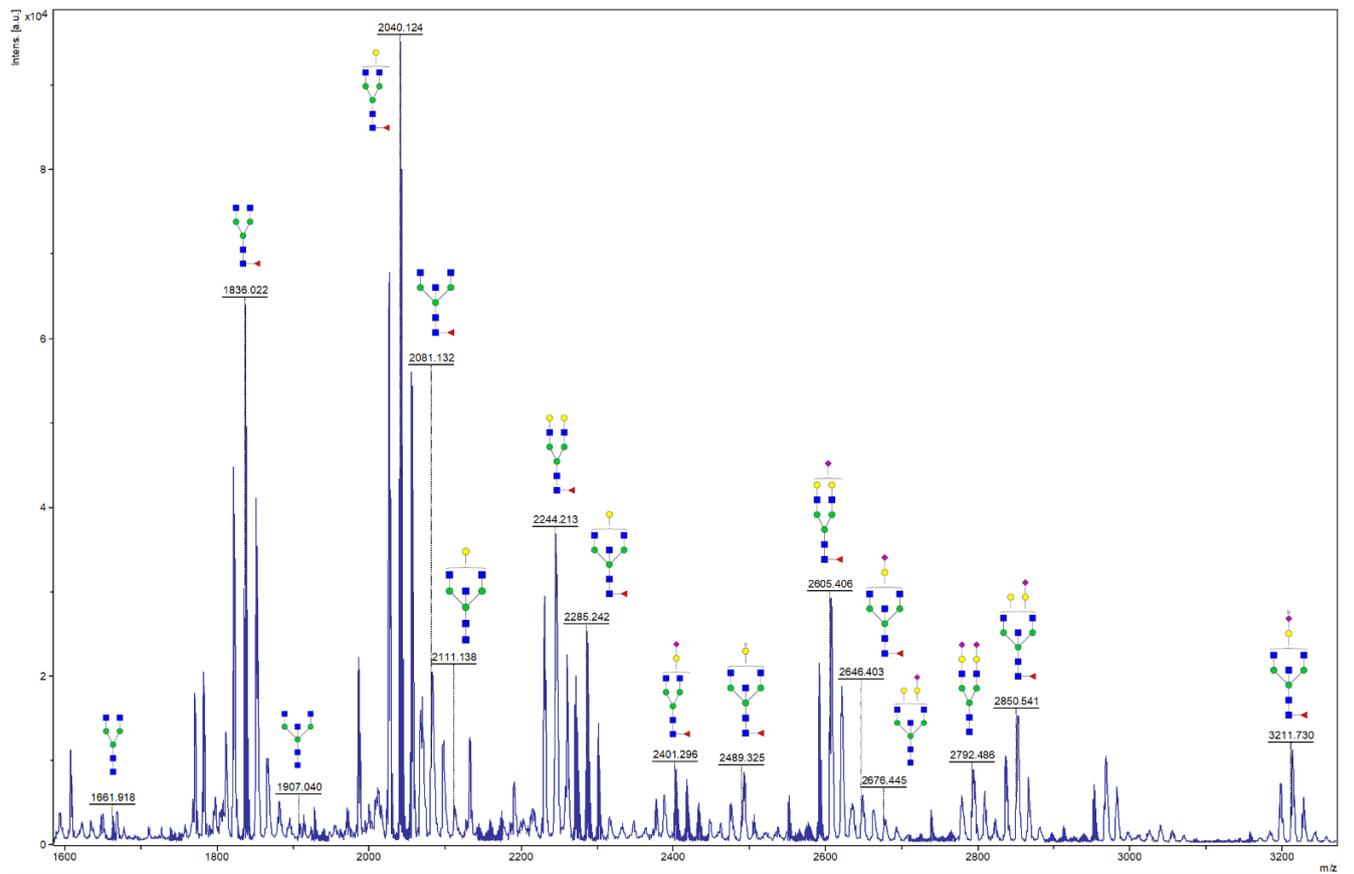
**Supplemental Figures:**



**Supplemental Figure 1.** Evolution of prednisone doses (mg/day), from D0 to D730. Plain line with circle = patient 1; dashed line with square = patient 2; dotted line with triangle = patient 3.



**Supplemental Figure 2.** Example of a mass spectrum of IgG Fc *N*-glycan from healthy donor. Blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; green circle, mannose; yellow circle, galactose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid. Glycans are drawn according to the international nomenclature recently updated [32].



**Supplemental Figure 3.** Example of mass spectrum obtained for IgG Fc *N*-glycans from a pemphigus patient at D0. Blue square, *N*-acetylglucosamine; red triangle, fucose; green circle, mannose; yellow circle, galactose; purple diamond, *N*-acetylneuraminic acid that belongs to the sialic acids. Glycans are drawn according to the international nomenclature recently updated [32].

## Conclusion de la publication :

En conclusion de cette publication, les IgG provenant de patients en rémission peuvent être pathogènes ou non selon le patient ou le moment. Une corrélation est observée aux temps précoces (phase active et 6 mois après traitement) entre le statut clinique et la pathogénicité des immunoglobulines G, alors que la persistance de pathogénicité des IgG *in vitro* au cours de l'évolution de la maladie même chez les patients en rémission clinique semble être prédictif de la rechute. Un profil particulier de *N*-glycosylation est observé chez les patients comparés aux donneurs sains. Néanmoins, ce profil n'est pas lié au statut clinique des patients puisqu'il est conservé au cours du temps même quand les patients sont en rémission. En conclusion, les propriétés pathogènes des IgG ne semblent pas être dues à des variations des *N*-glycanes présents sur les IgG au cours de l'évolution du pemphigus.

## I. Résultats complémentaires

Le *N*-glycane présent sur les IgG possède un *core* composé de GlcNAc et de mannoses (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). A ce *core* peut s'ajouter différents sucres tels que des acides sialiques, des galactoses, une GlcNAc bissectrice ou un fucose afin de produire jusqu'à 32 *N*-glycanes différents (Schroeder and Cavacini, 2010) (Figure 18).

Comme évoqué précédemment, des modifications dans la composition du *N*-glycane présent sur les IgG peuvent être associées à diverses MAI. Dans cette étude complémentaire, une signature de la *N*-glycosylation des IgG spécifiques du pemphigus a été mise en évidence en comparant les structures individuelles de *N*-glycanes présentes sur les IgG de nos patients en phase active à celles des donneurs sains.

### 1. Matériels et méthodes

#### A. Sérum et purification des immunoglobulines G

Des sérums de pemphigus ont été recueillis tout au long d'un essai clinique randomisé (RITUX 3 : numéro ClinicalTrials.gov, NCT00784589) ; les patients ont été traités par prednisone orale seule ou par une combinaison de rituximab associée à un régime de prednisone à court terme (Joly *et al.*, 2017).

Le plasma de donneurs sains a été récupéré à partir de couche leuco-plaquettaire

provenant de l'établissement français du sang.

Les fractions d'IgG provenant de sérum anti-DSG3<sup>+</sup> de patients ou de plasma de donneurs sains ont été purifiées par chromatographie d'affinité automatisée sur un chromatographe ÄKTA Start (Cytiva) utilisant une colonne de protéine G (protéine de la paroi cellulaire des streptocoques présentant une spécificité élevée pour la région Fc des IgG de mammifères) haute performance HiTrap® 1 mL (GE Healthcare).

Dans cette étude, les IgG provenant de 17 patients en phase active et de 8 donneurs sains ont été analysées. Les titres d'anticorps sériques IgG anti-DSG-1 et anti-DSG-3 des patients ont été mesurés par ELISA (Euroimmun).

#### B. Analyse de la N-glycosylation des immunoglobulines G par spectrométrie de masse

Le protocole utilisé pour l'analyse de la N-glycosylation des IgG par spectrométrie de masse est le même que celui utilisé dans l'article précédent. Pour calculer le pourcentage d'intensité des structures individuelles de N-glycanes, la somme des intensités de toutes les espèces de N-glycanes présentes dans l'échantillon a été défini comme 100%.

#### C. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Les comparaisons entre les profils de N-glycosylation des donneurs sains et des patients ont été effectuées à l'aide d'un test Mann Whitney non apparié. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

## 2. Résultats

Les IgG des patients en phase active possèdent plus de structures dites non-maturées c'est-à-dire sans galactose ni acide sialique terminaux et moins de structures dites maturées que les donneurs sains (Figure 26). En effet, les IgG des patients en phase active possèdent plus de N-glycanes avec des structures de type G0 (sans galactose), G0N (sans galactose mais avec une GlcNAc additionnelle) et G0FN (sans galactose mais avec un fucose et une GlcNAc additionnelle) que les IgG des donneurs sains. En revanche, ces dernières possédaient plus de N-glycanes avec des structures maturées de type G2F (deux galactoses et un fucose), G2FS1 (deux galactoses, un fucose et un acide sialique), G2S1Neu5 (deux galactoses et un acide N-

glycolylneuraminique Neu5Gc, qui est une autre forme de l'acide sialique provenant de l'alimentation) et G2FNS1 (deux galactoses, un fucose, une GlcNAc additionnelle et un acide sialique).

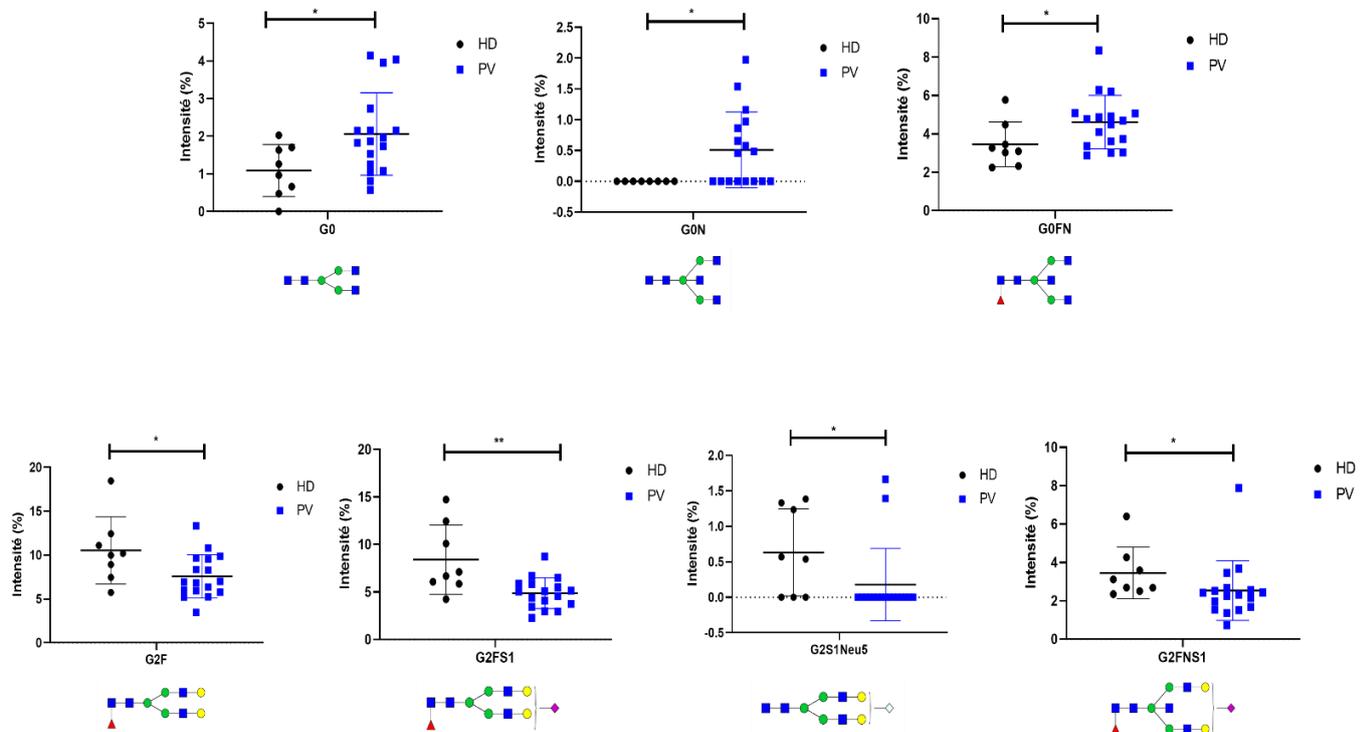


Figure 26 : Résultats de la comparaison des structures de N-glycanes entre les IgG de donneurs sains et celles de patients en phase active

Chaque structure individuelle de N-glycanes présentes sur les IgG de nos patients en phase active (PV) a été étudiée et comparée avec celles présentes sur les IgG de donneurs sains (HD). Les IgG des patients en phase active possèdent plus de N-glycanes peu maturées avec des structures de type G0 (sans galactose), G0N (sans galactose mais avec une GlcNAc additionnelle) et G0FN (sans galactose mais avec un fucose et une GlcNAc additionnelle) que les IgG des donneurs sains. A l'inverse, ces derniers possèdent plus de N-glycanes matures avec des structures de type G2F (deux galactoses et un fucose), G2FS1 (deux galactoses, un fucose et un acide sialique), G2S1Neu5 (deux galactoses et un acide N-glycolylneuraminique Neu5Gc, qui est une autre forme de l'acide sialique provenant de l'alimentation) et G2FNS1 (deux galactoses, un fucose, une GlcNAc additionnelle et un acide sialique). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test Mann Whitney non apparié. Les différences significatives sont indiquées par un astérisque ( $p > 0,05$ ) ou deux astérisques ( $p < 0,01$ ).

nHD= 8 ; nPV=17.

### 3. Conclusions

En condition physiologique, les N-glycanes présents sur les IgG subissent une maturation complète dans l'appareil de Golgi c'est-à-dire qu'ils présentent des galactoses et parfois des acides sialiques terminaux (Figure 27). Ces résultats ont été retrouvés chez les donneurs sains. En revanche, chez les patients en phase active, une diminution de ces structures matures et une augmentation des structures immatures (sans galactose ni acide sialique) sont observées.

Ces résultats semblent démontrer une dérégulation de la maturation des N-glycanes présents sur les IgG des patients.

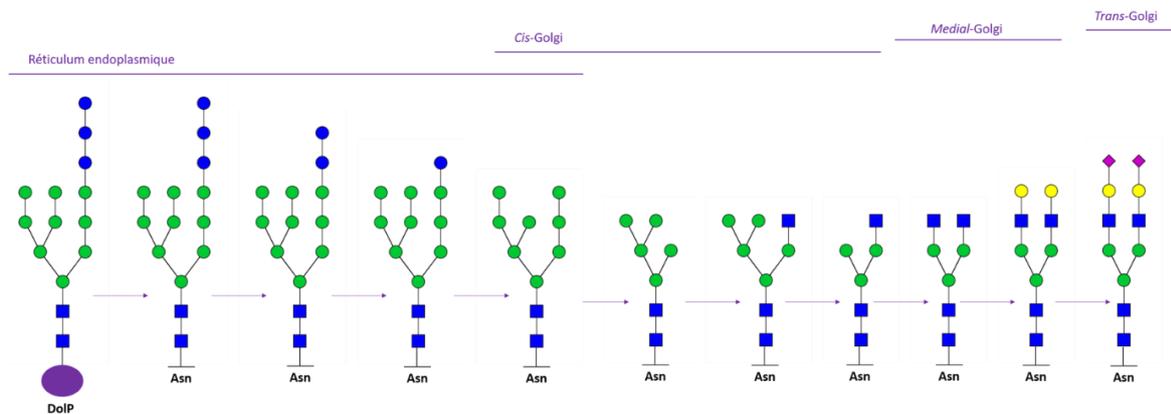


Figure 27 : Représentation schématique de la maturation des N-glycanes dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

Dans le réticulum endoplasmique, le précurseur oligosaccharidique de type  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  lié à un phosphate de dolichol (Dol-P) est transféré sur l'asparagine (Asn) du site consensus d'une protéine. La glycoprotéine va ensuite subir une élimination des résidus glucoses avant de sortir du réticulum endoplasmique et de rentrer dans l'appareil de Golgi, organe dans lequel les N-glycanes vont être maturés séquentiellement lors du passage de la glycoprotéine dans les différents saccules golgiennes. Dans les saccules cis de l'appareil de Golgi, le nombre de mannoses est réduit puis des résidus GlcNAc sont ajoutés au précurseur oligosaccharidique jusqu'à la forme  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . A la fin de la maturation des N-glycanes présents sur les IgG dans l'appareil de Golgi, ils présentent des galactoses voire des acides sialiques terminaux. La forme possédant deux acides sialiques est considérée comme la plus mature tandis que la forme ne possédant que deux GlcNAc après le noyau est considérée comme la moins mature. Carré bleu : N-acétylglucosamine ; rond vert : mannose ; rond bleu : glucose ; rond jaune : galactose ; losange violet : acide sialique ; Glc : glucose ; Man : mannose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine.

De nombreuses études ont démontré qu'une diminution de la galactosylation des IgG était associée à des MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique, le syndrome de Sjögren, la granulomatose avec polyangéite, certaines maladies céliaques, les myosites ainsi que l'anémie hémolytique auto-immune (Bond *et al.*, 1996, 1997; Cremata *et al.*, 2003; Gindzienska-Sieskiewicz *et al.*, 2007; Gudelj *et al.*, 2018a; Holland *et al.*, 2006; Parekh *et al.*, 1985; Perdivara *et al.*, 2011; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhner *et al.*, 2015). De plus, une diminution de la sialylation est également observée dans la polyarthrite rhumatoïde, la granulomatose avec polyangéite, le lupus érythémateux systémique et l'anémie hémolytique auto-immune (Espy *et al.*, 2011; Gudelj *et al.*, 2018a; Parekh *et al.*, 1985; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhner *et al.*, 2015).

En conclusion, une signature des N-glycanes spécifiques des patients atteints de pemphigus en phase active est observée. Cette signature semble être caractérisée par la présence importante de structures non-maturées et pourrait suggérer un défaut de maturation des N-glycanes chez les patients. De plus, d'après différentes études sur la N-

glycosylation des IgG dans les MAI, cette signature semblerait être également retrouvée dans plusieurs MAI.

## **II. Conclusions de la partie I**

Dans la première partie de cette thèse, la pathogénicité et la *N*-glycosylation des IgG ont été étudiées afin de les corrélérer avec le statut clinique des patients. Cette étude a démontré que la pathogénicité des Ac n'est pas toujours associée à l'état clinique des patients et qu'un profil particulier de *N*-glycosylation est observé chez les patients comparés aux donneurs sains qui n'est pas lié au statut clinique des patients. En conclusion, la pathogénicité des IgG ne semble pas être due à des variations des *N*-glycanes présents sur les IgG au cours de l'évolution de la maladie. De plus, une signature de *N*-glycanes de type non-maturée est observée chez nos patients en phase active qui est conservée au cours du temps même quand les patients sont en rémission. D'après la littérature, cette signature de *N*-glycanes est également retrouvée dans de nombreuses MAI et est plutôt caractéristique d'un profil pro-inflammatoire des Ac (Gudelj *et al.*, 2018a).

# Deuxième partie : Etude longitudinale des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléine 3 dans le pemphigus

Les aAc étant les seuls responsables de la maladie, cette deuxième partie de thèse est focalisée sur leur étude et plus particulièrement sur les IgG anti-DSG3 qui sont les aAc les plus fréquemment retrouvés chez les patients après traitement (Maho-Vaillant *et al.*, 2021).

Tout d'abord, la pathogénicité des IgG anti-DSG3 provenant de patients possédant des titres importants d'aAc anti-DSG3 même lors des phases de rémission a été étudiée longitudinalement. Cette pathogénicité a ensuite été corrélée au statut clinique des patients. Au cours de cette première étude, des changements de pathogénicité des IgG anti-DSG3 ont été observés au cours du temps chez certains patient. Une des hypothèses expliquant ce changement de pathogénicité des IgG anti-DSG3 est un changement de répertoire. En effet, la partie Fab des Ac a été démontrée comme pouvant induire seule la maladie (Rock *et al.*, 1990). De plus, cette observation est cohérente avec le fait que les aAc sont principalement de l'isotype IgG4, une sous-classe caractérisée par son incapacité à fixer le complément (Funakoshi *et al.*, 2012). Dans ce cadre, un protocole d'étude du répertoire des IgG anti-DSG3 a été développé afin de pouvoir comparer le répertoire en phase active et en phase de rémission complète chez nos patients sélectionnés.

Le changement de répertoire n'est pas le seul mécanisme pouvant modifier la pathogénicité des Ac. En effet, des modifications de la N-glycosylation des aAc ont été décrites dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux systémique (Gudelj *et al.*, 2018a; Magorivska *et al.*, 2016; Rombouts *et al.*, 2015; Scherer *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 2017; Wuhrer *et al.*, 2015). De plus, ces modifications peuvent être responsables de changement dans la pathogénicité de l'Ac. En effet, si le N-glycane situé sur la partie Fc est modifié, cela peut altérer les fonctions effectrices de l'Ac *via*, notamment, la modification de la liaison de l'IgG sur les FcγR (Schroeder and Cavacini, 2010). En revanche, si la modification a lieu sur le N-glycane présent sur la partie Fab, c'est l'affinité de l'Ac pour son Ag qui pourra alors être impactée (Coloma *et al.*, 1999; Leibiger *et al.*, 1999; Wallick *et al.*,

1988). L'hypothèse qu'une modification de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 soit responsable des changements de leur pathogénicité n'est donc pas à exclure. Ainsi, un protocole d'analyse de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 a été développé en parallèle afin d'analyser le *N*-glycome des mêmes patients que pour l'étude du répertoire.

## **I. Etude longitudinale de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3**

Afin de déterminer si les IgG anti-DSG3 détectés chez les patients en rémission complète après traitement présentaient le même pouvoir pathogène que ceux présents en phase active, une étude longitudinale de la pathogénicité de ces aAc chez des patients atteints de pemphigus gardant des titres d'aAc anti-DSG3 importants après traitement a été réalisée.

### **1. Mise au point du protocole de purification des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par chromatographie d'affinité**

La première partie de ce travail a été de mettre au point une méthode de purification des IgG anti-DSG3 par chromatographie d'affinité d'après la technique utilisée dans l'article de Chen *et al.* publié en 2017 (Chen *et al.*, 2017). Dans cet article, les auteurs ont purifié les aAc anti-DSG1 et anti-DSG3 à partir du sérum de patients atteints de pemphigus grâce à une chromatographie d'affinité utilisant une matrice DSG1 ou DSG3, c'est-à-dire des billes de cellulose couvertes de la partie extracellulaire des protéines DSG1 et DSG3 humaines recombinantes. Pour notre part, les IgG ont d'abord été purifiées afin de s'affranchir des reconnaissances non-spécifiques des IgM. Pour cela, une technique de chromatographie d'affinité automatisée par ÄKTA start (Cytiva) utilisant une colonne de protéine G (GE Healthcare) a été utilisée. De plus, le Dr Lars Komorowski (Euroimmun, Allemagne) nous a fourni les billes de cellulose couvertes de la partie extracellulaire de la DSG3 humaine recombinante.

L'Ac monoclonal de souris de type IgG1 AK23 dirigé contre la DSG3 humaine et obtenu *via* un hybridome fourni par le Dr Masayuki Amagai, a été utilisé pour mettre au point la méthode de purification (Chen *et al.*, 2017; Tsunoda *et al.*, 2003). Puis, les IgG purifiées d'un patient en phase active possédant un titre élevé d'IgG anti-DSG3 (1575 UI/mL; seuil de positivité de l'ELISA situé à 20 UI/mL) ont été utilisées afin de définir une relation entre le titre d'aAc anti-DSG3, la quantité d'IgG initiale et la quantité d'IgG anti-DSG3 obtenue après

purification. En effet, le titre d'aAc anti-DSG3 représente la quantité de cet aAc en circulation dans le sérum. Ainsi, la quantité d'IgG anti-DSG3 présente dans une certaine quantité d'IgG purifiées sera différente suivant le titre d'aAc du patient. Par exemple, pour ce patient (titre à 1575 UI/mL), 250µg d'IgG étaient nécessaires afin de purifier 10µg d'IgG anti-DSG3.

## **2. Mise au point du test de pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par immunofluorescence**

Pour tester la pathogénicité des IgG anti-DSG3, il existe deux tests *in vitro* décrits dans la littérature : le test de dissociation des kératinocytes et l'immunofluorescence (IF). Dans les deux cas, une lignée cellulaire immortalisée de kératinocytes appelée HaCaT a été utilisée. Etant donné les faibles quantités obtenues d'IgG anti-DSG3 purifiées, seule la mesure de la pathogénicité par IF a été utilisée pour cette étude car cette technique nécessite des quantités plus faibles d'Ac.

Pour effectuer le test de pathogénicité par IF, deux marqueurs ont été étudiés : la DSG3 et la flotilline-2. La flotilline-2 est une protéine associée à des microdomaines lipidiques appelés radeaux membranaires qui a récemment été démontrée comme interagissant avec la plakoglobine, une protéine du desmosome (Kurrle *et al.*, 2013). De plus, une précédente étude a démontré que lorsque des IgG de patients atteints de pemphigus étaient incubées avec des cellules HaCaT, le marquage de la DSG3 devenaient plus discontinu et une redistribution de la flotilline-2 étaient induite, visible par un marquage diffus dans le cytosol des cellules ainsi qu'une perte du marquage membranaire de la flotilline-2 (Völlner *et al.*, 2016). Ainsi, des résultats similaires sont attendus pour les IgG anti-DSG3 de nos patients.

### **A. Matériels et méthodes**

Pour réaliser cette étude, les cellules HaCaT ont étéensemencées sur des lames de microscopie en verre possédant des chambres de culture (*Nun Lab-Tek II Chamber Slide System*, ThermoFisher) et cultivées dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) GlutaMAX *high glucose* (ThermoFisher) contenant 1 mM de calcium, 50U/ml de pénicilline/streptomycine (ThermoFisher) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Après 2 jours de culture, lorsque les cellules étaient à confluence, les IgG anti-DSG3 ont été ajoutées et incubées avec les cellules pendant 20h dans un milieu DMEM GlutaMAX *high glucose* contenant 1 mM de calcium, 50U/ml de pénicilline/streptomycine mais sans SVF. A cette

étape, les IgG, si elles sont pathogènes, vont se fixer sur les DSG3 et induire leur internalisation ainsi qu'une redistribution de la flotilline-2.

Pour observer ce phénomène, après élimination du milieu de culture et lavage avec du PBS 1X contenant du calcium et du magnésium, les cellules ont été fixées avec de l'éthanol 100%, perméabilisées avec du triton X-100 à 0,3% et bloquées avec du sérum de rat à 1%. Puis, les cellules ont été incubées avec un Ac de souris dirigé contre la DSG3 (5H10) Alexa Fluor 647 et un Ac de lapin dirigé contre la flotilline-2 (HPA001396) pendant 1h30. Après plusieurs lavages, un Ac de chèvre anti-lapin IgG H&L Alexa Fluor 488 (ab150077) a été incubé pendant 1h à l'obscurité puis les lamelles ont été montées avec le milieu de montage *ProLong™ Diamond Antifade* contenant du *Di Aminido Phenyl Indol* (DAPI) (ThermoFisher). Pour finir, les échantillons ont été analysés avec un microscope confocal multi-photon droit à platine fixe Leica SP8. Les images d'IF ont été prises par Damien Schappman, ingénieur au sein de la Plateforme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN) de l'Université de Rouen Normandie. Les aires de fluorescence ont été mesurées *via* le logiciel ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA).

#### B. Détermination de la quantité d'immunoglobulines G anti-desmoglénines 3 nécessaire pour induire une pathogénicité *in vitro*

Pour tester la pathogénicité des IgG sériques, les cellules sont incubées avec 50µg d'IgG purifiées. En revanche, les IgG anti-DSG3 étant toutes spécifiques de la cible, une quantité plus faible devrait être suffisante pour induire un effet sur les cellules. Pour déterminer cette quantité, une gamme d'IgG anti-DSG3 comprise entre 1 et 7,5µg a été réalisée à partir d'IgG anti-DSG3 provenant de deux patients en phase active. Le patient 1 (PV1) possède un titre d'IgG anti-DSG3 de 5217 UI/mL tandis que le deuxième patient (PV2) possède un titre 1575 UI/mL. Les IgG anti-DSG3 du patient 2 induisent une baisse de l'expression de la DSG3 à la surface des cellules à des quantités plus faibles que celles du patient 1, indiquant une différence de pathogénicité entre les IgG anti-DSG3 des deux patients (Figure 28a). En revanche, l'augmentation de l'expression de flotilline-2 est presque identique entre les deux patients (Figure 28b). En moyennant les résultats, une baisse de plus de la moitié de l'aire de fluorescence de la DSG3 (Figure 28c) et une augmentation du double de l'aire de fluorescence de la flotilline-2 (Figure 28d) sont observées pour la condition à 5µg comparée à la condition 0µg d'IgG anti-DSG3. Cette condition a donc été choisie pour réaliser les expérimentations

suivantes.

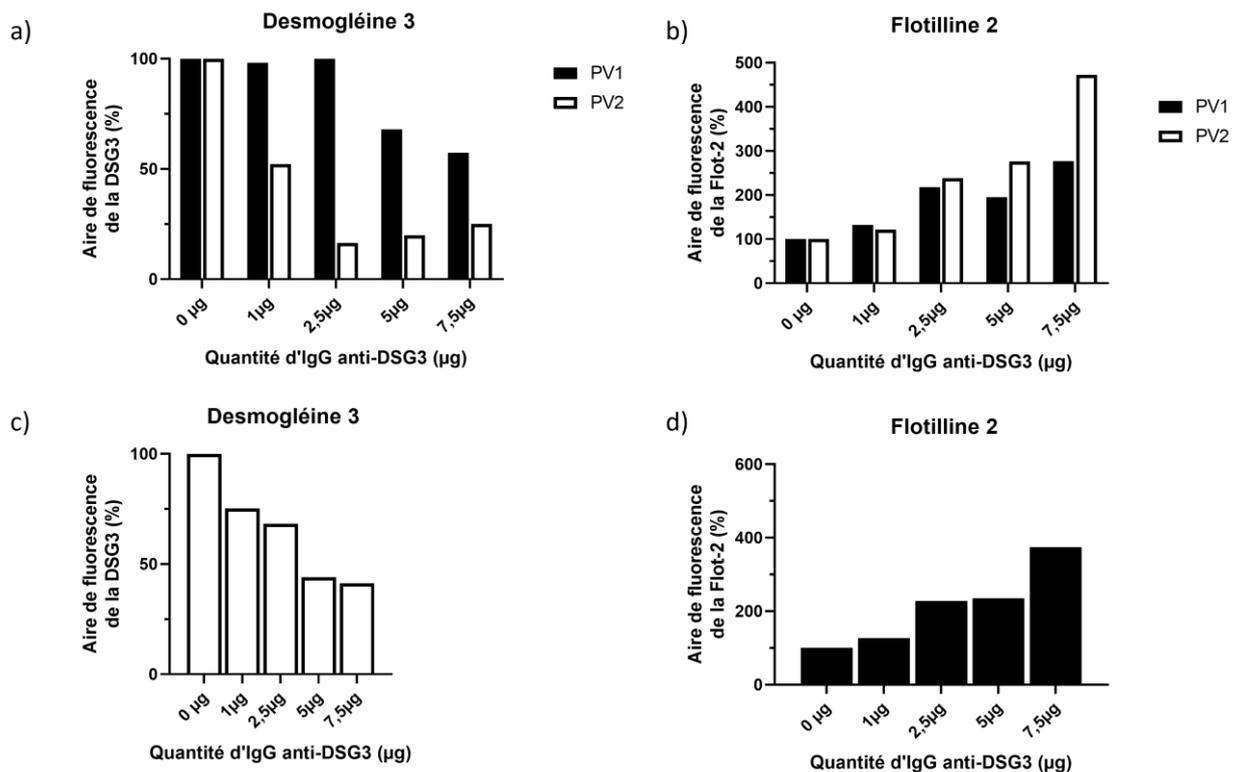


Figure 28 : Gamme d'immunoglobuline G anti-desmogléine 3 afin de déterminer la quantité d'auto-anticorps nécessaire pour induire une pathogénicité par immunofluorescence

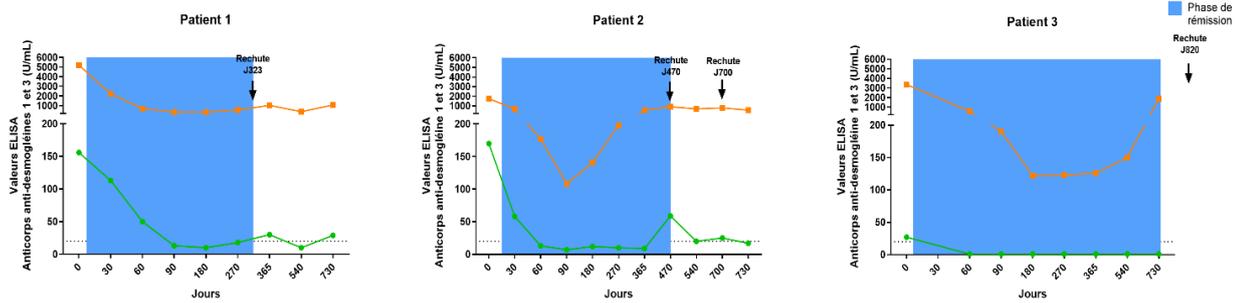
Afin de connaître la quantité d'immunoglobuline G (IgG) anti-desmogléine 3 (DSG3) nécessaire pour induire une pathogénicité sur les cellules HaCaT mesurée par immunofluorescence, une gamme d'IgG anti-DSG3 a été réalisée à partir de sérums provenant de deux patients atteints de pemphigus vulgaire en phase active. (a) Les IgG anti-DSG3 du patient 2 induisent une baisse de l'expression de la DSG3 à la surface des cellules à des quantités plus faibles que celles du patient 1, indiquant une différence de pathogénicité entre les IgG anti-DSG3 des deux patients. (b) En revanche, l'augmentation de l'expression de flotilline-2 est presque identique entre les deux patients. En moyennant les résultats, une baisse de plus de la moitié de l'aire de fluorescence de la DSG3 (c) et une augmentation de deux fois l'aire de fluorescence de la flotilline-2 (d) sont observées pour la condition à 5µg. Cette condition est utilisée pour la suite des expérimentations. Les aires de fluorescence sont mesurées via le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

PV = patient pemphigus

### 3. Résultats de l'étude longitudinale de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par immunofluorescence

La pathogénicité des IgG anti-DSG3 a été analysée longitudinalement chez les trois mêmes patients atteints de PV traités par corticostéroïdes que ceux étudiés dans le papier de thèse. La Figure 29 reprend les courbes d'aAc et de doses de corticostéroïdes administrées présentées dans ce même papier. Les résultats seront rappelés brièvement.

a)



b)

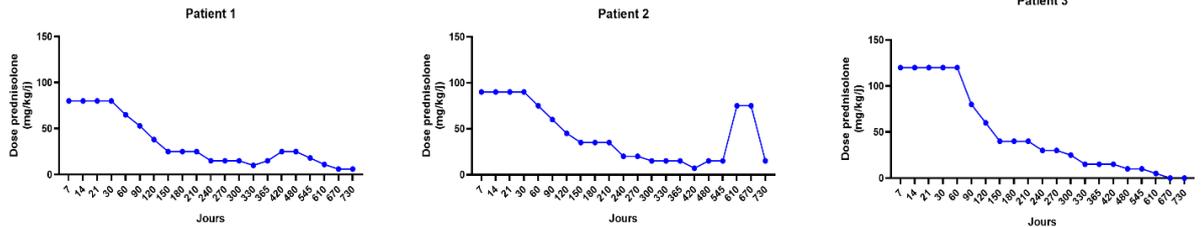


Figure 29 : Évolution des valeurs ELISA des anticorps anti-DSG1 et anti-DSG3 et courbe de prednisolone des patients.

(a) La ligne pointillée représente les valeurs seuils proposées par le fabricant pour les valeurs ELISA des anticorps anti-DSG1 (vert) et anti-DSG3 (orange). La phase de rémission est représentée en bleu. Les 3 patients maintiennent des titres forts d'IgG anti-DSG3 tout au long de l'étude et 2 d'entre eux ont eu au moins une rechute. (b) Dose de prednisolone (mg/kg/jour) administrée aux patients au cours de l'étude. DSG : desmogléine ; J : jours.

Après traitement, les courbes d'aAc anti-DSG1 et anti-DSG3 diminuent rapidement chez les 3 patients (Figure 29a). Cela correspond à une réduction comprise entre 91,7 % et 100 % par rapport à la ligne de base et est suivi d'une ré-augmentation progressive de leurs anticorps anti-DSG3 avant l'apparition de rechutes chez ces 3 patients entre le jour 365 et le jour 1080.

Concernant les doses de prednisolone administrée, lorsque le patient 1 rechute à J323, la dose de corticostéroïdes reçue était diminuée de plus de 6 fois par rapport à la dose initiale (Figure 29b). Les IgG anti-DSG3 du patient 2 remonte à J365 après une baisse de 6 fois de la dose de prednisolone. Les doses de prednisolone administrées au patient 3 diminue au cours de l'étude jusqu'à atteindre 0 à partir de J670. Son titre d'IgG anti-DSG3 commence à remonter lorsque les dose de prednisolone sont faibles (diminution de 12 fois la dose par rapport à la dose initiale).

Par conséquent, les trois patients sont entrés en rémission alors que leur titres d'aAc étaient élevés. Cette observation soulève la question des propriétés pathogènes des aAc même en phase de rémission. Néanmoins, ils étaient toujours sous prednisolone aux temps précoces, ce qui pourrait expliquer les temps de rechute tardif où les doses de prednisolone étaient en baisse.

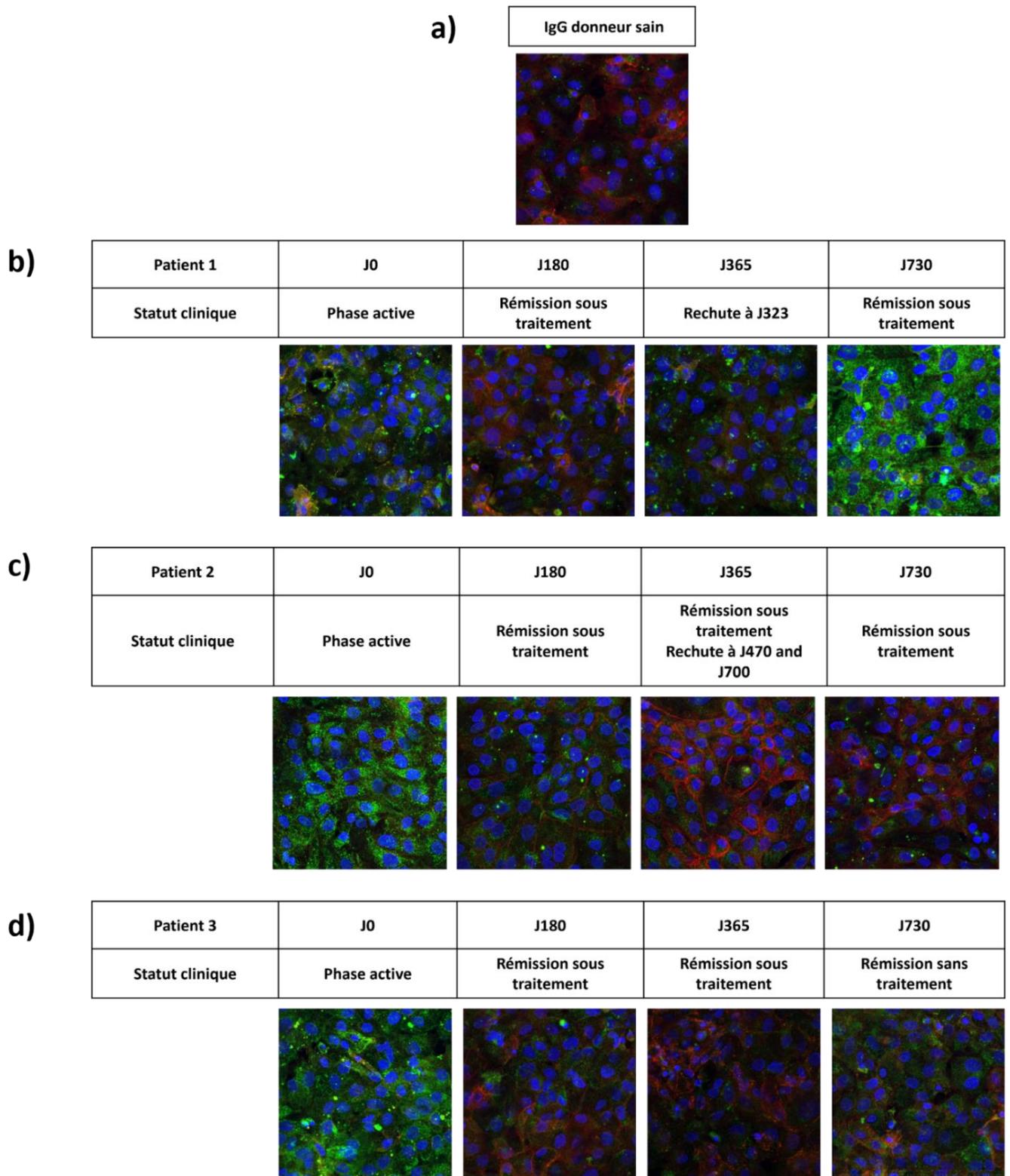


Figure 30 : Etude longitudinale de la pathogénicité des immunoglobulines G (IgG) anti-desmogléine 3 (DSG3) par immunofluorescence chez trois patients atteints de pemphigus vulgaire

Le test de pathogénicité des anticorps par immunofluorescence a été réalisé sur des cellules HaCaT cultivées pendant 2 jours sur des lames de microscopie en verre possédant des chambres de culture (Lab-Tek), incubées pendant 20h avec des Ac dans un milieu sans sérum de veau fœtal, fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps anti-DSG3 (rouge) et anti-flotilline-2 (vert). (a) Les cellules ont été incubées avec des IgG purifiées d'un donneur sain afin d'évaluer l'expression de la DSG3 et de la flotilline-2 en condition non pathogène : une forte expression de la DSG3 est observée à la surface des cellules (marquage en résille) tandis que la flotilline-2 est détectée faiblement dans les cellules HaCaT. (b-d) La pathogénicité des IgG anti-DSG3

*a été testée en phase active (J0), 6 mois (J180), 1 an (J365) et 2 ans après traitement (J730). La pathogénicité des anticorps est caractérisée par une diminution du marquage dit en résille de la DSG3 à la surface des cellules et une modification du cytosquelette mesurée par une augmentation du marquage de la flotilline-2, synonyme d'une redistribution de la protéine.*

Les IgG de donneurs sains n'induisent pas de pathogénicité puisqu'une forte expression de la DSG3 (en rouge) est observée à la surface des cellules (marquage en résille) tandis que la flotilline-2 (en vert) n'est détectée que faiblement dans les cellules HaCaT (Figure 30a). Lorsque les trois patients sont en phase active (J0), les IgG anti-DSG3 induisent une perte du marquage de la DSG3 associée à une augmentation importante du marquage de la flotilline-2 dans le cytosol des cellules, indiquant une pathogénicité des Ac. Lorsque les patients atteignent la rémission, 6 mois après traitement (J180), les IgG anti-DSG3 des patients 1 et 3 ne sont plus pathogènes, le marquage de la DSG3 est de nouveau visible et le marquage de la flotilline-2 est peu élevé dans le cytosol et plutôt localisé à la membrane plasmique (Figure 30d et 30d). En revanche, les IgG anti-DSG3 du patient 2 semblent légèrement pathogènes puisque le marquage de la DSG3 est faible et que le marquage de la flotilline-2 est légèrement augmenté dans le cytosol (Figure 30c). Un an après traitement (J365), les IgG anti-DSG3 du patient 1, qui a rechuté 42 jours avant, sont pathogènes puisqu'une disparition du marquage de la DSG3 et une faible augmentation du marquage de la flotilline-2 sont observées (Figure 30b). Les patient 2 et 3 sont en rémission et leurs IgG anti-DSG3 ne sont pas pathogènes, une expression forte de la DSG3 à la surface des kératinocytes ainsi qu'un marquage faible de la flotilline-2 sont observées (Figure 30c et 30d). Deux ans après le début du traitement (J730), le patient 1 est en rémission mais ses IgG anti-DSG3 sont pathogènes puisqu'une disparition complète du marquage de la DSG3 et une forte augmentation du marquage de la flotilline-2 dans le cytosol sont observées (Figure 30b). En effectuant quelques recherches sur ce patient, nous avons découvert qu'il avait rechuté entre la fin de l'étude et l'année qui a suivi, ce qui est cohérent avec ces résultats. Le patient 2 est en rémission et ses IgG anti-DSG3 ne sont pas pathogènes puisqu'un fort marquage de la DSG3 et un faible marquage cytosolique de la flotilline-2 sont observés (Figure 30c). Pour finir, le patient 3 est en rémission mais ses IgG anti-DSG3 semblent légèrement pathogènes avec un marquage de la DSG3 diminué et un marquage de la flotilline-2 augmenté par rapport au temps précédent (Figure 30d). Ces résultats semblent être corrélés avec la clinique du patient puisque nous savons qu'il a rechuté 90 jours après la fin de l'étude.

#### **4. Conclusions**

En conclusion, la pathogénicité des IgG anti-DSG3 analysée par une technique *in vitro* (IF) est relativement bien corrélée avec le statut clinique des patients excepté aux temps tardifs où elle semble plutôt anticiper l'apparition de signes cliniques. En effet, à J730, les patients 1 et 3 possèdent des IgG anti-DSG3 pathogènes alors qu'ils sont en rémission clinique. Néanmoins, dans les deux cas, nous savons que les patients ont rechuté dans les mois suivants ces résultats. Les IgG anti-DSG3 semblent donc redevenir pathogènes avant la rechute.

Des différences de pathogénicité ont été observées au cours du temps chez les patients alors qu'une quantité équivalente d'IgG anti-DSG3 avait été incubée avec les cellules, indiquant des modifications des propriétés pathogéniques de ces aAc. Une des hypothèses les plus probables pour expliquer ce phénomène serait un changement de reconnaissance épitopique de l'Ag par les IgG anti-DSG3, c'est-à-dire une modification de leur répertoire. En effet, la reconnaissance épitopique de la DSG3 par les aAc n'induit pas la même pathogénicité : seuls les aAc reconnaissant les ectodomains 1, 2 et 4 de la DSG3 induisent une acantholyse (Amagai *et al.*, 1992; Zengo *et al.*, 2012). De plus, une étude publiée en 2017 a démontré que le répertoire global des Ac sériques des patients atteints de pemphigus changeait au fil du temps chez les patients. Ainsi, certains aAc pouvaient être exprimés dans la circulation à un temps donné et pas à un autre (Chen *et al.*, 2017).

## **II. Etude longitudinale du répertoire des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 de patients atteints de pemphigus par analyse protéomique**

Afin d'expliquer les différences de pathogénicité observées au cours du temps lors de l'étude précédente, une méthode d'analyse du répertoire des IgG anti-DSG3 des patients a été développée afin de pouvoir réaliser une étude longitudinale.

### **1. Méthode d'analyse du répertoire des immunoglobulines G anti-desmogléines 3**

Comme évoqué dans la première partie de ce travail, la méthode de purification des IgG anti-DSG3 développée durant cette thèse est inspirée d'un papier publié par Chen *et al.* en 2017 (Chen *et al.*, 2017). Dans cet article, les auteurs ont étudié à la fois le répertoire des BCR des LB circulants et celui des aAc anti-DSG1/3 (Figure 31). Pour cela, les aAc ont été purifiés à

partir du sérum des patients par chromatographie d'affinité en utilisant une matrice DSG1 ou DSG3. Après dépôt des aAc sur un gel dénaturant, la chaîne lourde des aAc a été digérée par la trypsine et analysée par spectrométrie de masse. En parallèle, les IgG déplétées en aAc ont été purifiées sur colonne d'affinité protéine G et ont été analysées avec le même protocole que les aAc. Pour finir, les séquences des parties variables des aAc ont été analysées par bio-informatique en utilisant les séquences des BCR des LB circulants comme séquence de référence.

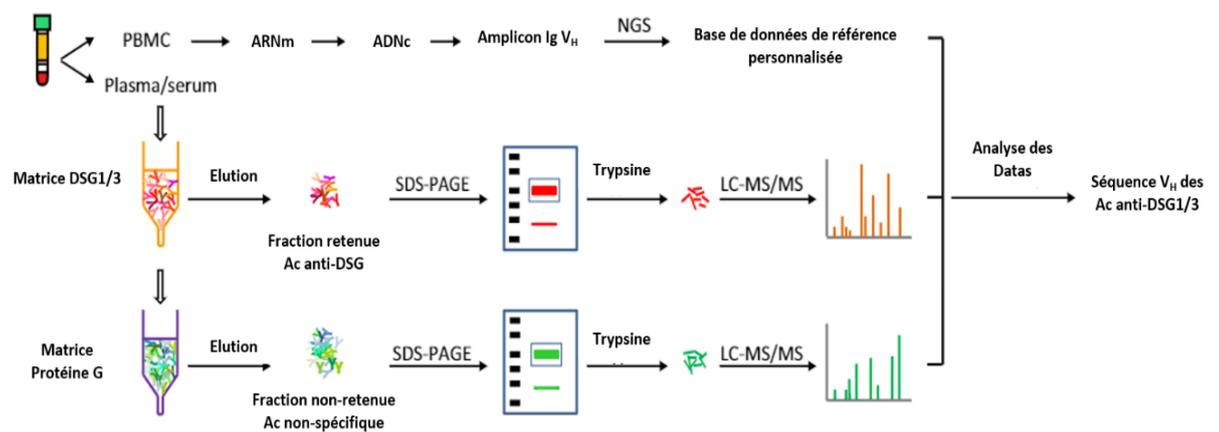


Figure 31 : Représentation schématique de la méthodologie d'étude du répertoire publiée par Chen et al.

A partir du sang des patients, les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells) et le sérum sont séparés et utilisés en parallèle. Premièrement, une base de données de référence personnalisée des récepteurs des lymphocytes B (BCR : B Cells Receptor) circulants est créée grâce aux PBMC des patients. Deuxièmement, les auto-anticorps (aAc) anti-desmogléine (DSG) 1 et 3 sont purifiés à partir du sérum des patients via une chromatographie d'affinité utilisant une matrice DSG1/3. La fraction contenant les aAc anti-DSG1/3 est déposée sur un gel dénaturant puis les chaînes lourdes sont découpées, digérées à la trypsine et analysées par spectrométrie de masse. En parallèle, les IgG de la fraction non-retenue sont purifiées par chromatographie d'affinité par protéine G puis traitées de la même façon que les aAc anti-DSG1/3. Les séquences des parties variables des chaînes lourdes des aAc anti-DSG1/3 sont ensuite obtenues par bio-informatique à partir des résultats générés par spectrométrie de masse en utilisant les séquences des BCR des LB circulants comme séquence de référence. Ac = anticorps ; ARNm = acide ribonucléique messenger ; ADNc = acide désoxyribonucléique complémentaire ; BCR = B Cells Receptor ; DSG = desmogléine ; LC-MS/MS = chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem ; NGS = Next-Generation Sequencing ; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells ; SDS-PAGE = électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium ;  $V_H$  = gène variable de la chaîne lourde.

D'après Chen et al., 2017.

Dans notre étude, contrairement à la méthode publiée par Chen *et al.*, les IgG ont été préalablement purifiées afin de s'affranchir des reconnaissances non-spécifiques des IgM. De plus, la chaîne lourde ainsi que la chaîne légère des IgG anti-DSG3 ont été analysées par spectrométrie de masse. Pour finir, les IgG anti-DSG1 n'ont pas été analysées car, comme expliqué précédemment, les IgG anti-DSG3 sont les aAc qui persistent le plus chez les patients au cours du temps (Maho-Vaillant *et al.*, 2021).

Le séquençage de protéines par spectrométrie de masse se réalise dans un premier temps en découpant la protéine d'intérêt grâce à une enzyme de restriction afin de générer des peptides. Ces peptides sont ensuite analysés par le spectromètre de masse qui va générer des séquences peptidiques. Ces séquences peptidiques sont mises en correspondance avec des bases de données composées des séquences de différentes protéines telles qu'UniProt (UniProt Consortium, 2021). La séquence protéique qui aura le meilleur taux de recouvrement par les peptides correspondra à notre protéine d'intérêt.

Ici, la difficulté est que l'on cherche à séquencer la partie variable des IgG anti-DSG3. Or, aucune séquence de référence n'existe puisque chaque partie variable d'un Ac est spécifique du clone d'Ac et de sa reconnaissance antigénique. C'est pour cela que dans leur étude Chen *et al.* ont utilisé les séquences des BCR des LB circulants comme séquence de référence. Malheureusement, l'analyse des BCR des LB circulants n'a pas pu être réalisée chez nos patients. En effet, des LB anti-DSG3 de patients en phase active et en phase de rémission avaient été triés au préalable et envoyés au laboratoire de Jinmiao Chen à Singapour. Néanmoins, seules 10 séquences ont pu être réalisées, ce qui n'était pas suffisant pour obtenir une banque de donnée de référence.

En l'absence de ces séquences, l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction a été privilégiée. Le but étant de réaliser un chevauchement entre les peptides générés après digestion des IgG anti-DSG3 par différentes enzymes de restriction afin de reconstituer la séquence de la partie variable de ces aAc. De plus, la banque de données publique IMGT (*the international ImMunoGeneTics information system*) a été utilisée comme banque de donnée de référence (Lefranc *et al.*, 2015).

La mise au point a été réalisée en utilisant l'Ac monoclonal AK23, puis les IgG purifiées d'un patient atteint de PV en phase active possédant un titre élevé d'IgG anti-DSG3 (1575 UI/mL). De plus, une méthode d'analyse permettant d'identifier les séquences des IgG anti-DSG3 et notamment leur CDR en utilisant la base de données des Ig humaines IMGT a été développée avec l'aide du Pr Thierry Lecroq du laboratoire d'informatique, de traitement de l'information et des systèmes (LITIS) de l'Université de Rouen Normandie.

## **2. Digestion de l'anticorps monoclonal anti-desmogléine 3 AK23 par différentes enzymes de restriction : trypsine, chymotrypsine, LysC, AspN et GluC**

En collaboration avec le Dr. Philippe Chan, ingénieur de la plateforme de protéomique Pissaro de l'Université de Rouen Normandie, plusieurs protéases ayant des sites de restriction différents ont été testées sur l'Ac monoclonal anti-DSG3 AK23 : trypsine, chymotrypsine, LysC, AspN et GluC. La trypsine est l'enzyme la plus utilisée en spectrométrie de masse. Elle va cliver la protéine après une arginine ou une lysine. Selon la répartition de ces deux acides aminés dans la protéine, la taille des fragments générés sera variable. La chymotrypsine va, quant à elle, cliver la protéine après une leucine, une tyrosine, une phénylalanine, une méthionine, un tryptophane, une glutamine ou une asparagine. La LysC est une enzyme de restriction dont le site de clivage se situe après une lysine, ce qui en fait un partenaire intéressant à la trypsine. Pour finir, GluC et AspN sont des enzymes de restriction qui clivent les protéines respectivement après un acide glutamique et un acide aspartique.

Les IgG anti-DSG3 purifiées ont été déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Les différentes digestions par les enzymes de restriction ont été réalisées séparément et 10µg d'IgG anti-DSG3 ont été utilisés pour chaque digestion. Cinq dépôts de 10µg ont donc été réalisés sur le gel. Les chaînes lourdes et légères de chaque dépôt ont été découpées et analysées séparément. Les bandes de gel ont été morcelées puis lavées. Après lavages, les protéines ont été réduites avec une solution composée de tris(2-carboxyethyl)phosphine 5mM et de tampon bicarbonate d'ammonium puis alkylées avec une solution d'iodoacétamide 55mM et de tampon bicarbonate d'ammonium afin que les sites de restriction des différentes enzymes soient accessibles. Après déshydratation, les échantillons ont été incubés avec une des enzymes de restriction pendant 16h à 30°C. Une fois cette étape passée, les peptides ont été extraits du gel avec une solution d'acide formique à 1% puis avec une solution composée à 50% d'acétonitrile et à 50% d'acide formique à 5%. Après chaque incubation, les surnageants ont été récupérés, séchés dans un concentrateur sous vide et repris dans une solution composée d'acétonitrile à 3% ainsi que d'acide formique à 0,1% afin d'être analysés sur le spectromètre de masse hybride quadripôle-Orbitrap Qexactive (ThermoFisher).

Les peptides d'AK23 ainsi générés ont été comparés aux séquences d'acides aminées

des chaînes lourdes (Figure 32) et légères (Figure 33) d'AK23 publiées par Tsunoda *et al.* en 2011 (Tsunoda *et al.*, 2011).

Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par la LysC est de 64% (Figure 32). Les CDR1, 2 et 3 sont tous les trois recouverts par des peptides, ce qui est encourageant pour l'analyse des IgG anti-DSG3 de patients. Après digestion par la trypsine, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 est de 76% et là encore les CDR1, 2 et 3 sont entièrement recouverts par des peptides. Pour la chymotrypsine, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par l'enzyme n'est que de 41% et seul le CDR2 est recouvert par des peptides, ce qui est nettement moins bon que pour les deux autres enzymes. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion de l'Ac par AspN est de seulement 17%. De plus, les CDR1 et 2 ne sont recouverts par aucun peptide tandis que seuls trois acides aminés du CDR3 sont recouverts. Pour GluC, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion de l'Ac par l'enzyme n'est que de 5%, ce qui est très bas. De plus, aucun CDR n'est recouvert par des peptides.

En conclusion, la LysC et la trypsine permettent un bon recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 avec un recouvrement des trois CDRs tandis que la chymotrypsine, AspN et GluC ne permettent qu'un recouvrement faible, voire très faible.

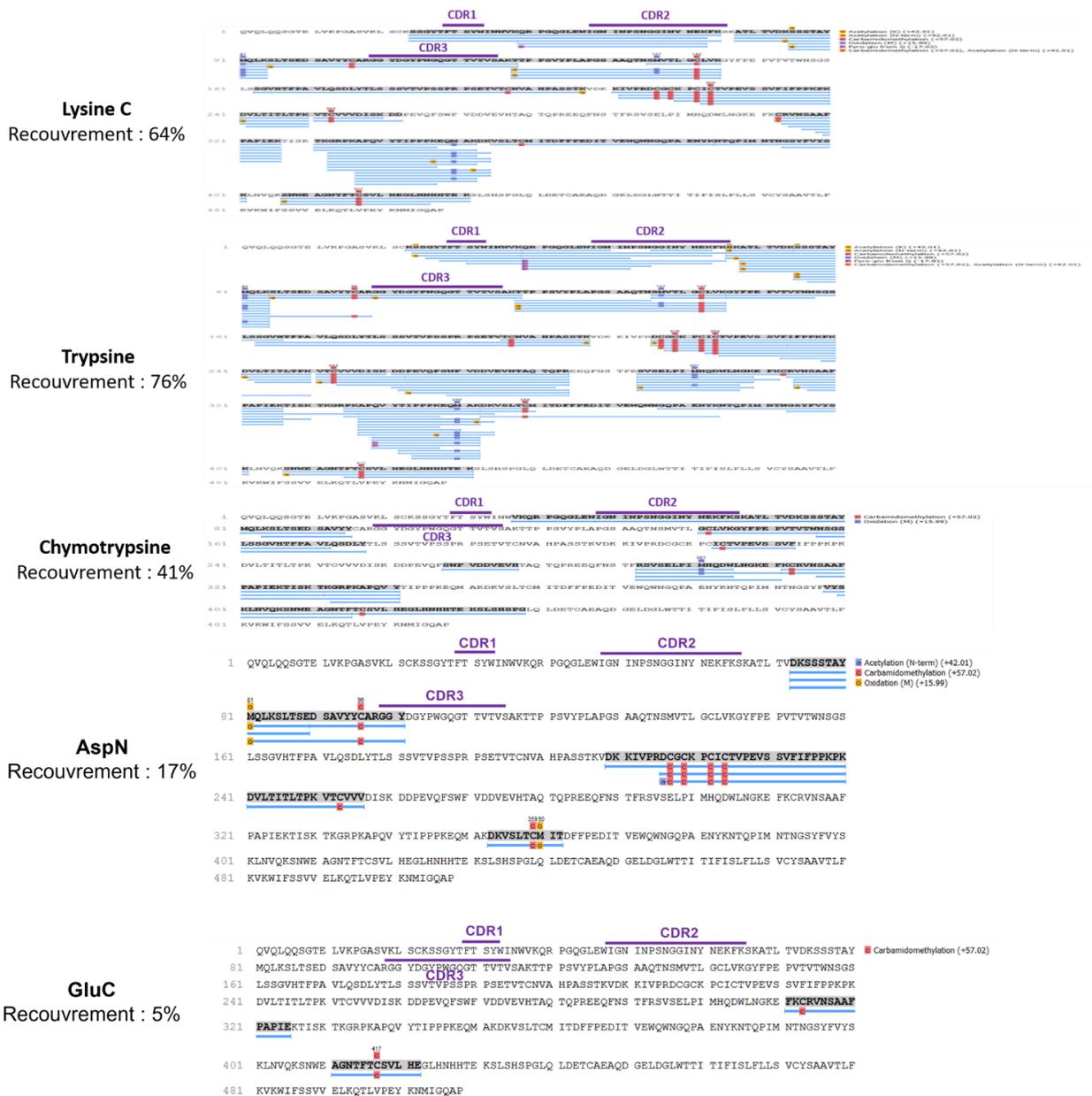


Figure 32 : Taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde de l'immunoglobuline G murine anti-desmoglène-3 humaine AK23 par les peptides générés après digestion de l'Ac par les enzymes de restriction (LysC, trypsin, chymotrypsine, AspN et GluC) et séquencés par spectrométrie de masse

Les séquences des peptides générées par spectrométrie de masse ont été comparées aux séquences de la chaîne lourde d'AK23 publiées (Tsunoda et al., 2011). Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par la LysC est de 76%. Les complémentarité-déterminant région (CDR) 1, 2 et 3 sont entièrement recouverts par des peptides. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par la trypsin est de 64%. Les CDR1, 2 et 3 sont également entièrement recouverts par des peptides. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par la chymotrypsine est de 41% et seul le CDR2 est recouvert par des peptides. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par AspN est de 17%. Les CDR1 et 2 ne sont pas recouverts par des peptides tandis que seuls trois acides aminés du CDR3 sont recouverts. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne lourde d'AK23 par les peptides générés après digestion par GluC est de 5%. Aucun CDR n'est recouvert par un peptide généré après digestion par l'enzyme.

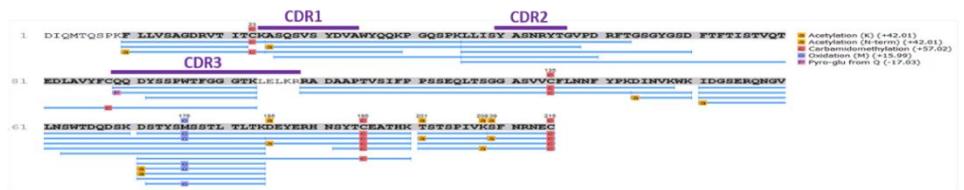
Concernant la chaîne légère, le taux de recouvrement de la séquence d'AK23 par les peptides générés après digestion par la LysC est de 93%, ce qui est bien meilleur que pour la

chaîne lourde (Figure 33). Les CDR1 et 2 sont entièrement recouverts par des peptides, en revanche le CDR3 n'est recouvert qu'en partie. Pour la trypsine, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 est de 95%, ce qui est supérieur au taux de recouvrement de la chaîne lourde. Les CDR1 et 2 sont recouverts entièrement par des peptides mais le CDR3 n'est recouvert qu'en partie. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par la chymotrypsine est seulement de 42% et seul le CDR2 est recouvert par des peptides. Pour AspN, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion de l'Ac par l'enzyme est de 62%, ce qui est bien meilleur que pour la chaîne lourde. Seuls les CDR1 et 2 sont entièrement recouverts par des peptides tandis que seuls deux acides aminés du CDR3 sont recouverts. Pour GluC, le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion de l'Ac par l'enzyme est seulement de 9% avec aucun CDR recouvert par un peptide.

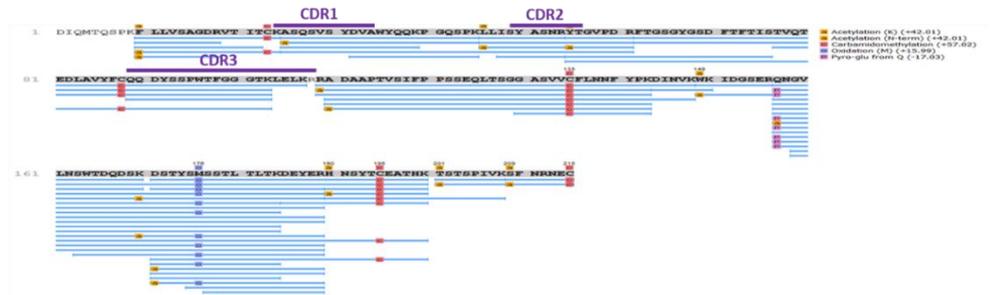
En conclusion, les taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère par les peptides générés après digestion par les enzymes LysC, trypsine et AspN sont bien meilleurs que pour la chaîne lourde mais le CDR3 n'est pas recouvert entièrement. Cela est dû à la présence de plusieurs sites de restriction des enzymes dans le CDR3 de la chaîne légère (un acide aspartique, deux lysines et une arginine) alors qu'il n'existe qu'un seul site de restriction (un acide aspartique) dans le CDR3 de la chaîne lourde. En revanche, les taux de recouvrement des séquences de la chaîne lourde et la chaîne légère par les peptides générés après digestion par les enzymes chymotrypsine et GluC sont équivalents.

La trypsine et la LysC semblent être les meilleures enzymes de restriction pour notre analyse. Néanmoins, AspN possède un bon taux de recouvrement de la chaîne légère. La chymotrypsine possède un taux de recouvrement moyen qui peut s'expliquer par le fait que les fragments générés après digestion par la chymotrypsine sont trop petits pour être analysés correctement par le spectromètre de masse du fait du grand nombre de sites de restriction de l'enzyme. Pour finir, la digestion par GluC ne génère que peu de fragments, trop longs pour être analysables. Ainsi, les résultats provenant de la digestion des échantillons par GluC et la chymotrypsine ont été exclus de notre analyse. En revanche, la digestion par AspN a été conservée car elle possédait un bon taux de recouvrement de la chaîne légère d'AK23.

**Lysine C**  
Recouvrement : 93%



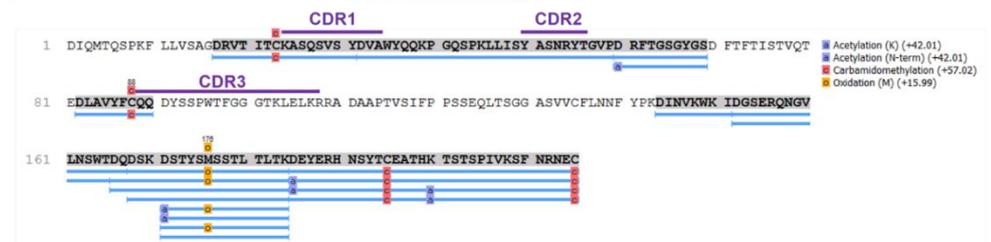
**Trypsine**  
Recouvrement : 95%



**Chymotrypsine**  
Recouvrement : 42%



**AspN**  
Recouvrement : 62%



**GluC**  
Recouvrement : 9%

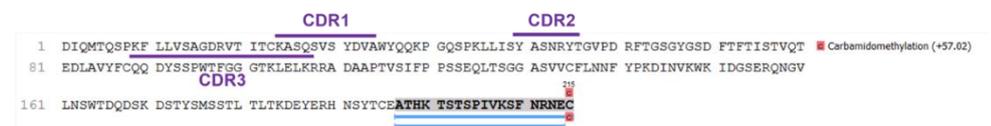


Figure 33 : Taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère de l'immunoglobuline G murine anti-desmoglérine-3 humaine AK23 par les peptides générés après digestion par les enzymes de restriction (LysC, trypsin, chymotrypsine, AspN et GluC) séquencés par spectrométrie de masse

Les séquences des peptides générées par spectrométrie de masse ont été comparées aux séquences de la chaîne légère d'AK23 publiées (Tsunoda et al., 2011). Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par la LysC est de 93%. Les complémentarité-déterminant région (CDR) 1 et 2 sont recouverts entièrement par des peptides, en revanche le CDR3 n'est recouvert qu'en partie. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par la trypsin est de 95%. Les CDR 1 et 2 sont recouverts entièrement par des peptides, en revanche le CDR3 n'est recouvert qu'en partie. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par la chymotrypsine est de 42% et seul le CDR2 est recouvert par des peptides. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par AspN est de 62%. Les CDR 1 et 2 sont recouverts par des peptides tandis que seuls deux acides aminés du CDR3 sont recouverts. Le taux de recouvrement de la séquence de la chaîne légère d'AK23 par les peptides générés après digestion par GluC est de 9%. Aucun CDR n'est recouvert par un peptide généré après digestion par l'enzyme.

### **3. Digestion des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 d'un patient atteint de pemphigus en phase active par différentes enzymes de restriction : trypsine, LysC et AspN**

Après avoir sélectionné les enzymes de restriction, le but est maintenant de reconstituer la séquence complète des chaînes lourdes et légères des IgG anti-DSG3 polyclonales des patients sans séquence de référence, contrairement à AK23.

Les IgG anti-DSG3 d'un patient atteint de pemphigus en phase active ont été analysées *via* le protocole mis au point à partir d'AK23. A partir des peptides obtenus après digestion des aAc par les 3 enzymes de restriction sélectionnées et analyse par spectrométrie de masse, des séquences peptidiques ont été générées *via* un algorithme créé par le Pr. Lecroq en prenant en compte des chevauchements entre peptides d'au moins trois acides aminés. Malheureusement, ces séquences peptidiques n'étaient pas assez longues pour contenir la séquence complète des aAc, ni même celle de leur partie variable. En effet, pour la chaîne lourde, la plus grande séquence peptidique faisait 46 acides aminés alors que pour la chaîne légère, elle faisait 47 acides aminés, sachant que d'après les résultats publiés, la partie variable de la chaîne lourde d'AK23 possède 120 acides aminés tandis que la partie variable de sa chaîne légère est composée 113 acides aminés. De plus, parmi les séquences peptidiques générées par chevauchement, très peu d'entre elles permettaient d'obtenir le CDR3 complet, essentiel à la reconnaissance de l'Ag par l'Ac.

La Figure 34 représente la localisation schématique de 15 séquences peptidiques générées par le chevauchement de peptides obtenus après digestion par les 3 enzymes de restriction sélectionnées sur la partie variable des aAc. Pour obtenir ces résultats, 38 séquences peptidiques ont été analysées. Les 23 autres séquences correspondaient soit à la partie constante des IgG anti-DSG3, soit à des contaminants tels que les enzymes de restriction ou des protéines du complément. Huit séquences sur les 15 recouvrent au moins partiellement un CDR dont 4 le recouvre entièrement. Malheureusement, ces séquences ne sont jamais assez longues pour contenir plusieurs CDRs.

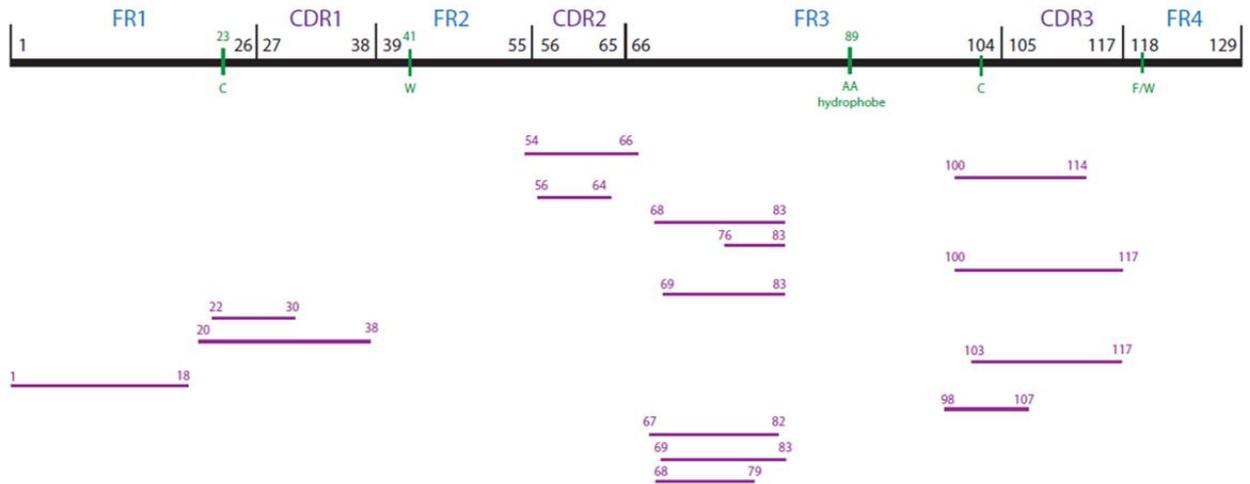


Figure 34 : Représentation schématique de la localisation des séquences peptidiques générées par le chevauchement de peptides obtenus après digestion par les 3 enzymes de restriction sélectionnées (Trypsine, LysC et AspN) sur la partie variable de auto-anticorps

La localisation des régions framework (FR), des complémentarité déterminant region (CDR) et des acides aminés conservés (en vert) a été réalisée à partir des données publiées par IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (Lefranc et al., 2015). Quinze séquences peptidiques obtenues via chevauchement de peptides générés par la digestion des immunoglobulines G anti-desmoglérine 3 d'un patient en phase active par plusieurs enzymes de restriction sont représentées. Huit séquences sur les 15 recouvrent au moins partiellement un CDR mais seul quatre séquences le recouvrent entièrement. Néanmoins ces séquences ne sont jamais assez longues pour recouvrir en même temps que le CDR les parties germinales ou régions framework entourant le CDR. C = cystéine ; W= tryptophane ; AA = acide aminé ; F = phénylalanine.

D'après les données publiées par Ellebrecht *et al.*, le CDR3 des IgG anti-DSG3 des patients atteints de pemphigus est relativement long, avec une composition moyenne de 18,8 acides aminés pour la chaîne lourde et de 9,8 acides aminés pour la chaîne légère (Ellebrecht *et al.*, 2018). Cette longueur complique l'obtention des séquences, en augmentant statistiquement le nombre de sites de restriction possible et donc la perte d'information. En effet, la répartition en acides aminés cibles de nos enzymes de restriction dans les CDR3 des patients atteints de pemphigus semblent relativement importante avec en moyenne 1,96 acide aspartique, 1,90 arginine, 1,05 phénylalanine, 0,79 leucine, 0,62 méthionine, 0,39 asparagine, 0,34 tryptophane et acide aspartique, 0,22 glutamine et 0,09 lysine présents dans le CDR3 de la chaîne lourde et 1,69 glutamine, 0,69 leucine, 0,49 acide glutamique, 0,39 acide aspartique, 0,21 tryptophane, 0,11 phénylalanine, 0,06 lysine, 0,04 arginine et méthionine et 0 asparagine présents dans le CDR3 de la chaîne légère. Ces résultats démontrent la difficulté d'obtenir une séquence peptidique recouvrant à la fois le CDR3 et les régions germinales qui l'entourent même par chevauchement de peptides générés par plusieurs enzymes de restriction.

#### **4. Conclusions**

En conclusion, les séquences obtenues grâce à notre algorithme n'étaient pas assez longues pour contenir plusieurs CDRs. Or, la reconnaissance antigénique s'effectue par l'association tridimensionnelle des trois CDRs de la chaîne lourde et des trois CDRs de la chaîne légère. Pour obtenir le répertoire des aAc, il est donc nécessaire d'obtenir une séquence composée des trois CDRs de chaque chaîne. De plus, la méthode d'analyse développée est très bien adaptée pour séquencer des Ac monoclonaux comme AK23. En effet, la présence d'un seul Ac dans l'échantillon augmente la profondeur de lecture c'est-à-dire le nombre de peptides chevauchants recouvrant la séquence d'acide aminés. En revanche, les IgG anti-DSG3 des patients sont polyclonales, ce qui ajoute une difficulté, puisque la profondeur de lecture sera plus faible. Par ailleurs, en condition polyclonale, il n'est pas possible de savoir à quel clone d'aAc appartient un peptide généré par spectrométrie de masse. La seule solution pour pouvoir différencier les clones entre eux est de réussir à obtenir la séquence complète de la partie variable des différents aAc.

De plus, dans notre étude, une base de données publique de séquences protéiques d'Ac a été utilisée alors que, dans l'article publié par Chen *et al.*, les auteurs ont utilisé les séquences obtenues à partir des BCR des LB circulants du même patient comme base de données. La base de données ainsi obtenue semble plus proche des séquences des aAc circulants que la base de données utilisée dans notre analyse et permet donc de combler les « trous » présents dans les séquences obtenues par chevauchement des fragments peptidiques issus des digestions par les différentes enzymes de restriction.

### **III. Etude longitudinale de la N-glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par protéomique dans le pemphigus, avant et après traitement**

Si la plupart des études portent sur la N-glycosylation des IgG dans les MAI, certaines études se sont intéressées aux aAc. Ces études ont été réalisées sur différents aAc et MAI telles que les Ac anti-protéine citrullinée dans la polyarthrite rhumatoïde, les Ac anti-protéinase 3 dans la granulomatose avec polyangéite, les Ac anti-globule rouge dans l'anémie hémolytique auto-immune ou encore les Ac anti-histone dans le lupus érythémateux systémique (Magorivska *et al.*, 2016; Rombouts *et al.*, 2015; Scherer *et al.*, 2010; Sonneveld

*et al.*, 2017; Wuhler *et al.*, 2015). Ces études ont démontré des différences de *N*-glycosylation entre les aAc et les IgG.

Après avoir étudié la *N*-glycosylation des IgG dans le pemphigus, nous avons voulu comparer ce profil de *N*-glycanes à celui des aAc IgG anti-DSG3. Pour cela, un protocole d'étude de la *N*-glycosylation des aAc a été développé.

### **1. Mise au point du protocole d'étude de la *N*-glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par spectrométrie de masse**

Contrairement aux IgG où la quantité n'est pas limitante, les IgG anti-DSG3 sont plus difficiles à obtenir. Dans un premier temps, nous avons dû, en collaboration avec le laboratoire Glyco-MEV UPRES-EA 4358 de l'Université de Rouen Normandie, adapter le protocole d'étude de la *N*-glycosylation pour des petites quantités d'IgG anti-DSG3 puis l'optimiser afin de pouvoir réaliser cette analyse en parallèle de celle du répertoire en utilisant une quantité identique d'IgG anti-DSG3 purifiées (Figure 35).

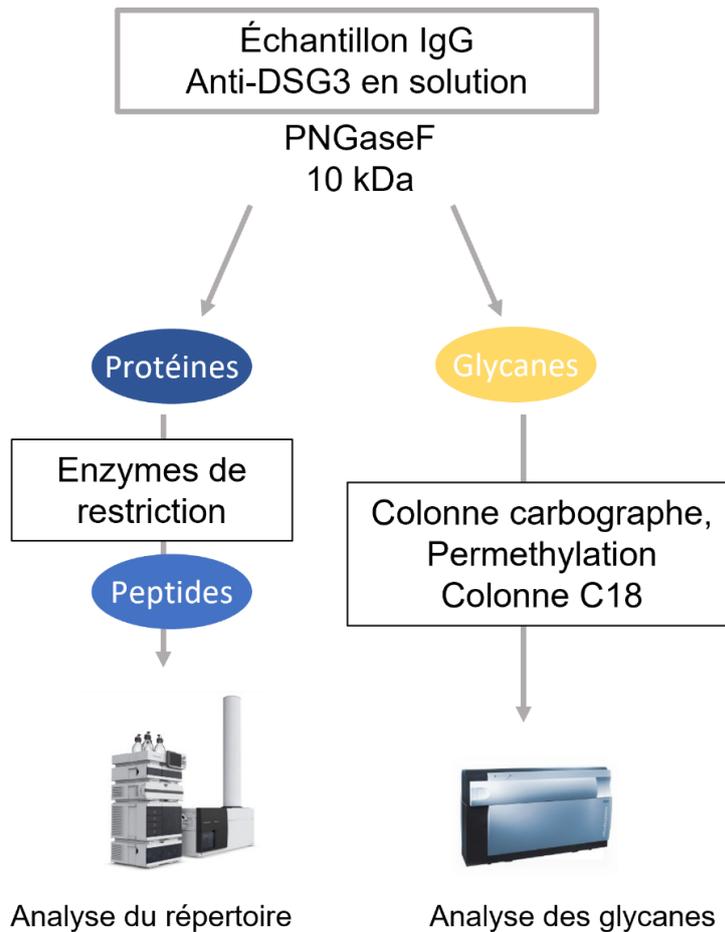


Figure 35 : Représentation schématique du protocole optimisé d'analyse des immunoglobulines G anti-desmogléine 3 par spectrométrie de masse

Les immunoglobuline G anti-desmogléine 3 (environ 20µg) sont tout d'abord digérées par la N-glycosidase F, une enzyme qui va séparer les N-glycanes des anticorps (Ac). Les N-glycanes sont ensuite isolés des Ac via des unités de filtration centrifuge de type Amicon Ultra (10kDa, Merck Milipore) puis purifiés sur colonne carbone graphite. Puis, les N-glycanes sont perméthylés, c'est-à-dire que les groupements hydroxyles (-OH) seront transformés en groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>) permettant une meilleure ionisation des échantillons au moment de l'analyse par spectrométrie de masse. Pour finir, les N-glycanes sont élués sur colonne à phase inverse C18 hydrophobe avant d'être analysés au spectromètre de masse Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time Of Flight (MALDI-TOF). En parallèle, les Ac dé-glycosylés sont déposés sur gel dénaturant et utilisés pour réaliser l'analyse du répertoire sur le spectromètre Qexactive décrite précédemment.

La mise au point a été réalisée avec 20µg d'IgG anti-DSG3 provenant du même patient en phase active que pour l'étude du répertoire (titre d'IgG anti-DSG3 : 1575 UI/mL). Cette quantité d'IgG anti-DSG3 a été choisie car c'était la quantité maximale que nous pouvions purifier à partir des volumes de sérum à notre disposition pour les patients en rémission qui ont souvent un titre d'IgG anti-DSG3 plus faible qu'en phase active. Afin de purifier 20µg d'IgG anti-DSG3, 500µg d'IgG ont été nécessaires (soit 100µL de sérum) pour le patient test. D'après nos calculs, pour un patient en rémission avec un titre d'IgG anti-DSG3 à 65 UI/mL, 12,1mg d'IgG seraient nécessaires afin de purifier 20µg d'IgG anti-DSG3 (soit 2,4mL de sérum). Or, en moyenne, le volume de sérum à notre disposition pour les patients en phase active est de

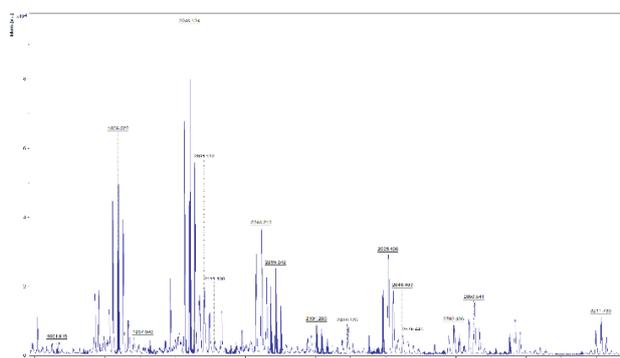
6,6mL et de 3,3mL pour les patients en rémission.

Les IgG anti-DSG3 ont d'abord été digérées par la *N*-glycosidase F afin de séparer le *N*-glycane de l'Ac. La *N*-glycosidase F est une enzyme qui va cliver la liaison entre le premier résidu GlcNAc (Figure 18) et l'asparagine portant le *N*-glycane présent sur l'Ac. Après digestion par l'enzyme, les *N*-glycanes sont séparés des Ac *via* des unités de filtration centrifuge de type Amicon Ultra (10kDa, Merck Milipore) puis les IgG anti-DSG3 dé-glycosylées sont déposées sur un gel dénaturant SDS-PAGE afin de réaliser l'analyse du répertoire. Les *N*-glycanes sont, quant à eux, purifiés sur une colonne carbone graphite afin d'éliminer les dernières traces de sel. Puis, ils sont perméthylés, c'est-à-dire que les groupements hydroxyles (-OH) sont transformés en groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>), ce qui permet une meilleure ionisation des échantillons au moment de l'analyse par spectrométrie de masse. Pour finir, les *N*-glycanes sont élués sur colonne à phase inverse C18 hydrophobe avant d'être analysés au spectromètre de masse *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time Of Flight* (MALDI-TOF).

## 2. Résultats de l'étude de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3

Malheureusement, la quantité d'IgG anti-DSG3 utilisée n'était pas suffisante pour permettre une analyse correcte des *N*-glycanes. En effet, les spectres de masse obtenus possédaient un bruit de fond important qui recouvrait les pics des *N*-glycanes, rendant l'analyse impossible (Figure 36). Malheureusement, nous n'avions pas assez de sérum à disposition pour purifier des quantités supérieures à 20µg d'IgG anti-DSG3 provenant des patients en rémission avec aAc. Parmi notre sélection de patients, seuls 3 patients auraient pu fournir 50µg d'IgG anti-DSG3 et seulement 2 patients 100µg. En effet, même si les titres d'IgG anti-DSG3 des patients sélectionnés pour notre étude sont relativement élevés en phase active (1487 UI/mL en moyenne ; de 120 UI/mL à 4975 UI/mL), leurs titres d'IgG anti-DSG3 lors de la phase de rémission sont situés entre 20 UI/mL et 1025 UI/mL avec une moyenne de 271 UI/mL. Ainsi, l'analyse de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 purifiées aurait pu être réalisée avec des quantités supérieures à 50µg d'IgG anti-DSG3 chez la quasi-totalité des patients en phase active mais pas au moment de leur rémission, ce qui n'aurait pas permis de répondre à notre hypothèse.

Spectre de masse obtenu à partir de *N*-glycanes purifiés provenant d'IgG



Spectre de masse obtenu à partir de *N*-glycanes purifiés provenant d'IgG anti-DSG3

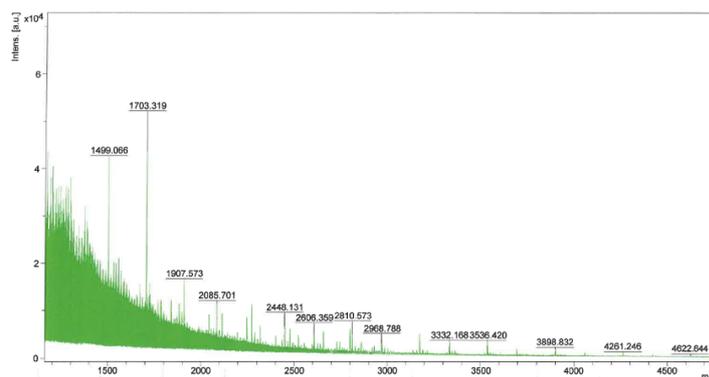


Figure 36 : Spectres de masse de *N*-glycanes issus d'immunoglobuline G ou d'immunoglobuline G anti-desmoglérine 3

Le premier spectre de masse est obtenu à partir de *N*-glycanes purifiés provenant d'immunoglobuline G (IgG) de patients atteints de pemphigus. Ce spectre est parfaitement lisible avec des pics de masse qui se dégagent du bruit de fond. Le deuxième spectre de masse est obtenu à partir de *N*-glycanes purifiés provenant d'IgG anti-desmoglérine 3 de patients atteints de pemphigus. Le bruit de fond est important et va recouvrir les pics de masse, rendant l'analyse impossible.

### 3. Conclusions

En conclusion, la quantité d'IgG anti-DSG3 purifiées testée n'était pas suffisante pour obtenir une analyse correcte des *N*-glycanes. Malheureusement, la sérothèque à notre disposition ne nous a pas permis d'avoir accès à des volumes de sérum suffisants pour pouvoir purifier des quantités d'IgG anti-DSG3 supérieures à 20 $\mu$ g chez la plupart des patients en rémission avec aAc.

## IV. Conclusions de la partie II

Cette deuxième partie de thèse a permis de démontrer que la pathogénicité des IgG anti-DSG3 était relativement bien corrélée avec le statut clinique des patients excepté aux temps tardifs où elle semble plutôt anticiper l'apparition de signes cliniques. De plus, des modifications de la pathogénicité des IgG anti-DSG3 sont observées au cours du temps, ce qui démontre que les aAc changent au cours du temps.

Afin d'expliquer les changements de pathogénicité observés chez les IgG anti-DSG3, nous avons choisi d'analyser le répertoire et la *N*-glycosylation de ces aAc au cours du temps, deux facteurs pouvant entraîner des modifications de pathogénicité des Ac. Malheureusement, la faible quantité de sérum à notre disposition et donc d'IgG anti-DSG3 purifiées ainsi que l'absence des séquences des BCR anti-DSG3 de nos patients ne nous ont pas permis de finaliser ces analyses.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

# Première partie : Etude longitudinale des immunoglobulines G dans le pemphigus

L'objectif de ce projet était de déterminer si les aAc détectés chez les patients en rémission complète après traitement présentaient le même pouvoir pathogène que ceux en phase active. Pour cela, nous avons étudié longitudinalement la pathogénicité *in vitro* et la *N*-glycosylation des IgG, cette dernière ayant été démontrée comme étant modifiée dans des MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux systémique (Gudelj *et al.*, 2018).

## I. Lien entre la *N*-glycosylation et la pathogénicité des immunoglobulines G

La *N*-glycosylation est la glycosylation principale des IgG. Le *N*-glycane présent sur la partie Fc des IgG va impacter la stabilité, la conformation ainsi que les fonctions effectrices de la molécule (Gudelj *et al.*, 2018a). En revanche, s'il est présent sur la partie Fab, il affectera l'affinité de l'Ac pour son Ag (Coloma *et al.*, 1999; Leibiger *et al.*, 1999; Wallick *et al.*, 1988). La *N*-glycosylation des IgG d'un individu sain est très stable sur des périodes de plusieurs années (Gornik *et al.*, 2009; Hennig *et al.*, 2016) tandis que de nombreuses modifications de la *N*-glycosylation des IgG sont observées lors de maladies et plus particulièrement lors de MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique, la granulomatose avec polyangéite ou l'anémie hémolytique auto-immune (Gudelj *et al.*, 2018a). Néanmoins, dans le pemphigus, aucune corrélation n'a encore été faite entre l'activité pathogénique des aAc *in vitro* et *in vivo*, et leur profil de *N*-glycosylation.

Dans un premier temps, nous avons démontré qu'en retirant les acides sialiques terminaux de l'Ac monoclonal AK23, son activité pathogénique était diminuée. Nous avons également confirmé ces résultats avec des IgG de patients en phase active. Ces résultats sont surprenants car de faibles niveaux de sialylation des IgG ont été décrits dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, la granulomatose avec polyangéite, le lupus érythémateux systémique ou l'anémie hémolytique auto-immune (Espy *et al.*, 2011; Gudelj *et al.*, 2018b; Parekh *et al.*, 1985; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhler *et al.*, 2015). Ces différentes études suggèrent que la perte des acides sialiques entrainerait une augmentation de la pathogénicité des Ac, ce qui est à l'opposé de nos résultats *in vitro*. En

revanche, nous observons bien une diminution de la sialylation chez les patients en phase active comparés aux donneurs sains. Pour expliquer ces résultats contradictoires, nous avons émis l'hypothèse que les *N*-glycanes qui induisent des effets sur la pathogénicité des IgG *in vitro* sont ceux présents sur la partie Fab de l'Ac. En effet, les tests de pathogénicité *in vitro* reposent sur l'action directe des aAc sur les cellules puisqu'ils se réalisent en l'absence de complément ou de FcγR. De plus, les analyses de la *N*-glycosylation des IgG par spectrométrie de masse ne différencient pas les *N*-glycanes provenant de la partie Fab de ceux provenant de la partie Fc. Néanmoins, les *N*-glycanes présents sur la partie Fc étant majoritaires, les résultats obtenus reflètent plutôt la *N*-glycosylation de la partie Fc de l'Ac, ce qui pourrait expliquer les différences entre nos résultats de pathogénicité *in vitro* et l'analyse des *N*-glycanes des patients. Cependant, pour vérifier notre hypothèse, l'analyse de la *N*-glycosylation de la partie Fab devrait être réalisée.

Dans un second temps, la pathogénicité des IgG de patients *in vitro* a été corrélée avec l'état clinique des patients. En phase aiguë de la maladie, il existe une bonne corrélation entre titre élevé d'Ac anti-DSG3, maladie active et activité pathogène des IgG *in vitro*. Six mois après traitement, tous les patients sont en rémission clinique sous traitement et il y a une bonne corrélation entre titre faible d'Ac anti-DSG3, rémission et absence d'activité pathogène des IgG *in vitro* chez deux des trois patients. Cependant, le patient 2 est une exception puisque ses IgG gardent des propriétés pathogènes tout au long de l'étude. Pour les temps tardifs, il n'y a pas de corrélation entre statut clinique et pathogénicité des Ac à J730 où les patients 2 et 3 possèdent des IgG pathogènes alors qu'ils sont en rémission. Les principales différences entre les J180 et J730 sont : la dose de corticostéroïdes reçue par les patients et leurs titres d'IgG anti-DSG3. En effet, lors des temps précoces, les doses reçues sont relativement élevées (de 25 à 40 mg/kg/j à J180) alors qu'elles diminuent au cours du temps (de 0 à 15 mg/kg/j à J730). Parallèlement, les titres d'IgG anti-DSG3 augmentent de 3,9 fois pour le patient 2 et de 15,6 fois pour le patient 3. Nous pouvons alors supposer que lorsque les doses de corticostéroïdes diminuent, les patients restent en rémission clinique mais leur aAc circulants redeviennent pathogènes. Ainsi, lorsque le titre d'aAc augmente chez ces patients et atteint un certain seuil, les patients rechuteront. Cette hypothèse semble juste puisque les patients 2 et 3 ont rechuté dans les mois suivants l'analyse de leurs IgG.

Dans un troisième temps, nous avons étudié le *N*-glycome des IgG de patients sur

plusieurs années afin de le corrélérer au statut clinique des patients et à la pathogénicité des Ac *in vitro*. Chez les donneurs sains, le *N*-glycome plasmatique a été démontré comme étant stable sur plusieurs années (Hennig *et al.*, 2016). Ainsi, les quelques changements observés chez les patients au cours du temps sont très probablement dus à leur état clinique. Une tendance à la diminution de la sialylation chez les IgG de patients en phase active comparées aux IgG de donneurs sains suivi d'une augmentation de la sialylation lorsqu'ils atteignent la rémission (J180) ont été observées. Ces résultats sont cohérents avec une étude réalisée dans la vascularite auto-immune (Kemna *et al.*, 2017). De plus, la présence d'une forte sialylation des IgG a été décrite comme diminuant l'affinité pour les FcγR activateurs. Cela va entraîner une réduction des fonctions effectrices des IgG telles que l'ADCC et donc avoir un effet plutôt anti-inflammatoire (Gudelj *et al.*, 2018a). De plus, une diminution de la fucosylation est également observée chez les patients en phase active comparés aux donneurs sains. La fucosylation est un phénomène plus hétérogène dans les MAI puisqu'elle est diminuée sur les IgG de patients atteints de lupus érythémateux systémique (Vučković *et al.*, 2015) ou de MAI de la thyroïde (Martin *et al.*, 2020) mais est augmentée sur les IgG de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Gińdzieńska-Sieśkiewicz *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2020). Néanmoins, il a été démontré que l'absence de fucose sur le *core* entraînait une amélioration de l'activité ADCC *via* une meilleure liaison au récepteur FcγRIIIA (Kanda *et al.*, 2007), ce qui suggérerait une association entre baisse de la fucosylation et l'augmentation de la pathogénicité des Ac.

Dans l'ensemble, nous démontrons dans cette étude que la composition des *N*-glycanes présents sur les IgG de patients, à l'exception des acides sialiques aux temps précoces, est relativement stable au cours du temps, même si quelques différences entre les individus sont observables. Ces résultats semblent indiquer qu'il existe un profil de *N*-glycosylation spécifique au pemphigus qui n'est modifié ni par le traitement ni par le changement de statut clinique. On peut donc supposer que les mécanismes qui aient entraîné ces modifications dans la *N*-glycosylation des patients n'aient pas été résolus par le traitement. Peu d'études ont analysées les effets des corticostéroïdes sur la *N*-glycosylation des IgG sériques. Néanmoins, une étude a démontré un rôle des corticostéroïdes dans le contrôle de l'expression de la sialyltransférase, l'enzyme responsable de la sialylation tandis qu'une autre étude n'a trouvé aucune association entre la modification de la *N*-glycosylation des IgG chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique et le traitement par corticostéroïdes (Lauc *et al.*,

2013; Maguire *et al.*, 1998). Il semblerait que, dans le pemphigus, les corticostéroïdes n'induisent pas non plus de modifications de la *N*-glycosylation des IgG.

## II. Identification de *N*-glycanes spécifiques du pemphigus

Ce profil de *N*-glycosylation spécifique du pemphigus a été étudié plus en détails *via* l'analyse des structures individuelles de *N*-glycanes présentes sur les IgG de nos patients en phase active comparées à celles présentes sur les IgG de donneurs sains. Cette étude a démontré que les IgG des patients en phase active possédaient plus de structures dites non-maturées c'est-à-dire sans galactose ni acide sialique terminaux et moins de structures dites maturées que les IgG de donneurs sains. En condition physiologique, les *N*-glycanes présents sur les IgG subissent une maturation complète dans l'appareil de Golgi c'est-à-dire qu'ils présentent des galactoses et parfois des acides sialiques terminaux. Nous retrouvons ces résultats chez les donneurs sains mais, chez les patients en phase active, une diminution des structures matures et une augmentation des structures immatures sont observées. Ces résultats semblent démontrer une dérégulation de la maturation des *N*-glycanes présents sur les IgG des patients. De plus, une diminution de la galactosylation des IgG est également observée dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique, le syndrome de Sjögren, la granulomatose avec polyangéite, certaines maladies céliaques, les myosites ainsi que l'anémie hémolytique auto-immune (Bond *et al.*, 1996, 1997; Cremata *et al.*, 2003; Gindzienska-Sieskiewicz *et al.*, 2007; Gudelj *et al.*, 2018b; Holland *et al.*, 2006; Parekh *et al.*, 1985; Perdivara *et al.*, 2011; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhrer *et al.*, 2015). Une diminution de la sialylation est également observée dans la polyarthrite rhumatoïde, la granulomatose avec polyangéite, le lupus érythémateux systémique et l'anémie hémolytique auto-immune (Espy *et al.*, 2011; Gudelj *et al.*, 2018b; Parekh *et al.*, 1985; Sonneveld *et al.*, 2017; Vučković *et al.*, 2015; Wuhrer *et al.*, 2015). Ce profil de *N*-glycosylation des IgG est donc présent dans de nombreuses MAI. L'hypothèse d'un défaut de maturation des *N*-glycanes présents sur les IgG des patients dans les MAI pourrait alors être posée. En effet, une étude effectuée dans la polyarthrite rhumatoïde a démontré une baisse de l'expression de l'enzyme  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransférase 1 qui limite la vitesse du transfert post-traductionnel de l'acide sialique aux *N*-glycanes liés aux IgG dans les cellules productrices d'Ac avant l'apparition de l'arthrite (Pfeifle *et al.*, 2017).

### III. Perspectives

Notre étude portant sur un petit nombre de patients, nous sommes actuellement en train de mener une deuxième étude sur une cohorte plus importante de patients afin de confirmer ces résultats. De plus, cette étude a pour but de déterminer le lien entre la *N*-glycosylation et les rechutes précoces chez les patients traités par Rituximab.

Certaines études se sont intéressées à la *N*-glycosylation sur les aAc dans différentes MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde, la granulomatose avec polyangéite, l'anémie hémolytique auto-immune ou lupus érythémateux systémique (Magorivska *et al.*, 2016; Rombouts *et al.*, 2015; Scherer *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 2017; Wuhler *et al.*, 2015). La plupart de ces études ont statué que la *N*-glycosylation des aAc était différente de celle des IgG et permettait même de prévoir les rechutes (Rombouts *et al.*, 2015). Ainsi, l'analyse de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 permettrait d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues lors de cette étude.

# Deuxième partie : Etude longitudinale des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléines 3 dans le pemphigus

Dans cette deuxième partie de thèse, la pathogénicité des aAc IgG anti-DSG3 a été étudiée longitudinalement afin de la comparer à celle des IgG et au statut clinique des patients. Nous avons ensuite étudié le répertoire et la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3.

## I. Comparaison de la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 et celle des immunoglobulines G

La pathogénicité des IgG anti-DSG3 et des IgG a été étudiée longitudinalement chez trois patients atteints de pemphigus qui gardaient des titres d'aAc forts tout au long de l'étude puis a été corrélée avec le statut clinique des patients.

En phase active, il existe une bonne corrélation entre la pathogénicité *in vitro* des IgG anti-DSG3, celle des IgG et le statut clinique des patients. En phase de rémission (J180), la pathogénicité *in vitro* des IgG anti-DSG3 et des IgG est corrélée au statut clinique pour deux patients (les patients 1 et 3). En revanche, pour le patient 2, les IgG anti-DSG3 et les IgG sont faiblement pathogènes. A 1 et 2 ans après traitement, la corrélation entre la pathogénicité des IgG anti-DSG3 et le statut clinique est relativement bonne excepté pour le patient 1. En effet, 2 ans après traitement, les IgG anti-DSG3 de ce patient sont pathogènes, ce qui n'est pas le cas de ses IgG. Une des hypothèses pouvant expliquer cette différence de pathogénicité est le titre d'aAc. En effet, pour réaliser le test de pathogénicité des IgG, nous avons toujours utilisé la même quantité d'IgG (50µg) quel que soit le titre d'aAc anti-DSG3. Le patient 1 possède un titre d'IgG anti-DSG3 de 1070 UI/mL à J730, ce qui est quasiment équivalent à celui qu'il possédait à J365 (1040 UI/mL) quand ses IgG étaient pathogènes. Le titre d'IgG anti-DSG3 ne semble donc pas être responsable de cette différence de pathogénicité. Néanmoins, on peut supposer qu'il y ait eu un changement de répertoire entre ces 2 temps en faveur de clones moins pathogènes. En effet, il a été démontré que les IgG anti-DSG3 ne possédaient pas tous le même pouvoir pathogène : seuls les aAc qui reconnaissaient les ectodomains 1, 2 et 4 de la DSG3 ont été décrits comme capables d'induire une acantholyse (Amagai *et al.*,

1992; Zenzo *et al.*, 2012). Ainsi, à titre égale, la pathogénicité des IgG sera différente car il y aura moins de clone pathogène. En revanche, en condition où l'on met les cellules uniquement en présence d'IgG anti-DSG3, les clones pathogènes seront en quantité suffisante pour induire une pathogénicité *in vitro*. Cette théorie permettrait également d'expliquer pourquoi le patient était en rémission alors qu'il possédait des IgG anti-DSG3 pathogènes.

D'autres différences de pathogénicité entre les IgG anti-DSG3 et les IgG sont visibles chez les patients 2 et 3. En effet, les IgG du patient 2 sont pathogènes tout au long de l'étude alors que ses IgG anti-DSG3 ne le sont plus dès J365. Des résultats similaires sont retrouvés chez le patient 3 où ses IgG sont de nouveau pathogènes après 2 ans de traitement, ce qui n'est pas le cas de ses IgG anti-DSG3. Une des hypothèses que nous avons émises pour expliquer cette différence de pathogénicité entre les IgG anti-DSG3 et les IgG est la présence d'autres aAc dans le sérum de ces patients. En effet, la présence d'aAc non-DSG dans le pemphigus a été démontrée par diverses observations telles que l'absence de corrélation entre les titres d'aAc anti-DSG et l'activité de la maladie chez certains patients et l'hétérogénéité de la maladie (Di Lullo *et al.*, 2019). Différentes études protéomiques ont identifié de nombreux aAc chez les patients atteints de pemphigus jouant un rôle dans la physiologie ou l'adhésion cellulaire des kératinocytes. Parmi ces nouveaux Ag, on peut citer les DSC, la plakophiline 3, la cadhérine E et les plakoglobines (protéines du desmosome), la protéine hSPCA1 ou Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase codée par le gène ATP2C1, les récepteurs cholinergiques, des protéines mitochondriales, la peroxydase thyroïdienne ou le récepteur FcεRI (Amber *et al.*, 2018). La présence de certains de ces aAc (anti-DSC3, anti-SPCA1 et anti-récepteur muscarinique de l'acétylcholine 3) a été étudiée lors d'une étude parallèle à cette thèse sur une large cohorte de patients atteints de pemphigus (papier en cours d'écriture). Les résultats de cette étude ont montré que les patients 2 et 3 possédaient des IgG anti-SPCA1 et anti-récepteur muscarinique de l'acétylcholine 3 en phase active mais qu'ils perdaient ces aAc après le début du traitement. Néanmoins, nous n'excluons pas la présence d'autres aAc pathogènes.

## **II. Etude longitudinale du répertoire des auto-anticorps immunoglobulines G anti-desmogléines 3 par protéomique dans le pemphigus, avant et après traitement**

Nous avons posé l'hypothèse que les différences de pathogénicité des IgG anti-DSG3 au

cours du temps étaient dû à un changement de répertoire des IgG anti-DSG3 circulantes. Un changement de répertoire est synonyme d'une modification de l'épitope reconnu par les aAc, ainsi les IgG anti-DSG3 ne seraient plus dirigées contre les mêmes ectodomains avant et après traitement entraînant une perte de la pathogénicité des aAc.

Pour démontrer ce changement de répertoire, nous avons choisi de séquencer la partie variable des IgG anti-DSG3 avant et après traitement par spectrométrie de masse. N'ayant pas accès aux séquences des BCR anti-DSG3 des patients, l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction a été privilégiée (trypsine, chymotrypsine, LysC, AspN, GluC). Le but était de réaliser un chevauchement entre les peptides générés après la digestion des IgG anti-DSG3 par ces différentes enzymes de restriction afin de reconstituer la séquence de la partie variable de ces aAc en utilisant la base de données publique IMGT. Malheureusement, les séquences obtenues grâce à notre algorithme n'étaient pas assez longues pour obtenir la séquence de la partie variable complète ni même pour contenir plusieurs CDRs. En effet, la méthode d'analyse que nous avons développée était très bien adaptée pour séquencer des Ac monoclonaux comme AK23 où la profondeur de lecture était importante. En revanche, les IgG anti-DSG3 de patients étant polyclonales, la profondeur de lecture sera plus faible. De plus, il sera impossible de savoir à quel Ac appartient un peptide sans avoir généré la séquence complète de la partie variable. Dans une étude proche de la nôtre, les auteurs ont utilisé les séquences obtenues à partir des BCR des LB circulants du même patient comme base de données (Chen *et al.*, 2017). Nous supposons que la base de données ainsi obtenue était plus proche des séquences des aAc circulants que la base de données que nous avons utilisée et plus particulièrement au niveau des régions germinales de la partie variable appelées régions *framework*. De plus, même si cet article démontrait que le répertoire des aAc sériques était plus polyclonale que celui mis en évidence par les études des BCR des LB anti-DSG, on peut s'attendre à ce que ces variations soient situées au niveau des CDRs et que les régions *framework* restent relativement stables.

### **III. Etude longitudinale de la N-glycosylation des immunoglobulines G anti-desmogléines 3 dans le pemphigus**

Les conclusions de notre étude portant sur la N-glycosylation des IgG sériques étaient que l'intensité des N-glycanes des IgG des patients, à l'exception des acides sialiques aux temps précoces, était relativement stable au cours du temps, même si quelques différences

entre les individus étaient observables. Néanmoins, de nombreuses études ont démontré que la *N*-glycosylation des aAc était différente de celle des IgG et permettait même de prévoir les rechutes (*Magorivska et al., 2016; Rombouts et al., 2015; Scherer et al., 2010; Sonneveld et al., 2017; Wuhler et al., 2015*).

Malheureusement, les quantités d'IgG anti-DSG3 utilisées dans notre étude n'étaient pas suffisantes pour obtenir une analyse correcte des *N*-glycanes. Néanmoins, la sérothèque à notre disposition ne nous permet pas d'avoir accès à des volumes de sérum suffisant pour purifier de plus grandes quantités d'IgG anti-DSG3 des patients en rémission avec aAc et analyser leur *N*-glycosylation. Ainsi, l'étude de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 aurait pu être réalisée chez certains patients en phase active mais pas au moment de leur rémission, ce qui ne nous aurait pas permis de répondre à notre hypothèse.

#### **IV. Perspectives**

L'étude longitudinale de la pathogénicité des IgG anti-DSG3 a démontré une corrélation avec le statut clinique des patients tandis que la persistance d'activité pathogène chez les aAc semble anticiper l'apparition de signes cliniques. Pour confirmer ces résultats, l'étude d'une plus grande cohorte serait nécessaire. De plus, lors de la comparaison entre la pathogénicité des IgG anti-DSG3 et celle des IgG, des différences de pathogénicité ont été observées. Chez certains patients, leurs IgG anti-DSG3 n'étaient pas pathogènes alors que leurs IgG l'étaient. Une des hypothèses que nous avons émises pour expliquer cette différence de pathogénicité était la présence d'autres aAc dans le sérum de ces patients. Nous sommes actuellement en train de finaliser une étude sur la présence de certains de ces aAc dans le sérum de patients atteints de pemphigus (anti-DSC3, anti-SPCA1 et anti-récepteur muscarinique de l'acétylcholine 3) dans une étude parallèle à cette thèse sur une large cohorte de patients. Néanmoins, nous n'excluons pas la présence d'autres aAc qui pourraient également induire une pathogénicité.

L'analyse du répertoire des IgG anti-DSG3 n'a pas pu être complétée car les séquences obtenues grâce à notre algorithme n'étaient pas assez longues pour obtenir la séquence complète de la partie variable. Nous avons posé l'hypothèse que pour finaliser cette analyse il serait nécessaire d'obtenir les BCR des LB circulants des patients dont nous cherchons à étudier le répertoire comme base de données. Néanmoins, nous avons commencé une étude

sur la reconnaissance des ectodomains de la DSG3 par les aAc. Cette étude nous permettra d'obtenir des premiers éléments de réponse quant à l'évolution du répertoire des IgG anti-DSG3 au cours du temps.

Pour finir, nous avons analysé la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3. Malheureusement, cette étude n'a pu aboutir du fait d'une quantité limitée de sérum. En effet, l'étude des *N*-glycanes par spectrométrie de masse demande des quantités importantes d'Ig. Or, les IgG anti-DSG3 sont relativement rares dans le sérum et plus particulièrement après traitement où les titres d'aAc des patients sont relativement bas. Réaliser cette étude demanderait donc de collecter une grande quantité de sérum que nous n'avons pas à disposition.

# CONCLUSION

La pathogénicité des IgG est relativement bien corrélée avec le statut clinique des patients aux temps précoces (phase active et 6 mois après traitement), tandis que la persistance d'une activité pathogène des IgG *in vitro* au cours de l'évolution de la maladie chez les patients en rémission clinique semble être prédictif de la rechute. Un profil particulier de *N*-glycosylation, retrouvé dans différentes MAI, est observé chez les patients comparés aux donneurs sains. Néanmoins ce profil n'est pas lié au statut clinique des patients puisqu'il est conservé au cours du temps même quand les patients sont en rémission. En conclusion, les propriétés pathogènes des IgG ne semblent pas être dues à des variations des *N*-glycanes présents sur les IgG au cours de l'évolution du pemphigus. Notre cohorte de patients étant relativement petite, ces résultats doivent être validés avec une plus grande cohorte.

La pathogénicité des IgG anti-DSG3 *in vitro* semble être mieux corrélée avec le statut clinique des patients que celle des IgG et permet même d'anticiper l'apparition de signes cliniques chez plusieurs patients. Des modifications de la pathogénicité des IgG anti-DSG3 sont observées au cours du temps, ce qui démontre un changement dans ces aAc au cours du temps. Le développement de méthodes d'étude du répertoire et de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 n'a pas été finalisé car certains paramètres nous manquent afin de pouvoir les compléter. En effet, la quantité de sérum, et donc d'IgG anti-DSG3 purifiées, est faible et les séquences des BCR anti-DSG3 de nos patients sont manquantes. Néanmoins, une étude est en cours afin d'étudier la reconnaissance des ectodomains de la DSG3 par les aAc, ce qui nous donnera des premiers éléments de réponse sur l'évolution du répertoire des IgG anti-DSG3 au cours du temps. Comme précédemment, une cohorte plus importante de patients serait nécessaire pour confirmer les résultats sur la pathogénicité des IgG anti-DSG3.

De façon intéressante, des différences entre la pathogénicité des IgG et celle des IgG anti-DSG3 ont été observées. Une des hypothèses émises pour expliquer cette différence était la présence d'autres aAc dans le sérum de ces patients. Une étude sur la présence de certains de ces aAc (anti-DSC3, anti-SPCA1 et anti-récepteur muscarinique de l'acétylcholine 3) est en cours sur une large cohorte de patients atteints de pemphigus.

En conclusion, la pathogénicité des IgG et des IgG anti-DSG3 semble être un phénomène

complexe dû à de nombreux facteurs. Dans cette thèse, seul un petit nombre de ces facteurs ont été explorés mais ce travail s'intègre dans une dynamique de recherche plus importante au sein du laboratoire. Actuellement, en plus de l'étude de la pathogénicité *in vitro*, de l'étude du répertoire et de la *N*-glycosylation des IgG anti-DSG3 initiées dans cette thèse, différentes études sont en cours telles qu'une étude portant sur les isotypes et les sous-classes des aAc anti-DSG3, une étude portant sur la présence et la pathogénicité *in vitro* et *in vivo* d'autres aAc dans le sérum des patients ou encore une étude portant sur la reconnaissance épitopique des aAc anti-DSG1 et anti-DSG3.

# BIBLIOGRAPHIE

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 3, 549–557.

Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54–60.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.

Alcover, A., Alarcón, B., and Di Bartolo, V. (2018). Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology* 36, 103–125.

Alpsoy, E., Akman-Karakas, A., and Uzun, S. (2015). Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 291–298.

Amagai, M., and Stanley, J.R. (2012). Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J. Invest. Dermatol.* 132, 776–784.

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., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90, 919–926.

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.

Amber, K.T., Valdebran, M., and Grando, S.A. (2018). Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol* 9, 1190.

Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* 106, 9–14.

Andersen, M.H., Schrama, D., thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 32–41.

Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat Rev Immunol* 16, 247–258.

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.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R.A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 21–50.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767–811.

Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* *109 Suppl*, S45-55.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 172–184.

Bereshchenko, O., Bruscoli, S., and Riccardi, C. (2018). Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front Immunol* *9*, 1332.

Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L.A., Enghild, J.J., Chua, M.P., and Rubenstein, D.S. (2005). Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J. Biol. Chem.* *280*, 23778–23784.

Bickle, K.M., Roark, T.K., and Hsu, S. (2002). Autoimmune Bullous Dermatoses: A Review. *AFP* *65*, 1861.

Blank, M., Barzilai, O., and Shoenfeld, Y. (2007). Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* *32*, 111–118.

Bluestone, J.A. (2011). Mechanisms of tolerance. *Immunol. Rev.* *241*, 5–19.

Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* *37*, 1141–1149.

Bond, A., Alavi, A., Axford, J.S., Youinou, P., and Hay, F.C. (1996). The relationship between exposed galactose and N-acetylglucosamine residues on IgG in rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA) and Sjögren's syndrome (SS). *Clinical & Experimental Immunology* *105*, 99–103.

Bond, A., Alavi, A., Axford, J.S., Bourke, B.E., Bruckner, F.E., Kerr, M.A., Maxwell, J.D., Tweed, K.J., Weldon, M.J., Youinou, P., et al. (1997). A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *J Autoimmun* *10*, 77–85.

Bondt, A., Rombouts, Y., Selman, M.H.J., Hensbergen, P.J., Reiding, K.R., Hazes, J.M.W., Dolhain, R.J.E.M., and Wuhler, M. (2014). Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol. Cell Proteomics* *13*, 3029–3039.

Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S33-

40.

van de Bovenkamp, F.S., Hafkenscheid, L., Rispens, T., and Rombouts, Y. (2016). The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J. Immunol.* *196*, 1435–1441.

Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C., and Jäck, H.-M. (2003). Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J. Immunol.* *171*, 2338–2348.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 257–290.

Burton, D.R., and Woof, J.M. (1992). Human antibody effector function. *Adv. Immunol.* *51*, 1–84.

Cain, D.W., and Cidlowski, J.A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* *17*, 233–247.

Canfield, S.M., and Morrison, S.L. (1991). The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *J. Exp. Med.* *173*, 1483–1491.

Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* *107*, 3967–3975.

Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S3-23.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001a). Autoimmune responses are directed against self antigens. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001b). The structure of a typical antibody molecule. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001c). The generation of diversity in immunoglobulins. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition.

Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 541–552.

Chen, K., and Cerutti, A. (2010). New Insights into the Enigma of Immunoglobulin D. *Immunol Rev* *237*, 160–179.

Chen, K., and Cerutti, A. (2011). The Function and Regulation of Immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol* *23*, 345–352.

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, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.

Choi, J., Kim, S.T., and Craft, J. (2012). The Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus – An Update. *Curr Opin Immunol* 24, 651–657.

Chow, S., Rizzo, C., Ravitskiy, L., and Sinha, A.A. (2005). The role of T cells in cutaneous autoimmune disease. *Autoimmunity* 38, 303–317.

Chung, A.W., Crispin, M., Pritchard, L., Robinson, H., Gorny, M.K., Yu, X., Bailey-Kellogg, C., Ackerman, M.E., Scanlan, C., Zolla-Pazner, S., et al. (2014). Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *AIDS* 28, 2523–2530.

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Annual Review of Immunology* 6, 629–662.

Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20.

Collins, A.M., and Watson, C.T. (2018). Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. *Front Immunol* 9, 2249.

Colliou, N., Picard, D., Caillot, F., Calbo, S., Corre, S.L., Lim, A., Lemerrier, B., Mauff, B.L., 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. *Science Translational Medicine* 5, 175ra30-175ra30.

Coloma, M.J., Trinh, R.K., Martinez, A.R., and Morrison, S.L. (1999). Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1-->6) dextran antibody. *J Immunol* 162, 2162–2170.

Cooper, M.D., and Alder, M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124, 815–822.

Corbett, S.J., Tomlinson, I.M., Sonnhammer, E.L., Buck, D., and Winter, G. (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, “minor” D segments or D-D recombination. *J. Mol. Biol.* 270, 587–597.

Corthésy, B. (2013). Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Front Immunol* 4.

Cosway, E.J., Lucas, B., James, K.D., Parnell, S.M., Carvalho-Gaspar, M., White, A.J., Tumanov,

- A.V., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2017). Redefining thymus medulla specialization for central tolerance. *J Exp Med* 214, 3183–3195.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., and Avrameas, S. (1995). Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 812–818.
- Cremata, J.A., Sorell, L., Montesino, R., Garcia, R., Mata, M., Cabrera, G., Galvan, J.A., Garcia, G., Valdes, R., and Garrote, J.A. (2003). Hypogalactosylation of serum IgG in patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 133, 422–429.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542.
- Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50, 1132–1148.
- Culton, D.A., Qian, Y., Li, N., Rubenstein, D., Aoki, V., Filho, 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.
- Davies, A.M., Rispens, T., den Bleker, T.H., McDonnell, J.M., Gould, H.J., Aalberse, R.C., and Sutton, B.J. (2013). Crystal structure of the human IgG4 C(H)3 dimer reveals the role of Arg409 in the mechanism of Fab-arm exchange. *Mol. Immunol.* 54, 1–7.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265.
- Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1.
- Di Lullo, G., Calabresi, V., Mariotti, F., Zambruno, G., Lanzavecchia, A., and Di Zenzo, G. (2019). Identification of a Novel Non-desmoglein Autoantigen in Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol* 10.
- 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. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.
- Duong, B.H., Tian, H., Ota, T., Completo, G., Han, S., Vela, J.L., Ota, M., Kubitz, M., Bovin, N., Paulson, J.C., et al. (2010). Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance in vivo. *J Exp Med* 207, 173–187.
- Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology* 10, 778–786.

Elkon, K., and Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 491–498.

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.

Engdahl, C., Bondt, A., Harre, U., Raufer, J., Pfeifle, R., Camponeschi, A., Wuhrer, M., Seeling, M., Mårtensson, I.-L., Nimmerjahn, F., et al. (2018). Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. *Arthritis Res Ther* 20, 84.

Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35.

van Erp, E.A., Luytjes, W., Ferwerda, G., and van Kasteren, P.B. (2019). Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Front. Immunol.* 10.

Espy, C., Morelle, W., Kavian, N., Grange, P., Goulvestre, C., Viallon, V., Chéreau, C., Pagnoux, C., Michalski, J.-C., Guillevin, L., et al. (2011). Sialylation levels of anti-proteinase 3 antibodies are associated with the activity of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Rheum* 63, 2105–2115.

Fairfax, K.A., Kallies, A., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin. Immunol.* 20, 49–58.

Fathman, C.G., and Lineberry, N.B. (2007). Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 599–609.

Fenton, M.J., and Golenbock, D.T. (1998). LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 64, 25–32.

Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nuñez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227, 106–128.

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.

Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710–720.

Gasteiger, G., D'Ossualdo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M., and Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun* 9, 111–125.

- Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P.E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 485–497.
- van de Geijn, F.E., Wuhrer, M., Selman, M.H., Willemsen, S.P., de Man, Y.A., Deelder, A.M., Hazes, J.M., and Dolhain, R.J. (2009). Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy* *11*, R193.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656–661.
- Gensous, N., Charrier, M., Duluc, D., Contin-Bordes, C., Truchetet, M.-E., Lazaro, E., Duffau, P., Blanco, P., and Richez, C. (2018). T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front. Immunol.* *9*.
- Germain, R.N., and Stefanová, I. (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 467–522.
- 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.
- Gindzienska-Sieskiewicz, E., Klimiuk, P.A., Kisiel, D.G., Gindzienski, A., and Sierakowski, S. (2007). The changes in monosaccharide composition of immunoglobulin G in the course of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* *26*, 685–690.
- Gińdzieńska-Sieśkiewicz, E., Radziejewska, I., Domysławska, I., Klimiuk, P.A., Sulik, A., Rojewska, J., Gabryel-Porowska, H., and Sierakowski, S. (2016). Changes of glycosylation of IgG in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Adv Med Sci* *61*, 193–197.
- 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 of Inflammation* *2013*, e764290.
- Gómez Román, V.R., Murray, J.C., and Weiner, L.M. (2014). Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In *Antibody Fc*, M.E. Ackerman, and F. Nimmerjahn, eds. (Boston: Academic Press), pp. 1–27.
- González, D., van der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J.A., Langerak, A.W., González, M., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., and Morgan, G.J. (2007). Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* *110*, 3112–3121.
- Gornik, O., Wagner, J., Pučić, M., Knežević, A., Redžić, I., and Lauc, G. (2009). Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* *19*, 1547–1553.
- Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2499–2515.

- Gu, P., Gao, J.F., D'Souza, C.A., Kowalczyk, A., Chou, K.-Y., and Zhang, L. (2012). Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 9, 136–146.
- Gudelj, I., Lauc, G., and Pezer, M. (2018a). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology* 333, 65–79.
- Gudelj, I., Salo, P.P., Trbojević-Akmačić, I., Albers, M., Primorac, D., Perola, M., and Lauc, G. (2018b). Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 2034–2039.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667.
- Guo, Q., Wang, Y., Xu, D., Nossent, J., Pavlos, N.J., and Xu, J. (2018). Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res* 6.
- Hammers, C.M., and Stanley, J.R. (2016). Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol* 11, 175–197.
- Hancock, R.E., and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82–88.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., and George, A.J.T. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9, 325–338.
- Harpaz, Y., and Chothia, C. (1994). Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J. Mol. Biol.* 238, 528–539.
- Hébert, V., Maho-Vaillant, M., Golinski, M.-L., Petit, M., Riou, G., Boyer, O., Musette, P., Calbo, S., and Joly, P. (2021). Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor Axis in Patients With Pemphigus Treated With Rituximab Versus Standard Corticosteroid Regimen. *Front. Immunol.* 12.
- Heil, M., and Land, W.G. (2014). Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.* 5.
- Hennig, R., Cajic, S., Borowiak, M., Hoffmann, M., Kottler, R., Reichl, U., and Rapp, E. (2016). Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 1860, 1728–1738.
- Heupel, W.-M., Zillikens, D., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2008). Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* 181, 1825–1834.
- Hodoniczky, J., Zheng, Y.Z., and James, D.C. (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol Prog* 21, 1644–1652.
- van 't Hof, W., Veerman, E.C., Helmerhorst, E.J., and Amerongen, A.V. (2001). Antimicrobial

peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* 382, 597–619.

Holland, M., Yagi, H., Takahashi, N., Kato, K., Savage, C.O.S., Goodall, D.M., and Jefferis, R. (2006). Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 669–677.

Honjo, T. (1983). Immunoglobulin genes. *Annu. Rev. Immunol.* 1, 499–528.

Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 12, 157–167.

Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M., and Palm, W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* 264, 415–420.

I, S.-C., V, K., and Y, O. (2013). The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition (*Front Immunol*).

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.

Ivanova, E.A., and Orekhov, A.N. (2015). T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *BioMed Research International* 2015, e327470.

Janeway, C.A. (2013). Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold spring harb symp quant biol.* 1989. 54: 1-13. *J. Immunol.* 191, 4475–4487.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197–216.

Jefferis, R. (2010). The antibody paradigm: present and future development as a scaffold for biopharmaceutical drugs. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 26, 1–42.

Jefferis, R., Lund, J., and Pound, J.D. (1998). IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163, 59–76.

Jeong, E., and Lee, J.Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med. J.* 52, 379–392.

Jolly, P.S., Berkowitz, P., Bektas, M., Lee, H.-E., Chua, M., Diaz, L.A., and Rubenstein, D.S. (2010). p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis\*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8936–8941.

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* 389, 2031–2040.

- Jones, M.B., Oswald, D.M., Joshi, S., Whiteheart, S.W., Orlando, R., and Cobb, B.A. (2016). B-cell-independent sialylation of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 7207–7212.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 541–570.
- Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Yano, K., Kakita, S., et al. (2007). Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* *17*, 104–118.
- Kardos, M., Levine, D., Gürcan, H.M., and Ahmed, R.A. (2009). Pemphigus vulgaris in pregnancy: analysis of current data on the management and outcomes. *Obstet Gynecol Surv* *64*, 739–749.
- Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C.T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A.S., and Amagai, M. (2017). Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17026.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., Jacobsen, L.M., Schatz, D.A., and Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17016.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Schmeits, J.L., Wang, J., and Shimizu, N. (1997). One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res.* *7*, 250–261.
- Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2001). Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N. Engl. J. Med.* *345*, 747–755.
- Keene, J.A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *155*, 768–782.
- Kemna, M.J., Plomp, R., van Paassen, P., Koeleman, C.A.M., Jansen, B.C., Damoiseaux, J.G.M.C., Cohen Tervaert, J.W., and Wuhler, M. (2017). Galactosylation and Sialylation Levels of IgG Predict Relapse in Patients With PR3-ANCA Associated Vasculitis. *EBioMedicine* *17*, 108–118.
- Kitajima, Y. (2014). 150(th) anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. *Cell Commun. Adhes.* *21*, 269–280.
- Kneisel, A., and Hertl, M. (2011). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* *9*, 844–857.
- Kolev, M., Le Friec, G., and Kemper, C. (2014). Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 811–820.

Koneczny, I. (2018). A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol* 9, 97.

Koneczny, I., Stevens, J.A.A., De Rosa, A., Huda, S., Huijbers, M.G., Saxena, A., Maestri, M., Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., Tzartos, S., et al. (2017). IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J. Autoimmun.* 77, 104–115.

de Koning, H.D., Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen-Willems, I.M.J.J., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L.J.M. (2010). A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 2611–2620.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.

Koshland, M.E. (1985). The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu. Rev. Immunol.* 3, 425–453.

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.

Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sonderrmann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325, 979–989.

Krištić, J., Vučković, F., Menni, C., Klarić, L., Keser, T., Beceheli, I., Pučić-Baković, M., Novokmet, M., Mangino, M., Thaqi, K., et al. (2014). Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *The Journals of Gerontology: Series A* 69, 779–789.

Krystal-Whittemore, M., Dileepan, K.N., and Wood, J.G. (2016). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* 6.

Kuhns, M.S., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2006). Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* 24, 133–139.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420, 1–16.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34.

Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159.

Kurrle, N., Völlner, F., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., and Tikkanen, R. (2013). Flotillins directly interact with  $\gamma$ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS One* 8, e84393.

Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24,

571–606.

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. *Experimental Dermatology* 23, 253–259.

Lauc, G., Huffman, J.E., Pučić, M., Zgaga, L., Adamczyk, B., Mužinić, A., Novokmet, M., Polašek, O., Gornik, O., Krištić, J., et al. (2013). Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genet* 9, e1003225.

LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.

Lee, S.K., Bridges, S.L., Koopman, W.J., and Schroeder, H.W. (1992). The immunoglobulin kappa light chain repertoire expressed in the synovium of a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35, 905–913.

Lee-Sundlov, M.M., Ashline, D.J., Hanneman, A.J., Grozovsky, R., Reinhold, V.N., Hoffmeister, K.M., and Lau, J.T. (2017). Circulating blood and platelets supply glycosyltransferases that enable extrinsic extracellular glycosylation. *Glycobiology* 27, 188–198.

Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Duroux, P., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Aouinti, S., Carillon, E., Duvergey, H., Houles, A., Paysan-Lafosse, T., et al. (2015). IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Research* 43, D413–D422.

Leibiger, H., Wüstner, D., Stigler, R.D., and Marx, U. (1999). Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J* 338 ( Pt 2), 529–538.

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 26, 579–591.

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, 6587296.

Lin, M.S., Swartz, S.J., Lopez, A., Ding, X., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P., Fairley, J.A., and Diaz, L.A. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 99, 31–40.

Lipscomb, M.F., and Masten, B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82, 97–130.

Liu, H., Bulseco, G.-G., and Sun, J. (2006). Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunol. Lett.* 106, 144–153.

Liu, L., Stadheim, A., Hamuro, L., Pittman, T., Wang, W., Zha, D., Hochman, J., and

Prueksaritanont, T. (2011). Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials. *Biologicals* 39, 205–210.

Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–244.

Lu, Y., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Longman, E., Davis, K.G., Ortega, A., Grossmann, J.G., Sandlie, I., and García de la Torre, J. (2007). Solution conformation of wild-type and mutant IgG3 and IgG4 immunoglobulins using crystallohydrodynamics: possible implications for complement activation. *Biophys. J.* 93, 3733–3744.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* 2012.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* 108, 781–794.

Macauley, M.S., Pfrengle, F., Rademacher, C., Nycholat, C.M., Gale, A.J., von Drygalski, A., and Paulson, J.C. (2013). Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *J Clin Invest* 123, 3074–3083.

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.

MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.

Magorivska, I., Muñoz, L.E., Janko, C., Dumych, T., Rech, J., Schett, G., Nimmerjahn, F., Bilyy, R., and Herrmann, M. (2016). Sialylation of anti-histone immunoglobulin G autoantibodies determines their capabilities to participate in the clearance of late apoptotic cells. *Clin Exp Immunol* 184, 110–117.

Maguire, T.M., Coughlan, C.M., Seckl, J.R., and Breen, K.C. (1998). The effect of corticosteroids on serum sialyltransferase enzyme activities in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1379, 23–28.

Maho-Vaillant, M., Perals, C., Golinski, M.-L., Hébert, V., Caillot, F., Mignard, C., Riou, G., Petit, M., Viguier, M., Hertl, M., et al. (2021). Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J Invest Dermatol*.

Mandal, A., and Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 8, 47–55.

Mani, R.-S., and Chinnaiyan, A.M. (2010). Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat. Rev. Genet.* 11, 819–829.

Martin, T.C., Šimurina, M., Ząbczyńska, M., Martinic Kavur, M., Rydlewska, M., Pezer, M., Kozłowska, K., Burri, A., Vilaj, M., Turek-Jabrocka, R., et al. (2020). Decreased Immunoglobulin

G Core Fucosylation, A Player in Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity, is Associated with Autoimmune Thyroid Diseases. *Mol Cell Proteomics* 19, 774–792.

Martins, J.P., Kennedy, P.J., Santos, H.A., Barrias, C., and Sarmiento, B. (2016). A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. *Pharmacol. Ther.* 161, 22–39.

Mathis, D., and Benoist, C. (2004). Back to central tolerance. *Immunity* 20, 509–516.

Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K. i, Hayashida, H., Miyata, T., and Honjo, T. (1998). The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J. Exp. Med.* 188, 2151–2162.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.

Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology* 30, 221–241.

Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9, 181–218.

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.

Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379–385.

Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 63, 1455–1463.

Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 578–584.

Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 762–774.

Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015). Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6.

Methot, S.P., and Di Noia, J.M. (2017). Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv. Immunol.* 133, 37–87.

Mimouni, D., Bar, H., Gdalevich, M., Katzenelson, V., and David, M. (2008). Pemphigus--analysis of epidemiological factors in 155 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22, 1232–1235.

Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 448–462.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two

types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* *136*, 2348–2357.

Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 933–944.

Neefjes, J., Jongstra, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* *11*, 823–836.

Neelamegham, S., Aoki-Kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lisacek, F., Lütke, T., O'Boyle, N., Packer, N.H., Stanley, P., Toukach, P., et al. (2019). Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans guidelines. *Glycobiology* *29*, 620–624.

Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 281–294.

Ngo, S.T., Steyn, F.J., and McCombe, P.A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* *35*, 347–369.

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.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* *24*, 19–28.

Noris, M., and Remuzzi, G. (2013). Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol* *33*, 479–492.

Nose, M., and Wigzell, H. (1983). Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 6632–6636.

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.

Oganesyan, V., Damschroder, M.M., Cook, K.E., Li, Q., Gao, C., Wu, H., and Dall'Acqua, W.F. (2014). Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J. Biol. Chem.* *289*, 7812–7824.

Pallikkuth, S., de Armas, L., Rinaldi, S., and Pahwa, S. (2017). T Follicular Helper Cells and B Cell Dysfunction in Aging and HIV-1 Infection. *Front Immunol* *8*, 1380.

Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 383–391.

Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 323–358.

Pan, M., Zhu, H., and Xu, R. (2015). Immune cellular regulation on autoantibody production in pemphigus. *J. Dermatol.* *42*, 11–17.

- Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., et al. (1985). Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* *316*, 452–457.
- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 331–360.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* *357*, 1777–1789.
- Patel, F., Wilken, R., Patel, F.B., Sultani, H., Bustos, I., Duong, C., Zone, J.J., Raychaudhuri, S.P., and Maverakis, E. (2017). Pathophysiology of Autoimmune Bullous Diseases: Nature Versus Nurture. *Indian J Dermatol* *62*, 262–267.
- Patrício, P., Ferreira, C., Gomes, M.M., and Filipe, P. (2009). Autoimmune bullous dermatoses: a review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1173*, 203–210.
- Pelanda, R., and Torres, R.M. (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*, a007146.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* *37*, 273–283.
- Perdivara, I., Peddada, S.D., Miller, F.W., Tomer, K.B., and Deterding, L.J. (2011). Mass spectrometric determination of IgG subclass-specific glycosylation profiles in siblings discordant for myositis syndromes. *J Proteome Res* *10*, 2969–2978.
- Perniola, R. (2018). Twenty Years of AIRE. *Front. Immunol.* *9*.
- Pfeifle, R., Rothe, T., Ipseiz, N., Scherer, H.U., Culemann, S., Harre, U., Ackermann, J.A., Seefried, M., Kleyer, A., Uderhardt, S., et al. (2017). Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol* *18*, 104–113.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pitkänen, J., and Peterson, P. (2003). Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes & Immunity* *4*, 12–21.
- 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.
- Pos, O., van Dijk, W., Ladiges, N., Linthorst, C., Sala, M., van Tiel, D., and Boers, W. (1988). Glycosylation of four acute-phase glycoproteins secreted by rat liver cells in vivo and in vitro. Effects of inflammation and dexamethasone. *Eur J Cell Biol* *46*, 121–128.
- Qian, Y., Jeong, J.S., Maldonado, M., Valenzuela, J.G., Gomes, R., Teixeira, C., Evangelista, F., Qaqish, B., Aoki, V., Hans, G., et al. (2012). Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. *J. Immunol.* *189*, 1535–1539.

- Quast, I., Keller, C.W., Maurer, M.A., Giddens, J.P., Tackenberg, B., Wang, L.-X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M.C., and Lünemann, J.D. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest* 125, 4160–4170.
- Quintero-Ronderos, P., and Montoya-Ortiz, G. (2012). Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis* 2012, 593720.
- Raju, T.S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 471–478.
- Ravetch, J.V., and Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84–89.
- Reily, C., Stewart, T.J., Renfrow, M.B., and Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 346–366.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J.D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797.
- Rispens, T., and Vidarsson, G. (2014). Chapter 9 - Human IgG Subclasses. In *Antibody Fc*, M.E. Ackerman, and F. Nimmerjahn, eds. (Boston: Academic Press), pp. 159–177.
- Rock, B., Labib, R.S., and Diaz, L.A. (1990). Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal Balb/c mice. *J Clin Invest* 85, 296–299.
- Rock, K.L., Reits, E., and Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* 37, 724–737.
- Rombouts, Y., Ewing, E., van de Stadt, L.A., Selman, M.H.J., Trouw, L.A., Deelder, A.M., Huizinga, T.W.J., Wuhler, M., van Schaardenburg, D., Toes, R.E.M., et al. (2015). Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74, 234–241.
- Rook, G.A.W., Steele, J., Brealey, R., Whyte, A., Isenberg, D., Sumar, N., Nelson, J.L., Bodman, K.B., Young, A., Roitt, I.M., et al. (1991). Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of Autoimmunity* 4, 779–794.
- Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 715–725.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480–2488.
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 9.
- Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (2016). Autoantigens as Partners in Initiation and Propagation of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Annu Rev Immunol* 34, 395–420.
- Roth, D.B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr* 2.

- Rothenberg, M.E. (1998). Eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* *338*, 1592–1600.
- Roux, K.H., Strelets, L., and Michaelsen, T.E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol.* *159*, 3372–3382.
- Rudolph, M.G., and Wilson, I.A. (2002). The specificity of TCR/pMHC interaction. *Current Opinion in Immunology* *14*, 52–65.
- Ruiz-Argüelles, A. (2013). *T lymphocytes in autoimmunity* (El Rosario University Press).
- 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.
- Sabouri, Z., Schofield, P., Horikawa, K., Spierings, E., Kipling, D., Randall, K.L., Langley, D., Roome, B., Vazquez-Lombardi, R., Rouet, R., et al. (2014). Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E2567-2575.
- 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*, e50696.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 490–500.
- Samelson, L.E., and Klausner, R.D. (1988). The T-cell antigen receptor. Structure and mechanism of activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *540*, 1–3.
- Sandel, P.C., and Monroe, J.G. (1999). Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* *10*, 289–299.
- Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 167–202.
- Scherer, H.U., Woude, D. van der, Ioan-Facsinay, A., Bannoudi, H. el, Trouw, L.A., Wang, J., Häupl, T., Burmester, G.-R., Deelder, A.M., Huizinga, T.W.J., et al. (2010). Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism* *62*, 1620–1629.
- Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., and Joly, P. (2019). Pemphigus. *The Lancet* *394*, 882–894.
- Schneider, P., and Tschopp, J. (2003). BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunol Lett* *88*, 57–62.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* *125*, S41–S52.
- Schuurman, J., Perdok, G.J., Gorter, A.D., and Aalberse, R.C. (2001). The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol. Immunol.* *38*,

1–8.

Schwab, I., and Nimmerjahn, F. (2013). Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 13, 176–189.

Schwartz, R.H. (2003). T Cell Anergy. *Annual Review of Immunology* 21, 305–334.

Schwarz, F., and Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 576–582.

Seeling, M., Brückner, C., and Nimmerjahn, F. (2017). Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nature Reviews Rheumatology* 13, 621–630.

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* 167, 5439–5448.

Shah, A.A., Seiffert-Sinha, K., Sirois, D., Werth, V.P., Rengarajan, B., Zrnchik, W., Attwood, K., and Sinha, A.A. (2015). Development of a disease registry for autoimmune bullous diseases: initial analysis of the pemphigus vulgaris subset. *Acta Derm. Venereol.* 95, 86–90.

Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63.

da Silva, E.Z.M., Jamur, M.C., and Oliver, C. (2014). Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *J Histochem Cytochem.* 62, 698–738.

Sinha, A.A., Hoffman, M.B., and Janicke, E.C. (2015). Pemphigus vulgaris: approach to treatment. *Eur J Dermatol* 25, 103–113.

Sokolosky, J.T., and Szoka, F.C. (2015). The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, 109–124.

Someya, T., and Amagai, M. (2019). Toward a new generation of smart skins. *Nat. Biotechnol.* 37, 382–388.

Sonneveld, M.E., de Haas, M., Koeleman, C., de Haan, N., Zeerleder, S.S., Ligthart, P.C., Wührer, M., van der Schoot, C.E., and Vidarsson, G. (2017). Patients with IgG1-anti-red blood cell autoantibodies show aberrant Fc-glycosylation. *Scientific Reports* 7, 8187.

Sproston, N.R., and Ashworth, J.J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* 9.

Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 275, 71–78.

Stanley, P., Taniguchi, N., and Aebi, M. (2015). N-Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H.

Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *The Journal of Immunology* *193*, 5370–5378.

Su, Z., Xie, Q., Wang, Y., and Li, Y. (2020). Abberant Immunoglobulin G Glycosylation in Rheumatoid Arthritis by LTQ-ESI-MS. *Int J Mol Sci* *21*.

Sugiyama, H., Matsue, H., Nagasaka, A., Nakamura, Y., Tsukamoto, K., Shibagaki, N., Kawamura, T., Kitamura, R., Ando, N., and Shimada, S. (2007). CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* *214*, 210–220.

Suurmond, J., and Diamond, B. (2015). Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity (American Society for Clinical Investigation).

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. *Annual Review of Immunology* *21*, 713–758.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805–820.

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.

Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nat. Immunol.* *18*, 716–724.

Thomann, M., Reckermann, K., Reusch, D., Prasser, J., and Tejada, M.L. (2016). Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Molecular Immunology* *73*, 69–75.

Torzecka, J.D., Woźniak, K., Kowalewski, C., Waszczykowska, E., Sysa-Jedrzejowska, A., Pas, H.H., and Narbutt, J. (2007). Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development? *Arch. Dermatol. Res.* *299*, 239–243.

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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1864*, 1401–1409.

Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* *136*, 21–27.

Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* *19*, 641–644.

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* 170, 2170–2178.

Tsunoda, K., Ota, T., Saito, M., Hata, T., Shimizu, A., Ishiko, A., Yamada, T., Nakagawa, T., Kowalczyk, A.P., and Amagai, M. (2011). Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* 179, 795–806.

Turvey, S.E., and Broide, D.H. (2010). Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S24-32.

Unanue, E.R. (1984). Antigen-Presenting Function of the Macrophage. *Annual Review of Immunology* 2, 395–428.

UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 49, D480–D489.

Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675.

Vénéreau, E., Ceriotti, C., and Bianchi, M.E. (2015). DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 6, 422.

Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, 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. *Nature Reviews Immunology* 8, 523–532.

Vojdani, A. (2014). A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity (Hindawi).

Völlner, F., Ali, J., Kurrle, N., Exner, Y., Eming, R., Hertl, M., Banning, A., and Tikkanen, R. (2016). Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Sci Rep* 6, 28820.

Vučković, F., Krištić, J., Gudelj, I., Teruel, M., Keser, T., Pezer, M., Pučić-Baković, M., Štambuk, J., Trbojević-Akmačić, I., Barrios, C., et al. (2015). Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol* 67, 2978–2989.

Wahren-Herlenius, M., and Dörner, T. (2013). Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* 382, 819–831.

Wallick, S.C., Kabat, E.A., and Morrison, S.L. (1988). Glycosylation of a VH residue of a monoclonal antibody against alpha (1----6) dextran increases its affinity for antigen. *J Exp Med* 168, 1099–1109.

Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066.

- Wang, L., Wang, F.-S., and Gershwin, M.E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.* 278, 369–395.
- Weller, P.F., and Spencer, L.A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 746–760.
- Wells, A.D. (2009). New Insights into the Molecular Basis of T Cell Anergy: Anergy Factors, Avoidance Sensors, and Epigenetic Imprinting. *The Journal of Immunology* 182, 7331–7341.
- Wieczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., and Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 8, 292.
- Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270–282.
- Woof, J.M., and Mestecky, J. (2005). Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Rev.* 206, 64–82.
- Wu, L.C., and Zarrin, A.A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 247–259.
- Wuhrer, M., Stavenhagen, K., Koeleman, C.A.M., Selman, M.H.J., Harper, L., Jacobs, B.C., Savage, C.O.S., Jefferis, R., Deelder, A.M., and Morgan, M. (2015). Skewed Fc glycosylation profiles of anti-proteinase 3 immunoglobulin G1 autoantibodies from granulomatosis with polyangiitis patients show low levels of bisection, galactosylation, and sialylation. *J Proteome Res* 14, 1657–1665.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496, 445–455.
- 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.
- Yan, L., Wang, J.-M., and Zeng, K. (2012). Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 167, 768–777.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D.M., Lubkowski, J., and Oppenheim, J.J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 181–215.
- Yasuda, K., Takeuchi, Y., and Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 41, 283–297.
- Young, E., Lock, E., Ward, D.G., Cook, A., Harding, S., and Wallis, G.L.F. (2014). Estimation of polyclonal IgG4 hybrids in normal human serum. *Immunology* 142, 406–413.
- 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.

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.

Zhao, C.Y., Chiang, Y.Z., and Murrell, D.F. (2016). Neonatal Autoimmune Blistering Disease: A Systematic Review. *Pediatr Dermatol* 33, 367–374.

Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*. 16, 3–10.

Zoete, V., Irving, M., Ferber, M., Cuendet, M.A., and Michielin, O. (2013). Structure-Based, Rational Design of T Cell Receptors. *Front Immunol* 4, 268.

# **ANNEXES**



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

Vivien Hébert<sup>1,2\*</sup>, Marie Petit<sup>1</sup>, Maud Maho-Vaillant<sup>1,2</sup>, Marie-Laure Golinski<sup>1,2</sup>, Gaëtan Riou<sup>1</sup>, Céline Derambure<sup>3</sup>, Olivier Boyer<sup>1</sup>, Pascal Joly<sup>1,2</sup> and Sébastien Calbo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1234, Normandie University, Rouen, France, <sup>2</sup>Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France, <sup>3</sup>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-1 $\beta$ , 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-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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, corticosteroids, 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 B-cell 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 $\gamma$ , TGF  $\beta$ 2, and APRIL) was not detected at baseline neither in DSG-positive, 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  $\Delta$ CT expression of these genes between autoreactive and non-autoreactive 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 $\beta$ , 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

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

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 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**).

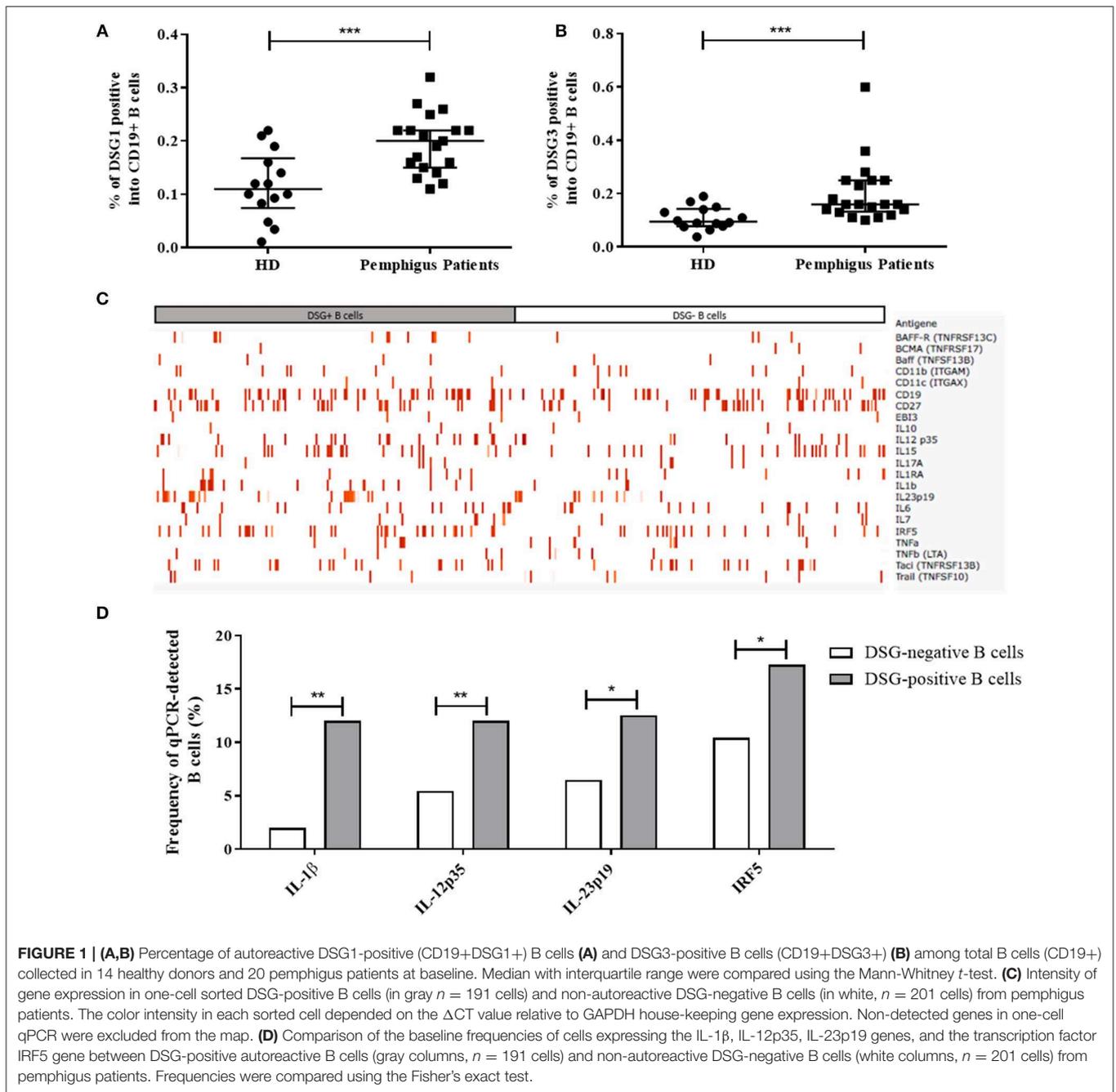
Interestingly, the expression of the IL-1 $\beta$  gene in DSG-positive B cells, which was higher at baseline in pemphigus patients than in healthy individuals (12 vs. 6%,  $p = 0.048$ ), returned to normal values after rituximab treatment (12 vs. 4%,  $p = 0.039$ ). We also observed that, whereas the 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 $\beta$  (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.

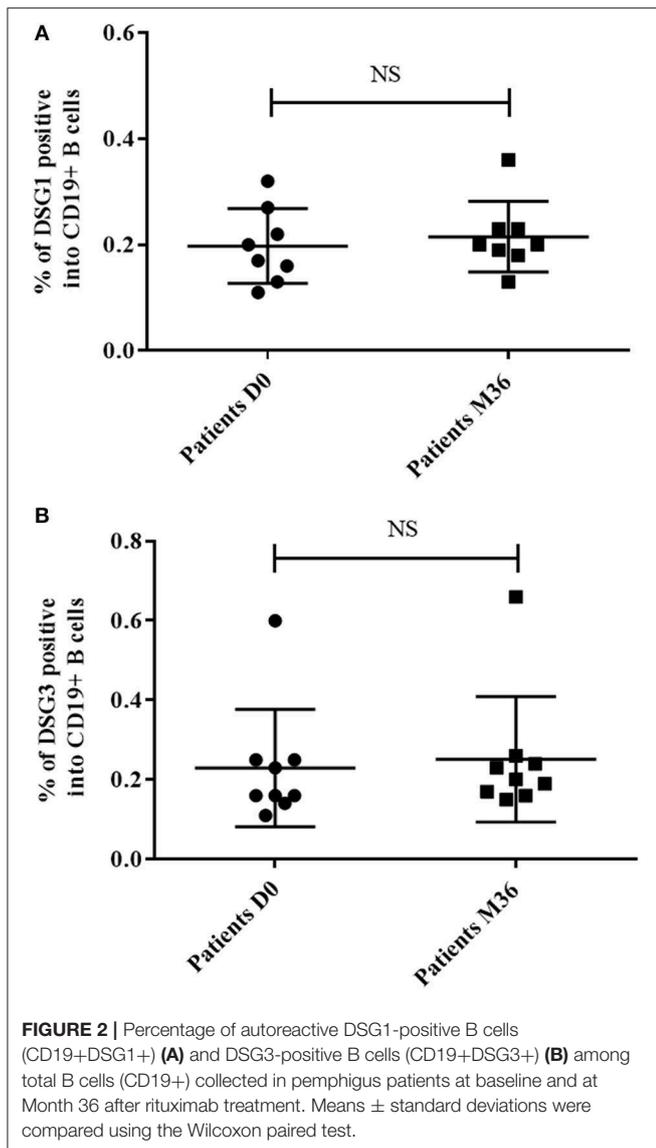


After treatment with systemic corticosteroids (**Figure 5**), IL-1 $\beta$  gene was downregulated (12–1.7%,  $p = 0.003$ ) allowing to return to values close to those observed in HD. Although the baseline gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL-23p19 in desmoglein-positive B cells from patients 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 $\beta$ , 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 transcriptomic 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

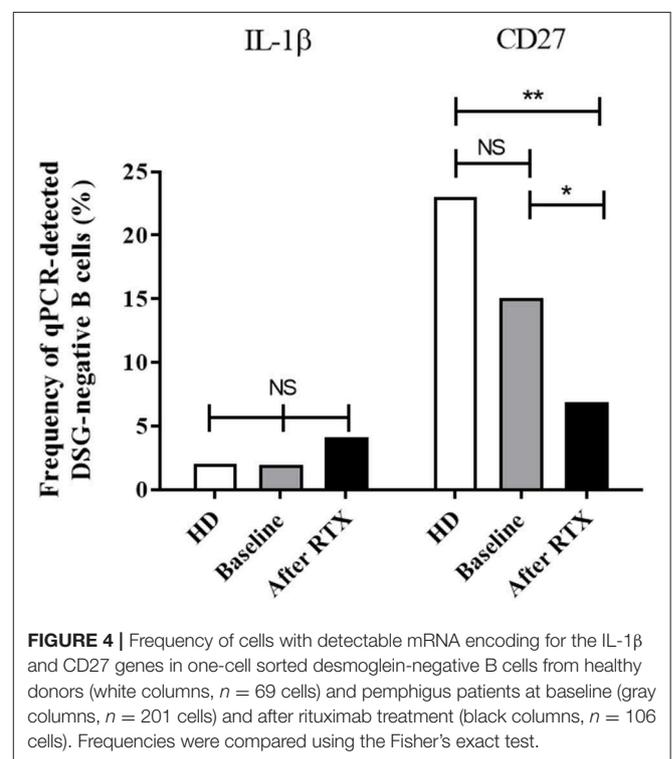
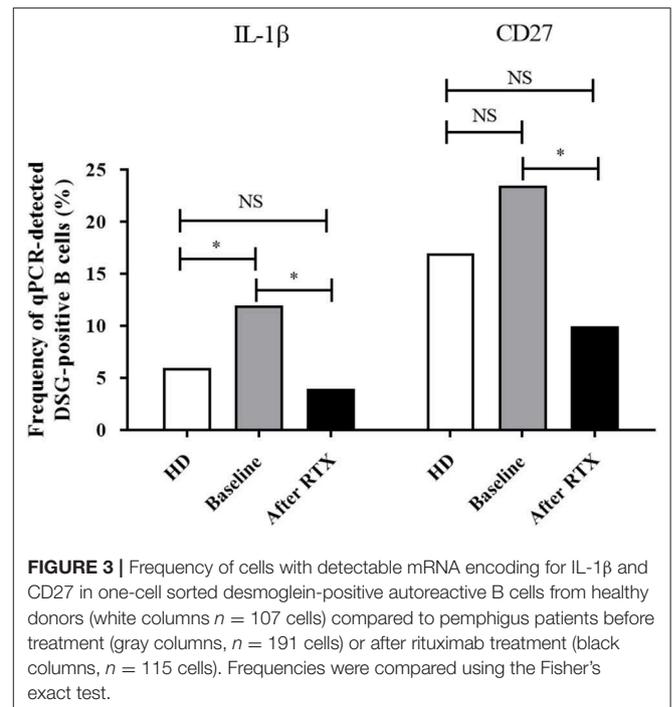


transcriptomic analyses, we observed a significant decrease in the frequency of memory CD19+CD27+ autoreactive DSG-positive and DSG-negative B cells after rituximab treatment (Figure 7A), that were not observed in patients treated with CS alone without rituximab (Figure 7B).

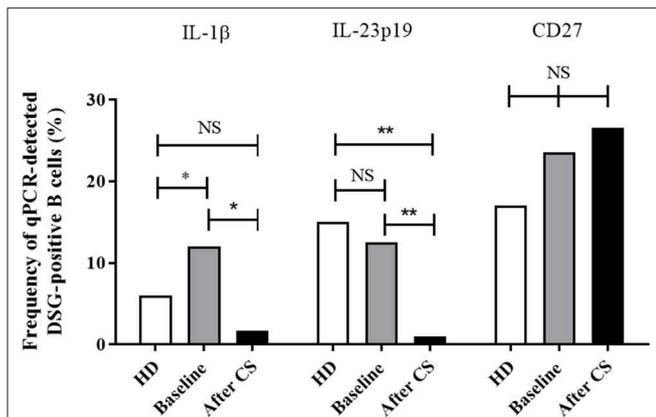
## ELISA Assays

In order to evaluate the consequences of the decreased IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  using ELISA assay.

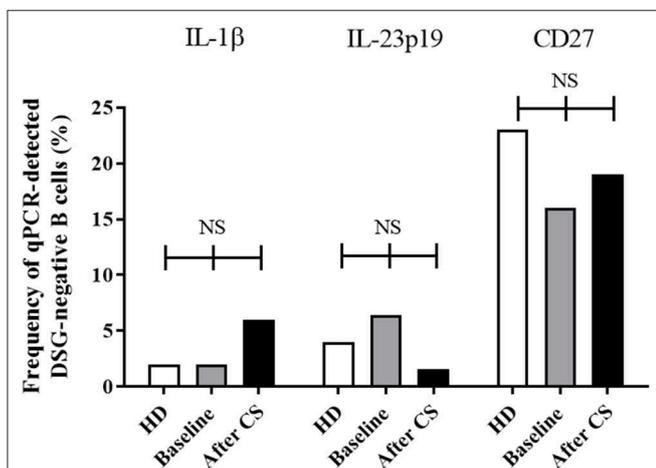
We observed a non-significant decrease of serum IL-1 $\beta$  ELISA values in pemphigus patients during the first 3 months of treatment, that was secondarily followed by a re increase of serum levels to baseline values when corticosteroids doses were tapered during patients' follow-up (Figure 8).



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).



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

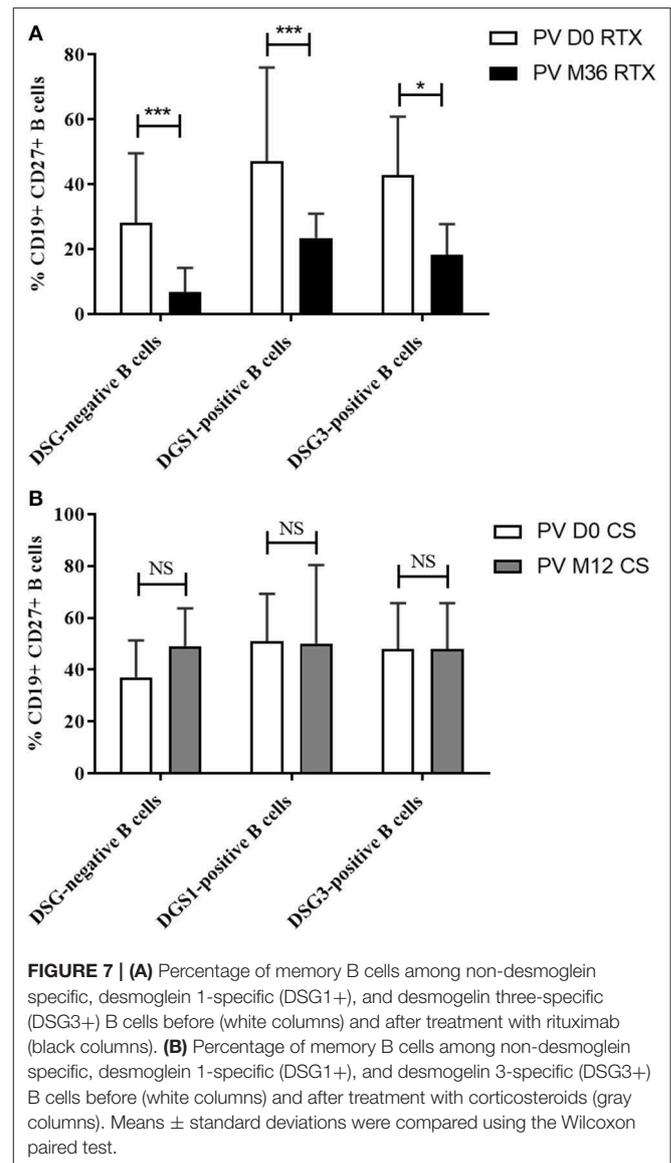


**FIGURE 6** | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1 $\beta$ , IL-23p19, and CD27 in one-cell sorted desmoglein-negative B cells from healthy donors (white columns,  $n = 69$  cells), and pemphigus patients at baseline before treatment (gray columns,  $n = 201$  cells) or after corticosteroids 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).

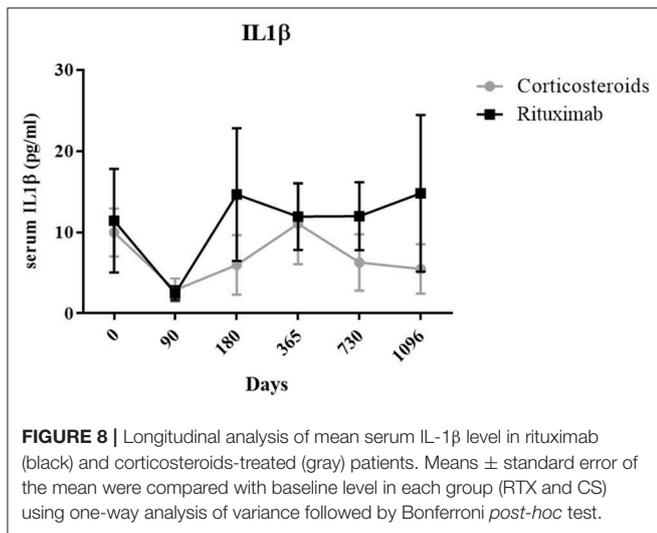
This methodology has several major interests. First, it allowed to study *ex vivo* autoreactive B-lymphocytes, since pemphigus is one of the rare autoimmune diseases in humans in which autoantibodies directed against DSG are pathogenic (15). Second,



**FIGURE 7** | (A) Percentage of memory B cells among non-desmoglein specific, desmoglein 1-specific (DSG1+), and desmoglein three-specific (DSG3+) B cells before (white columns) and after treatment with rituximab (black columns). (B) Percentage of memory B cells among non-desmoglein specific, desmoglein 1-specific (DSG1+), and desmoglein 3-specific (DSG3+) B cells before (white columns) and after treatment with corticosteroids (gray columns). Means  $\pm$  standard deviations were compared using the Wilcoxon paired test.

auto-reactive DSG positive B cells are the pre-stage of antibody-secreting 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 single-cell 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 $\beta$ , 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



in complete remission was actually pretty close to that of DSG-positive B cells collected at baseline in patients with active pemphigus, except for the IL-1 $\beta$  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 DSG-positive 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 refound 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 72 h 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 $\beta$  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 desmoglein-negative B cells. This observation might suggest the potential role of IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  itself (17, 18). In our work, we observed a slight decrease of serum IL-1 $\beta$  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 $\beta$  has previously been suggested by Feliciani et al. who demonstrated that an IL-1 $\beta$  KO mouse model was less susceptible to passive transfer of IgG isolated from the serum of a PV patient. Moreover, increased concentrations of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  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-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  decreased in patients in clinical remission after treatment with IVIG. Finally, IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 DSG-negative 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 analyze 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-self-reactive 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 $\beta$ , 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 $\beta$  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 short-term 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 follow-up, 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 $\beta$  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/ $\mu$ l). 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 10 $\mu$ 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 (6-carboxy-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, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 2, 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.

### $\Delta$ Ct Analysis

The  $\Delta$ 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  $\leq$ 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:

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>

## 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 organ-specific, 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 N-terminal 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 anti-desmoglein 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, Hébert 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, Lemerrier 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
- 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. 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-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1 $\alpha$  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
- Santarasci 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.



OPEN ACCESS

**Edited by:**

Savino Sciascia,  
University of Turin, Italy

**Reviewed by:**

Paolo Arduino,  
University of Turin, Italy  
Jun Yamagami,  
Keio University Hospital, Japan  
Daisuke Tsuruta,  
Osaka City University, Japan

**\*Correspondence:**

Vivien Hébert  
vivien.hebert@chu-rouen.fr

**†ORCID:**

Maud Maho-Vaillant  
orcid.org/0000-0003-4221-2792  
Marie-Laure Golinski  
orcid.org/0000-0002-3532-5345  
Marie Petit  
orcid.org/0000-0003-2187-3997  
Olivier Boyer  
orcid.org/0000-0002-7591-307X  
Philippe Musette  
orcid.org/0000-0002-4003-9992  
Sébastien Calbo  
orcid.org/0000-0003-4358-8417  
Pascal Joly  
orcid.org/0000-0002-8079-5004

**Specialty section:**

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

**Received:** 09 February 2021

**Accepted:** 30 April 2021

**Published:** 14 May 2021

**Citation:**

Hébert V, Maho-Vaillant M,  
Golinski M-L, Petit M, Riou G,  
Boyer O, Musette P, Calbo S and  
Joly P (2021) Modifications of the  
BAFF/BAFF-Receptor Axis in Patients  
With Pemphigus Treated With  
Rituximab Versus Standard  
Corticosteroid Regimen.  
Front. Immunol. 12:666022.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.666022

# Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor Axis in Patients With Pemphigus Treated With Rituximab Versus Standard Corticosteroid Regimen

Vivien Hébert<sup>1,2\*</sup>, Maud Maho-Vaillant<sup>1,2†</sup>, Marie-Laure Golinski<sup>1,2†</sup>, Marie Petit<sup>1†</sup>, Gaëtan Riou<sup>1</sup>, Olivier Boyer<sup>1†</sup>, Philippe Musette<sup>3†</sup>, Sébastien Calbo<sup>1†</sup> and Pascal Joly<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup> Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1234, FOCIS Center of Excellence PAN'THER, Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France, <sup>2</sup> Department of Dermatology, French Reference Center for Auto Immune Blistering Diseases, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France, <sup>3</sup> Paris Sorbonne North University INSERM UMR 1125 and Dermatology Department Avicenne University Hospital, Bobigny, France

The efficacy of the B-cell-depleting agent rituximab has been reported in immune diseases but relapses are frequent, suggesting the need for repeated infusions. The B-cell activating factor (BAFF) is an important factor for B cell survival, class switch recombination and selection of autoreactive B cells, as well as maintaining long-lived plasma cells. It has been hypothesized that relapses after rituximab might be due to the increase of serum BAFF levels. From the Ritux3 trial, we showed that baseline serum BAFF levels were higher in pemphigus patients than in healthy donors ( $308 \pm 13$  pg/mL versus  $252 \pm 28$  pg/mL,  $p=0.037$ ) and in patients with early relapse compared who didn't ( $368 \pm 92$  vs  $297 \pm 118$  pg/mL,  $p=0.036$ ). Rituximab and high doses of CS alone have different effects on the BAFF/BAFF-R axis. Rituximab led to an increase of BAFF levels associated to a decreased mRNA (Day 0:  $12.3 \pm 7.6$  AU vs Month 36:  $3.3 \pm 4.3$  AU,  $p=0.01$ ) and mean fluorescence intensity of BAFF-R in non-autoreactive (Day 0: 3232 vs Month 36: 1527, mean difference: 1705, 95%CI: 624 to 2786;  $p=0.002$ ) as well as on reappearing autoreactive DSG-specific B cells (Day 0: 3873 vs Month 36: 2688, mean difference: 1185, 95%CI: -380 to 2750;  $p=0.20$ ). Starting high doses of corticosteroids allowed a transitory decrease of serum BAFF levels that re-increased after doses tapering whereas it did not modify BAFF-R expression in autoreactive and non-autoreactive B cells. Our results suggest that the activation of autoreactive B cells at the onset of pemphigus is likely to be related to the presence of high BAFF serum levels and that the decreased BAFF-R expression after rituximab might be responsible for the delayed generation of memory B cells, resulting in a rather long period of mild pemphigus activity after rituximab therapy. Conversely, the incomplete B cell depletion and persistent BAFF-R expression associated with high BAFF serum levels might explain the high number of relapses in patients treated with CS alone.

**Keywords:** Pemphigus, BAFF - B-cell activating factor, BAFF-receptor, rituximab, Corticosteroid

## INTRODUCTION

Pemphigus is, in most cases, mediated by anti-desmoglein (DSG) 1 and anti-DSG3 autoantibodies (1, 2). The B-cell activating factor (BAFF) is an important factor for B cell survival, class switch recombination, selection of autoreactive B cells and maintaining long-lived plasma cells (3, 4). The BAFF-receptor (BAFF-R), expressed on the majority of B cells, is the key receptor involved in promoting B cell survival (5). In mice, overexpression of BAFF results in the development of autoimmune manifestations (6). In human, a correlation between BAFF levels and disease severity has been shown in several auto-immune diseases (7–9), leading to belimumab (an anti-BAFF-R monoclonal antibody) approval in systemic lupus erythematosus (SLE) by the Food and Drug Administration. Anti-BAFF-R monoclonal antibodies (mAb) are currently being tested in pemphigus.

The Ritux3 trial showed that first-line treatment with rituximab (RTX), an anti-CD20 mAb, combined with a short-term regimen of corticosteroids (CS) was more effective and safer than a standard regimen of long-term CS (10). Despite a rather low (12 of 46) relapse rate in the RTX group compared to the CS group (20/44), most of relapses (9/12) occurred quite early in the RTX group during the first 12 months after the start of treatment, whereas relapses in the CS group occurred more regularly during patients' follow-up (7 during the 1<sup>st</sup> year and 13 during the 2<sup>nd</sup> year after the start of treatment). A high relapse rate has been consistently reported in the literature in patients with pemphigus who received only one cycle of rituximab (11–14), as well as in other auto-immune diseases. It has been hypothesized that some relapses after rituximab might be due to the increase of serum BAFF levels, which could promote the recovery of auto-reactive B cells (4, 15).

We used samples collected from patients treated with RTX or oral CS alone in the Ritux 3 trial to longitudinally assess the BAFF/BAFF-R axis. For this, we studied: i) serum BAFF levels, ii) BAFF-R mRNA in bulked total B cells and one-cell sorted autoreactive B cells, and iii) BAFF-R phenotypic expression in both treatment groups.

## METHODS

### Clinical Trial

Ninety newly-diagnosed pemphigus patients were randomly assigned to receive a standard regimen of CS versus RTX associated with a short-term regimen of CS. 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 RTX of 500 mg at Month 12 and Month 18. They also received an initial dose of prednisone of 0.5 to 1 mg/kg/day, depending on initial pemphigus severity (moderate versus severe), which was rapidly tapered over 3 to 6 months. Patients assigned to the standard oral CS group were given an initial dose of prednisone of 1 to 1.5 mg/kg/day, with a progressive tapering over 12 to 18 months, depending on initial pemphigus severity.

### Patients

Blood samples from RTX-treated patients were analyzed before (Day 0) and 36 months after the initial rituximab infusion

(Month 36), after recovery of B lymphocytes. Blood samples from CS-treated patients were analyzed before (Day 0), 12 months (Month 12) and 24 months (Month 24) after the start of CS therapy in order to perform biological analyses in patients still receiving CS treatment. The pemphigus disease area index (PDAI) score was used to assess pemphigus severity.

We performed a sequential analysis of serum BAFF levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 88 patients (45 treated with RTX, 43 treated with CS), and 37 healthy donors (HD). We analyzed the transcriptomic and cytometric profiles of BAFF-R expression in cell sorted autoreactive DSG+ B lymphocytes, and in DSG- whole B lymphocytes from 10 patients before and after treatment with RTX or CS, as well as in 7 HD.

### Desmoglein-Specific B-Cell Staining

In order to analyse DSG1 and DSG3 specific B cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were extracted from venous blood using Ficoll-Hypaque (Lymphoprep<sup>TM</sup>, Oslo, Norway). Then, B cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, USA) according to manufacturer's instructions. Then, purified B cells were incubated for 30 minutes at 4°C with histidine-tagged recombinant DSG1 or DSG3 (30 ng/μl).

### Flow Cytometry Analysis

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 DSG-specific B cells. Data were collected by FACS ARIA III (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software 10 (TreeStar).

### One-Cell Sorting and Pre-Amplification

DSG-specific single B cells were sorted by FACS ARIA III into 96-well plates containing 10 μL Platinum Taq polymerase and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), a mixture of Taqman primer-probes at 0.2× concentration specific for the transcripts of interest and CellsDirect qRT-PCR buffer (Invitrogen). Immediately following cell sorting, samples were centrifuged, incubated at 55°C for 10 minutes, and subjected to 20 cycles of Polymerase Chain Reaction (PCR) (50°C for 15 minutes then 95°C for 15 seconds for the reverse transcription, followed by 20 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 4 minutes for amplification). Subsequent pre-amplified single-cell cDNA was stored at –20°C until analysis.

### Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

After ¼ dilution in TE buffer, each cDNA sample was then separated into 48 separate reactions for further quantitative Polymerase Chain Reaction (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, and the samples were added

to a 48.48 nanofluidic chip (Fluidigm, Inc.) along with 38 individual Taqman primer-probe mixtures listed in along with 38 other individual Taqman primer-probe mixtures (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 RNA contained in one cell was therefore possibly too low. We analyzed qPCR results in frequency of cytokine gene expressing B cells between different groups.

### BAFF Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The concentration of BAFF in patients' serum (42 RTX-treated and 26 CS-treated patients) was determined using ELISA: DuoSet kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. BAFF levels were measured at Days 0, 90, 180, 365, 730 and Month 36.

### Statistical Analysis

Prism software was used for statistical analysis. Fisher exact test was used to compare the frequencies, the T-test to compare patients before and after treatment and one-way Anova for multiple comparisons. A p value of less than 0.05 was considered significant for all analyses.

## RESULTS

### BAFF Levels in Pemphigus Patients

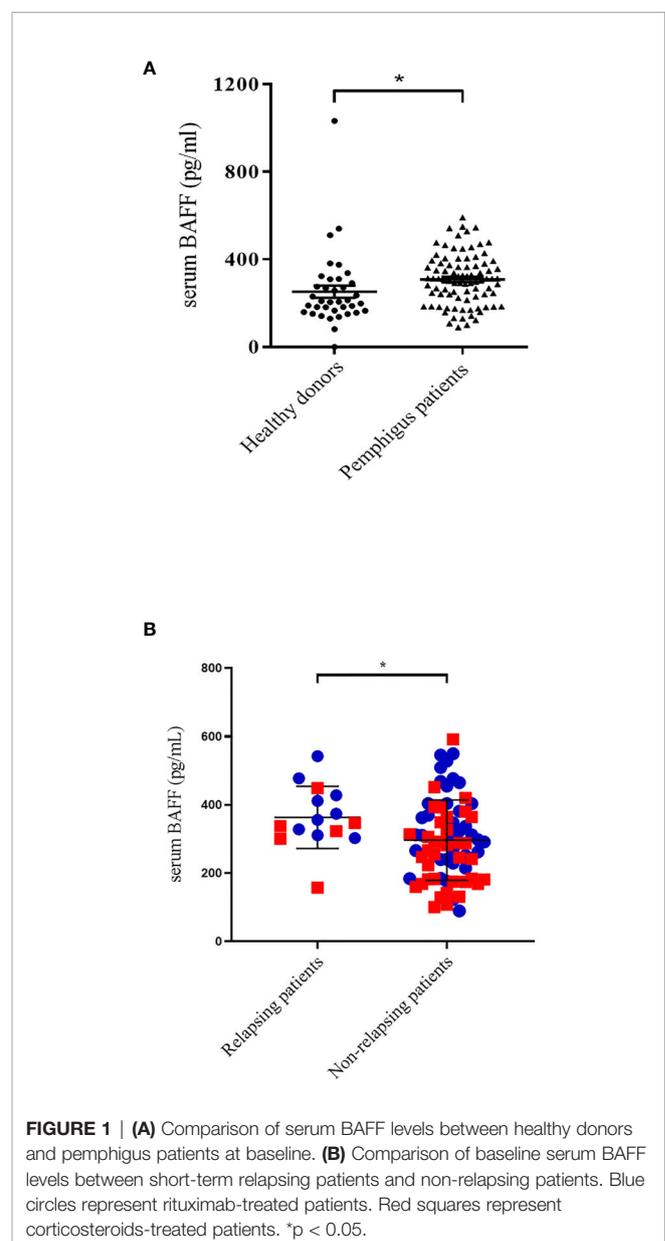
Using serum samples from 88 patients and 37 healthy donors (HD), we first showed that serum BAFF levels (mean  $\pm$  SD) measured at baseline were significantly higher in pemphigus patients than in HD ( $308 \pm 13$  pg/mL vs  $252 \pm 28$  pg/mL,  $p=0.037$ ) (Figure 1A). Moreover, we showed that patients who further relapsed during the 12 months after the start of treatment had significantly higher serum BAFF levels than patients who did not relapse ( $368 \pm 92$  vs  $297 \pm 118$  pg/mL,  $p=0.036$ ) (Figure 1B). A ROC curve showed that a BAFF level  $\geq 300$  pg/mL provided a sensitivity of 54.8%, a specificity of 92.9%, and a 98% negative and a 28% positive predictive value for the occurrence of relapse during the first year after the start of treatment (AUC=0.70; 95% CI: 0.57-0.83;  $p=0.019$ ), regardless of the treatment group (RTX or CS alone).

### Evolution of the BAFF/BAFF-R Axis After Rituximab

Serum BAFF levels evolved inversely to the percentage of CD19+ blood B cells in patients from the RTX group. Serum BAFF levels

started to decrease from Day 180 to Day 360, and from Day 730 to Day 1096, corresponding to periods of recovery of blood B cells (Figure 2).

BAFF-R mRNA relative expression and BAFF-R protein expression were first studied in total B cells from 11 pemphigus patients. BAFF-R mRNA expression decreased after RTX treatment from  $12.3 \pm 7.6$  AU at Day 0 to  $3.3 \pm 4.3$  AU at Month 36,  $p=0.01$ , which corresponded to values close to those measured in HD ( $2.2 \pm 2.1$  AU) data not shown. The mean fluorescence intensity (MFI) of the BAFF-R protein in total B cells also decreased significantly after RTX from 3232 at Day 0 to 1527 at Month 36 (mean difference: 1705, 95% CI: 624 to 2786;  $p=0.002$ ), the values measured at Month 36 were even lower than those measured in HD (Figure 3A).



**FIGURE 1 | (A)** Comparison of serum BAFF levels between healthy donors and pemphigus patients at baseline. **(B)** Comparison of baseline serum BAFF levels between short-term relapsing patients and non-relapsing patients. Blue circles represent rituximab-treated patients. Red squares represent corticosteroids-treated patients. \* $p < 0.05$ .

We then assessed BAFF-R mRNA expression in one-cell sorted autoreactive B cells collected at baseline (n=191 cells) or after RTX (n=115 cells). MFI was measured in bulked autoreactive B cells from the same 11 patients. While we did not evidence significant modifications of BAFF-R mRNA expression after treatment (Day 0: 12/191 (6.3%) vs Month 36: 12/115, (10.5%);  $p=0.20$ ), we observed a non-statistically significant decrease of BAFF-R phenotypic expression on reappearing autoreactive DSG-specific B cells relative to baseline samples (from 3873 at baseline to 2688 at Month 36, mean difference: 1185, 95% CI: -380 to 2750;  $p=0.20$ ) (data not shown), which was reminiscent to that observed in the whole B cell population.

## Evolution of the BAFF/BAFF-R Axis After Corticosteroids Alone

Treatment with high doses of CS alone led to a transient but significant decrease of serum BAFF levels during the first three months after the start of treatment (273.2 pg/mL vs 194.2 pg/mL,  $p=0.0002$ ), when patients received the highest doses of prednisone (Figure 2). Serum BAFF levels then re-increased from Day 90 to the end of the study, when prednisone doses were tapered under 20 mg/day.

mRNA and cytometric MFI expression of BAFF-R in total B cells did not show significant variations after CS treatment (mRNA expression:  $2.2 \pm 2.1$  AU vs  $10.1 \pm 5.4$ ;  $p=0.32$ ; phenotypic expression: 3232 vs 4100, mean difference: 898, 95% CI: -2463 to 667;  $p=0.43$ ). Longitudinal transcriptomic and cytometric analyses were then performed in one-cell sorted autoreactive B cells collected at baseline (n=191 cells) and after CS (n=120 cells), and in bulked autoreactive B cells, respectively. No significant modification of BAFF-R mRNA expression (12/191 (6.3%) vs 3/120, (2.5%);  $p=0.18$ ), or phenotypic expression (3873 vs 4771, mean difference: -868, 95% CI: -2086 to 650;  $p=0.24$ ) (Figure 3B) was evidenced between autoreactive cells collected at baseline and those collected after CS treatment.

## DISCUSSION

In this study, we showed for the first time, in a significantly larger cohort than in previous studies, that pemphigus patients had higher BAFF serum levels than healthy donors (16, 17). Moreover, early-relapsing patients had higher baseline serum BAFF levels than patients who did not relapse during the first year of follow-up, regardless of the treatment used. Interestingly, we calculated that patients who had a baseline serum BAFF level <300 pg/mL had a 98% chance of remaining in clinical remission during the first year of treatment. Both groups of patients treated with RTX or corticosteroids who further short-term relapsed had a higher baseline mean serum BAFF level than patients who did not further relapse, although these differences did not reach statistical significance and may be due to a weak number of relapses (data not shown).

We showed that RTX and high doses of CS alone had different effects on the BAFF/BAFF-R axis. As expected, the evolution of serum BAFF levels was negatively correlated with blood B cell count in the RTX group and serum BAFF levels started to decrease when B cells started to return. Interestingly, most relapses observed in the RTX group occurred precisely during that time when B cells were in presence of the highest BAFF

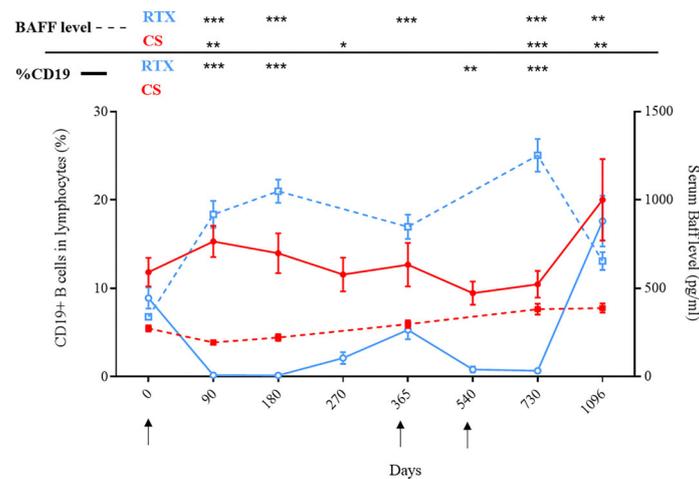
serum levels (10, 18). On the contrary, CS alone led to a transient decrease of serum BAFF levels, followed by a re-increase after CS doses were tapered under 20 mg/day, corresponding to the time period during which most patients relapsed.

Our findings suggest that a combined therapy associating anti-CD20 and anti-BAFF monoclonal antibodies might be of interest in pemphigus. These biologics, which work through complementary mechanisms, might result in an enhanced depletion of circulating and tissue-resident autoreactive B lymphocytes when administered together. In particular, it would make sense to use anti-BAFF therapy when B cells start to return, when serum BAFF levels are still very high, i.e. around the sixth month after the initial RTX infusion. The therapeutic regimen currently proposed to prevent short-term relapses after the initial cycle of RTX in pemphigus, is to perform additional RTX infusions whose exact time interval after the initial cycle, dosage and number are not clearly determined. Another strategy to prevent these short-term relapses might be to combine RTX maintenance infusion and anti-BAFF therapy, or to use anti-BAFF therapy alone as maintenance therapy. A phase-3 study is currently conducted to evaluate and compare the efficacy and tolerance of subcutaneous injections of belimumab in association to 2 cycles of RTX or a placebo in patients with SLE, after promising results in refractory SLE (19, 20).

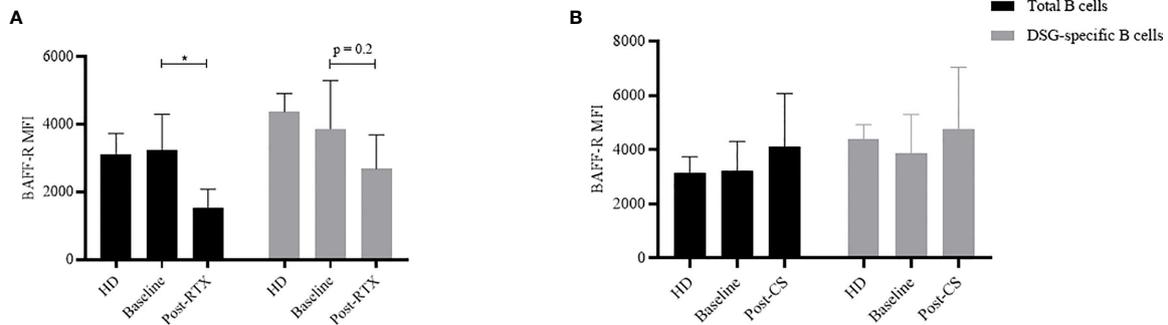
Second, we showed that RTX led to decreased mRNA and phenotypic expression of BAFF-R in non-autoreactive B cells. Such a modification has already been reported in total B cells from patients with rheumatoid arthritis and idiopathic thrombocytopenic purpura (21, 22). We also observed a decrease of BAFF-R phenotypic expression on reappearing autoreactive DSG-specific B cells, which likely did not reach statistical significance due to the limited number of sorted DSG-specific B cells. Nevertheless, one can hypothesize that the decreased BAFF-R expression after RTX might be responsible for the delayed generation of memory B cells, resulting in a rather long period of mild pemphigus activity after RTX therapy. Interestingly, these modifications of the BAFF/BAFF-R axis seem likely related to a specific effect of RTX, since we did not observe these modifications in patients treated with CS alone, in whom we did not observe any modification in BAFF-R expression.

The main strength of this work is the high number of sera in which BAFF dosages were longitudinally performed in particular in patients treated with RTX, which is currently the mainstay of treatment for moderate to severe types of pemphigus. Our principal limitation was the low number of autoreactive B cells that could be analyzed due to the rarity of this cell population in patients' blood, and the quite long time after which some frozen samples were analyzed, which further lowered the number of auto-reactive cells that we were able to study. In particular, a higher number of sorted autoreactive B cells would have allowed us to reach a statistically significant difference, notably regarding the under-expression of the BAFF-receptor by recovering autoreactive B-cells.

Overall, these findings suggest that the activation of autoreactive B cells at the onset of pemphigus, is likely related to the presence of high BAFF serum levels. Furthermore, the decrease of BAFF-R expression observed in recovering B cells after RTX might prevent the binding of BAFF to these cells, resulting in a decreased activation of B cells despite the presence



**FIGURE 2** | Evolution of serum BAFF levels and CD19+ B cells according to treatments: rituximab (blue curves) or corticosteroids (red curves). Mean percentages of CD19+ B cells among peripheral blood lymphocytes were measured by flow cytometry and are indicated in full lines. Mean serum BAFF levels were measured by ELISA and are indicated in dashed lines. Arrows correspond to rituximab infusions. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**FIGURE 3** | Evolution of B-cells BAFF-R expression according to treatment by rituximab (A) or corticosteroids (B). (A) Evolution of the mean cytometric BAFF-R MFI expression in total B cells (black) and autoreactive DSG-specific B cells (grey) before ( $n = 22$ ) and after rituximab ( $n = 11$ ) and comparison to healthy donors ( $n = 4$ ). (B) Evolution of the mean cytometric BAFF-R MFI expression in total B cells (black) and autoreactive DSG-specific B cells (grey) before ( $n = 22$ ) and after corticosteroids ( $n = 11$ ) and comparison to healthy donors ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ .

of high BAFF serum levels. Conversely, the incomplete B cell depletion and persistent BAFF-R expression associated with high BAFF serum levels might explain the high number of relapses in patients treated with CS alone.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and

institutional requirements. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VH: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft. MM-V: Investigation. M-LG: Investigation. MP: Investigation. GR: Software. OB: Resources. PM: Methodology. SC: Methodology. PJ: Writing – review & editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

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

## REFERENCES

- Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol* (2016) 11:175–97. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044313
- 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) 139(1):31–7.
- Brink R. Regulation of B Cell Self-Tolerance by BAFF. *Semin Immunol* (2006) 18(5):276–83. doi: 10.1016/j.smim.2006.04.003
- 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. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.010
- Smulski CR, Kury P, Seidel LM, Staiger HS, Edinger AK, Willen L, et al. BAFF- and TACI-Dependent Processing of BAFFR by ADAM Proteases Regulates the Survival of B Cells. *Cell Rep* (2017) 18(9):2189–202. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.005
- Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders Along With Autoimmune Manifestations. *J Exp Med* (1999) 190(11):1697–710. doi: 10.1084/jem.190.11.1697
- Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Mühle C, Martinez-Gamboia L, et al. High-Level Serum B-cell Activating Factor and Promoter Polymorphisms in Patients With Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol* (2007) 136(2):309–14. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06431.x
- Mackay F, Sierro F, Grey ST, Gordon TP. The BAFF/APRIL System: An Important Player in Systemic Rheumatic Diseases. *Curr Dir Autoimmun* (2005) 8:243–65. doi: 10.1159/000082106
- Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. The BAFF/APRIL System in SLE Pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* (2014) 10(6):365–73. doi: 10.1038/nrrheum.2014.33
- 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.
- Cianchini G, Corona R, Frezzolini A, Ruffelli M, Didona B, Puddu P. Treatment of Severe Pemphigus With Rituximab: Report of 12 Cases and a Review of the Literature. *Arch Dermatol* (2007) Aug 1143(8):1033–8. doi: 10.1001/archderm.143.8.1033
- Chang Y, Chen X, Wang M, Zhu X. A 10-Year Retrospective Cohort Analysis of Rituximab for the Treatment of Pemphigus in a Chinese Population. *J Am Acad Dermatol* (2021). doi: 10.1016/j.jaad.2020.12.062
- Mahmoudi H, Tavakolpour S, Balighi K, Farid AS, Nili A, Jan D, et al. Rituximab in Practice: Clinical Evaluation of Patients With Pemphigus After Rituximab Administration. *Dermatol Ther* (2021) 34(1):e14633. doi: 10.1111/dth.14633
- Shimanovich I, Baumann T, Schmidt E, Zillikens D, Hammers CM. Long-Term Outcomes of Rituximab Therapy in Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* (2020) 34(12):2884–9. doi: 10.1111/jdv.16561
- 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. doi: 10.1016/S1074-7613(04)00079-2
- 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* (2009) 129(9):2202–10. doi: 10.1038/jid.2009.27
- 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. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07305.x
- Mignard C, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Balayé P, Prost-Squarcioni C, Houivet E, et al. Factors Associated With Short-term Relapse in Patients With Pemphigus Who Receive Rituximab as First-line Therapy: A Post Hoc Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* (2020) 156(5):545–52.
- Teng YKO, Bruce IN, Diamond B, Furie RA, van Vollenhoven RF, Gordon D, et al. Phase III, Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, 104-Week Study of Subcutaneous Belimumab Administered in Combination With Rituximab in Adults With Systemic Lupus Erythematosus (SLE): BLISS-BELIEVE Study Protocol. *BMJ Open* (2019) 9(3):e025687. doi: 10.1136/bmjopen-2018-025687
- Kraaij T, Arends EJ, van Dam LS, Kamerling SWA, van Daele PLA, Bredewold OW, et al. Long-Term Effects of Combined B-cell Immunomodulation With Rituximab and Belimumab in Severe, Refractory Systemic Lupus Erythematosus: 2-Year Results. *Nephrol Dial Transplant* (2020). doi: 10.1093/ndt/gfaa117
- Becerra E, Scully MA, Leandro MJ, Heelas EO, Westwood J-P, De La Torre I, et al. Effect of Rituximab on B Cell Phenotype and Serum B Cell-Activating Factor Levels in Patients With Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Clin Exp Immunol* (2015) 179(3):414–25. doi: 10.1111/cei.12472
- 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. doi: 10.1136/ard.2010.131326

**Conflict of Interest:** 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 © 2021 Hébert, Maho-Vaillant, Golinski, Petit, Riou, Boyer, Musette, Calbo and Joly. 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.

# Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus

Maud Maho-Vaillant<sup>1,2</sup>, Corine Peral<sup>3</sup>, Marie-Laure Golinski<sup>1,2</sup>, Vivien Hébert<sup>1,2</sup>, Frédérique Caillot<sup>4</sup>, Claire Mignard<sup>1</sup>, Gaëtan Riou<sup>2</sup>, Marie Petit<sup>2</sup>, Manuelle Viguier<sup>5</sup>, Michael Hertl<sup>6</sup>, Olivier Boyer<sup>2</sup>, Sébastien Calbo<sup>2</sup>, Nicolas Fazilleau<sup>3,7</sup> and Pascal Joly<sup>1,2,7</sup>

Pemphigus is an autoimmune blistering disease mediated by autoantibodies directed against desmogleins (DSGs). We recently showed that first-line treatment with rituximab (RTX) enables more patients to achieve long-lasting remission off therapy than corticosteroids alone. To understand the immunological mechanisms that mediate long-lasting clinical remission after RTX treatment, we analyzed the phenotype of DSG-specific memory B cells and DSG-specific T follicular helper cells by flow cytometry and measured antibody-secreting cells by enzyme-linked immune absorbent spot in patients treated with corticosteroids alone or RTX. This post hoc analysis of the RITUX3 trial showed that RTX induced a significant decrease of IgG-switched DSG-specific memory B cells. Accordingly, anti-DSG antibody-secreting cells were no longer detected in patients in complete remission after RTX. In contrast, corticosteroids did not modify the frequency or the phenotype of DSG-specific memory B cells, and anti-DSG antibody-secreting cells were still detected after treatment, even in patients in remission. Using peptide-HLADRB1\*0402 tetramer staining, we identified DSG-3–specific T follicular helper cells, which dramatically decreased after RTX, while remaining stable after corticosteroid treatment. Our findings suggest that long-lasting response to RTX in pemphigus relies on the decrease of DSG-specific circulating T follicular helper cells, which correlates with a sustained depletion of IgG-switched memory autoreactive B cells, leading to the disappearance of anti-DSG antibody-secreting cells.

*Journal of Investigative Dermatology* (2021) ■, ■–■; doi:10.1016/j.jid.2021.01.031

## INTRODUCTION

Pemphigus is a life-threatening autoimmune disease of the skin and mucosae owing to the production of antibodies (Abs) directed against two desmosomal proteins: desmoglein (DSG)-1 and DSG-3, which are adhesion molecules of the epidermis (Schmidt et al., 2019). We recently reported the long-lasting efficacy of rituximab (RTX), the anti-CD20 mAb, in patients with pemphigus (Joly et al., 2017). Relative to a

standard regimen of corticosteroids (CSs) alone, RTX associated with a short-term regimen of prednisone allowed 89% of patients to achieve complete remission off therapy at month (M) 24. RTX is thought to act mainly by B-cell depletion in pemphigus, as in other autoimmune diseases (Alberici et al., 2015; Albers et al., 2017). Relapses have been reported to be associated with B-cell reconstitution. Up to now, the effect of RTX has mainly been assessed on total B cells, which does not necessarily reflect its effect on autoreactive DSG-specific B cells. In particular, we previously reported in patients with pemphigus treated with RTX as second-line treatment that long-term remission was associated with prolonged failure of anti-DSG B-cell response (Colliou et al., 2013).

Most of the anti-DSG Abs belong to the IgG4 subclass (Ellebrecht et al., 2018), which suggests the involvement of T follicular helper (TFH) cells in the selection process within the germinal center. TFH cells are characterized by the expression of CXCR5 chemokine receptor and the production of IL-21, a cytokine that is essential for the generation of memory B cells and plasma cells (Zotos et al., 2010). A higher frequency of circulating TFH cells and increased serum IL-21 levels have been recently reported in patients with pemphigus relative to healthy controls (Hennerici et al., 2016). This latter study suggested the existence of DSG-3–specific autoreactive T helper (Th) cells producing IL-21 on ex vivo stimulation with DSG-3. The aim of this postanalysis of the RITUX3 trial was to investigate the effect of RTX compared with a standard CS

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Centre de Référence des Maladies Bulleuses Auto-Immunes, Normandie University, Rouen, France; <sup>2</sup>INSERM U1234, UNIROUEN, Normandie University, Rouen, France; <sup>3</sup>Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM U1291, CNRS U5051, University of Toulouse, Toulouse, France; <sup>4</sup>Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, Rouen, France; <sup>5</sup>Department of Dermatology, Centre de Référence des Maladies Bulleuses Auto-Immunes and EA 7509, Reims-Champagne Ardenne University, Reims, France; and <sup>6</sup>Department of Dermatology and Allergology, Philipps University, Marburg, Germany

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Maud Maho-Vaillant, Faculté de Médecine et Pharmacie, INSERM U1234, Rouen University Hospital, Bâtiment Recherche - 3ème étage, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France. E-mail: [maud.maho@univ-rouen.fr](mailto:maud.maho@univ-rouen.fr)

Abbreviations: Ab, antibody; ASC, antibody-secreting-cell; CS, corticosteroid; DSG, desmoglein; ELISPOT, enzyme-linked immune absorbent spot; M, month; RTX, rituximab; TFH, T follicular helper; Th, T helper

Received 26 October 2020; revised 31 December 2020; accepted 24 January 2021; accepted manuscript published online XXX; corrected proof published online XXX

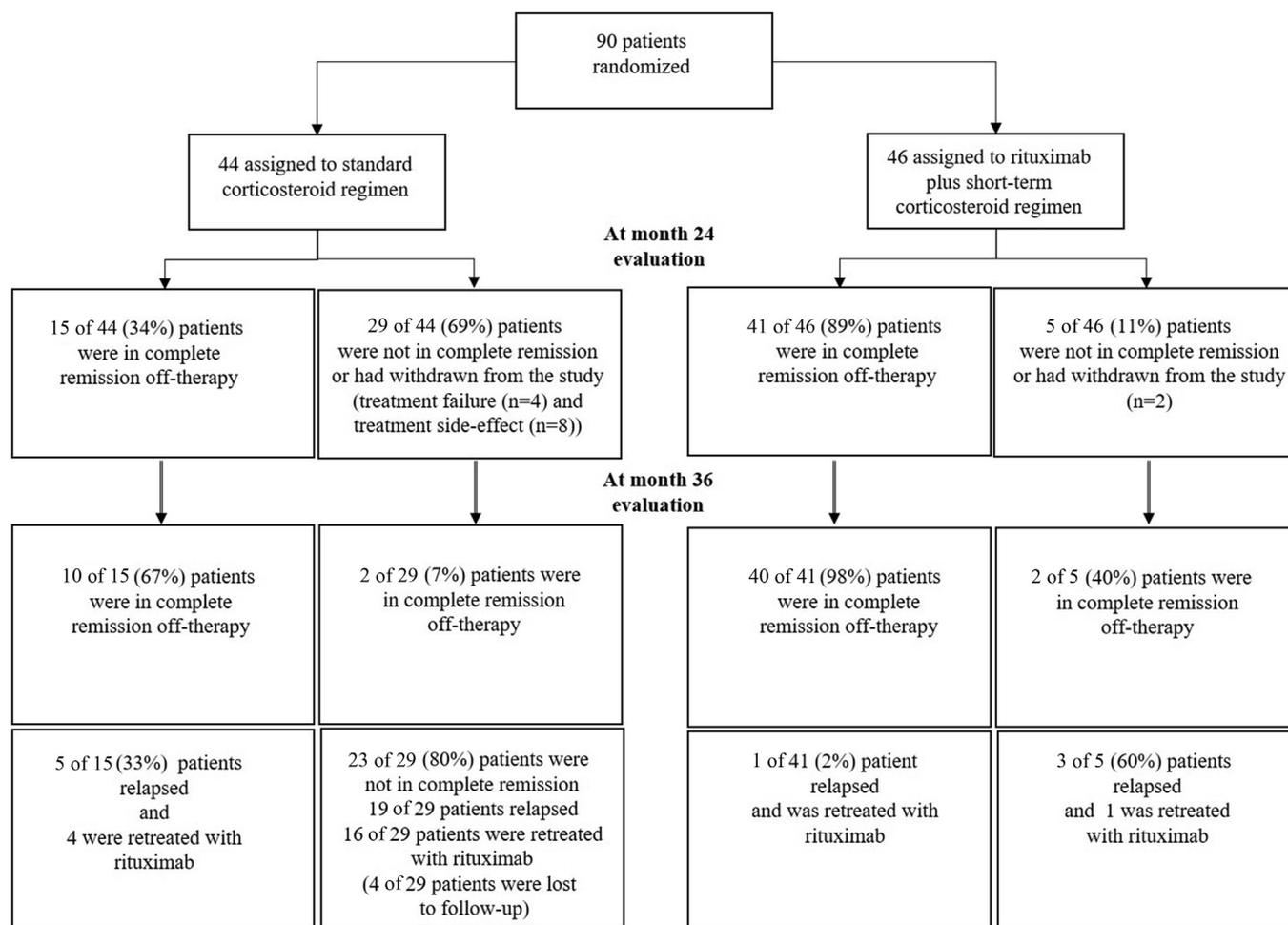


Figure 1. Flow chart of the study.

regimen alone on the frequency and phenotype of DSG-specific B cells and DSG-specific TFH cells in patients with pemphigus. In particular, we studied the relationships between autoreactive B-cell and T-cell populations and long-lasting clinical remission or the onset of relapses.

## RESULTS

### Clinical course of patients

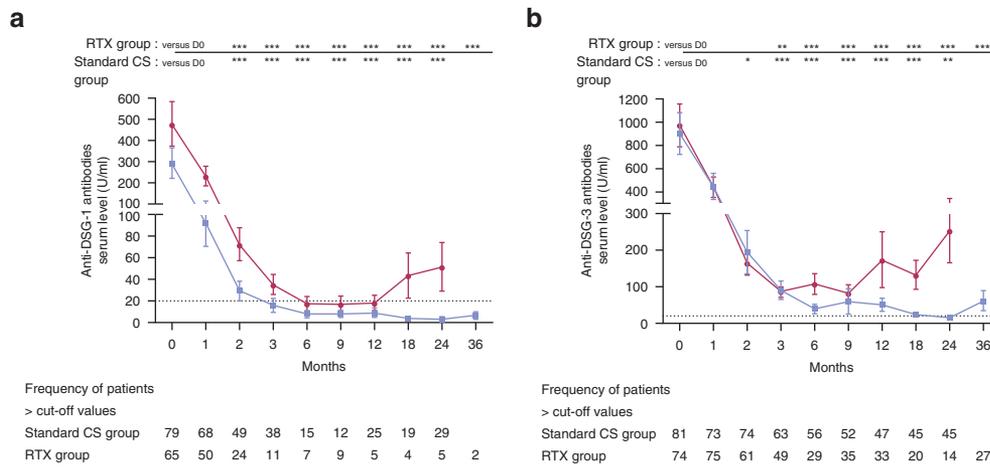
A total of 90 patients were randomly assigned to standard CS regimen or RTX plus short-term prednisone groups (Figure 1). At the final evaluation at M36, 44 of 46 patients (96%) from the RTX group were in complete remission off therapy, including two patients who were secondarily treated with RTX between M24 and M36, and two patients had persistent disease activity. A total of 15 patients from the CS group were in complete remission off therapy or still on minimal therapy at M24, and 29 patients had persistent disease activity. According to the protocol of the RITUX3 trial, 20 of 44 patients (45%) from the CS group were secondarily treated with RTX between M24 and M36 (after assessment of the primary endpoint at M24) owing to persistent disease activity or CS side effects. Because the treatments of patients from the CS group were no longer homogeneous during the third year of the trial, biological analyses were not performed after the M24 visit in these patients from the CS group.

### Serum autoantibodies against DSG-1 and DSG-3

Relative to the RITUX3 trial (Joly et al., 2017), which reported the monitoring of biological parameters until M24, we have shown in Figure 2 the evolution of mean serum anti-DSG-1 and anti-DSG-3 Ab ELISA values of patients from the RTX group until M36. In both treatment groups, autoantibody titers decreased from baseline to M9. They then increased mainly in patients from the CS group, whereas they remained negative or at very low levels in most patients from the RTX group. At M24 evaluation, 5% of patients from the RTX group had positive serum anti-DSG-1 versus 29% of patients from the CS group ( $P < 0.01$ ). Anti-DSG-3 Abs were still detected at M24 in 14% of patients from the RTX group versus 45% of those from the CS group ( $P < 0.01$ ). 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.

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

The evolution of peripheral whole blood B cells, TFH cells, and serum IL-21 level during the course of treatment with RTX or CS alone is shown in Figure 3. The TFH-cell subpopulation was defined by the phenotype  $CD3^+CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$ . This analysis was performed longitudinally in 11 patients from the RTX group and in nine



**Figure 2.** Evolution of anti-DSG-1 and anti-DSG-3 antibody ELISA values in sera from patients with pemphigus, according to treatment regimens. Blue line = patients assigned to the RTX group. Red line = patients assigned to the standard CS group. The dashed line represents the cut-off values proposed by the manufacturer for (a) anti-DSG-1 and (b) anti-DSG-3 antibody ELISA values. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 versus baseline. CS, corticosteroid; DSG, desmoglein; RTX, rituximab.

patients from the standard CS group. Serum IL-21 levels were measured by ELISA in all patients. As expected, a dramatic decrease in peripheral whole blood B cells was observed after

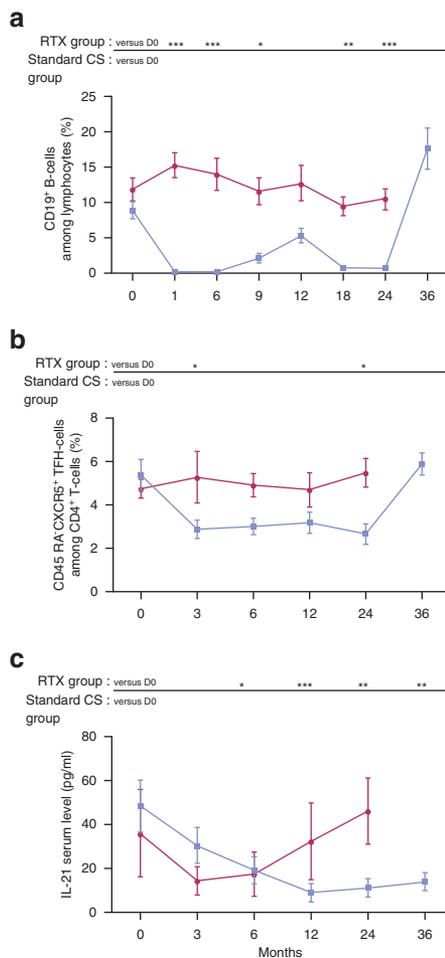
the initial infusion of RTX, followed by a transient increase from M9 to M12 and a further progressive increase after the last infusion of RTX at M18, whereas no significant evolution was observed in patients treated with CS alone (Figure 3a). In patients from the RTX group, a 50% decrease in TFH-cell frequency, which paralleled B-cell depletion, was observed from M3 to M24, followed by an increase of TFH cells up to baseline values, which occurred after B-cell recovery (Figure 3b). In contrast, no variation in TFH-cell frequency was observed in patients treated with a standard CS regimen. A dramatic and persistent decrease of serum IL-21 level was observed from baseline to M36 in patients treated with RTX. Conversely, whereas only a transient decrease of IL-21 level was observed from baseline to M3 in patients from the standard CS group, IL-21 levels increased after M3 in these patients once CS doses were tapered under 20 mg/day (Figure 3c).

To assess the potential prognostic value of serum level of IL-21 and TFH-cell frequency, we compared these parameters between patients with long-lasting clinical remission and those who relapsed during the follow-up. Because too few patients in the RTX group had persistent disease activity, we performed these experiments in patients treated with CS alone. We did not observe a statistically significant difference in IL-21 serum level (*P* = 0.53) or frequency of whole TFH cells (*P* = 0.80) between patients with prolonged remission and those who further relapsed.

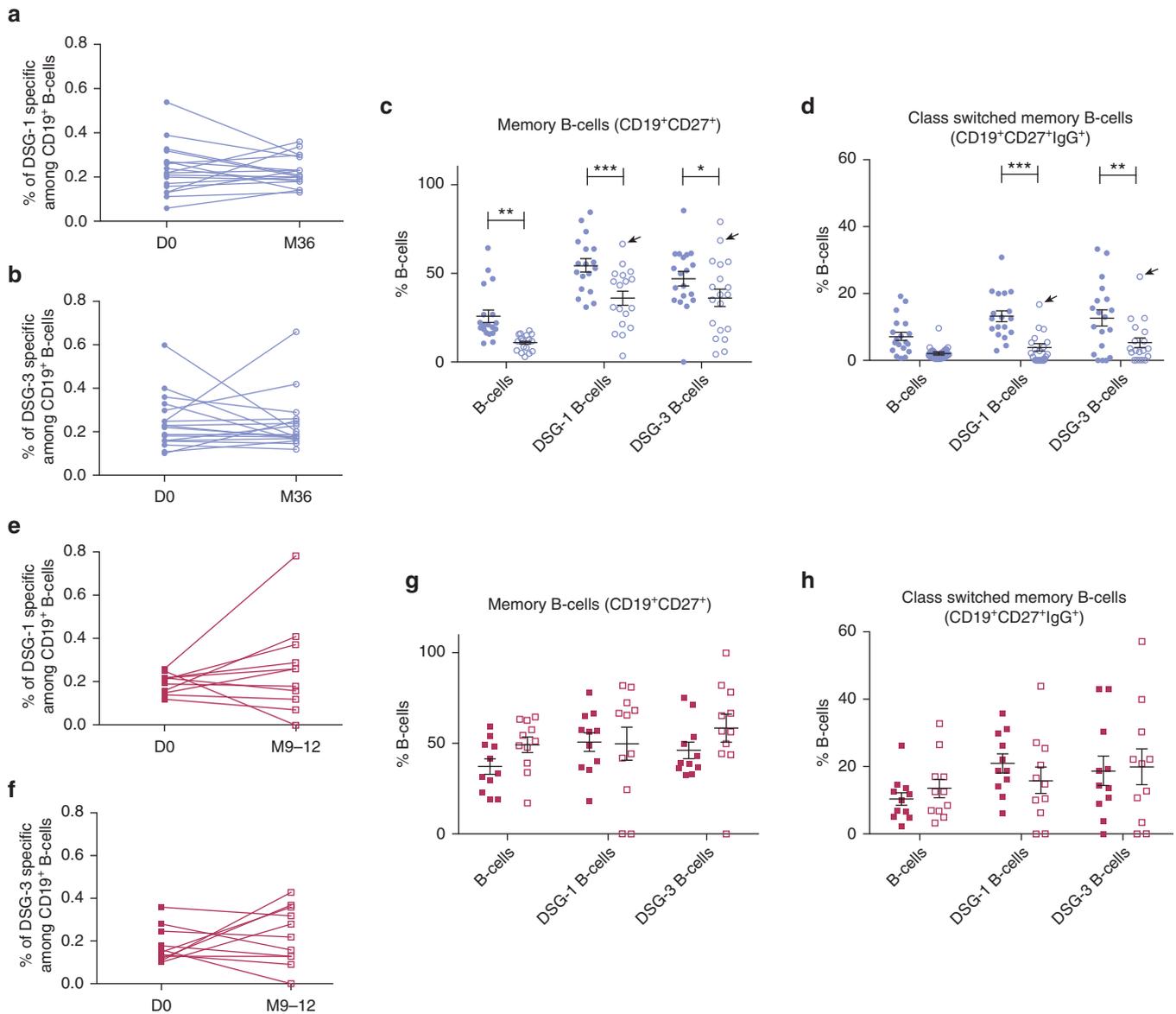
**Immunophenotyping of DSG-1- and DSG-3-specific B cells**

DSG-1- and DSG-3-specific circulating B cells were detected in blood samples collected at baseline from 30 patients with pemphigus at frequencies ranging from 0.11% to 0.54% (mean ± SEM: 0.23 ± 0.01%) for DSG-1-specific B cells and from 0.1% to 0.6% (mean: 0.21 ± 0.01%) for DSG-3-specific B cells of whole CD19<sup>+</sup> B cells (baseline frequencies in Supplementary Figure S1a and b). DSG-specific B cells from patients with pemphigus were more frequently CD27<sup>+</sup> and class-switched IgG<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> than whole B cells (CD27<sup>+</sup>: 51 ± 2% of DSG-specific B cells vs. 31 ± 3% of whole CD19<sup>+</sup> B cells, *P* < 0.0001; IgG<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>: 15.5 ± 1.4% of DSG-specific B cells vs. 8.4 ± 1.2% of whole CD19<sup>+</sup> B cells, *P* < 0.0001) (Supplementary Figure S1b and c).

To assess the differential effects of CS alone and CS combined with RTX, we analyzed the evolution of



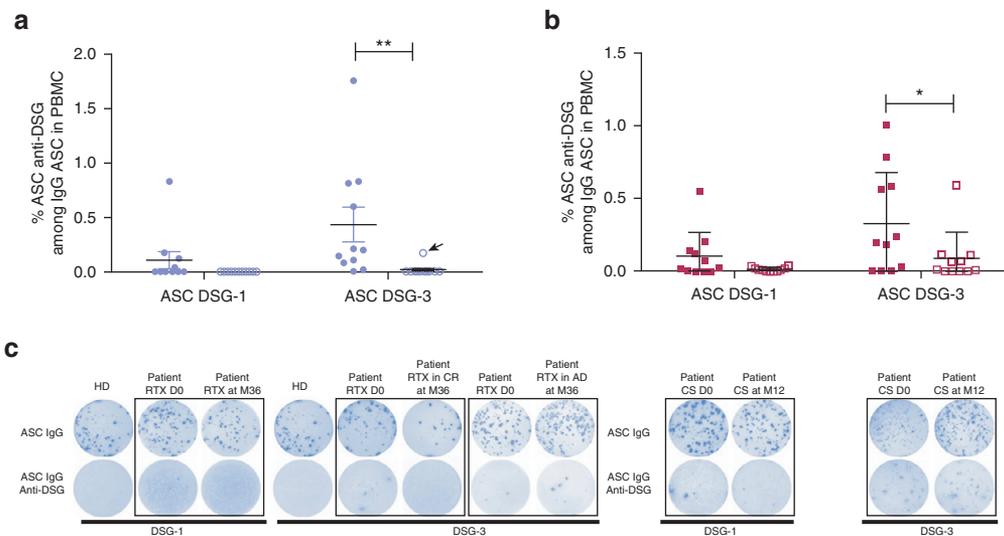
**Figure 3.** Evolution of peripheral blood whole B cells, TFH-cell subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells, and serum IL-21 level during follow-up of patients according to treatment regimen. Blue line = patients assigned to the RTX group. Red line = patients assigned to the standard CSs group. The frequency of (a) whole B cells and (b) TFH-cell subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells were calculated by flow cytometry. (c) Serum IL-21 level was measured by ELISA. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 versus baseline. CS, corticosteroid; RTX, rituximab; TFH, T follicular helper.



**Figure 4. Frequency and phenotype of peripheral blood whole B cells and DSG-1- and DSG-3-specific B cells evaluated by flow cytometry in patients with pemphigus at D0 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. Evolution of the frequency of DSG-1- and DSG-3-specific B cells among purified B cells between D0 (plain symbols) and after treatment (open symbols) at (a, b) M36 after B-cell recovery for the RTX group or (e, f) at M9–12 when prednisone doses were tapered under 20 mg/day for the CS group. Evolution of the memory B-cell subpopulation (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) and class-switched memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>) among whole B cells and DSG-specific B cells at D0 and (c, d) after RTX treatment or (g, h) after CS treatment. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001. CS, corticosteroid; D0, baseline; DSG, desmoglein; M, month; RTX, rituximab.

DSG-1- and DSG-3-specific B cells at M36 (corresponding to 18 Ms after the last infusion of RTX) in patients from the RTX group and between M9 and M12 (when prednisone doses were tapered <20 mg/day) in patients from the CS group. Surprisingly, DSG-1- and DSG-3-specific B cells were still detected at M36 evaluation in patients in complete remission after RTX treatment at mean frequencies of  $0.23 \pm 0.01\%$  and  $0.23 \pm 0.02\%$  of B cells, respectively, which were close to the frequencies measured at baseline (Figure 4a and b). The mean frequency of DSG-1- and DSG-3-specific CD27<sup>+</sup> memory B cells decreased from baseline to M36 after RTX treatment

(DSG-1<sup>+</sup> B cells:  $55 \pm 4\%$  vs.  $36 \pm 4\%$ , *P* < 0.001; DSG-3<sup>+</sup> B cells:  $48 \pm 4\%$  vs.  $36 \pm 5\%$ , *P* < 0.05) (Figure 4c). Additionally, the frequency of class-switched DSG-specific CD27<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup> B cells dramatically decreased from baseline to M36 after RTX (DSG-1<sup>+</sup> B cells:  $13.5 \pm 1.6\%$  vs.  $3.8 \pm 1.0\%$ , *P* < 0.001; DSG-3<sup>+</sup> B cells:  $13.0 \pm 2.4\%$  vs.  $4.5 \pm 0.9\%$ , *P* < 0.01) (Figure 4d). The one patient whose blood sample was available out of two patients with persistent disease activity after RTX had the highest frequency of class-switched DSG-3-specific CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> B cells (25.0%, Figure 4d, black arrow). In contrast with the changes observed in the RTX group, we did not observe



**Figure 5. Frequency of peripheral blood DSG-1- and DSG-3-specific ASCs evaluated by ELISPOT assay in patients with pemphigus at D0 and after treatment.** (a) Blue = patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent AD after RTX treatment is indicated by an arrow. (b) Red = patients assigned to the standard CS group. (c) Total IgG-ASCs (top) and DSG IgG ASCs (bottom) were detected using ELISPOT in PBMCs of representative patients with pemphigus and one HD. The number of spots detected showed that DSG IgG ASCs, but not total Ig-ASCs, were depleted in patients with pemphigus in CR after RTX treatment. Analyses were performed at D0 (plain symbols) and posttreatment samples (open symbols) at M36 after B-cell recovery in patients from the RTX group and at M9–12 when prednisone doses were tapered under 20 mg/day in patients from the standard CS group. Result are presented as frequencies of DSG-1- and DSG-3-specific IgG-ASCs among total IgG-ASCs. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . AD, active disease; ASC, antibody-secreting cell; CR, clinical remission; CS, corticosteroid; D0, baseline; DSG, desmoglein; ELISPOT, enzyme-linked immune absorbent spot; HD, healthy donor; M, month; RTX, rituximab.

any modification in the frequency of DSG-specific class-switched  $CD27^+IgG^+$  B cells from baseline to M12 in patients treated with CS alone (DSG-1 $^+$  B cells:  $20.9 \pm 2.7\%$  vs.  $15.9 \pm 3.9$ ;  $P = 0.17$ ; DSG-3 $^+$  B cells:  $18.7 \pm 4.3\%$  vs.  $20.0 \pm 5.3$ ;  $P = 0.83$ ) (Figure 4e–h).

#### Assessment of circulating anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG-secreting B cells using enzyme-linked immune absorbent spot assay

DSG-1- and DSG-3-specific Ab-secreting-cells (ASCs) were measured in 11 patients from the RTX group (including 10 patients in complete remission off treatment and one patient with persistent disease activity) and in 11 patients from the standard CS group. At baseline, anti-DSG-1 and/or anti-DSG-3 IgG-ASCs were detected both in patients from the RTX group ( $0.10 \pm 0.07\%$  and  $0.43 \pm 0.16\%$ , respectively) and in those from the standard CS group ( $0.10 \pm 0.05\%$  and  $0.32 \pm 0.10\%$ , respectively) (Figure 5a and b). After B-cell recovery at M36 evaluation, anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG-ASCs were no longer detectable in 10 patients from the RTX group who were in clinical remission ( $P < 0.01$  versus baseline samples), whereas 0.17% anti-DSG-3 IgG-ASCs were still detected in the one patient with persistent mucosal lesions (Figure 5a, black arrow and Figure 5c). In contrast, anti-DSG-1 and/or anti-DSG-3 IgG-ASCs were still detected after treatment in patients from the CS group, even in those in clinical remission, although at a lower frequency than at baseline (DSG-1 ASC:  $0.10 \pm 0.05$  at baseline vs.  $0.01 \pm 0.01$  at M12,  $P = 0.5$ ; DSG-3

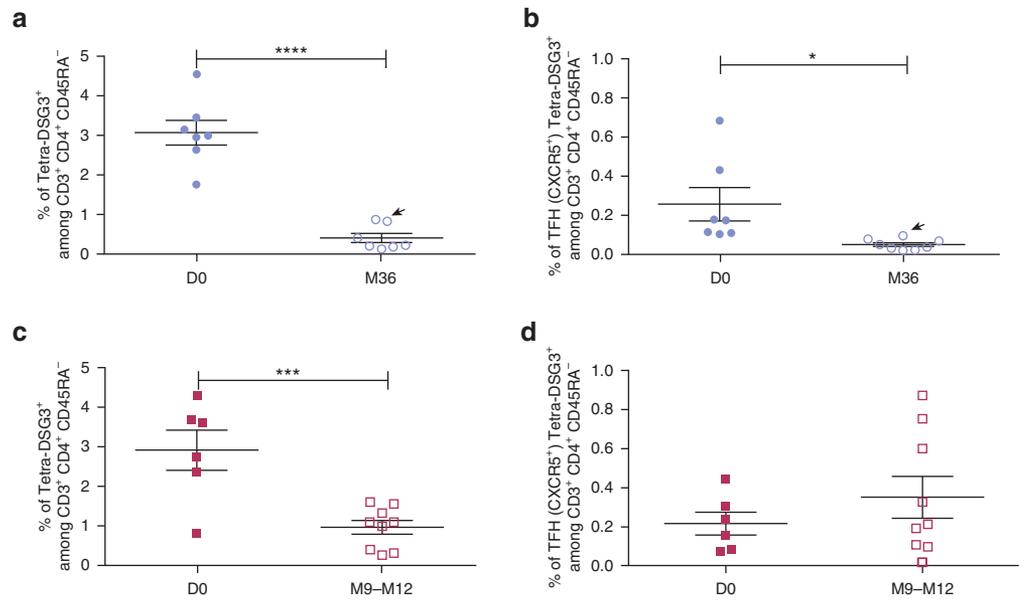
ASC:  $0.32 \pm 0.10$  at baseline vs.  $0.089 \pm 0.050\%$  at M12;  $P < 0.05$ ) (Figure 5b and c).

#### Effect of treatments on frequencies and phenotype of circulating DSG-3-specific Th cells and TFH cells

Because anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG-ASCs were no longer detected in patients in complete remission after RTX treatment, whereas non switched DSG-1- and DSG-3-specific naive and, to a lesser degree, memory B cells were still detected after RTX treatment, we further investigated DSG-3-specific Th cells and TFH cells.

Using immunodominant peptide of DSG-3 (190-204)/HLA-DRB1\*0402 tetramer staining, we studied the frequency of DSG-3-specific Th cells and TFH cells at baseline and at M36 in seven patients treated with RTX and at baseline and at M9–12 in six and nine patients from the CS group respectively, who all carried the HLA-DRB1\*0402 PV susceptibility allele. DSG-3-specific circulating Th cells and TFH cells were detected in blood samples collected at baseline at frequencies ranging from 0.8–4.5% (mean:  $3.0 \pm 0.27\%$ ) for Th cells and from 0.07–0.68% (mean:  $0.24 \pm 0.05\%$ ) for TFH cells of whole  $CD4^+$  T cells. The frequency of DSG-3-specific circulating Th cells and TFH cells dramatically decreased after RTX treatment (Th:  $3.0 \pm 0.31\%$  at baseline vs.  $0.4 \pm 0.12\%$  at M36;  $P < 0.0001$ ; TFH:  $0.25 \pm 0.08\%$  at baseline vs.  $0.05 \pm 0.009\%$  at M36;  $P = 0.02$ ) (Figure 6a and b). In contrast, although DSG-3-specific Th cells from patients treated with CS alone decreased after CS treatment ( $2.94 \pm 0.51\%$  at baseline vs.  $0.97 \pm 0.17\%$  at M9–12,  $P = 0.0009$ ), DSG-3-specific

**Figure 6. Frequency of peripheral DSG-3-specific T cells and TFH cells evaluated among whole CD4<sup>+</sup> T cells in patients with pemphigus at baseline and after treatment.** Blue = patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent active disease at M36 is identified by an arrow. Red = patients assigned to the standard CS group. The frequencies of (a, c) DSG-3-specific T cells and (b, d) TFH cells were calculated by flow cytometry using DSG-3 peptide/HLADRB1\*0402 tetramer. Analyses were performed at D0 and M36 after B-cell recovery in patients from the RTX group and at M9–12 when prednisone doses were tapered under 20 mg/day in patients from the standard CS group. Baseline samples correspond to plain symbols and posttreatment samples to open symbols. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . CS, corticosteroid; D0, baseline; DSG, desmoglein; M, month; RTX, rituximab; TFH, T follicular helper.



TFH cells were still detected after CS treatment at similar levels as at baseline, even in patients in clinical remission ( $0.22 \pm 0.06$  at baseline vs.  $0.35 \pm 0.10\%$  at M9–12,  $P = 0.34$ ) (Figure 6c and d).

## DISCUSSION

This study shows that long-lasting efficacy of RTX in patients with pemphigus is associated with 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<sup>+</sup> Abs, as demonstrated by enzyme-linked immune absorbent spot (ELISPOT) and ELISA, respectively. These findings contrast with the presence of circulating DSG-1- and DSG-3-specific B cells in patients in complete remission after RTX therapy at frequencies that were in fact very close to those observed at baseline before treatment, corresponding to around 0.2% of total B cells. This discrepancy was likely related to the phenotype of the reappearing B cells after the initial RTX-induced B-cell depletion, among which most of the DSG-3-specific B cells were naive non switched CD27<sup>-</sup> B cells. The decrease in CD27 expression by DSG-specific B cells is in accordance with our previous findings, which also reported a decrease in the frequency of DSG-specific memory B cells after RTX treatment (Hébert et al., 2019; Pollmann et al., 2019). It is also in accordance with the decrease in transcription of the *CD27* gene that we recently reported in patients treated with RTX. The only patient who still had active disease after RTX treatment had a high frequency of memory class-switch IgG B cells among DSG-3-specific B cells (25%) and, accordingly, a high frequency of circulating anti-DSG-3 IgG-secreting B cells (0.17%) and high titers of serum anti-DSG-3 IgG<sup>+</sup> Abs (1,500 U/ml).

Because of their capacity to regulate the maturation of B cells into memory B cells and IgG-secreting plasma cells,

TFH cells have been suspected to be involved in several autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus (Choi et al., 2015), rheumatoid arthritis (Arroyo-Villa et al., 2014), and IgG4-related diseases (Chen et al., 2018). A decrease of circulating TFH cells has been described in patients with Sjögren syndrome or type 1 diabetes mellitus after RTX treatment (Verstappen et al., 2017; Xu et al., 2013). An effect of RTX on DSG-specific T cells from patients with pemphigus was previously reported by the team of Hertl by using ELISPOT assay (Eming et al., 2008), who observed a decrease in the number of DSG-3-specific CD4<sup>+</sup> Th1 and Th2 cells in patients treated with RTX. Using tetramer technology, we demonstrated the *in vivo* presence of DSG-3-specific Th cells and TFH cells in patients with pemphigus. Strikingly, we observed here a dramatic decrease in DSG-3-specific TFH cells in the blood of patients after RTX treatment, which remained at very low levels up to M36 after RTX treatment, whereas the whole circulating TFH-cell compartment returned to baseline values.

In addition, we observed a dramatic decrease of serum IL-21 levels, which paralleled B-cell depletion after RTX treatment. IL-21, which is highly produced by TFH cells, plays a crucial role in B-cell maturation, in particular, the production of memory B cells. It has been recently reported that T cells produced IL-21 when cultured with recombinant DSG, suggesting that the decrease of serum IL-21 levels observed after RTX treatment in this study might be at least partly explained by the decrease of circulating DSG-3-specific TFH cells (Hennerici et al., 2016).

The disappearance of DSG-1- and DSG-3-specific IgG-switched CD27<sup>+</sup> B cells perfectly correlated with the disappearance of DSG-3-specific TFH cells and the decrease of serum IL-21 levels, which are both known to play a major role in B-cell maturation (Zotos et al., 2010).

In mice, TFH differentiation is initiated early when dendritic cells prime naive CD4<sup>+</sup> T cells (Kitano et al., 2011). However, this priming is not sufficient to complete full TFH-cell differentiation but instead drives the production of pre-TFH cells, a partially differentiated intermediate that expresses CXCR5 and the transcriptional repressor Bcl6 (Goenka et al., 2011). Thus, the absence of B cells or the presence of B cells with irrelevant antigen-specificity impair TFH-cell generation (Johnston et al., 2009). Moreover, maintenance of the TFH-cell phenotype requires sustained antigenic stimulation by B cells (Baumjohann et al., 2013). In a mouse model of pemphigus, adoptive transfer of DSG-3-specific B cells was not sufficient to induce the disease in recipient mice deficient for both T and B cells, whereas the cotransfer of similar B cells with activated ICOS<sup>+</sup> TFH cells was pathogenic (Kim et al., 2020).

Our observations in patients with pemphigus are in accordance with this model in which the absence of DSG-specific B cells following RTX treatment impacts the maturation and/or maintenance of DSG-specific TFH cells, which in turn blocks the isotype switch of DSG-specific B cells.

Thus, our results collectively suggest that the blockage of reappearing B cells at the naive stage and the blockage of the class switch from IgM to IgG might play a major role in the long-lasting effect of RTX in patients with pemphigus.

These findings seem likely related to a specific effect of RTX, because we did not observe such variations in the number of whole and DSG-specific TFH cells or any reversal in the balance between memory and naive DSG-specific B-cell subpopulations in patients treated with CS alone. Indeed, the persistence of DSG-specific TFH cells in these latter patients might have favored the persistence of circulating DSG-specific CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> B cells and anti-DSG IgG-ASCs, which were responsible for the increase of serum anti-DSG Abs observed once CS doses had been tapered.

Overall, this study shows that the therapeutic effect of RTX in pemphigus is not only because of a long-lasting depletion of DSG-specific B cells, but rather relates to an inefficient maturation and class-switching process of DSG-specific B cells, which likely involves the long-lasting disappearance of DSG-specific TFH cells, a population that is closely associated with the anti-DSG-3 Ab response in pemphigus (Kim et al., 2020).

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A total of 90 patients, 74 with pemphigus vulgaris and 16 with pemphigus foliaceus, were included in a randomized clinical trial (RITUX3; [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) number, NCT00784589). The Ethics Committee (CPP Nord-Ouest1) approved the study. Patients with newly diagnosed pemphigus were assigned to receive either 1 or 1.5 mg/kg/day of oral prednisone, with a progressive tapering of prednisone doses over M12–18, or two infusions of 1 g of RTX on day 0 and day 14, and 500 mg at M12 and M18, 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 gradually reduced after achievement of disease control, with the aim to stop prednisone after M3 in patients with moderate pemphigus and after M6 in patients with severe pemphigus. Patients were followed for up to 3 years.

### Clinical and immunological evaluations

Complete remission and relapse were defined according to the consensus statement definition for pemphigus end points (Murrell et al., 2008). Blood samples of healthy donors were from The French Blood Donor Service. Participants gave their written informed consent. Blood samples of patients were collected at baseline and at each follow-up visit until the end of the study at M36.

### Serum autoantibody titers

Titers of serum anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG Abs were measured using an ELISA (EUROIMMUN, Lübeck, Germany).

### Cytokine levels

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

### Phenotyping analysis

PBMCs were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque gradients (GE Healthcare Lifesciences, Chicago, IL) to assess B- and T-lymphocyte markers. The phenotype of PBMCs was determined by flow cytometry with mAbs against CD19, CD24, CD27, CD38, IgD, IgM, and IgG (Beckman Coulter, Brea, CA and BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Whole circulating TFH cells were further characterized by using a combination of different mAbs against CD3, CD4, CD45RA, and CXCR5 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany and BD Biosciences). The percentages of each subpopulation were determined using FlowJo software (BD Biosciences).

### Anti-DSG B-cell analysis

To analyze the phenotype of B cells specific for DSG-1 and DSG-3, B cells were isolated and labeled as described by Hébert et al. (2019) with recombinant DSG-1 or DSG-3 kindly provided by M. Herlt (Eming et al., 2008). The percentage and phenotype of DSG-1- and DSG-3-specific B cells were determined using FlowJo software.

### Anti-DSG-3 TFH-cell analysis

To verify that our patients with pemphigus had the HLADRB1\*0402 genotype of pemphigus vulgaris susceptibility, peripheral blood from patients was collected after obtaining informed consent. Genomic DNA from PBMCs was isolated using the NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The specific analysis of HLADRB1\*04 was performed using the Olerup SSP DRB1\*04 PCR Typing Kit (Bionobis, Guyancourt, France) according to the manufacturer's protocol. Autoreactive T cells were only characterized in patients with pemphigus vulgaris with the HLADRB1\*0402 genotype. Frequency and phenotype of DSG-3-specific Th cells and TFH cells were determined by flow cytometry using mAbs against CD3, CD4, CD45RA, and CXCR5 (Miltenyi Biotec and BD Biosciences) and a tetramer-based detection system using HLADRB1\*0402-tetramers loaded with the DSG-3 190-204 immunodominant peptide (LNSKIAFKIVSQEPA, obtained from NIH Tetramer core facility, Emory University, Atlanta, GA). The percentages of DSG-3-specific Th cells and TFH cells were determined using FlowJo software.

### DSG-specific B-cell detection using ELISPOT assay

The frequencies of circulating total IgG and DSG-specific IgG-ASCs were determined by human IgG ELISPOT Basic (Mabtech, Nacka Strand, Sweden). PBMCs from patients with pemphigus and healthy donors were prestimulated with R848 (1 µg/ml) and recombinant human IL-2 (10 ng/ml) in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml

penicillin, and 100 µg/ml streptomycin; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in separate plates for 72 hours. Plates of ELISPOT MAIPS-4510 (Merckmillipore, Darmstadt, Germany) were coated overnight at 4 °C with anti-IgG human Abs. Plates were washed and blocked with complete medium before use. Prestimulated PBMCs were washed, resuspended in complete medium, transferred to plate, and incubated for 24 hours with  $1 \times 10^5$ – $4 \times 10^5$  PBMCs per well to detect anti-DSG-1 and anti-DSG-3 IgG-secreting ASCs and with  $2.5 \times 10^3$ – $1 \times 10^4$  PBMCs per well to detect total IgG-ASCs. IgG-ASCs were detected by addition of biotinylated mouse IgG anti-human IgG. Frequency of anti-DSG-1 or anti-DSG-3 IgG-secreting ASCs was calculated after incubation for 2 hours with histidine-tagged recombinant DSG-1 or DSG-3 proteins (1 µg/ml) in PBS with calcium (Eurobio, Les Ulis, France). Biotinylated anti-histidine (0.5 µg/ml) (Abcam, Cambridge, United Kingdom) was then added. Streptavidin enzyme and substrate tetramethylbenzidine were used to detect spots. The number of spots was determined with ELISPOT Plate Readers and ImmunoSpot software (CTL Europe GmbH, Bonn, Germany). Results were expressed as frequencies of DSG-specific IgG-ASCs among total IgG-ASCs. The sensitivity and specificity of our ELISPOT assay were estimated at 1 DSG-3-specific ASC/ $10^5$  total ASCs and 100%, respectively.

### Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Prism software (Graph Pad, San Diego, CA) was used for statistical analysis. Statistical analysis was performed by Fisher's 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 analyses, one-way ANOVA with Dunnett post-test or two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test were used. A *P* < 0.05 was considered significant for all analyses.

### ORCID

Maud Maho-Vaillant: <http://orcid.org/0000-0003-4221-2792>  
 Corine Perals: <http://orcid.org/0000-0001-6911-168X>  
 Marie-Laure Golinski: <http://orcid.org/0000-0002-3532-5345>  
 Vivien Hébert: <http://orcid.org/0000-0001-9071-2033>  
 Frédérique Caillot: <http://orcid.org/0000-0001-6201-7201>  
 Claire Mignard: <http://orcid.org/0000-0003-2592-4253>  
 Gaëtan Riou: <http://orcid.org/0000-0001-5679-9737>  
 Marie Petit: <http://orcid.org/0000-0003-2187-3997>  
 Manuelle Viguier: <http://orcid.org/0000-0001-9049-8700>  
 Michael Hertl: <http://orcid.org/0000-0002-5494-2461>  
 Olivier Boyer: <http://orcid.org/0000-0002-7591-307X>  
 Sébastien Calbo: <http://orcid.org/0000-0003-4358-8417>  
 Nicolas Fazilleau: <http://orcid.org/0000-0002-3574-5614>  
 Pascal Joly: <http://orcid.org/0000-0002-8079-5004>

### CONFLICT OF INTEREST

MH has received unrestricted grant funds from Topas Therapeutics, Hamburg, Germany. PJ is a consultant for Roche, GlaxoSmithKline, Eli Lilly, Principabio, Sanofi Aventis, Argenx. The remaining authors state no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by INSERM, Normandie University, the French Programme Hospitalier de Recherche Clinique, French Ministry of Health (No 2008-005266-31), the French Society of Dermatology, The Inspire Program from the Region Occitanie/Pyrénées-Méditerranée (#1901175), and the European Regional Development Fund (MP0022856). 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, Gaëlle Quereux, Alain Dupuy, Sébastien Debarbieux, Martine Avenel-Audran, Michel D'Incan, Christophe Bedane, Nathalie Bénétou, Denis Jullien, Nicolas Dupin, Laurent Misery, Laurent Machet, Marie Beylot-Barry, Olivier

Dereure, and Bruno Sassolas). We thank Françoise Hau, Fabienne Jouen, and Vincent Ferranti for technical assistance. We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for editing the manuscript.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: MMV, SC, MV, NF, PJ; Formal Analysis: MMV; Funding Acquisition: NF, PJ; Investigation: MMV, CP, MLG, VH, FC, CM, GR, MP; Methodology: MMV, SC, NF; Project Administration: NF, PJ; Resources: NH, OB, NF, PJ; Supervision: SC, NF, PJ; Validation: MMV, CP; Visualization: MMV, SC; Writing - Original Draft Preparation: MMV, SC, NF, PJ; Writing - Review and Editing: MMV, CP, MLG, VH, FC, CM, GR, MP, MV, NH, OB, SC, NF, PJ

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

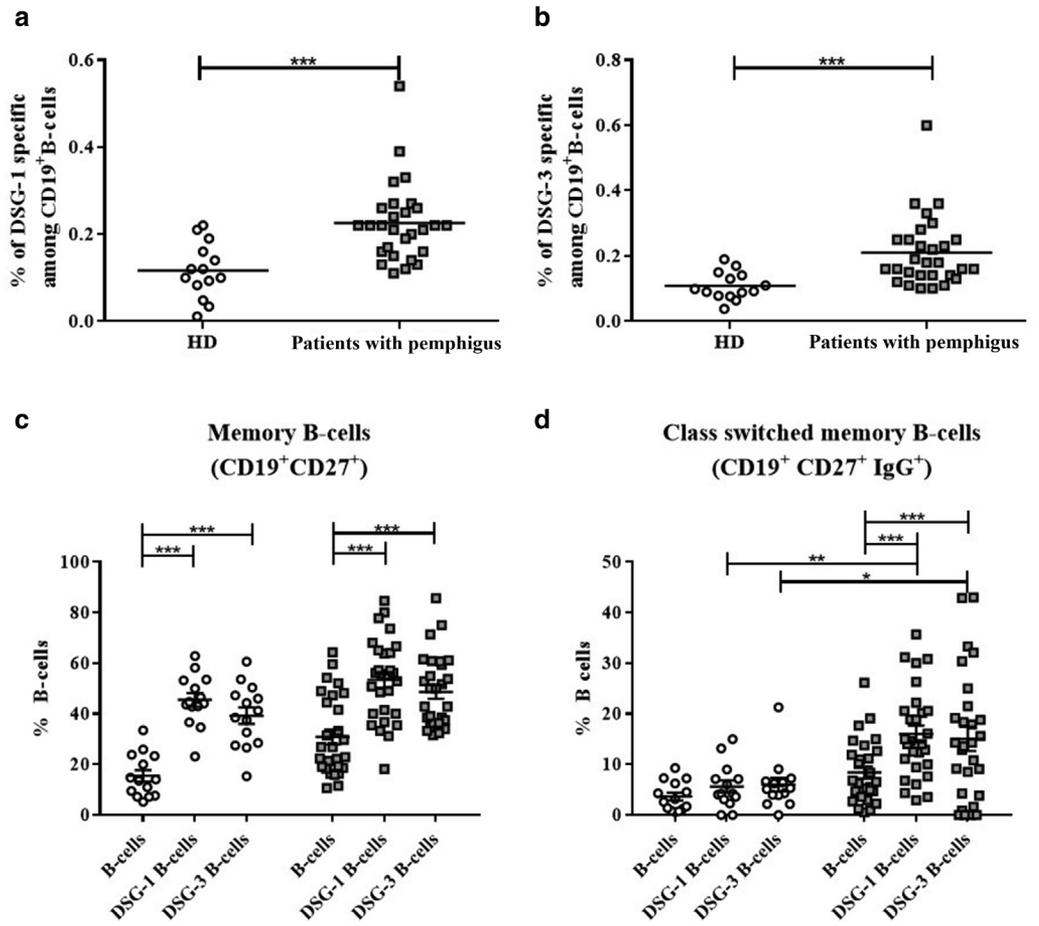
Supplementary material is linked to the online version of the paper at [www.jidonline.org](http://www.jidonline.org), and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.031>.

### REFERENCES

- 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. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:1153–60.
- 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.
- Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acín P, Bonilla-Hernán MG, Plasencia C, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:500.
- Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 2013;38:596–605.
- 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* 2018;70:1853–65.
- Choi JY, Ho JH, Pasoto SG, Bunin V, Kim ST, Carrasco S, et al. Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:988–99.
- 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.
- 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.
- 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.
- Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP, et al. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J Immunol* 2011;187:1091–5.
- Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M, Golinski ML, 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.
- 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.
- Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009;325:1006–10.
- Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hébert 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.
- Kim AR, Han D, Choi JY, Seok J, Kim S-E, Seo S-H, et al. Targeting inducible costimulator expressed on CXCR5+PD-1+ TH cells suppresses the

- progression of pemphigus vulgaris. *J Allergy Clin Immunol* 2020. S0091;6749:30493–0.
- Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 2011;34:961–72.
- 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.
- Pollmann R, Walter E, Schmidt T, Waschke J, Hertl M, Möbs C, et al. Identification of autoreactive B cell subpopulations in peripheral blood of autoimmune patients with pemphigus vulgaris. *Front Immunol* 2019;10:1375.
- Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet* 2019;394:882–94.
- 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.
- 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* 2013;8:e79858.
- 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.

**Supplementary Figure S1. Frequency and phenotype of peripheral blood DSG-1– and DSG-3–specific B cells evaluated by flow cytometry in patients with pemphigus at D0 and in HDs.** Frequency of (a) DSG-1– and (b) DSG-3–specific B cells among purified CD19<sup>+</sup> B cells in patients with pemphigus (gray squares) and in HDs (white circles). Phenotype of B-cell subpopulations: (c) Memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), and (d) class-switched memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>) among whole B cells and DSG-specific B cells. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001. D0, baseline; DSG, desmoglein; HD, healthy donor.



# Etude longitudinale des anticorps dans le pemphigus

Mots clefs : Auto-anticorps, IgG, Pemphigus, N-glycosylation, Répertoire, Corticostéroïdes, Pathogénicité, Desmogléine 3, Spectrométrie de masse

## RESUME

Le pemphigus est une maladie auto-immune associée à la présence d'auto-anticorps pathogènes reconnaissant des protéines d'adhésion de la peau appelées desmogléines 1 et 3. Le caractère pathogène des anticorps a été démontré par l'observation de pemphigus néonataux chez des nouveaux nés dont la mère était atteinte de pemphigus et par des expériences de transfert passif chez la souris. Néanmoins, lors d'une précédente étude clinique menée par le laboratoire, la présence d'auto-anticorps a été détectée chez certains patients en rémission complète. Pour comprendre ce phénomène, nous avons étudié longitudinalement la pathogénicité des immunoglobulines G et des immunoglobulines G anti-desmogléine 3, qui sont les auto-anticorps les plus fréquemment présents chez les patients après traitement. Divers phénomènes peuvent être à l'origine de modifications de la pathogénicité des anticorps tels que leur répertoire ou leur N-glycosylation. En effet, des études ont démontré que la pathogénicité des immunoglobulines G anti-desmogléine 3 était dépendante de l'épitope reconnu. De plus, dans un grand nombre de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus systémique érythémateux, des modifications de la N-glycosylation des immunoglobulines G et des auto-anticorps ont été identifiées, indiquant un lien entre la N-glycosylation et la pathogénicité des anticorps.

Pour tester notre hypothèse d'absence de pathogénicité des anticorps chez les patients en rémission, nous avons étudié la N-glycosylation des immunoglobulines G sériques. Tout d'abord, nous avons établi un lien entre la pathogénicité des anticorps et leur N-glycosylation *in vitro*. La digestion de l'anticorps monoclonal anti-desmogléine 3 AK23 ou des immunoglobulines G de patients par la neuraminidase afin de retirer les acides sialiques entraîne une diminution de leur activité pathogène. Puis, la pathogénicité et la N-glycosylation des immunoglobulines G circulantes ont été analysées longitudinalement chez des patients traités par corticostéroïdes qui maintenaient des titres élevés d'immunoglobuline G anti-desmogléine 3 tout au long de l'étude, même lorsqu'ils étaient en rémission clinique. Nous montrons que la pathogénicité des anticorps n'est pas toujours associée à l'état clinique des patients. En effet, une bonne corrélation entre le statut clinique et la pathogénicité des immunoglobulines G est observée aux temps précoces (phase active et 6 mois après traitement), tandis que la persistance d'une activité pathogène des IgG *in vitro* au cours de l'évolution même chez les patients en rémission clinique semble être prédictif de la rechute. Un profil particulier de N-glycosylation est observé chez les patients comparés aux donneurs sains. Néanmoins ce profil n'est pas lié au statut clinique des patients puisqu'il est conservé au cours du temps même quand les patients sont en rémission. En conclusion, les propriétés pathogènes des IgG ne semblent pas être dues à des variations des N-glycanes présents sur les IgG au cours de l'évolution du pemphigus.

Les auto-anticorps étant responsables des symptômes cliniques de la maladie, la deuxième partie de cette thèse est focalisée sur l'étude des immunoglobulines G anti-desmogléine 3. Leur pathogénicité a été testée longitudinalement, aux mêmes temps que pour les immunoglobulines G sériques, et une corrélation a été observée avec le statut clinique. De plus, la pathogénicité de ces auto-anticorps permet également d'anticiper l'apparition de symptômes cliniques.