Analyse des réponses lymphocytaires B et T spécifiques de l'antigène des patients atteints de pemphigus et traités par rituximab.

Vivien Hébert

▶ **To cite this version:**

Vivien Hébert. Analyse des réponses lymphocytaires B et T spécifiques de l'antigène des patients atteints de pemphigus et traités par rituximab.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR077 . tel-03824382

HAL Id: tel-03824382
https://theses.hal.science/tel-03824382

Submitted on 21 Oct 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

Analyse des réponses lymphocytaires B et T spécifiques de l'antigène des patients atteints de pemphigus et traités par rituximab.

Présentée et soutenue par
VIVIEN HEBERT

Thèse soutenue le 17/12/2021 devant le jury composé de		
M. FREDERIC CAUX	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE SORBONNE PARIS-NORD	Rapporteur du jury
MME STEPHANIE GRAFF-DUBOIS	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE SORBONNE PARIS-NORD	Rapporteur du jury
MME SOPHIE CANDON	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME GUISLAINE CARCELAIN	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Membre du jury
M. NICOLAS FAZILLEAU	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE TOULOUSE 3 PAUL SABATIER	Membre du jury
MME MANUELLE VIGUIER	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE	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

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

PANTHER INSERM U1234

Analyse des réponses lymphocytaires B et T spécifiques de l'antigène des patients atteints de pemphigus traités par rituximab

Le 17 décembre 2021
Par Vivien Hébert
CHU Charles Nicolle de Rouen, service de dermatologie,
Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes,
INSERM U1234 « PANTHER »

A Edgar, Joséphine et Laura

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse, le Pr Pascal Joly. Merci de la confiance que vous m'accordez depuis bientôt 10 ans. Merci pour votre incomparable expérience que vous me faites partager au quotidien, sur les plans clinique, scientifique mais aussi humain. Plus le temps passe et plus je suis impressioné par vos connaissances. L'adage socratique « je sais que je ne sais rien » prend tout son sens à vos côtés. Ce parcours universitaire c'est le vôtre, j'en ai tout à fait conscience et je vous en suis infiniment reconnaissant. Pour reprendre l'expression de Laura, vous avez fait de ce sacerdoce un « marathon sur un tapis rouge ». Il me reste quelques courtes années pour tenter de combler le fossé qui nous sépare, je compte bien les rentabiliser. Pour toujours, merci.

Je tiens à remercier le Pr Graff-Dubois d'avoir très gentiment accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie sincèrement de consacrer une partie de votre temps précieux à examiner mon manuscrit ainsi que pour l'intérêt que vous portez à ces travaux. Je vous adresse ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr Caux d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie également de vos enseignements et de votre gentillesse, lors de nos différentes réunions du groupe de recherche sur les maladies bulleuses. C'est toujours un plaisir de travailler à vos côtés. Je vous adresse ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier les Prs Guislaine Carcelain et Manuelle Viguier d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je vous en suis très reconnaissant. Merci.

Je souhaite également remercier le Pr Sophie Candon d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci de ta gentillesse au quotidien et tes enseignements lors de nos réunions communes, malheureusement encore trop rares. Merci.

J'adresse également mes remerciements au Dr Nicolas Fazilleau. Merci particulièrement pour ton accueil au sein de ton équipe. Merci pour ton dynasmisme incomparable ; ta volonté d'aller toujours de l'avant. Merci pour ton enthousiasme à toute épreuve ; devant toute manip foirée, il y a un résultat à tirer. Tu es quelqu'un de rigoureux et profondément bienveillant, toi et ton équipe avez rendu mon année de mobilité bien moins difficile que je ne l'avais imaginée ; je ne pouvais pas mieux tomber. Je prendrai plaisir à retravailler avec toi dans le futur. Très chaleureusement, merci.

Je souhaite remercier le Pr Olivier Boyer de m'avoir accueilli au sein de son labo. Merci, de m'avoir toujours soutenu depuis mon arrivée. C'est toujours un plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie également le Dr Fabienne Jouen pour son expertise et sa gentillesse au quotidien.

Je remercie le Dr Sébastien Calbo qui encadre l'équipe de dermatologie. Merci de m'avoir accueilli comme tu l'as fait. Merci de ta gentillesse et de ta grande expertise.

Je tiens à remercier particulièrement mes collègues du laboratoire de Rouen, Maud et Marie-Laure. Cette thèse, c'est aussi la vôtre. Merci de votre dynamisme, de votre expertise et de votre patience à former un médecin manchot. Sans vous, je n'y serais jamais arrivé. Pour cela, vous pourrez compter sur ma reconnaissance éternelle. Je suis ravi de poursuivre cette activité à vos côtés. Je n'ai aucun doute qu'on mènera à bien de beaux projets par la suite. De tout cœur, merci.

Un immence merci à mes co-thésards de Toulouse Cyrielle, Fanny et Juju. Vous avez été ma cure de jouvence pendant une année. Grâce à vous, je me suis réconcilé avec la génération 2.0. Merci de m'avoir aidé dans ce projet et surtout d'avoir rendu cette année, difficile sur le plan personnel, bien meilleure. Je ne me fais pas soucis pour votre réussite future, vous êtes aussi brillants qu'un marquage RORγT. Nul doute qu'on continuera à entretenir nos relations. A très vite. Merci merci merci.

Merci Manu. Je ne sais pas trop pourquoi mais merci.

Merci à toutes les personnes travaillant au labo qui m'ont aidé de près ou de loin ; je ne l'oublie pas. Merci Gaëtan, Céline, Laurent, Mélanie et surtout Marie.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues dermatologues qui m'ont suppléé lors de mes absences du service. Un grand merci particulièrement à Priscille et Anne-Bénédicte pour votre flexibilité quant à mon emploi du temps partagé entre le service et le labo.

Merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu dans mes moments, pas si rares, de ras-le-bol. Ils se reconnaitront.

Merci à mes amis et à ma famille. Ils devraient normalement se reconnaître.

Pour tout le reste, ô combien plus important, merci Edgar, Joséphine et surtout Laura.

RESUME

Le pemphigus est une maladie auto-immune spécifique de la peau et des muqueuses médiée par des auto-anticorps (Ac) spécifiques des desmogléines (DSG) 1 ou 3. Ces Ac pathogènes provoquent la perte d'adhésion cellulaire entre les kératinocytes, aboutissant à des lésions érosives cutanées et muqueuses particulièrement invalidantes. Le pemphigus se développe dans un contexte bien particulier mêlant prédisposition génétique et facteurs environnementaux. Le traitement de première intention des formes modérée à sévère repose sur l'utilisation du rituximab (RTX), un Ac monoclonal chimérique anti-CD20 permettant ainsi l'élimination des lymphocytes B, et d'une corticothérapie orale de courte durée. Malgré l'efficacité redoutable de cette association, un taux de rechutes important persiste, principalement la 1ère année.

D'abord, nous avons déterminé des facteurs pronostiques de rechute chez les patients traités par rituximab. Ainsi, la présence d'au moins un des critères suivants : PDAI ≥ 45 au diagnostic et/ou la présence d'Ac anti-DSG1 ≥ 20UI/mL et/ou anti-DSG3 ≥ 130UI/mL entre le 3ème et le 6ème mois permettait de prédire une rechute à court terme avec une VPP de 50% et une VPN de 94%. Ainsi, dans l'hypothèse où une perfusion additionnelle de RTX permettrait d'éviter la rechute, le traitement des patients présentant au moins l'un de ces critères permettrait potentiellement d'éviter 1 rechute sur 2. Au contraire, le risque de rechute encouru de ne pas traiter systématiquement un patient qui ne présente aucun de ces critères serait faible, de l'ordre de 5%.

Dans un deuxième temps, dans une analyse transcriptomique longitudinale sur 33 gènes d'intérêt, nous avons montré que les LB spécifiques de la DSG présentaient initialement un profil pro-inflammatoire par rapport aux LB non auto-réactifs, avec une augmentation de la fréquence d'expression de trois gènes codant pour les cytokines *IL-1β*, *IL-12p35* et *IL-23p19* ainsi que pour le gène de l'*IRF5*. Étonnamment, le rituximab n'induisait que peu de changement d'expression génique au sein des LB spécifiques des DSG, à l'exception de l'*IL-1β* et du *CD27* tous deux « *down-régulés* ». La diminution d'expression transciptomique du marqueur mémoire CD27 observée au sein des LB autoréactifs, était confirmée en cytométrie, en corrélation avec l'amélioration clinique.

Ensuite, nous avons étudié la cytokine BAFF, facteur d'activation des cellules B et son récepteur BAFF-R dans la physiopathologie du pemphigus, à partir de prélèvements sanguins et sérologiques longitudinaux de patients traités par RTX ou par une corticothérapie standard (CS) à fortes doses. Nous avons montré que les taux sériques basaux de BAFF étaient plus élevés chez les patients atteints de pemphigus que chez les donneurs sains et plus particulièrement chez les patients ayant connu une rechute précoce par rapport aux autres. Le rituximab entraînait une augmentation des taux de BAFF associée à une diminution d'expression transcriptomique et cytométrique de BAFF-R à la fois sur les LB non-autoréactifs et autoréactifs. La CS permettait une diminution transitoire des taux sériques de BAFF suivie d'une ré-ascension lors de la décroissance des doses sous un seuil de 20mg/j, sans modification de l'expression de BAFF-R dans les cellules B autoréactives et non autoréactives. Ainsi, l'activation des cellules B autoréactives au début du pemphigus pourrait être liée à la présence de taux sériques élevés de BAFF et la diminution de l'expression du BAFF-R retarderait le retour de cellules B mémoires. Inversement, la déplétion incomplète des cellules B et l'expression persistante de BAFF-R associées à des taux sériques élevés de BAFF pourraient expliquer le nombre élevé de rechutes chez les patients traités par corticothérapie seule.

Dans un autre travail, nous avons étudié la distribution et l'évolution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 chez les patients atteints de PV, et corrélé leur distribution et leur pathogénicité in vitro avec l'évolution clinique des patients, avant et après un traitement par corticostéroïdes seuls ou associés au rituximab. La distribution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 était étudiée avec un test ALBIA (Addressable Laser Bead ImmunoAssay) et la pathogénicité in vitro par un test de dissociation et par un marquage de la DSG3 en immunofluorescence. Nos résultats ont confirmé la présence majoritaire d'IgG4 anti-DSG3 chez les patients, avec une association à une autre sous-classe dans plus d'un quart des cas. Seul le RTX permettait de réduire la diversité des sous-classes après traitement. La présence de ≥2 sous-classes d'IgG anti-DSG3 au diagnostic était liée à un risque accru de rechutes. Nos tests de pathogénicité ont souligné l'importance de la concentration en IgG4 anti-DSG3, principalement lorsqu'il s'agit du seul isotype retrouvé. Au contraire, dans le cas de patients présentant à la fois des IgG3 et des IgG4 au diagnostic et uniquement des IgG4 en rémission, les IgG3 purifiées ont été capables d'induire une acantholyse alors que les résidus purifiés d'IgG3 ne l'étaient pas. Nos résultats démontrent que d'autres IgG anti-DSG3 sont parfois nécessaires, malgré la présence d'IgG4, pour induire la pathogénicité, principalement lorsque les IgG4 sont présentes en faible quantité.

Enfin, nous avons étudié l'impact du RTX sur la fréquence, la polarisation et l'activation des LT folliculaires *helper* (Tfh) et régulateurs (Tfr) spécifiques de la DSG3 en utilisant un tétramère HLADRB1-0402 chargé du peptide immunodominant de la DSG3. Au diagnostic, nous avons montré que les phénotypes des Tfh autoréactifs et non autoréactifs des patients étaient différents avec une prédominance des phénotypes Tfh1* et Tfh17 dans les LT autoréactifs et, au contraire, un phénotype Tfh2 sous-représenté. L'utilisation du RTX n'a eu aucun effet sur la polarisation des Tfh au cours du suivi, malgré l'obtention d'une rémission clinique chez tous les patients. Nous avons ensuite montré l'émergence progressive d'une population Tfr spécifique de l'Ag après l'utilisation de RTX. De plus, ces Tfr émergents spécifiques de l'Ag surexprimaient significativement les marqueurs d'activation de surface PD1, ICOS et CD25 par rapport aux Tfh autoréactifs mais aussi par rapport aux Tfr non spécifiques de l'antigène. Ainsi, nous avons montré que le rituximab permettait l'apparition d'une large population de Tfr hyper-activés spécifiques de l'Ag qui pourrait expliquer son efficacité à long terme.

ABSTRACT

Pemphigus is a specific autoimmune disease of the skin and mucous membranes mediated by autoantibodies (Abs) specific for desmogleins (DSG) 1 or 3. These pathogenic Abs cause loss of cell adhesion between keratinocytes, resulting in particularly disabling erosive skin and mucous membrane lesions. Pemphigus develops in a very specific context combining genetic predisposition and environmental factors. The first-line treatment of moderate to severe forms of pemphigus is based on the use of rituximab (RTX), a chimeric anti-CD20 monoclonal Ab that eliminates lymphocytes, and short-term oral corticosteroids therapy. Despite the exceptional efficacy of this combination, a high relapse rate, mainly in the first year, was observed.

First, we determined prognostic factors of short-term relapse in patients treated with rituximab. Thus, the presence of at least one of the following criteria: PDAI ≥ 45 at diagnosis and/or the presence of anti-DSG1 Ab ≥ 20IU/mL and/or anti-DSG3 Ab ≥ 130IU/mL between the months 3 and 6 predicted short-term relapse with a PPV of 50% and an NPV of 94%. Thus, assuming that additional RTX infusion would prevent relapse, treatment of patients with at least one of these criteria would potentially prevent one in two relapses. On the contrary, the risk of relapse occurrence by not systematically treating a patient who does not present any of these criteria would be low, around 5%.

In a second step, in a longitudinal transcriptomic analysis of 33 genes of interest, we showed that DSG-specific B cells initially exhibited a proinflammatory profile compared with non-autoreactive B cells, with increased frequency of expression of three genes encoding for the cytokines IL-1β, IL-12p35, and IL-23p19 as well as the IRF5 gene. Surprisingly, rituximab induced little change in gene expression within DSG-specific LBs, with the exception of IL-1β and CD27 both "down-regulated." The decrease in transciptomic expression of the memory marker CD27 observed in autoreactive B cells was confirmed by cytometry, correlating with clinical improvement.

Next, we studied the B-cell activating factor BAFF cytokine and its receptor BAFF-R in the pathophysiology of pemphigus from longitudinal blood and serological samples of patients treated with RTX or high-dose of standard corticosteroids (SC). We showed that basal serum BAFF levels were higher in pemphigus patients than in healthy donors and especially in patients with early relapse compared to those without. Rituximab resulted in increased BAFF

levels associated with decreased transcriptomic and cytometric expression of BAFF-R on both non-autoreactive and autoreactive B cells. CS allowed for a transient decrease in serum BAFF levels followed by a re-ascension upon dose decrease below a threshold of 20mg/d, with no change in BAFF-R expression in autoreactive and non-autoreactive B cells. Thus, activation of autoreactive B cells at the onset of pemphigus could be related to the presence of high serum BAFF levels and the decrease in BAFF-R expression after rituximab could delay the return of memory B cells. Conversely, incomplete B-cell depletion and persistent BAFF-R expression associated with high serum BAFF levels could explain the high number of relapses in patients treated with corticosteroids alone.

In another work, we studied the distribution and evolution of anti-DSG3 IgG subclasses in patients with PV, and correlated their distribution and in vitro pathogenicity with the clinical course of the patients, before and after treatment with CS or combined with rituximab. The distribution of anti-DSG3 IgG subclasses was studied with an Addressable Laser Bead ImmunoAssay (ALBIA) and the in vitro pathogenicity by a dissociation assay and by immunofluorescence staining of DSG3. Our results confirmed the majority presence of anti-DSG3 IgG4 in patients, with an association with other subclasses in more than a quarter of the cases. Only RTX reduced the subclasses diversity after treatment. The presence of $\geq$2 anti-DSG3 IgG subclasses at diagnosis was associated with an increased risk of relapse. Our pathogenicity tests highlighted the importance of anti-DSG3 IgG4 concentration, mainly when it was the only isotype found. On the contrary, in patients with both IgG3 and IgG4 at diagnosis and only IgG4 in remission, purified IgG3 was able to induce acantholysis while purified IgG3 residues were not. Our results demonstrate that other IgGs are sometimes required, despite the presence of IgG4, to induce pathogenicity, mainly when IgG4 is present in low levels.

Finally, we studied the impact of RTX on the frequency, polarization and activation of DSG3-specific follicular helper (Tfh) and regulatory (Tfr) T cells using a HLADRB1-0402 tetramer loaded with the DSG3 immunodominant peptide. At diagnosis, we showed that the phenotypes of the patients' autoreactive and non-autoreactive Tfh cells were different with a predominance of Tfh1* and Tfh17 phenotypes in autoreactive T cells and, on the contrary, an under-represented Tfh2 phenotype. RTX had no effect on Tfh polarization during follow-up, despite the achievement of clinical remission in all patients. We then demonstrated the progressive emergence of an Ag-specific Tfr population after RTX. Moreover, these emerging Ag-specific Tfr cells significantly over-expressed the surface activation markers PD1, ICOS and CD25 compared to autoreactive Tfh cells but also compared to non-antigen-specific Tfr

cells. Thus, we showed that rituximab allowed the emergence of a large population of hyper-activated Ag-specific Tfr cells that could explain its long-term efficacy.

ABRÉVIATIONS

A

Ac : Anticorps

Ach : Acétylcholine

Acm : Anticorps monoclonaux
ADCC : *Antibody-dependent cell cytotoxicity*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AID : *Activation-induced deaminase*
APRIL : *A proliferation-inducing ligand*
ARN : Acide ribonucléique
ASC : *Antibody secreting cell*

B

BAFF : *B-cell activating factor*
BAFF-R *: B-cell activating factor receptor*
Bcl-6 : *B-cell lymphoma 6 protein*
BCMA : *B cell maturation antigen*
BCR : *B cell receptor*
Blimp-1 : *B Lymphocyte-induced maturation protein 1*
Breg : Lymphocyte B régulateur
BTK : Tyrosine kinase de Bruton

C

Ca^{2+} : Calcium
CAAR-T : *Chimeric autoantibody receptor T cell*
CAM : Complexe d'attaque membranaire
CAR-T : *Chimeric antigen receptor T cell*
CCR : *C-C chemokine receptor*
CD : Cluster de différenciation
CDC : C*omplement-dependent cytotoxicity*
CDR : *Complementary determining region*
CD40L : *CD40 ligand*
CG : Centre germinatif
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CS : Corticothérapie standard
cTfh : *Circulating follicular helper cells*
CTLA-4 : C*ytotoxic T lymphocyte antigen-4*
CXCR : *C-X-C chemokine receptor*

D

DAMP : *Damage associated molecular pattern*
DBAI : Dermatose bulleuse auto-immune
Dp : Desmoplakine
Dsc : Desmocolline
DSG : Desmogléine

E

E-cadhérine : *Epithelial-cadherin*
EBI3 : *Epstein-Barr virus-induced gene 3*
EBV : Virus Eptsein-Barr
EC : Domaine extracellulaire

EGFR : *Epidermal growth factor receptor*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELISPOT *: Enzyme-linked immunospot*
Evpl : Envoplakine

F

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

G

GATA3 : *GATA binding protein 3*
GC : Glucocorticoïde

H

H : *Heavy chain*
HACA: *Human anti-chimeric antibodie)*
HLA : *Human leucocyte antigen*
HSV : Herpes virus simplex

I

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

J

J : Jonction
JDE : Jonction dermo-epidermique

K

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

L

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

M

mAchR : Récepteur muscarinique de l'acétylcholine
MAI : Maladie auto-immune
MEC : Matrice extracellulaire
MFI : *Mean fluorescence intensity*
MMR : *Mismatch repair*
MTX : Methotrexate

N

nAchR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NF-kB : *Nuclear factor-kappa B*
NK: *Natural killer*
nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

O

OX40L : *OX-40 Ligand*

P

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

Q

qRT-PCR : *Quantitative real-time polymerase chain reaction*

R

RAG : *Recombination-ativating genes*
RORγt : *Retinoic acid-related orphan receptor γ t*
RTX : Rituximab

S

SAP : *SLAM-associating protein*
scFc : *Single-chain variable fragment*
SIC : Systeme immunitaire cutané
SLAM : *Signaling lymphocytic activation molecule*
SNP : *Single-nucleotide polymorphism*
SSR : Séquence signal de recombinaison
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
ST18 : *Suppression of tumorigenicity 18*

T

TACI : *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilinligand interactor*
T-bet : *T-box transcription factor*
TCR : *T cell receptor*
Tfh : Lymphocyte T folliculaire helper
Tfr : Lymphocyte T régulateur folliculaire
TGFβ: *Transforming growth factor beta*
Th : *Lymphocyte T helper*
TLR : *Toll-like receptor*
TNF : *Tumor necrosis factor*
Treg : Lymphocyte T régulateur
Trp^2 : Résidus de tryptophane (position 2)
Tr1 : Lymphocyte T régulateur de type 1

U

UV : Ultra-Violet

V

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

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la peau 1
Figure 2 : Cellules épidermiques 2
Figure 3 : Complexe moléculaire desmosomal 5
Figure 4 : Expression des protéines desmosomales dans l'épiderme au cours du temps 7
Figure 5 : Structure moléculaire de l'hémidesmosome 8
Figure 6 : Barrière immunologique de la peau 10
Figure 7 : 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. 14
Figure 8 : Aspects clinique et histologique de pemphigoïde bulleuse (PB) 20
Figure 9 : Diagnostic du pemphigus 21
Figure 10 : Aspects cliniques du pemphigus vulgaire 23
Figure 11 : Immunofluorescence directe d'une lésion de pemphigus montrant un marquage IgG « en résille » 24
Figure 12 : Aspects cliniques de pemphigus superficiel 25
Figure 13 : Aspect clinique de pemphigus paranéoplasique montrant une stomatite érosive et ulcérative avec une atteinte caractéristique du vermillon 27
Figure 14 : Carte mondiale montrant l'association des gènes HLA de type II avec le PV dans différentes populations, regroupées selon les régions géographiques 33
Figure 15 : Présentation antigénique de la DSG 3 par le CMH de classe II 34
Figure 16 : Les régions endémiques du folgo selvagem 36
Figure 17: Effets pathogènes des auto-anticorps du pemphigus d'après les résultats cliniques et expérimentaux 38
Figure 18 : Mécanismes de l'acantholyse 41
Figure 19 : Modèles murins de pemphigus 42
Figure 20 : La théorie de la compensation de la desmogléine et les sites de formation des bulles dans le pemphigus 47
Figure 21 : Structures et fonctions des différents isotypes d'IgG 49
Figure 22 : Régions antigéniques ciblées par les anticorps anti-DSG 50
Figure 23 : Modélisation de l'interface d'adhésion des domaines extracellulaires des cadhérines et des épitopes ciblés par des anticorps pathogènes anti-DSG3 51

Figure 24 : Schéma hypothétique de l'évolution temporelle des événements pathogènes conduisant à l'acantholyse dans le pemphigus 54
Figure 25 : Schéma simplifié des mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie du pemphigus 56
Figure 26 : Différenciation des lymphocytes $CD4^+$ naïfs..... 59
Figure 27 : Différenciation des LT CD4 naïfs 65
Figure 28 : Circulation et localisation des cellules Tfh..... 65
Figure 29 : Génération des cellules Tfh 66
Figure 30 : Localisation et mécanismes régissant l'action des lymphocytes T résidents mémoires dans les lésions cutanées de pemphigus 68
Figure 31 : Molécules de base exprimées par les cellules Tfh et Tfr..... 72
Figure 32 : Structure et mécanismes d'action du rituximab..... 84
Figure 33 : Mode d'action du RTX dans le pemphigus..... 86
Figure 34 : Mécanismes d'action des thérapies émergentes pour le traitement du pemphigus 91
Figure 35 : Structure de l'anti-DSG3 CAAR T..... 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et antigéniques des principales dermatoses bulleuses auto-immunes 20
Tableau 2 : Incidence du pemphigus selon les pays 30
Tableau 3 : Pathologies associées aux PV et PF 31

SOMMAIRE

Introduction *1*

I. La Peau **1**

1. Les bases dermatologiques pour comprendre 1

A. L'Epiderme 1

a. Les cellules épidermiques 2

b. La stratification épidermique 3

c. La cohésion épidermique 3

- Les Desmosomes 3
- Les cadhérines desmosomales 6
- Les protéines Armadillo 6
- Les desmoplakines 6
- Organisation et évolution des protéines desmosomales 7

B. La jonction dermo-épidermique 8

2. La réponse effectrice dans la peau 9

A. L'immunité cutanée innée 10

B. L'immunité cutanée adaptative 12

3. La tolérance immunologique 13

A. La tolérance centrale dans le thymus 14

a. La sélection négative 15

b. La sélection des lymphocytes T régulateurs 15

B. La tolérance centrale dans la moelle osseuse 15

C. La tolérance périphérique 16

a. La tolérance périphérique des lymphocytes T 16

- L'anergie 16
- La suppression active 17

b. La tolérance périphérique des lymphocytes B 18

II. Le Pemphigus **19**

1. Généralités 19

A. Différences entre pemphigus et pemphigoïdes 19

B. Diagnostic 21

2. Les différentes formes de pemphigus 22

A. Le pemphigus vulgaire 22

B. Le pemphigus foliacé ou superficiel 24

C. Le pemphigus paranéoplasique 26

D. Les autres pemphigus 27

a. Le pemphigus herpétiforme 27

b. Le pemphigus à IgA 28

c. Le pemphigus médicamenteux 28

3. Epidémiologie 28

4. Susceptibilités au pemphigus 30
A. Pathologies associées aux pemphigus 31
B. Génétique du pemphigus 31
a. Susceptibilité HLA 32
b. Susceptibilités non HLA 34
C. Les facteurs environnementaux 35
5. Physiopathologie du pemphigus 37
A. Généralités 37
B. L'acantholyse 40
C. Modèles expérimentaux de pemphigus 41
a. Le test d'acantholyse in vitro 41
b. Les modèles murins 42
• Transfert passif 43
• Modèles de maladie active 43
• Modèles humanisés 44
D. Rôle des auto-anticorps 45
a. Les anticorps anti-desmogléine 45
b. La théorie de la compensation 46
c. Détail des anticorps anti-desmogléine 47
• Les isotypes d'immunoglobulines 48
• La spécificité antigénique 49
• Les anticorps non anti-desmogléine 52
6. La réponse immunitaire au cours du pemphigus 56
A. Rôle de l'immunité innée 57
a. Les kératinocytes 57
b. Les cellules présentatrices d'antigène 57
B. Rôle de l'immunité adaptative 58
a. Les lymphocytes T dans le pemphigus 58
• Polarisations Th1 et Th2 60
• Les LT régulateurs 61
• Les Th 17 62
• Les Tfh 63
• Les Tfr 71
b. Les lymphocytes B dans le pemphigus 72
• L'homéostasie B 74
• Le répertoire antigénique et isotypique 75
• Le répertoire B anti-DSG 77
• Les fonctions effectrices des LB 79
• Les lymphocytes B régulateurs 80
7. Les Traitements 81
A. Les glucocorticoïdes (GC) 82
B. Le rituximab (RTX) 83
C. Les autres traitements utilisés : 90

D. Les traitements émergents : 90
a. Les traitements ciblant les LB autres que le RTX 91
b. Récepteur chimérique d'auto-anticorps (CAR)-cellules T 93
c. Cibler le récepteur Fc néonatal dans le pemphigus 96
d. Cibler les cellules T et le « crosstalk » entre les cellules T et B dans le pemphigus 97
e. L'hypothèse d'un traitement local 98

Objectifs 101

Résultats 103

I. Article 1 : *Pronostic factors of relapse in patients treated by Rituximab in first line treatment of pemphigus* 103

II. Article 2 : *Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor axis in patients with pemphigus treated with rituximab versus standard corticosteroid regimen* 111

III. Article 3 : *Modifications of the transcriptomic profile of autoreactive B cells from pemphigus patients after treatment with rituximab or a standard corticosteroid regimen* 119

IV. Article 4 : *The diversity of anti-DSG3 IgG subclasses in pemphigus patients' serum has a major impact on pemphigus activity and is predictive of relapses in rituximab-treated patients* 131

V. Article 5 : *Impact of rituximab on follicular helper and regulatory T cells in patients with pemphigus vulgaris* 151

Discussion 173

I. Détermination des facteurs de risque de rechute précoce après RTX 173

II. Analyse transcriptomique longitudinale des LB spécifiques de la DSG3 177

III. Impact de l'axe BAFF/BAFF-récepteur dans la physiopathologie du pemphigus 181

IV. Relation entre la diversité des sous-classes d'IgG anti-DSG3 et l'activité du pemphigus. 184

V. Impact du RTX sur les cellules T folliculaires auxiliaires et régulatrices chez les patients atteints de pemphigus vulgaire 186

Conclusion 189

Annexes 193

Références 217

INTRODUCTION

I. La Peau

1. Les bases dermatologiques pour comprendre

La peau est un organe dynamique en perpétuelle évolution, elle est constituée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1). Sa surface représente presque 2 m² et pèse de 4 à 5 kg, soit environ 6% du poids total du corps (Tobin 2006).

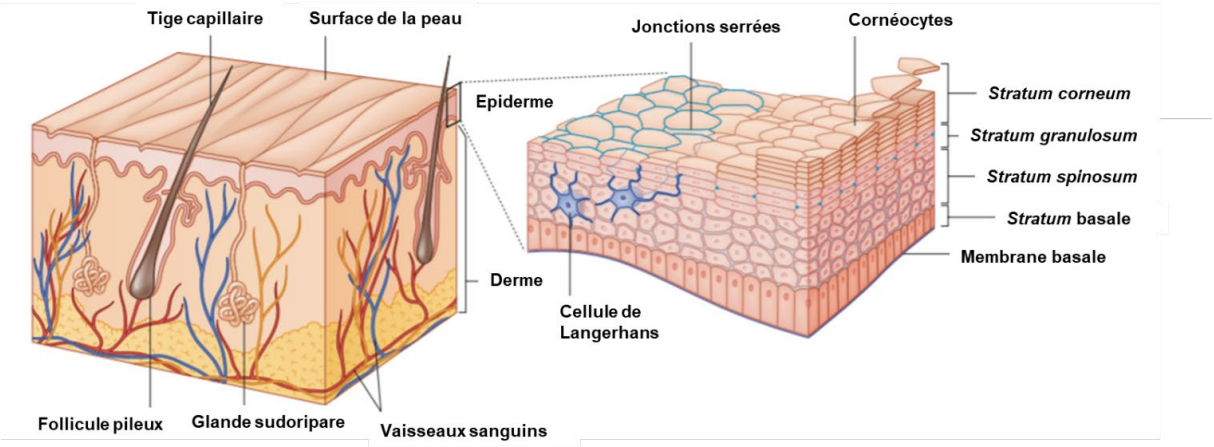


Figure 1 : Structure de la peau
Organisation des couches de la peau de la superficie vers la profondeur :
- *Epiderme : stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basal et membrane basale*
- *Derme contenant les follicules pileux, les glandes sudoripares et les vaisseaux sanguins*

(Someya and Amagai, 2019)

A. *L'Epiderme*

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

a. *Les cellules épidermiques*

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

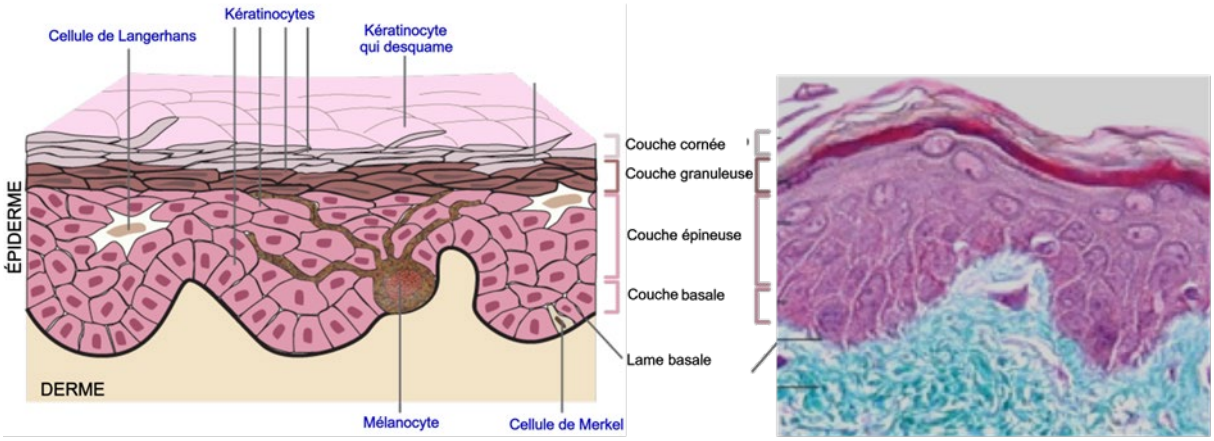


Figure 2 : Cellules épidermiques
Organisation cellulaire de l'épiderme en représentation schématique et coupe histologique transversale.

Les kératinocytes constituent 80 à 90% des cellules épidermiques. Leur principale caractéristique est de synthétiser les kératines qui vont former le cytosquelette intracellulaire en s'associant aux microfilaments d'actine et aux microtubules. Les kératinocytes forment, grâce à leurs cohésions intercellulaires, la barrière physique de l'épiderme.

Les mélanocytes sont exclusivement situés dans la couche basale de l'épiderme et synthétisent les mélanines (les phéomélanines et les eumélanines) dans des organites spécialisés appelés mélanosomes. Ces mélanosomes sont secondairement transférés aux kératinocytes grâce aux dendrites des mélanocytes et responsables de la coloration de la peau indispensable à la protection contre les UV (Cichorek et al., 2013 ; Wang et al., 2016).

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

Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs qui participent à la sensation tactile fine (Boulais and Misery 2007; Keymeulen et al. 2009; Moll et al. 2005).

b. *La stratification épidermique*

Les kératinocytes se répartissent dans quatre couches distinctes (Figure 2) : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Cette stratification correspond aux changements de forme et d'aspects des kératinocytes pendant leur différenciation au cours de leur migration de la couche basale germinative vers la couche superficielle de l'épiderme.

La couche basale est le compartiment germinatif riche en cellules souches capables de proliférer et de donner naissance aux kératinocytes. Les cellules basales sont attachées par des hémidesmosomes à la membrane basale acellulaire qui sépare l'épiderme du derme et forment la jonction dermo-épidermique. Une fois que les kératinocytes se sont détachés de la membrane basale, ils perdent leur potentiel prolifératif. Ces cellules présentent de nombreux desmosomes qui renforcent les contacts intercellulaires. Les kératinocytes de la couche cornée sont appelés cornéocytes. Ce sont des cellules mortes et anucléées mais fonctionnelles. C'est l'étape finale de transformation des kératinocytes. Ils sont réunis entre eux par des jonctions serrées *via* les cornéodesmosomes qui sont progressivement dégradés, c'est le processus de desquamation. L'épithélium se renouvelle donc continuellement. La migration d'un kératinocyte à travers l'épiderme se fait en 3 semaines (Blanpain and Fuchs 2009; Eckhart et al. 2013; Fuchs 2016).

c. *La cohésion épidermique*

L'architecture de l'épiderme repose sur la cohésion interkératinocytaire via des structures jonctionnelles constituées de complexes multiprotéiques visibles en microscopie électronique. Ces jonctions participent, à des degrés divers, à la fonction de barrière de la peau.

On distingue différents types de jonctions : les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les jonctions d'ancrage. Ces différents types de jonctions assurent une solidité mécanique par contact entre les cellules ou à la matrice extracellulaire mais permettent aussi la transmission de signaux de communication nécessaires dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarisation cellulaire.

- ***Les Desmosomes***

Les desmosomes forment la structure d'adhésion majeure des kératinocytes. Ils ancrent le réseau de filaments intermédiaires à la membrane plasmique. Ils sont présents dans toutes les couches épidermiques, notamment dans les couches épineuses et granuleuses et prennent le nom de cornéo-desmosomes dans la couche cornée.

Les desmosomes sont des structures moléculaires complexes organisées autour de cadhérines desmosomales : les desmogléines (DSG) et les desmocollines (Dsc) (Figure 3). Ces glycoprotéines transmembranaires possèdent des domaines extracellulaires situés dans la desmoglie. Ils permettent d'assurer l'adhésion entre cellules voisines en formant des interactions Ca^{2+} dépendantes homophiles et hétérophiles. La partie intracellulaire de ces protéines est associée aux plaques desmosomales où s'insèrent les filaments intermédiaires de kératines. Les protéines composant la plaque desmosomale comprennent la plakoglobine (Pg) et les plakophilines (Pkp). La liaison au cytosquelette est médiée par des protéines de la famille des plakines, les desmoplakines (Dp).

Le rôle crucial du desmosome dans le maintien de l'intégrité épidermique a été largement démontré. Par exemple, le pemphigus a comme caractéristique la production d'Ac pathogènes ciblant les DSG qui sont des protéines essentielles au desmosome (Amagai et al. 1991).

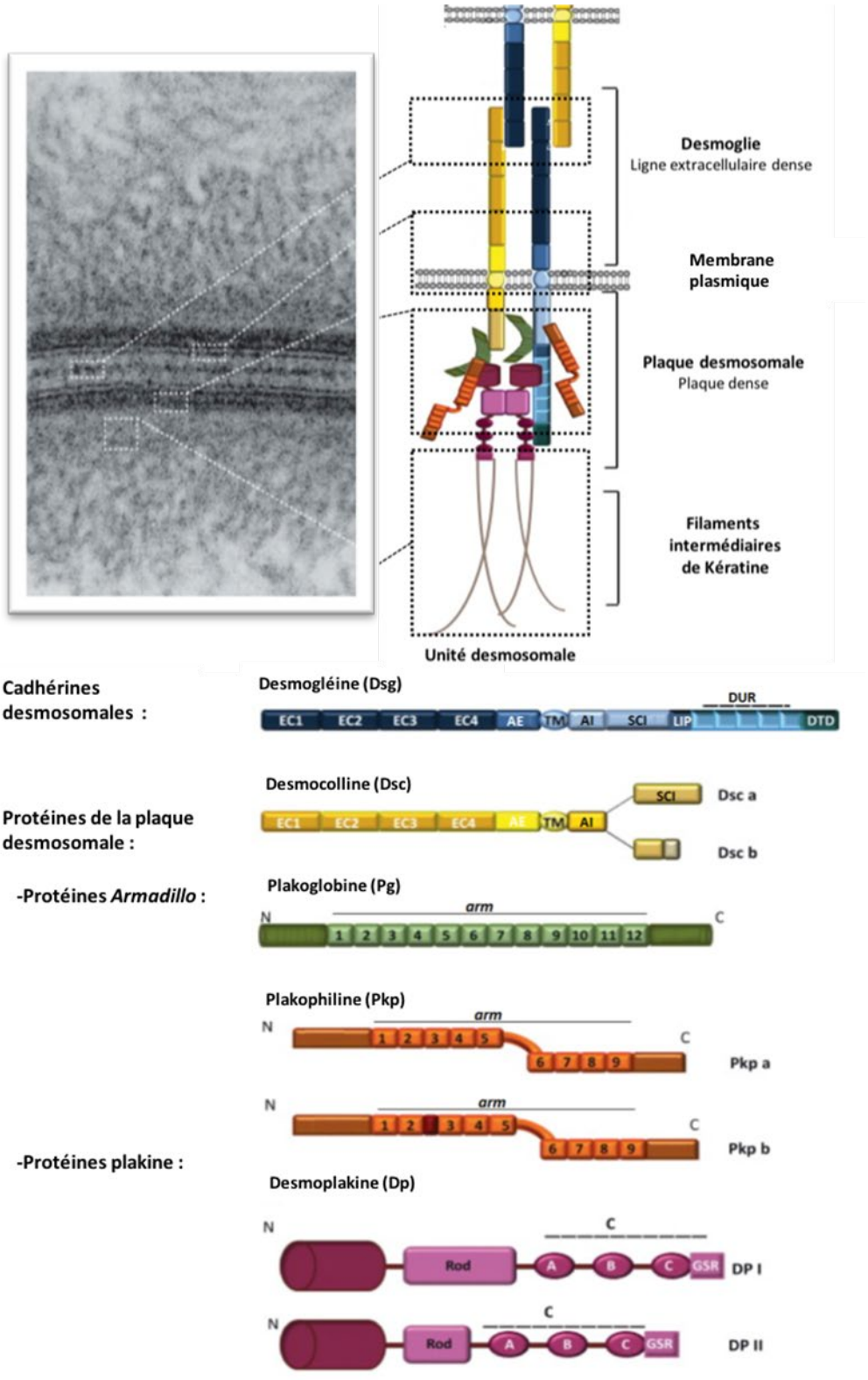


Figure 3 : Complexe moléculaire desmosomal

Micrographie électronique d'un desmosome associé à la représentation schématique des principaux constituants protéiques desmosomaux. Les desmogléines (Dsc) et les desmocollines (Dsc), membres de la famille des cadhérines, interagissent entre elles dans la desmoglie pour adhérer aux cellules voisines. Les queues cytoplasmiques des cadhérines s'associent aux protéines cytoplasmiques qui forment la plaque desmosomale. Elle est composée des protéines Armadillo : la Plakoglobine (Pg) et la Plakophiline (Pkp) et d'une plakine, la Desmoplakine (Dp). Ces protéines ancrent le desmosome aux filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette (Johnson et al. 2014).

- ***Les cadhérines desmosomales***

Les cadhérines desmosomales, regroupant les DSG et les Dsc, sont des glycoprotéines transmembranaires Ca^{2+}-dépendantes. Les domaines extracellulaires assurent l'adhésion, tandis que les queues cytoplasmiques s'associent aux protéines de la plaque desmosomale (Figure 3).

Il existe, chez l'homme, trois isoformes de Dsc et quatre isoformes de DSG (Green and Simpson 2007). Les DSG et les Dsc contiennent quatre domaines EC hautement conservés, un domaine d'ancrage extracellulaire (AE) plus variable, un domaine transmembranaire (TM) et un domaine d'ancrage intracellulaire (AI), suivi par des domaines cytoplasmiques supplémentaires spécifiques (Al-Jassar et al. 2013; Cirillo 2016; Delva et al. 2009; Nekrasova and Green 2013).

Ces cadhérines sont liées entre-elles dans l'espace interkératinocytaire. L'adhésion peut se produire par des interactions *cis* et/ou *trans* homophiles ou hétérophiles entre les domaines extracellulaires des DSG et des Dsc pour former un pont entre deux cellules au niveau du desmosome. Le mécanisme par lequel les cadhérines desmosomales interagissent n'est pas encore clair.

- ***Les protéines Armadillo***

Ces protéines sont les partenaires de liaison cytoplasmique des cadhérines. Dans le desmosome, elles participent à l'attachement des desmoplakines aux filaments intermédiaires de kératine et régulent le regroupement des composants desmosomaux. Les protéines présentes dans les desmosomes sont la Pg, les Pkp 1, 2 et 3 (Figure 3) (Hatzfeld et al. 2014).

- ***Les desmoplakines***

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

La Dp est la composante la plus abondante du desmosome et sert de lien principal entre les filaments intermédiaires et la membrane plasmique. Elles interagissent par leur domaine

plakine N-terminal avec les protéines *Armadillo* (la Pg et les Pkp) et avec les régions cytoplasmiques des cadhérines desmosomales. La queue C-terminale est impliquée dans la liaison avec les filaments intermédiaires (Getsios et al. 2004; Leung et al. 2002).

- ***Organisation et évolution des protéines desmosomales.***

La composition et la structure des desmosomes varient au cours du processus de différenciation de l'épiderme (Figure 4).

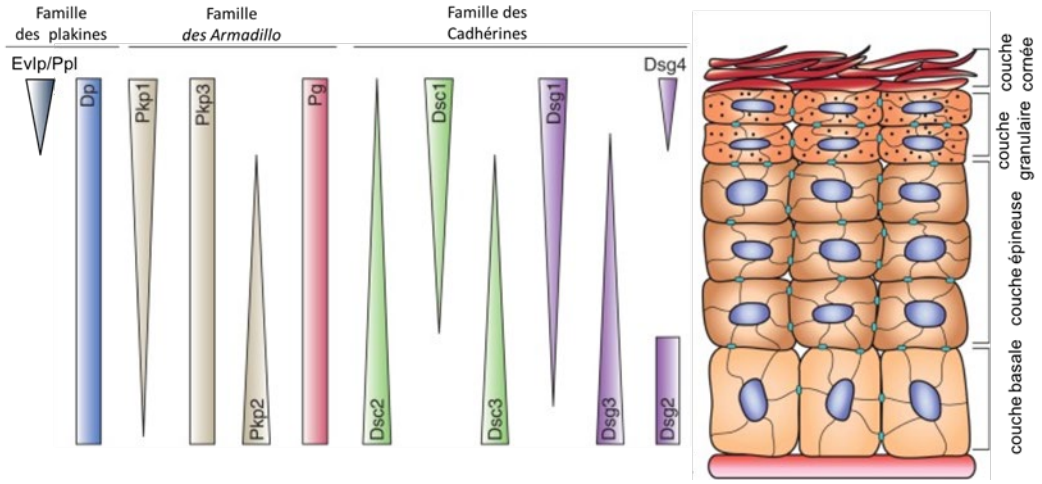


Figure 4 : Expression des protéines desmosomales dans l'épiderme au cours du temps
Représentation schématique des niveaux d'expressions protéiques de chaque molécule du desmosome dans les quatre couches principales de l'épiderme. Dsc : Desmocolline; DSG : DSG; Dp : Desmoplakine; Evpl : Envoplakine; Pg : Plakoglobine; Pkp : Plakophiline et Ppl : Periplakin (Johnson et al., 2014).

La différenciation épidermique induit des changements dans l'expression des cadhérines desmosomales et dans la répartition des Pkp entre le noyau et les jonctions cellulaires. Les constituants des desmosomes vont être exprimés de manière séquentielle. La Dsg2 est présente exclusivement dans la couche basale. Les Dsc2, Dsc3, et Dsg3 sont très fortement exprimées dans la couche basale et sont progressivement remplacées par les Dsc1, Dsg1 et Dsg4 lors du déplacement des kératinocytes vers les couches superficielles. De façon similaire, la Pkp2 est graduellement remplacée par la Pkp1. L'expression de la Pkp3 et de la Dp reste constante dans toutes les couches de l'épiderme. L'Evlp et la Ppl sont concentrées dans les couches supérieures de l'épiderme.

B. *La jonction dermo-épidermique*

La jonction dermo-épidermique (JDE) est caractérisée par la membrane basale, zone de transition entre l'épiderme et le derme dont l'intégrité est essentielle à la structure de la peau. Elle est composée d'un complexe moléculaire permettant un système d'accroche entre les cellules et la matrice extracellulaire. En histologie, elle apparaît comme une ligne méandreuse qui permet d'augmenter considérablement la surface d'échange dermo-épidermique mais aussi de s'adapter à ses étirements.

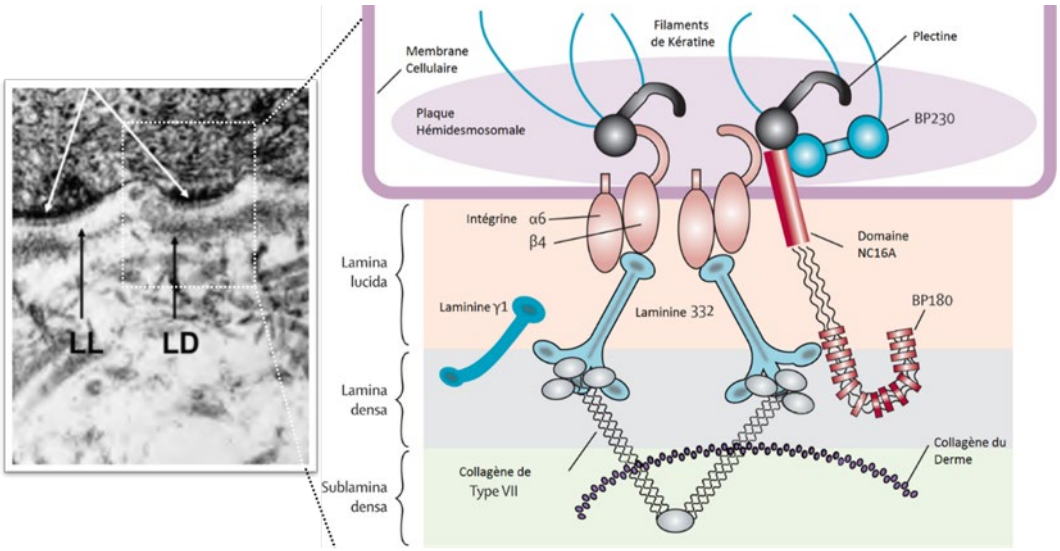


Figure 5 : Structure moléculaire de l'hémidesmosome
Micrographie électronique d'un hémidesmosome associé à la représentation schématique de ses principaux constituants protéiques (Schmidt et al. 2019).

En microcopie électronique, on distingue 4 sous-régions majeures de la JDE : (i) les hémidesmosomes, (ii) la *lamina lucida*, (iii) la *lamina densa* et (iv) la *sub-lamina densa.* Les kératinocytes de la couche basale sont ancrés à la membrane basale par la structure jonctionnelle hémidesmosomale (Figure 5).

Les filaments de kératine des cellules basales s'associent aux protéines de la plaque cytoplasmique hémidesmosomale. Celle-ci est composée de protéines de la famille des plakines telles que la plectine mais aussi de la BP230, antigène de la PB également appelé BPAG1. Ces protéines interagissent avec l'intégrine α6β4 et la BP180, antigène de la PB aussi appelé BPAG2. Ces protéines transmembranaires se connectent *via* leurs domaines extracellulaires à la laminine 332 (ou laminine 5), principale composante des filaments d'ancrage. Ces filaments

d’ancrage traversent la *lamina lucida* pour se connecter aux fibrilles d’ancrage au sein de la *lamina densa*. La *sub-lamina densa* correspond à la partie la plus superficielle du derme dans laquelle sont situées des fibrilles d'ancrage de collagène de type VII (Borradori and Sonnenberg 1999; Tsuruta et al. 2011).

Dans les DBAI jonctionnelles (groupe des pemphigoïdes), plusieurs molécules de la JDE ont été identifiées comme cibles d’auto-Ac conduisant à la formation de bulles par décollement de l’épiderme en un seul bloc (Kridin 2018a). La PB est caractérisée par la présence d’auto-Ac dirigés contre la BP180 et la BP230 (Stanley et al. 1988). La BP180 est également l'antigène cible chez les patients atteints de pemphigoïde gestationnelle et chez des patients atteints de dermatose bulleuse à IgA linéaire. Dans la pemphigoïde des muqueuses, les auto-Ac peuvent se lier à différents auto-antigènes : principalement la BP180, la laminine-5 mais aussi l’intégrine α6β4 et le collagène de type VII. Ce dernier est également l'auto-antigène cible retrouvé dans l'épidermolyse bulleuse acquise.

2. La réponse effectrice dans la peau

La peau joue un rôle immunologique en tant que barrière protectrice passive, mais aussi via un réseau de cellules effectrices et de médiateurs moléculaires constituant un système appelé « le système immunitaire cutané » (SIC) (Abdallah et al. 2017). Ce système permet à la fois une tolérance des cellules du soi et organismes commensaux de l’épiderme, tout en étant actif contre les agents pathogènes. Le SIC fait partie d’un réseau dense et structuré de vaisseaux lymphatiques et sanguins (Chaplin 2010a). Deux systèmes de défense se dinguent : l'immunité innée et l’immunité adaptative (Figure 6).

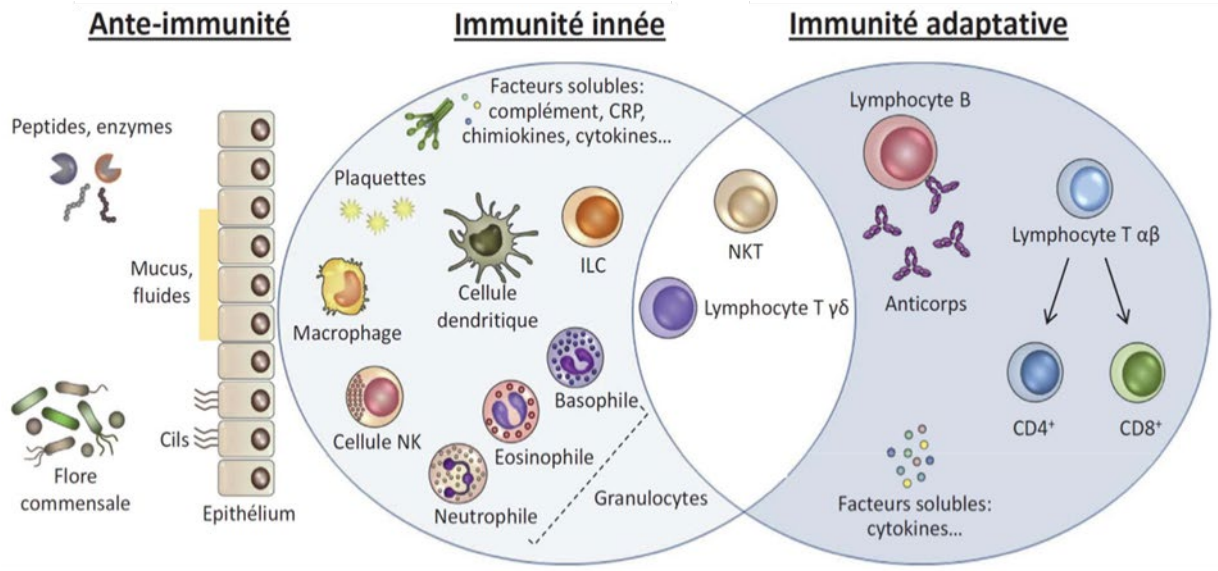


Figure 6 : Barrière immunologique de la peau
Représentation schématique du système immunitaire cutané. L'anté-immunité désigne des éléments qui entrent en jeu dans la défense de l'organisme avant la mise en place des mécanismes de défenses spécifiques de l'immunité comme la flore commensale, les peptides et les enzymes anti-microbiens, ... La réponse immunitaire repose sur un réseau de cellules effectrices (lymphocytes, monocytes, polynucléaires…) et de médiateurs moléculaires (chimiokines, cytokines, compléments, anticorps, ...). La première ligne de défense est assurée par le système immunitaire inné, barrière efficace contre une très grande variété de pathogènes. Cette première forme d'immunité est renforcée par l'immunité adaptative qui est spécifique des micro-organismes ou de molécules étrangères. CRP : C-reactive protein ; ILC : Cellule lymphoïde innée ; NK : Natural Killer.

A. *L'immunité cutanée innée*

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). L'immunité innée dispose de cellules (monocytes, polynucléaires) et de molécules (cytokines, le système du complément) capables d'apporter une réponse rapide aux agressions. Les cellules de l'immunité innée, comme les DC, les macrophages, les lymphocytes NK (*Natural Killer*), les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles portent des récepteurs appelés PRR (*Pathogen Recognition Receptor*). Les PRR peuvent reconnaître de nombreuses molécules exprimées par les agents pathogènes appelées PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) ou par des cellules endogènes endommagées appelées DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*). Les PAMPs sont majoritairement des structures conservées entre les pathogènes viraux, bactériens ou fongiques tels que le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, la flagelline ou les acides

nucléiques. Les PRR appartiennent à plusieurs familles telles que les récepteurs de la famille des lectines, les TLR (*Toll-like receptor)* ou les récepteurs de type NOD (NLR : *Nucleotid-binding Oligomerization Domain-like Receptors)* (Akira et al. 2006; Takeuchi and Akira 2010). Ce sont des protéines solubles, transmembranaires ou cytoplasmiques, leur stimulation entraîne l'activation des cellules de l'immunité innée qui sécrètent alors des médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires ou des chimiokines. Ces médiateurs vont à leur tour activer d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, aboutissant à l'initiation de la phase vasculaire de la réponse inflammatoire qui conduit à la migration cellulaire. Ces cellules sont capables de détruire directement les agents pathogènes par phagocytose. Lorsque ces mécanismes sont insuffisants pour éliminer ou résoudre l'invasion, le système immunitaire adaptatif entre en jeu. La coordination entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est assurée par les CPA. Elles assurent la capture des pathogènes, l'apprêtement de la molécule étrangère appelée « antigène » et sa présentation aux lymphocytes T (LT) *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi que la spécialisation de l'immunité adaptative.

Le système immunitaire cutané présente certaines spécificités comme les cellules de Langerhans, qui constituent un sous-ensemble unique de CPA professionnelles et qui résident exclusivement dans la peau, entre les kératinocytes. Les kératinocytes ont également un rôle immunologique important dans le SIC. Ils expriment différents PRR et des récepteurs à de nombreuses cytokines. Ils produisent également diverses cytokines, interleukines et chimiokines qui jouent un rôle prépondérant dans le trafic lymphocytaire (Olaru and Jensen 2010). Par ailleurs, les kératinocytes sécrètent des peptides anti-microbiens (PAM) qui contribuent directement à l'élimination des agents pathogènes (de Jongh et al. 2005). Dans le derme, le SIC est constitué des cellules lymphoïdes innées tels que les NK, des macrophages résidents et des DC dermiques. Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui sont essentielles pour l'élimination des déchets, tels que les débris cellulaires et les agents pathogènes. Ils permettent également la production de facteurs de croissance nécessaires à la réparation tissulaire (Krzyszczyk et al. 2018; Ono and Kabashima 2015). Les DC constituent une population hétérogène différenciés par des marqueurs de surface spécifiques et par leurs fonctions. Les DC dermiques aussi appelées DC conventionnelles ou myéloïdes sont caractérisées par l'expression de CD11c, du CMH de classe II et par l'absence des molécules CD14 et CD16 (Haniffa et al. 2015). Les DC dermiques et les cellules de Langerhans sont les

sentinelles de la peau capables de de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour y activer les LT naïfs et diriger la réponse immunitaire vers la tolérance ou l'immunité.

B. *L'immunité cutanée adaptative*

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 à « 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 2010b). Tandis que les LB maturent dans la moelle osseuse afin de devenir des cellules productrices d'Ac, les LT vont migrer dans le thymus afin d'y finirent leur développement. Après avoir maturé 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 adaptée. La rencontre antigénique associée à des molécules de co-stimulation induit une prolifération et une différenciation en lymphocytes effecteurs ou mémoires.

Il existe plusieurs sous-types de LT, dotés de modes d'actions différents pour lutter contre les pathogènes. Les LT $CD8^+$ aussi appelés LT cytotoxiques sont capables de détruire les cellules infectées par la libération de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes ou par l'expression de ligands pour des récepteurs de mort tel que FasL (CD95L) (Lieberman 2003). Les LT $CD4^+$ aussi appelés LT auxiliaires ou *helper* participent à la régulation de la réponse immunitaire adaptative par l'activation des cellules immunitaires. Ils agissent par des interactions cellulaires et/ou par la production de cytokines (O'Shea and Paul 2010).

Les LB vont quant à eux se différencier en LB mémoire et en plasmocyte ayant la capacité de produire des Ig dont la structure est proche de celle du BCR du LB dont ils sont issus (Herzog et al. 2009). Les récepteurs des lymphocytes sont issus de la recombinaison aléatoire de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) de plusieurs segments de gènes appelés V (Variabilité), D (Diversité), J (Jonction) codant pour les domaines variables des chaînes polypeptidiques des TCR et des BCR (Jung and Alt 2004). Ce système de recombinaison permet théoriquement la synthèse d'une infinité de récepteurs différents.

Le répertoire antigénique lymphocytaire peut donc s'adapter à tous types de structures antigéniques, y compris les antigènes du soi. Le système immunitaire est donc susceptible de générer des LT et des LB auto-réactifs, capables de déclencher une réponse auto-immune. Tout au long du développement des cellules de l'immunité adaptative, des mécanismes de sélection sont présents afin d'éviter le développement de telles maladies auto-immunes (Bonilla and Oettgen 2010).

3. 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 apparait 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 2010b).

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 7) (Mathis and Benoist 2004).

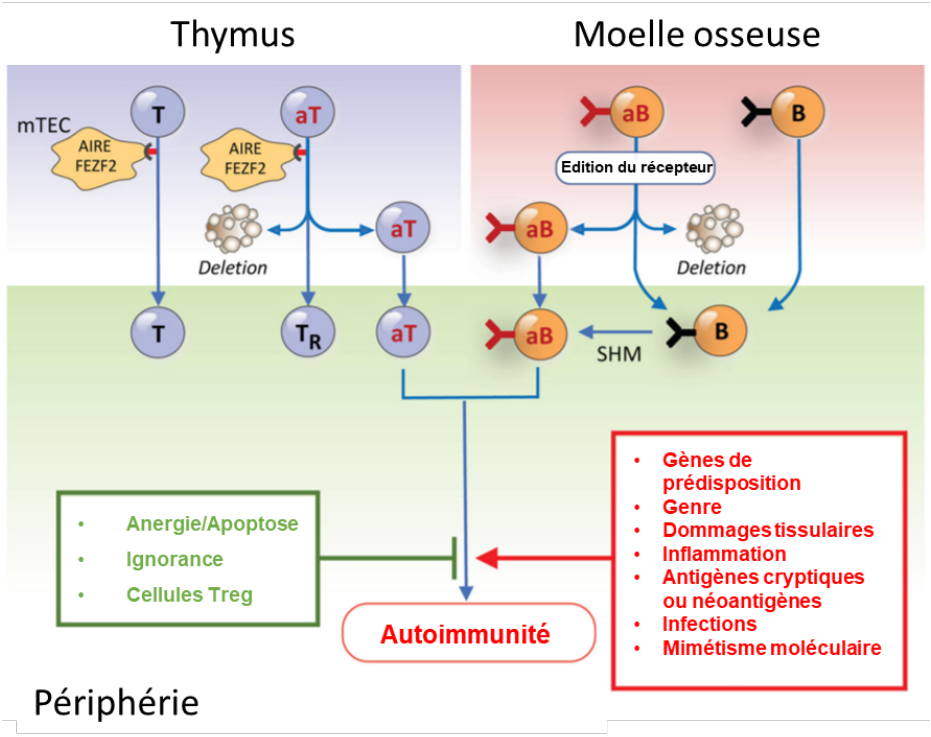


Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes d'échappement des lymphocytes T et des lymphocytes B auto-réactifs de la tolérance centrale et leur engagement dans la périphérie.
Dans le thymus, les lymphocytes T sont sélectionnés en fonction de leur reconnaissance antigénique. Le gène Autoimmune regulator (AIRE) 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 T auto-réactifs ; TR : lymphocytes T régulateurs ; SHM : processus d'hypermutation somatique
(Theofilopoulos et al., 2017).

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 (Treg) (Bluestone 2011).

a. *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 médier 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 LT régulateurs (Perniola 2018).

b. *La sélection des lymphocytes T régulateurs*

Le développement des Treg dans le thymus nécessite des interactions de haute affinité 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 Treg (Sakaguchi et al. 2010). Il a également été démontré que la spécificité des TCR pour des auto-Ag est cruciale pour la différentiation des thymocytes en Treg. En effet, la sélection des Treg 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 BCR de type IgM mais ne sont pas encore matures (Nemazee 2017a). 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 transitionnels 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).

Au total, 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).

C. *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 dites immuno-privilégiés 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 réfrénées par anergie ou délétion clonale (Bluestone 2011).

Les mécanismes de tolérance périphérique des LT sont les suivants :

- ***L'anergie***

L'anergie est le phénomène rendant des LT matures incapables de répondre à une stimulation suite à la rencontre avec un Ag en l'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 Différenciation* (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. 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 $CD4^+$ anergiques possédant un phénotype et un programme d'expression génique distincts peuvent se convertir en Treg. Ces Treg vont alors inhiber les LT $CD4^+$ afin maintenir l'homéostasie immunitaire. Ils agissent sur les LT auto-réactifs en inhibant 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 Treg représentent approximativement 10% des LT $CD4^+$ 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 Treg possèdent différents mécanismes leur permettant d'inhiber les cellules auto-réactives. 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 Treg (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 Treg vont ainsi acquérir les molécules B7 fonctionnelles présentes à la surface des DC. Ce phénomène va permettre aux Treg d'empêcher la fonction activatrice des DC et donc de limiter les réponses immunitaires (Gu *et al.*, 2012). Le troisième mécanisme des Treg est leur sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, le *transcription growth factor* TGF-β et l'IL-35. Enfin, Treg peuvent inhiber l'auto-réactivité en contraignant 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 Treg et les

molécules B7 présentes sur les DC. Cette enzyme IDO permet la production de métabolites pro-apoptotiques menant à la suppression des LT effecteurs (Mellor and Munn 2004; 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 2017a). 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 2017a).

II. Le Pemphigus

Le pemphigus appartient au groupe des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) parmi lesquelles on distingue les DBAI épidermiques (les pemphigus) des DBAI jonctionnelles ou sous-épidermiques (les pemphigoïdes). Celles-ci ont un point commun dans leur présentation clinique qui est l'apparition de bulles et/ou érosions pouvant toucher à la fois la peau et les muqueuses.

1. Généralités

A. *Différences entre pemphigus et pemphigoïdes*

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

Les DBAI intra-épidermiques ou groupe des pemphigus sont caractérisées par la production d'auto-Ac dirigés contre des protéines du desmosome, complexe moléculaire responsable de la cohésion épidermique. Ces auto-Ac entrainent une perte d'adhésion des kératinocytes, c'est l'acantholyse. Les principales formes cliniques de pemphigus sont le pemphigus vulgaire (PV), le pemphigus foliacé ou superficiel (PF) et le pemphigus paranéoplasique (PPN) (Tableau 1).

Par opposition, les DBAI sous épidermiques ou jonctionnelles (les pemphigoïdes), présentent divers auto-Ac dirigés contre des antigènes hémi-desmosomaux de la JDE responsables de la formation de bulles par décollement de l'épiderme du derme en un seul bloc, conférant à la bulle formée une solidité importante (Figure 8). La pemphigoïde bulleuse (PB) est l'entité la plus fréquente. Les autres de dermatoses auto-immunes jonctionnelles sont la pemphigoïde gestationnelle, la pemphigoïde des muqueuses, la dermatose bulleuse à IgA linéaire et l'épidermolyse bulleuse acquise (Kridin 2018a) (Tableau 1).

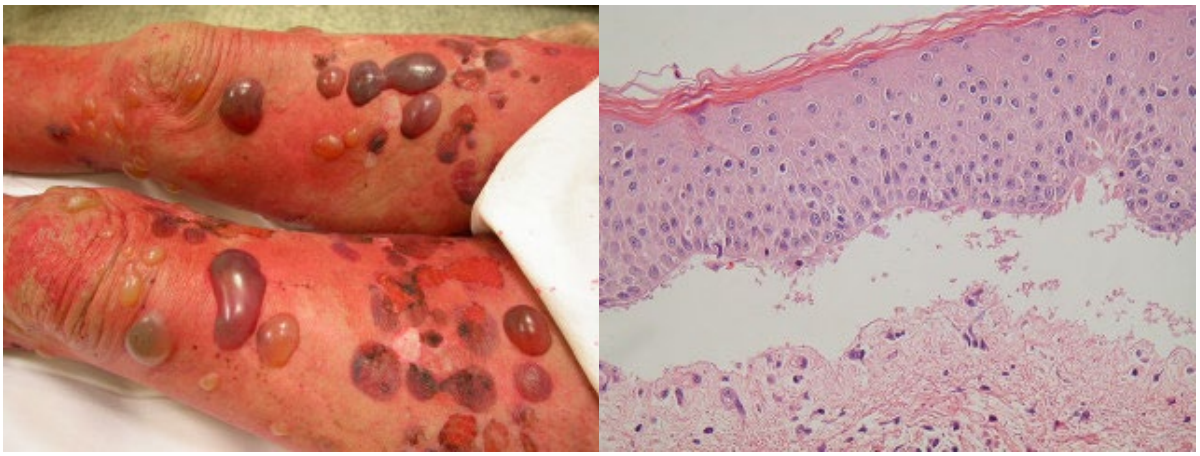


Figure 8 : Aspects clinique et histologique de pemphigoïde bulleuse (PB)
A gauche : Bulles tendues à toit solide de pemphigoïde bulleuse
A droite : Coupe histologique de pemphigoïde bulleuse montrant un clivage jonctionnel responsable d'une bulle sous-épidermique.

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

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

B. *Diagnostic*

Le diagnostic de pemphigus repose sur l'examen clinique de la peau et des muqueuses, et sur un examen histologique réalisé sur biopsie d'une lésion permettant de révéler le niveau de formation de la bulle épidermique ainsi que la composition d'un éventuel infiltrat inflammatoire (polynucléaires éosinophiles, polynucléaires neutrophiles…) (Mihai and Sitaru 2007; Otten et al. 2014). Cependant, la confirmation diagnostic passe par la détection d'auto-Ac dans la peau ou dans le sérum des malades pour confirmer la nature auto-immune de la maladie. Les différents examens immuno-pathologiques de routine utilisés pour le diagnostic sont représentés dans la Figure 9.

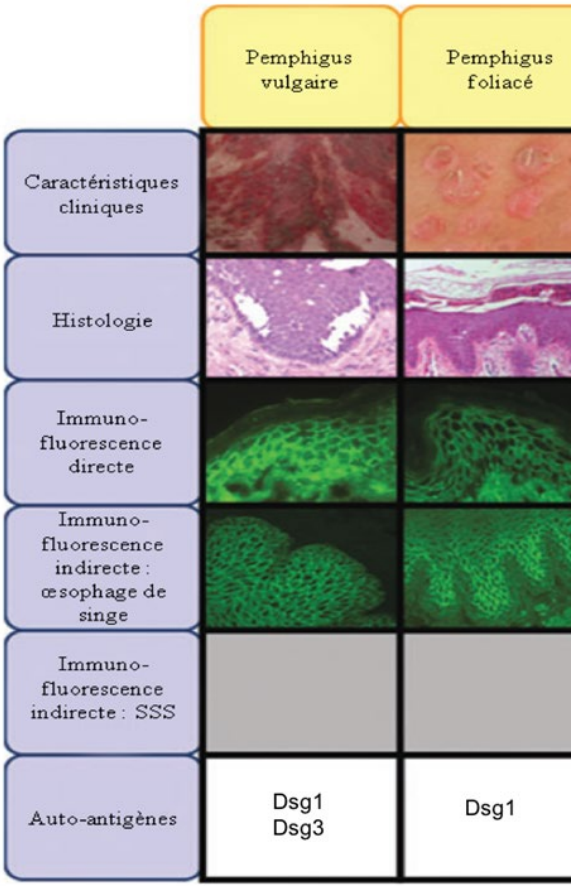


Figure 9 : Diagnostic du pemphigus
Examens clinique, histologique et immuno-pathologique par immunofluorescence directe , indirecte caractéristiques des principales formes de pemphigus (vulgaire et foliacé) (Kneisel Hertl Michael, 2011).

La mise en évidence des dépôts d'Ig et/ou du fragment C3 du complément sur la peau péri-lésionnelle par immunofluorescence directe (IFD) est le critère de référence pour le diagnostic de pemphigus et d'une DBAI en général. Dans le cas du pemphigus, l'IFD montre un marquage qui dessine une image en résille suivant les jonctions inter-kératinocytaires au sein de l'épiderme dans le pemphigus.

Les Ac circulants peuvent être détectés en immunofluorescence indirecte (IFI) en incubant les sérums des patients sur des substrats épithéliaux tels que la peau humaine, l'œsophage de singe ou la vessie de rat.

Les examens sérologiques par dosage immuno-enzymatique (ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay)* ou par *immuno-blot* en utilisant des protéines recombinantes ou des extraits de tissulaires permettent également de mettre en évidence la présence d'auto-Ac dans le sérum de malades et aident à la caractérisation de la spécificité des auto-Ac pour discriminer les différentes DBAI. Ces dosages sont un élément clé du diagnostic et permettent également de mesurer l'activité de la maladie tout au long du suivi du patient.

2. Les différentes formes de pemphigus

Différentes formes de pemphigus sont décrites en fonction des caractéristiques cliniques, histologiques et immunologiques. Le PV et le PF sont les formes les plus courantes. D'autres formes plus rares existent comme le PPN, le pemphigus herpétiforme et le pemphigus à IgA (Joly and Litrowski 2011).

A. *Le pemphigus vulgaire*

Le PV est la forme la plus répandue de pemphigus, représentant jusqu'à 70% de tous les cas de pemphigus. Il s'agit généralement d'hommes et de femmes d'âge moyen (entre 40 et 60 ans) même si des formes pédiatriques ont été exceptionnellement décrites (Bastuji-Garin et al. 1995; Langan et al. 2008; Zillikens et al. 1995).

La présentation clinique classique se caractérise par des érosions muqueuses, principalement buccales, extrêmement douloureuses et responsables d'une dysphagie et d'une

anorexie avec amaigrissement. Des érosions des muqueuses plus profondes pharyngo-laryngées, œsophagiennes, génitales, anales et conjonctivales sont également possibles.

L'atteinte cutanée survient généralement après ou concomitamment à l'atteinte des muqueuses. Elle se caractérise par des érosions croûteuses faisant suite à la rupture de bulles flasques fragiles, survenant sur une peau saine ou érythémateuse. On retrouve un décollement épidermique déclenché par le simple frottement de la peau en zone péri-lésionnelle, c'est le signe de Nikolsky (Duvert-Lehembre and Joly 2014) (Figure 10).

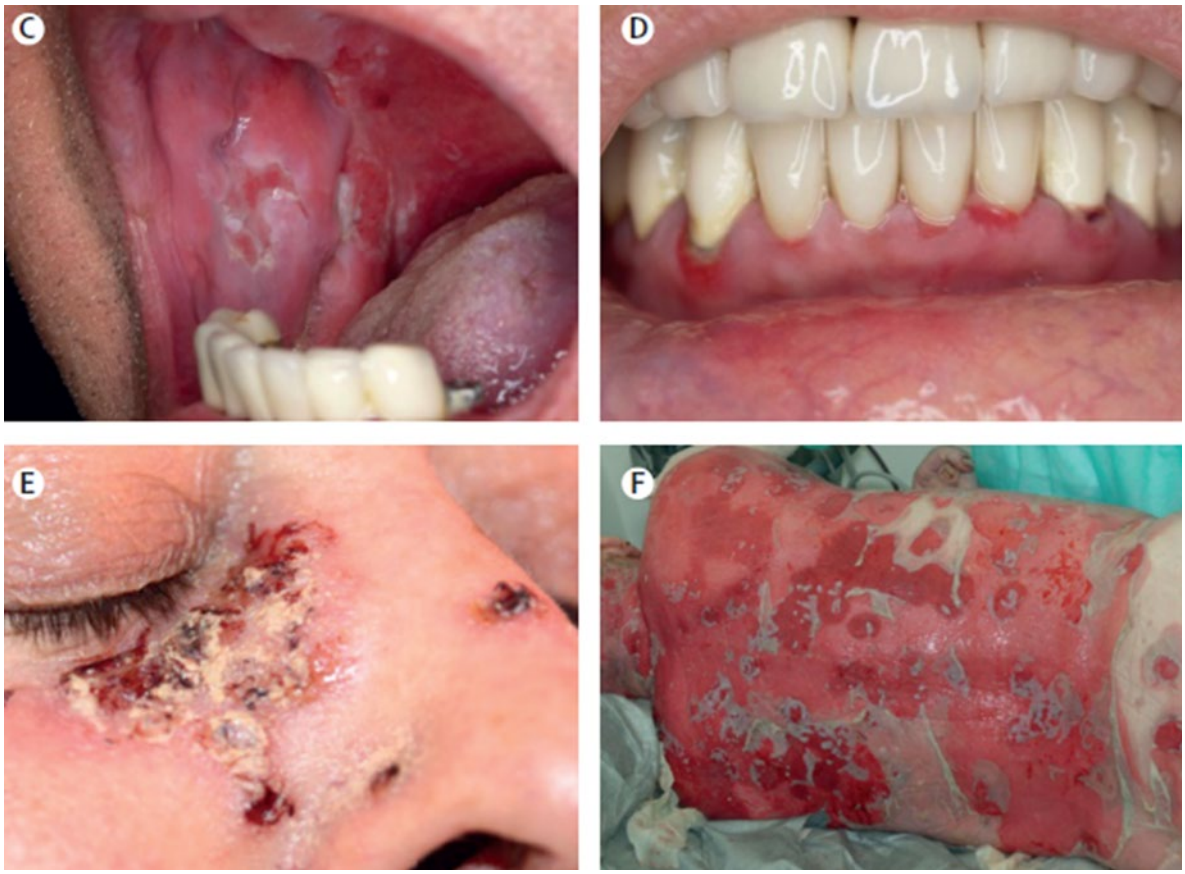


Figure 10 : Aspects cliniques du pemphigus vulgaire
En haut à gauche : érosions de la muqueuse jugale et du palais
En haut à droite : érosions gingivales du collet dentaire
En bas à gauche : érosions croûteuses du visage
En bas à droite : larges nappes érosives du dos et du cou
(Schmidt et al. 2019).

Le diagnostic repose donc sur :

- la présence d'un clivage intra-épidermique au-dessus de la couche basale de l'épiderme en histologie standard sur peau lésé

- la détection d'IgG liée au tissu avec un schéma intercellulaire dit en « résille » en IFD sur biopsie en peau péri-lésionnelle (Figure 11)

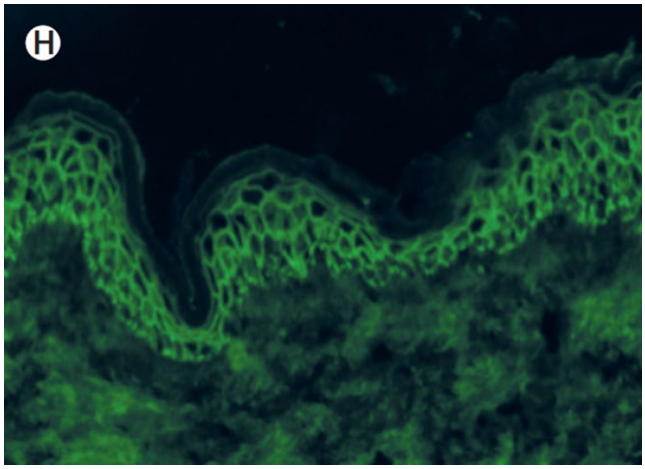


Figure 11 : Immunofluorescence directe d'une lésion de pemphigus montrant un marquage IgG « en résille »
(Schmidt et al. 2019).

- la détection d'auto-Ac circulants sériques se liant aux structures desmosomales des cellules épithéliales d'œsophage de singe en IFI

- la détection des Ac anti-DSG3 sériques par ELISA. La présence simultanée d'Ac anti-DSG3 et anti-DSG1 est habituellement observée de la forme cutanéo-muqueuse du PV.

Le pemphigus végétant est une variante rare du pemphigus vulgaire dans laquelle la cicatrisation est associée à la prolifération de l'épiderme. Les lésions apparaissent généralement dans les zones axillaire, ombilicale, périanale, inguinale ou encore mammaire. En raison de leur localisation, les lésions sont généralement infectées secondairement, ralentissant ainsi la cicatrisation (Joly and Litrowski 2011; Ruocco et al. 2015).

B. *Le pemphigus foliacé ou superficiel*

Le PF est la forme superficielle du pemphigus et représente un quart des cas de pemphigus. Il se présente sous une forme sporadique (estimée aux USA et en Europe à moins de 1 cas par million d'habitants) et sous une forme endémique apparentée principalement dans certaines zones du Brésil (pemphigus *braziliensis* ou *fogo selvagem*) et d'Afrique du Nord (Tunisie) (Hans-Filho et al. 1999). La forme endémique affecte généralement les adolescents et les jeunes adultes.

Les patients présentent des lésions cutanées, sans atteinte muqueuse, avec des bulles flasques et fragiles qui évoluent en plaques érythémateuses hyperkératosiques, préférentiellement dans les zones cutanées séborrhéiques (cuir chevelu, visage, poitrine, épaules). Les bulles étant superficielles et fragiles, elles ne sont pas toujours perçues (Figure 12). Le signe de Nikolsky est là aussi positif.

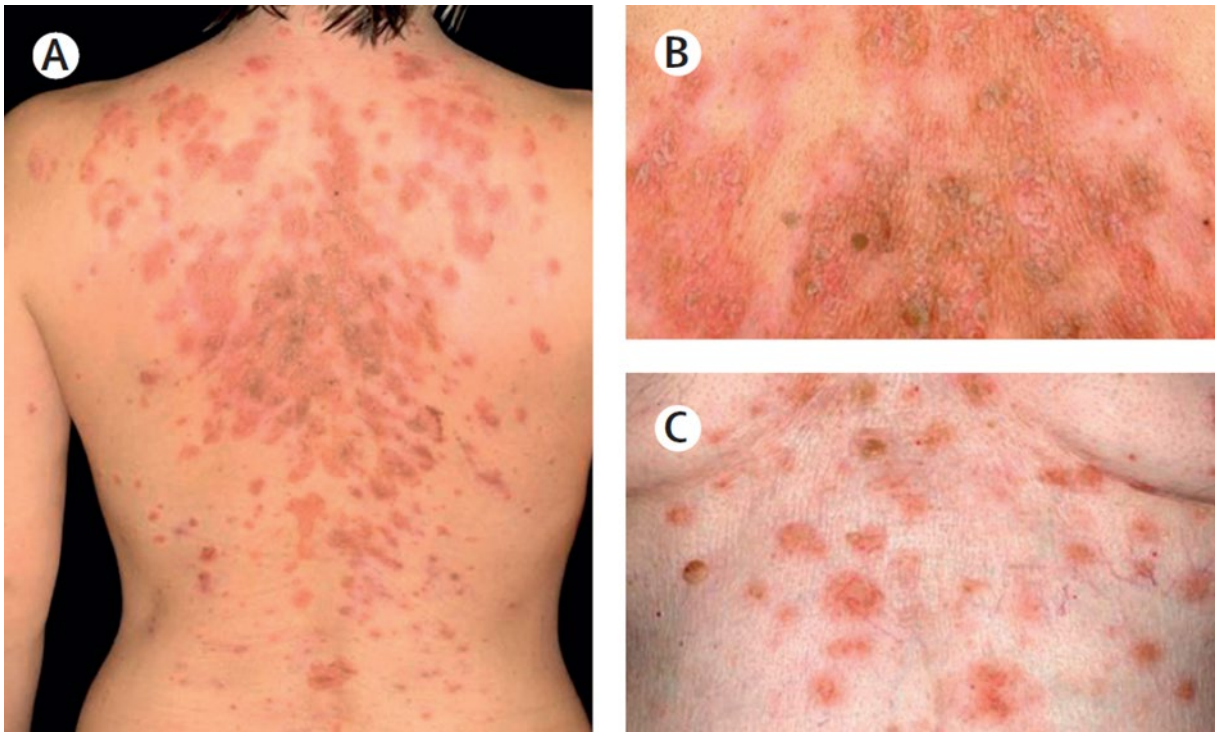


Figure 12 : Aspects cliniques de pemphigus superficiel
A gauche, en haut à droite et en bas à droite : érythème finement érosif et squameux (Schmidt et al. 2019).

Le diagnostic repose sur :

- la mise en évidence d'une acantholyse au sein de la couche granuleuse de l'épiderme avec la formation d'un clivage superficiel dit subcornéal en histologie standard sur peau lésée. Un léger infiltrat inflammatoire composé de polynucléaires éosinophiles peut être observé dans le derme superficiel.

- la présence de dépôts d'IgG dans l'espace intercellulaire avec une présence accrue au niveau de l'épiderme sous-corné en IFD.

- la détection des Ac anti-DSG1 sériques par ELISA (dans plus de 90% des cas) qui sont étroitement corrélés à l'activité de la maladie.

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

C. *Le pemphigus paranéoplasique*

Le PPN est une DBAI rare (moins de 5% des cas) et souvent mortelle associée à des prolifération malignes survenant généralement chez des patients âgés de 45 à 70 ans (Anhalt et al. 1990).

Le PPN est caractérisé par un grand polymorphisme immunologique et par conséquent clinique.

En effet, le PPN est caractérisé par la présence d'auto-Ac IgG dirigés contre de nombreuses protéines du desmosome dont les DSG1 et 3 (160 et 130 kDa) mais aussi contre plusieurs membres de la famille des plakines tels que les desmoplakines I et II (250 et 210 kDa respectivement), l'envoplakine (210 kDa) et la périplakine (190 kDa). Les auto-antigènes peuvent être aussi des molécules d'adhésion hémi-desmosomale comme l'antigène majeur de la PB BPAG1 (230 kDa) ou la plectine (500 kDa) (Anhalt et al. 1990; Joly et al. 1994; Oursler et al. 1992).

Ainsi, les lésions sont très polymorphiques et touchent le plus souvent la peau et les muqueuses à la fois superficielles et profondes (Figure 13). L'atteinte est généralement très sévère, associée à une altération de l'état général du patient. L'atteinte du versant externe des lèvres, non retrouvée dans le PV, est un signe évocateur. Cependant, l'atteinte d'autres localisations muqueuses inhabituelles telles que celles du nez, du pharynx, du larynx, de l'œsophage et des parties génitales orientent également le diagnostic. L'atteinte cutanée est volontiers très sévère et apparait habituellement secondairement à l'atteinte muqueuse. Les lésions sont polymorphes : érythème diffus, lésions vésiculo-bulleuses, éruptions lichénoïdes, papules, plaques squameuses, érosions ou ulcérations. En plus de l'atteinte cutanéo-muqueuse, le PPN peut affecter également l'épithélium respiratoire, dû à la présence d'auto-Ac ciblant des antigènes indispensables à la cohésion de celui-ci. Cela entraîne alors une pneumopathie obstructive gravissime par décollement de l'épithélium réalisant un bouchon muqueux des voies respiratoires (Joly 1997).

Les maladies les plus fréquemment associées au PPN sont le lymphome non hodgkinien et la leucémie lymphoïde chronique, suivie de la maladie de Castleman, du thymome, de la macroglobulinémie de Waldenström, des sarcomes et des carcinomes du pancréas, du côlon et de la prostate (Camisa and Helm 1993).

Figure 13 : Aspect clinique de pemphigus paranéoplasique montrant une stomatite érosive et ulcérative avec une atteinte caractéristique du vermillon
(Kasperkiewicz et al. 2017a).

D. *Les autres pemphigus*

Les autre formes rares de pemphigus déjà décrites présentent des aspects cliniques, histologiques et immunopathologiques différents des formes classiques de PV et le PF (Pollmann et al. 2018).

a. *Le pemphigus herpétiforme*

Le pemphigus herpétiforme associe les caractéristiques cliniques de la dermatite herpétiforme et les caractéristiques immunologiques du pemphigus (Jablonska et al. 1975). Les patients présentent des lésions cutanées érythémateuses, vésiculo-bulleuses, pustuleuses ou papuleuses, associées à un prurit sévère touchant le tronc et les extrémités proximales. Sa particularité histologique est la présence d'une spongiose à éosinophiles, sans forcément d'acantholyse associée. Les antigènes cibles sont la DSG1 et moins fréquemment la DSG3. (Karray and Badri 2018; Porro et al. 2014).

b. *Le pemphigus à IgA*

Il s'agit d'un pemphigus rare caractérisé par la présence d'IgA ciblant les protéines desmosomales Dsc1, DSG1 et DSG3 (Wallach et al. 1982). Il se caractérise par la présence de bulles fragiles et de pustules sur une peau érythémateuse touchant surtout le tronc, les extrémités proximales et les régions intertrigineuses. L'histologie révèle une légère acantholyse très superficielle et un infiltrat épidermique de polynucléaires neutrophiles. Les dépôts d'auto-Ac de type IgA sont détectables en IFD (Hashimoto 2001). Le pemphigus à IgA peut être séparé en deux sous-entités : la dermatose intra-épidermique neutrophilique associée aux IgA contre la DSG1 ou la DSG3 et la dermatose pustuleuse sous-cornée associée aux IgA contre la Dsc1 (Hashimoto et al. 1997; Kárpáti et al. 2000; Yasuda et al. 2000).

c. *Le pemphigus médicamenteux*

Certains médicament peuvent aggraver voire causer un pemphigus (Korman et al. 1991). Bien qu'il prenne le plus souvent l'aspect clinique d'un PF, le pemphigus médicamenteux peut prendre toutes les formes. L'atteinte des muqueuses est rare. En raison de cette hétérogénéité clinique, une étiologie médicamenteuse doit être systématiquement évoquée devant tout cas de pemphigus. Les médicaments inducteurs sont : i) les médicaments thiolés d'une part (pénicillamine, captopril, thiopronine, pyrithioxine) et ii) les médicaments non thiolés d'autre part (pénicilline, céphalosporine).

3. Epidémiologie

Le pemphigus vulgaire et le pemphigus foliacé représentent 90 à 95% des diagnostics de pemphigus. Les fréquences relatives de pemphigus vulgaire et de pemphigus foliacé dans une population varient considérablement d'un pays à l'autre. La fréquence relative du pemphigus vulgaire varie entre 95% en Arabie Saoudite et 13% au Mali. En Europe et en Amérique du Nord, le pemphigus vulgaire représente 65 à 90% des cas de pemphigus (Schmidt et al. 2019). Le pemphigus se manifeste généralement entre l'âge de 45 et 65 ans dans la plupart des populations avec un âge moyen d'apparition plus jeune, encore inexpliqué, d'environ 45 ans en Afrique du Sud et dans le nord-est de la Chine. Des rapports du Royaume-Uni et de la France ont souligné que

l'incidence du pemphigus augmente avec l'âge (Bernard et al. 1995; Jelti et al. 2019a; Langan et al. 2008). Dans l'enfance et l'adolescence, le pemphigus est extrêmement rare, 1 à 4 % des patients atteints de pemphigus vulgaire sont âgés de moins de 18 ans. Le pemphigus foliacé chez les enfants n'a été décrit que dans des cas isolés, en dehors des zones endémiques, mais dans ces régions, jusqu'à 30 % des patients ont été signalés comme étant âgés de moins de 20 ans (Hans-Filho et al. 1999; Hans-Filho et al. 1999; Mintz and Morel 2011). La plupart des études épidémiologiques font état d'une prédominance féminine avec des ratios hommes/femmes compris entre 1:1-1 et 1:1-7 selon les populations (Hübner et al. 2016; Kridin 2018b).

L'incidence du pemphigus varie considérablement d'une population à l'autre, allant de 0.6 par million d'habitants par an en Suisse et 0.6 en Finlande, à 8.0 en Grèce et 10.0 en Iran. Les incidences les plus élevées, 16.1 aux USA et 32.0 en Israël, ont été enregistrées dans la population juive (Tableau 2). La variabilité est très probablement liée aux différents antécédents génétiques et aux facteurs déclenchants. Cette notion est soutenue par des observations en Israël et en Allemagne ; l'Israël ayant une incidence de 3,6 fois supérieure chez les patients d'origine juive que chez ceux d'origine arabe et l'Allemagne ayant une incidence 8,8 fois plus élevée chez les patients d'Europe centrale que chez les patients originaires d'Italie et de Turquie (Hahn-Ristic et al. 2002; Kridin 2018b). En 2014, la prévalence a été estimée à 95 par million d'habitants pour le pemphigus vulgaire et à 10 par million pour le pemphigus foliacé (Hübner et al. 2016).

Region#	Period	Mean age (years)	Incidence (/million/year)
Botswana*[20]	2008-2015	n.d.	1.7
Bulgaria* [21]	1980-1995	72	4.7
Croatia* [22]	2005-2010	n.d.	3.7
Finland [23]	1969-1978	58	0.76
France* [15, 24, 25]	1985-1990 2002-2006 2004-2013	52 62 59	1.7 2.7 1.5 (1.0 in the north, 3.4 in the south) (
Germany* [26, 27]	1989-1997 2001-2002	n.d. 62	0.98, entire population (PV) 0.77, native Germans (PV) 6.8, Southern Europeans (PV) 0.6
Greece* [28]	1985-2004	60	8.0
India* [29]	2001	44	4.4
Israel* [30, 31]	1952-1972 2006-2015	n.d. 55	16.1, Jewish 7.2 (9.6 in Jewish, 3.2 in Arabs)
Iran* [32, 33]	1991-2000 1984-2003	38 42	6.7 10.0
Italy* [34]	1982-1996	56 (PV)	6.0 (PV)
Kuwait[35]	1991-2002	37	4.6
Macedonia [36]	1990-2004	52	4.4
Malaysia* [37]	n.d.	n.d.	2.0 (PV)
Mali* [38]	n.d.	47	2.9
Poland*[39]	2001-2015	55 (PV) 64 (PF)	3.7
Romania* [40]	2001-2007	53	4.0
Saudi Arabia* [41]	1990-1999	43	1.6
Serbia* [42, 43]	1990-2002 1991-2010	56 n.d.	6.6 4.4
South Korea [44]	2006-2015	n.d.	2.1
Spain*[45]	2004-2017	51	4.7
Switzerland [46]	2001-2002	62	0.6
Taiwan [47]	2002-2009	53	4.7
Tunisia* [14, 15, 48]	1985-1987 1986-1991 1997-2007	28 (PF) 37 50	4.0 (PF) 6.7 8.6
Turkey* [49-51]	1998-2004 1998-2009 2013-2014	43 48 49	2.4 1.8 4.7
U.K. [52]	1996-2006	71	6.8 (PV)
USA* [53]	1972-1977	64	4.2, non-Jewish 32, Jewish

in alphabetical order; * defined region(s) of the country was (were) studied
n.d., not determined; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris

Tableau 2 : Incidence du pemphigus selon les pays
*# par ordre alphabétique ; * région(s) définie(s) du pays a (ont) été étudiée(s). n.d., non déterminé. (Schmidt et al. 2019).*

Dans certaines zones rurales d'Amérique du Sud (Brésil, nord de la Colombie et Pérou) et en Tunisie, des incidences beaucoup plus élevées de pemphigus foliacé ont été enregistrées que dans d'autres régions du monde (Morini et al. 1993). Les cas dits endémiques de pemphigus foliacé ont été initialement décrits en 1903 et sa forme la plus étendue au Brésil est connue sous le nom de fogo selvagem (Warren et al. 2000).

4. Susceptibilités au pemphigus

Le déclenchement d'une réponse auto-immune est souvent multifactoriel, impliquant à la fois des facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux. Différentes études épidémiologiques et génétiques sur les formes sporadiques ou endémiques du pemphigus ont permis de mettre en évidence certains facteurs de susceptibilité au pemphigus.

A. *Pathologies associées aux pemphigus*

Le pemphigus vulgaire et le pemphigus foliacé sont associés à diverses maladies, dont d'autres pathologies auto-immunes, le psoriasis, des troubles neurologiques et psychiatriques, et certaines tumeurs malignes (Tableau 3).

Associated disease[+]	Population	Number of pemphigus/ control patients	Statistics
Autoimmune diseases			
Rheumatoid arthritis[54, 55]	Israel	110/ 969[*]	p=0.016
	USA	Not detailed	2.82 (1.33-6.00)**
Autoimmune thyroid disease[54, 55]	Israel	110/ 969[1]	p=0.046
	USA	Not detailed	6.03 (3.53-10.31)**
Diabetes mellitus type I[55]	USA	Not detailed	5.07 (1.07-23.98)**
Myasthenia gravis[56]	USA	6,406/ca. 17.4 million	6.92 (2.55-18.79)**
Systemic lupus erythematosus[57]	Taiwan	1,998/ 7,992	4.46 (1.88-10.6)**
Sjögren's syndrome[57]	Taiwan	1,998/ 7,992	15.0 (3.16-71.5)**,§
Alopecia areata[57]	Taiwan	1,998/ 7,992	2.68 (1.26-5.67)**,§
Malignancies			
Leukaemia[56, 58]	USA	6,406/ca. 17.4 million	1.56 (1.08-2.24)**
	Israel	1,985/ 9,874	2.1 (1.2-3.6)**,%
Non-Hodgkin lymphoma[56, 58]	USA	6,406/ca. 17.4 million	1.52 (1.15-2.03)**
	Israel	1,985/ 9,874	1.5 (1.0-2.2)**
Haematological malignancies[59]	Germany	PV only: 860/5,142	2.10 (1.40-3.03)**
Multiple myeloma[58]	Israel	1,985/ 9,874	2.2 (1.2-3.9)**
Oesophageal cancer[60]	Israel	1,985/ 9,874	2.9 (1.1-7.4)**
Laryngeal cancer[60]	Israel	1,985/ 9,874	2.0 (1.0-4.1)**
Oropharyngeal cancer[59]	Germany	PV only: 860/5,142	7.21 (2.68-19.9)**
Gastrointestinal cancer[59]	Germany	PV only: 860/5,142	2.56 (1.85-3.46)**
Colon cancer[59]	Germany	PV only: 860/5,142	2.44 (1.16-3.62)**
Non-melanoma skin cancer[59]	Germany	PF only: 103/588	2.45 (1.43-4.04)**
Chronic inflammatory diseases			
Psoriasis[57, 61#]	Israel	1,985/ 9,874	2.84 (2.09-3.85)**
	Taiwan	1,998/ 7,992	7.18 (5.55-9.29)**
Ulcerative colitis[62]	Israel	1,985/ 9,874	1.9 (1.1-3.3)**
Chronic obstructive pulmonary disease[63]	Israel	1,985/ 9,874	1.3 (1.2-1.5)**
Neurological diseases			
Dementia[64]	Israel	1,985/ 9,874	1.97 (1.77-2.20)**
Epilepsy[64]	Israel	1,985/ 9,874	1.78 (1.36-2.33)**
Parkinson disease[64]	Israel	1,985/ 9,874	2.09 (1.74-2.51)**
Bipolar disorders[65]	Israel	1,985/ 9,874	1.7 (1.0-2.9)**
Schizophrenia[66]	Israel	1,985/ 9,874	1.5 (1.1-2.2)**
Others			
Diabetes[67]	Canada	295/ Canadian general population	2.20 (1.64-2.87)[&]
Hypothyroidism[67]	Canada	295/ Canadian general population	1.53 (1.08-2.10)[&]

Tableau 3 : Pathologies associées aux PV et PF
*Seules les études ayant rapporté une association positive sont présentées, * parents au premier degré, ** Odds ratio (intervalle de confiance à 95 %)*
(Schmidt et al. 2019).

B. *Génétique du pemphigus*

A l'instar des autres maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organes, de nombreux arguments supportent le fondement génétique du pemphigus. Il ne s'agit pas d'un modèle héréditaire mais plutôt d'un modèle «polygénique» avec des mécanismes ajoutés ou complémentaires de plusieurs gènes (Tron et al. 2006).

a. *Susceptibilité HLA*

La répartition géographique inégale des cas de pemphigus et la prévalence accrue dans certains groupes ethniques s'expliquent par des polymorphismes HLA particuliers augmentant significativement la susceptibilité. Des études ont montré que le PV (Figure 14), le PF et le PPN sont préférentiellement associés aux allèles HLA de classe II dans divers groupes ethniques.

Les preuves les plus solides du risque de pemphigus vulgaire dans toutes les populations ont été retrouvée sur les allèles HLA DRB1*04:02 et DQB1*05:03 (Vodo et al. 2018). En fait, la plupart des patients atteints de pemphigus vulgaire expriment l'un de ces deux allèles. Dans deux méta-analyses portant sur 18 études relatives à l'association du pemphigus vulgaire avec les allèles des gènes HLA-DRB1 et HLA-DQB1 : DRB1*04, DRB1*08, DRB1*14, DQB1*05:03 et DQB1*03:02 étaient significativement augmentés (Li et al. 2018b; Yan et al. 2012). Au contraire, la fréquence des allèles DRB1*03, DRB1*07, DRB1*15, DQB1*05:01, DQB1*02, DQB1*06:01 et DQB1*03:03 était diminuée de manière significative chez les patients par rapport aux contrôles sains. Très récemment, deux études d'association à l'échelle génomique chez des patients chinois atteints de pemphigus vulgaire ont identifié DRB1*14, DQB1*05:03 et DRB1*04 comme des allèles à risque (Gao et al. 2018; Zhang et al. 2019).

Dans les cas du pemphigus foliacé brésilien non endémique mais aussi non endémique, HLA DRB1*04 était l'allèle de susceptibilité le plus fréquemment signalé.

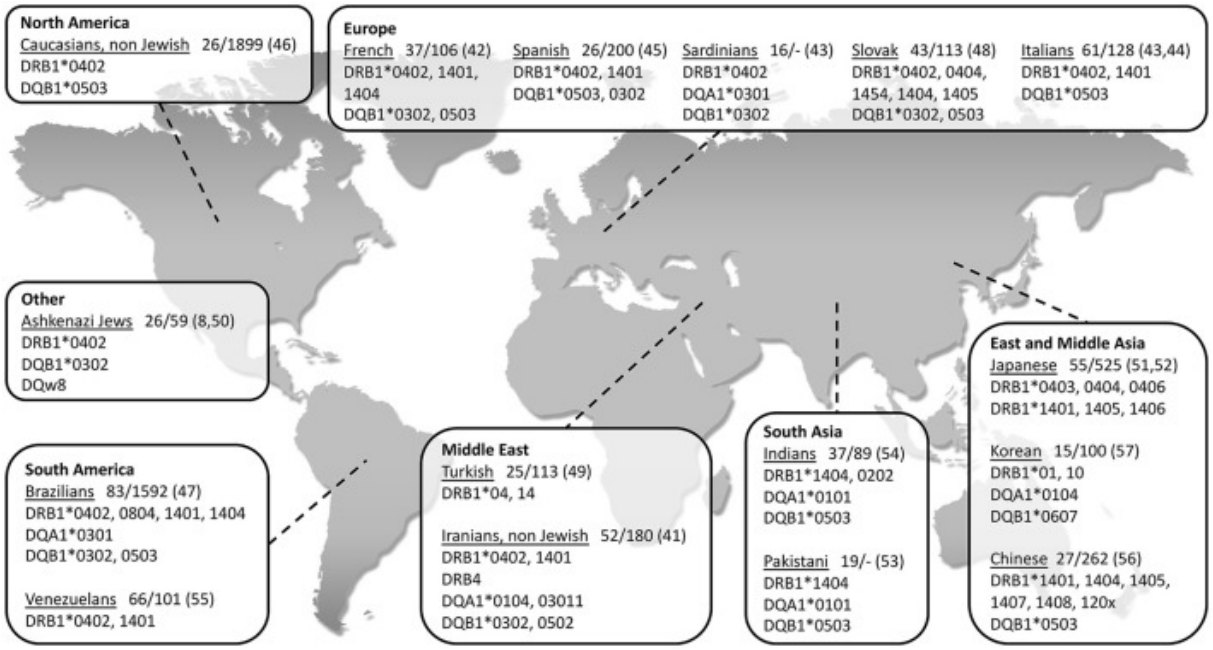


Figure 14 : Carte mondiale montrant l'association des gènes HLA de type II avec le PV dans différentes populations, regroupées selon les régions géographiques
Le nom de chaque population étudiée est suivi par : 1. Patients/témoins (n). Les numéros entre parenthèses sont les références bibliographiques utilisées dans l'article d'où provient cette figure.
(Vodo et al. 2019).

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

Au vu du rôle des gènes HLA de classe II dans la réponse immunitaire adaptative, l'explication la plus plausible de cette association est que ces allèles associés au pemphigus confèrent aux molécules du CMH la capacité de lier plus efficacement les peptides dérivés des auto-antigènes et de les présenter aux LT auto-réactifs conduisant les LB auto-réactifs à produire des auto-Ac pathogènes (Figure 15).

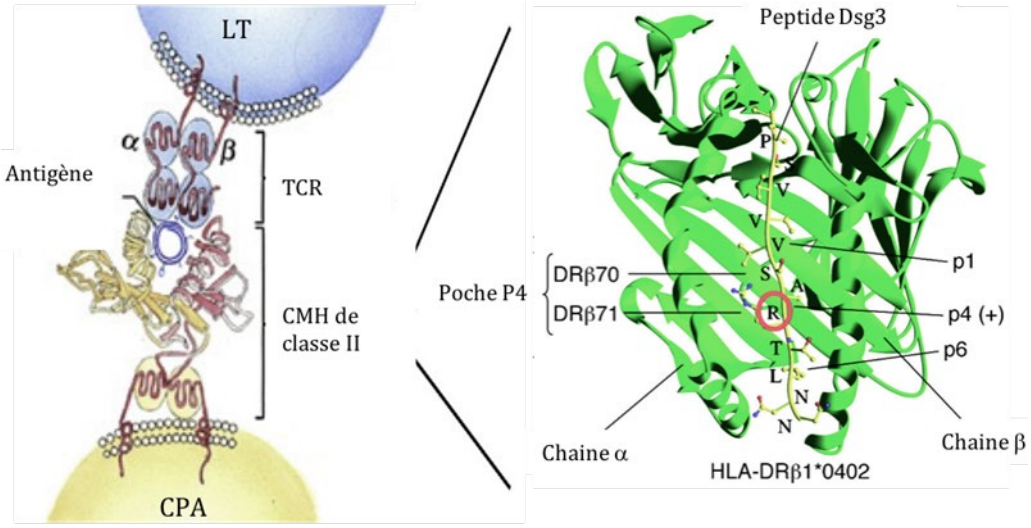


Figure 15 : Présentation antigénique de la DSG 3 par le CMH de classe II
*Modélisation du sillon de présentation antigénique du peptide de la DSG3 par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) au TCR (T cell receptor) du LT CD4+ par l'intermédiaire du CMH de classe II HLA-DRB1*04. Tous les peptides DSG3 ont des acides aminés conservés aux positions relatives 1, 4 et 6. Les acides aminés chargés positivement en position 4 (cercle rouge) représentent vraisemblablement des motifs d'ancrage à la poche P4 chargée négativement formée par les résidus DRβ70 et DRβ71 de DRβ1*0402 (Hertl et al., 1998, 2006).*

L'hypothèse selon laquelle des allèles HLA de classe II favorisent la réponse auto-immune a été confirmée dans plusieurs travaux sur la réponse proliférative lymphocytaire T vis-à-vis des peptides de la DSG1 et de la DSG3 obtenue chez des patients pemphigus mais également chez des donneurs sains présentant les même haplotypes HLA de susceptibilité (Gebhard et al., 2005; Hertl et al., 1998). Par ailleurs, les sites de liaison peptidique des molécules HLA-DRB1 et DQB1 ont montré des caractéristiques structurales identiques dans les poches P1, P4, P6, P7 et P9 de la molécule HLA (Wucherpfennig et al. 1995). Enfin, la présence d'un AA chargé positivement au sein des épitopes T de la DSG3 renforce l'adhésion dans la poche P4 chargée négativement (Figure 15). Ainsi, ces molécules HLA présentent une conformation et des charges électriques participant à leur haute affinité pour les peptides de la DSG3.

b. *Susceptibilités non HLA*

A ce jour, seul un nombre limité d'études a pu montrer une association entre les gènes non HLA et le PV. La plupart de ces études ont utilisé une approche par gènes « suspectés » pour étudier une association possible entre la PV et des gènes liés à l'auto-immunité, principalement des auto-antigènes, des cytokines et des immunoglobulines connus pour jouer un rôle dans la

pathogenèse du PV, comme le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-10 (Feliciani et al. 2000; Giordano and Sinha 2012; Grando 2011). Cependant, les résultats de ces études ont souvent été contradictoires, limités à des groupes ethniques spécifiques et n'ont pas pu être extrapolés à d'autres populations.

Jusqu'à présent, quatre gènes non-HLA ont été associés au pemphigus vulgaire dans au moins deux populations (Gao et al. 2018; Sarig et al. 2012; Vodo et al. 2018):

- DSG3, codant pour l'auto-antigène du pemphigus vulgaire pemphigus vulgaire DSG3 : deux haplotypes différents dans le gène DSG3 ont été trouvés en association avec le PV chez des patients britanniques et indiens du Nord, respectivement. Il est intéressant de noter que les patients porteurs de l'un de ces deux haplotypes à risque étaient toujours porteurs d'allèles HLA de classe II associés au PV, ce qui suggère des effets additifs possibles pour ces deux loci (Capon et al. 2006).

- TAP2, codant pour une protéine impliquée dans le transport des peptides vers les antigènes HLA de classe I

- IL6, codant pour la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6

- ST18, codant pour un facteur de transcription impliqué dans l'inflammation et l'apoptose, surexprimé dans le tissu cutané du pemphigus vulgaire. En effet, l'expression du gène ST18 stimule l'acantholyse induite par le sérum de PV et la sécrétion de molécules inflammatoires clés, ce qui soutient un rôle direct de la ST18 dans la pathogenèse du PV (Assaf et al. 2021).

C. *Les facteurs environnementaux*

Outre les traits de susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux déclencheurs de la maladie ont été postulés, comme le prouvent les observations réalisées dans les zones endémiques ou au sein des familles de patients. De faibles concentrations d'auto-anticorps anti-DSG sont présentes dans les sérums d'environ la moitié des parents au premier degré cliniquement non affectés de patients atteints de pemphigus (Ahmed et al. 1993; Brandsen et al. 1997) et dans le sérum des habitants des zones à forte prévalence de pemphigus foliacé (Warren et al. 2000), ce qui suggère l'existence de plusieurs facteurs déclenchants.

Le PF endémique brésilien (folgo selvagem) est un exemple qui illustre bien l'interaction entre les prédispositions génétiques précédemment décrites, et les facteurs environnementaux (Figure 16). En effet, dans le PF endémique, la protéine salivaire LJM11 de la mouche des sables

Lutzomyia Longipalpis présente une homologie de séquence avec la DSG1 et est responsable d'une réaction croisée avec celle-ci (Qian et al. 2012).

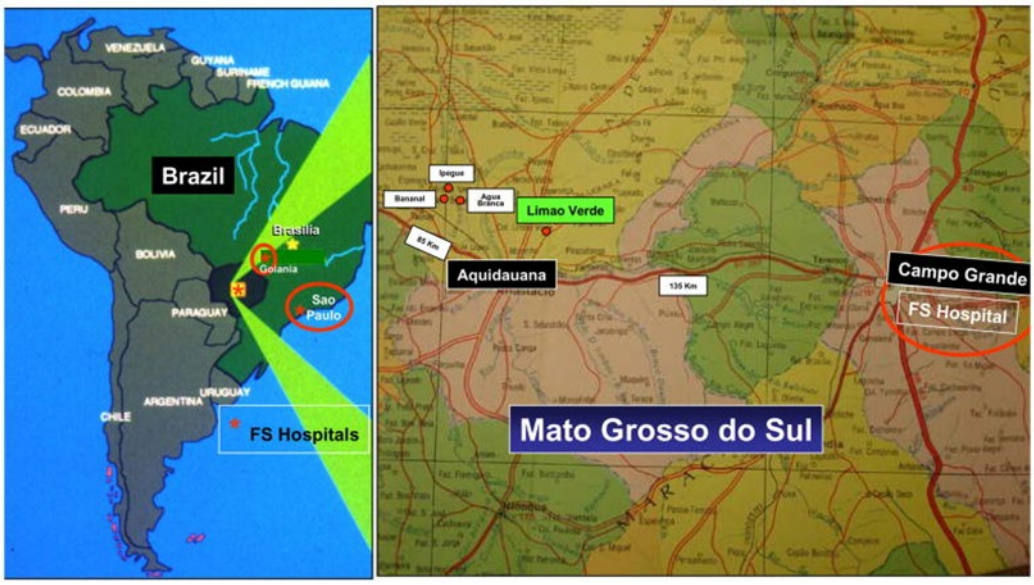


Figure 16 : Les régions endémiques du folgo selvagem
Les régions endémiques du FS sont situées dans les plans centraux du Brésil. Du fait de la forte prévalence du FS, pouvant atteindre 3% de la population dans certaines villes, des hôpitaux spécialisés s'y sont installés (Diaz et al. 2020).

Fait intéressant, les individus sains vivants dans les zones endémiques présentent des Ac anti-DSG1 non pathogènes. Ce sont des IgM et IgG de sous-classe IgG1 dirigés contre le domaine EC5 de la DSG1. Les malades, quant à eux, présentent des auto-Ac anti-DSG1 pathogènes de sous-classe IgG4 et des IgE se liant aux domaines EC1 et EC2 de la DSG1 impliqués dans la pathogénèse du pemphigus (Warren et al. 2003). La stimulation antigénique initiée par ces facteurs environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés pourrait alors se concrétiser par une extension épitopique et être à l'origine du processus auto-immun (Aoki et al. 2015).

Dans le pemphigus non endémique, plusieurs facteurs de risque ont été mis en évidence comme l'utilisation de médicaments particuliers tels que la pénicillamine et le captopril, l'exposition à des pesticides, les vapeurs métalliques, les rayons ultraviolets et les radiations ionisantes, les brûlures, les interventions chirurgicales le microbiote (Scaglione et al., 2020) ou encore les événements stressants (Morell-Dubois et al. 2008).

Quelques cas de pemhigus ou d'exacerbation suite à une vaccination ont été décrits. C'est le cas de vaccination contre la grippe, l'hépatite B, la rage et le tétanos (Berkun et al. 2005; De Simone et al. 2008; Korang et al. 2002; Yalçin and Alli 2007). A noter que plusieurs cas de rechutes ou exacerbations de pemphigus et même un cas de 1ère poussée de la maladie ont été rapportés suite à la vaccination contre la Covid-19 (Damiani et al. 2021; Solimani et al. 2021; Thongprasom et al.). A ce jour, aucune démonstration de causalité entre la survenue ou exacerbation de pemphigus et la vaccination n'a été établie.

Les infections herpétiques tels que le virus herpès simplex (HSV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou le virus de l'herpès (HHV-8), pourraient participer pathogénèse du pemphigus d'après certaines observations cliniques et expérimentales (Tufano et al. 1999). En effet, les épidermiques dues au HSV conduiraient à une surexposition de la DSG1 et la DSG3 à l'origine de la production d'auto- Ac.

5. Physiopathologie du pemphigus

A. *Généralités*

La physiopathologie du pemphigus a fait l'objet de récentes revues approfondies (Ahmed et al. 2016; Amber et al. 2018; Kasperkiewicz et al. 2017; Nguyen et al. 2000c; Pollmann et al. 2018; Schmidt et al. 2019; Spindler et al. 2018) . En résumé, chez des individus génétiquement susceptibles, la réaction auto-immune est dirigée par des lymphocytes T et des lymphocytes B autoréactifs. Les lymphocytes T autoréactifs sont éduqués par des cellules présentatrices d'antigènes qui présentent des peptides DSG spécifiques via leurs molécules HLA de classe II décrites précédemment. Ces lymphocytes T autoréactifs CD4 sont spécifiques des molécules de DSG et vont stimuler la production d'anticorps spécifiques de la DSG par les cellules B (Hertl et al. 2006; Kasperkiewicz et al. 2017). L'importance physiopathologique des lymphocytes T dans le pemphigus vulgaire a également été démontrée in vitro chez des souris transgéniques exprimant le HLA-DRB1*04:02 et le récepteur CD4 humain, qui, après immunisation avec de la DSG3 humaine, ont été amenées à exprimer des IgG anti-DSG3 humaines avec une activité acantholytique (Eming et al. 2014). De plus, l'étude récente des populations Tfh (folliculaire helper) autoréactives, populations T CD4 partenaires privilégiés des LB autoréactifs au sein du

centre germinatif, laisse à penser que celles-ci ont logiquement un rôle central dans la réponse auto-immune (Maho-Vaillant et al. 2021).

Les observations cliniques (Hébert et al. 2019; Joly et al. 2017) et expérimentales (Figure 17) prouvent largement la pathogénicité des auto-anticorps contre DSG1 et DSG3 dans le pemphigus.

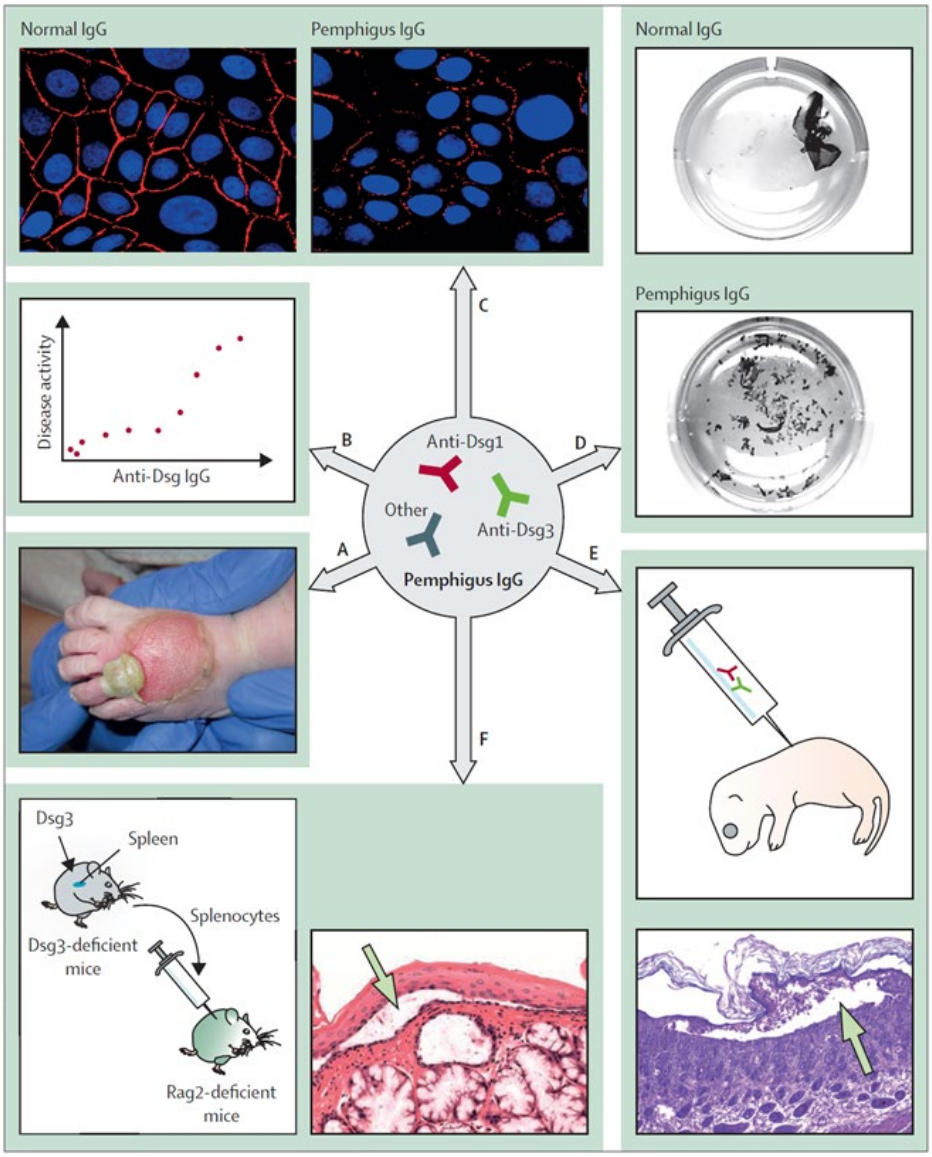


Figure 17: Effets pathogènes des auto-anticorps du pemphigus d'après les résultats cliniques et expérimentaux
(A) Le transfert transplacentaire d'auto-anticorps maternels provenant de mères atteintes de PV peut provoquer des bulles transitoires chez les nouveau-nés (pemphigus néo-natal)(Wu et al. 2009).
(B) Les valeurs ELISA des anticorps sériques anti-DSG sont parallèles à l'activité de la maladie chez presque tous les patients atteints de pemphigus foliacé et chez la plupart des patients atteints de pemphigus vulgaire (Hébert et al. 2019; Schmidt et al. 2010).
(C) Dégradation des desmosomes (coloration rouge) dans des kératinocytes en culture après incubation avec des IgG provenant de patients (Farb et al. 1978).

(D) Acantholyse des kératinocytes en culture après traitement avec des IgG provenant de patients (Ishii et al. 2005).
(E) Clivage intra-épidermique (flèche) chez les souris auxquelles on a injecté des sérums de patients ou des IgG monoclonales murines anti-DSG (Anhalt et al. 1982; Schulze et al. 2012).
(F) Production d'anticorps anti-DSG3 et bulles intra-épidermiques (flèche) induites chez des souris immunodéficientes Rag2-KO après transfert de lymphocytes provenant de souris DSG3-KO immunisées à la desmogléine 3 (Amagai et al. 2000).
D'après Schmidt et al. 2019.

Néanmoins, tous les anticorps anti-DSG ne sont pas pathogènes, ce qui pourrait expliquer que chez certains patients atteints de pemphigus vulgaire, les concentrations sériques d'anti-DSG3 ne soient pas en corrélation avec l'activité de la maladie et puissent persister jusqu'à la rémission. Les épitopes pathogènes de la DSG1 et de la DSG3 sont dépendants du Ca2+ et de la conformation. Ils sont généralement regroupés dans les domaines EC1 et EC2, mais peuvent être trouvés sur tous les domaines extracellulaires de la DSG (EC1-5) (Eming et al. 2014; Zenzo et al. 2012).

Contrairement aux pemphigoïdes dans lesquelles une cascade d'événements comprenant l'activation du complément et les effets médiés par les récepteurs Fc des anticorps induisent la formation de bulles sous-épidermiques, des fragments monovalents d'anticorps anti-DSG dépourvus de la partie Fc peuvent également provoquer une acantholyse in vitro et in vivo (Payne et al. 2005; Rock et al. 1989). Conformément à ces observations, les auto-anticorps du pemphigus sont principalement de la sous-classe IgG4 (Funakoshi et al. 2012; Futei et al. 2001; Rock et al. 1989), qui n'active pas le complément, active faiblement les cellules effectrices immunitaires via sa région Fc et ne s'apparie pas efficacement l'antigène (Aalberse and Schuurman 2002). Ainsi, la liaison des auto-anticorps semble pouvoir compromettre directement la fonction desmosomale.

Par ailleurs, le rôle pathogène d'anticorps non dirigés contre les protéines desmogléines est suggéré. Pour exemple, l'hypothèse du rôle des anticorps anti-Dsc est soutenue par plusieurs observations : i) le phénotype clinique d'érosions sévères, la présence d'un clivage supra basal chez les souris déficientes en Dsc1 épidermique, et ii) les effets pathogènes des IgG anti-Dsc3 in vitro (Chen et al. 2008; Rafei et al. 2011).

La contribution des anticorps contre des antigènes non-desmosomaux à la physiopathologie du pemphigus est quant à elle suggérée par la corrélation des concentrations sériques d'IgG anti-récepteur de l'acétylcholine de type muscarinique avec la sévérité de la maladie, la présence d'Ac dirigés contre hSPCA1 (canal calcique) chez la moitié des patients atteints de PV ou encore et l'effet copathogène des anticorps anti-mitochondriaux in vitro (Amber et al. 2018). Ceci sera développé davantage plus loin dans le manuscrit.

B. *L'acantholyse*

La séquence exacte des événements dans l'acantholyse médiée par les anticorps anti-DSG n'a pas encore été complètement élucidée; cependant, trois mécanismes majeurs de liaison des IgG anti-DSG ont été identifiés (Figure 18): (i) par le biais d'un obstacle stérique à l'adhésion trans- (entre molécules sur des cellules opposées) et cis- (entre molécules sur les mêmes cellules) médiée par la desmogléine; (ii) par la promotion du désassemblage des desmosomes (par regroupement et/ou endocytose des desmogléines); et (iii) par la stimulation des voies de signalisation qui peuvent entrer en synergie avec ces mécanismes pour moduler l'adhésion cellulaire des kératinocytes. En effet, dans le PV, l'endocytose de la desmogléine 3 induite par les IgG est régulée par la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) p38 et son effecteur en aval, la protéine kinase 2 activée par les MAPK (MK2) (Jolly et al. 2010; Mao et al. 2011; Saito et al. 2012). L'inhibition de p38 ou de MK2 prévient l'acantholyse induite par les IgG du pemphigus vulgaire et les bulles spontanées induites par les anticorps monoclonaux dans les modèles de souris à transfert passif (Berkowitz et al. 2006). De la même façon, p38 régule l'acantholyse induite par les IgG du pemphigus foliacé.

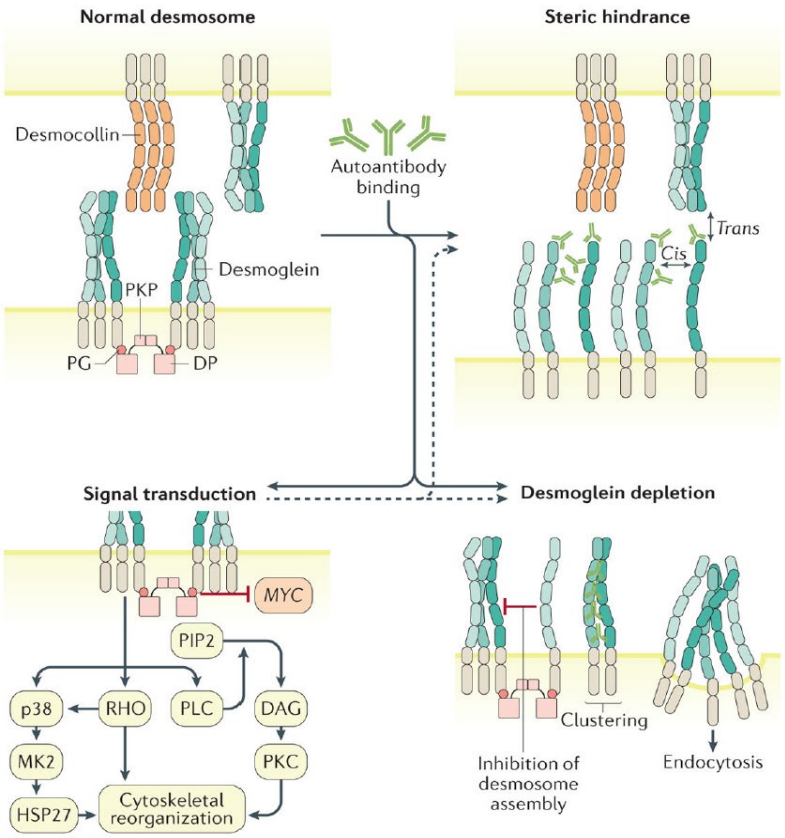


Figure 18 : Mécanismes de l'acantholyse
Les flèches pointillées indiquent que le mécanisme de transduction du signal peut affecter à la fois l'encombrement stérique et la déplétion de la desmogléine. DAG, diacylglycérol ; DP, desmoplakine ; HSP27, protéine de choc thermique 27 ; PG, plakoglobine ; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PKC, protéine kinase C ; PKP, plakophiline ; PLC, phospholipase C.
(Kasperkiewicz et al. 2017).

C. *Modèles expérimentaux de pemphigus*

La recherche scientifique sur le pemphigus dispose désormais de modèles *in vitro* et *in vivo* solides qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes auto-immuns régulant la maladie et plus particulièrement le rôle de l'immunité adaptative via l'activation des LT et LB auto-réactifs et l'action des auto-Ac dans le pemphigus.

a. *Le test d'acantholyse in vitro*

Il s'agit d'un test permettant de reproduire *in vitro* l'acantholyse observée histologiquement *in vivo*. Cela a été réalisé sur des cultures de peau humaine en présence d'IgG de patients atteints de PV et de PF, confirmant la pathogénicité des auto-Ac (Hu et al. 1978; Schiltz and Michel 1976).

L'interprétation est basée sur le nombre de fragments cellulaires obtenus par l'application d'un stress mécanique et l'utilisation de dispase sur une culture de kératinocytes en monocouche (HaCaT) mise en présence d'auto-Ac. Le test permet d'obtenir des scores de dissociation parfaitement corrélés à la sévérité de la maladie sur des sérums de patients ayant des sévérités cliniques différentes mais présentant des titres d'Ac similaires par ELISA (Ishii et al. 2005).

b. *Les modèles murins*

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'étudier la physiopathologie du pemphigus et d'évaluer les stratégies thérapeutiques (Figure 19). Les travaux sont majoritairement orientés sur l'auto-immunité contre la DSG3 en tant qu'auto-antigène principal du PV.

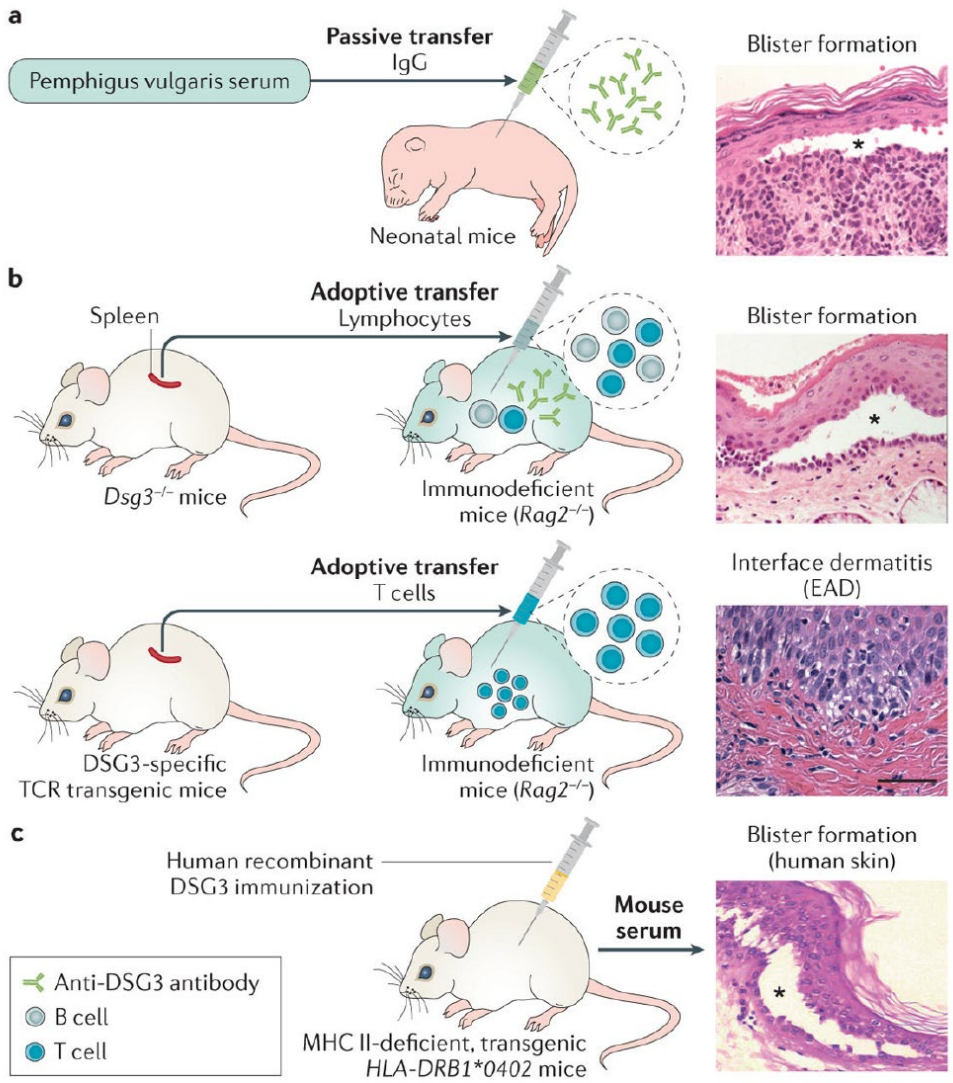


Figure 19 : Modèles murins de pemphigus

a | Modèle de transfert passif. Des fractions d'IgG à partir de sérums de patients sont injectées par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée à des souris néonatales. La souris développe des bulles qui présentent une histologie typique observée chez les patients, avec un dépôt d'IgG sur les surfaces cellulaires des kératinocytes et une acantholyse (astérisque).
b | Modèle de maladie active.
En haut : Les souris déficientes en DSG3 (DSG3-/-) ne génèrent pas de tolérance contre la DSG3 car celle-ci n'a jamais été exposée aux cellules immunitaires. Après transfert adoptif de lymphocytes de souris DSG3-/-, les souris immunodéficientes (Rag2-/-), produisent des anticorps IgG anti-DSG3 et présentent un phénotype de PV.
En bas : Le PV est généré par le transfert adoptif de cellules T spécifiques de DSG3 à partir de souris transgéniques exprimant le TCR spécifique de DSG3 à des souris immunodéficientes. Les cellules T transférées s'infiltrent directement dans la peau et attaquent les kératinocytes exprimant DSG3, provoquant une dermatose auto-immune expérimentale, en l'absence d'anticorps anti-DSG3, utile pour analyser les mécanismes auto-immuns cellulaires médiés par les cellules T.
*c | Modèle humanisé. Dans ce modèle, des souris déficientes en CMH de classe II sont modifiées pour exprimer le HLA-DRB1*0402 transgénique. Après immunisation avec de la DSG3 recombinante humaine, les souris produisent des anticorps anti-DSG3 humains capables d'induire la formation de bulles dans des modèles de peau humaine (Kasperkiewicz et al., 2017).*

- ***Transfert passif***

Dans un modèle de souris néonatales (Balb/c), le transfert passif d'IgG purifiées à partir de sérums de patients atteints de PV, permet de reproduire un phénotype de pemphigus sur la souris et ainsi de confirmer la pathogénicité des auto-anticorps IgG (Anhalt et al. 1982) (Figure 19A).

Par la suite, ce modèle a permis d'étudier les médicaments qui ciblent l'interaction anticorps-antigène et les événements moléculaires observables au sein des kératinocytes. Par exemple, ce modèle a permis de montrer que le transfert passif d'IgG de patients PV à des souris déficientes en protéine C5 du complément provoque, de la même manière, l'apparition de de lésions pemhigus-like, suggérant que l'activation de la voie du complément n'est pas utile au phénomène d'acantholyse (Anhalt et al. 1986). De même, il a été démontré que des IgG4 anti-DSG1 purifiées à partir de sérums issus de patients atteints PF brésilien endémique, étaient capables d'induire des érosions cutanées de façon dose-dépendante (Rock et al. 1989b; Roscoe et al. 1985). Enfin, il existe désormais un modèle à partir de l'inoculation de cellules d'hybridome AK23 produisant des Ac monoclonaux (Acm) anti-DSG3 à des souris adultes (Tsunoda et al. 2003).

- ***Modèles de maladie active***

Des modèles de maladie active ont été élaborés afin d'étudier les mécanismes aboutissant la production d'auto-Ac mais permettant aussi d'évaluer les stratégies thérapeutiques ciblant les cellules T et B autoréactives. Initialement, le problème principal a été de faire face aux mécanismes de tolérance émergeant parallèlement à la réponse auto-immune (Figure 19B).

Pour surseoir à cet obstacle, un modèle murin à partir du transfert adoptif de splénocytes de souris DSG3 KO à des souris immunodéficientes ($Rag2^{-/-}$) mais exprimant la DSG3 a été élaboré (Amagai et al. 2000; Koch et al. 1997). Ce modèle a permis de générer une auto-immunité chez la souris receveuse du fait de l'exposition à la DSG3 endogène de celle-ci en s'affranchissant d'une tolérance préalable à la DSG3 puisque les lymphocytes transférés n'y avaient jamais été exposés au préalable. Ce modèle murin de pemphigus a aussi mis en évidence le caractère indispensable des LB et des LT CD4 à la genèse du pemphigus puisque la déplétion d'une de ces deux populations avant transfert annule la réponse auto-immune chez la souris receveuse (Aoki-Ota et al. 2004).

Des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de la DSG3 peuvent être aussi utilisées pour comprendre certains aspects des mécanismes de tolérance et spécifiquement le rôle des cellules T dans la réponse humorale et l'immunité cellulaire (Takahashi et al. 2011). Ainsi, ces LT $CD4^+$ issues de souris transgéniques provoquent un phénotype sévère de dermatose de l'interface par une infiltration de LT lorsqu'ils sont transférés chez des souris immuno-déficientes.

- ***Modèles humanisés***

Une dernière approche est celle des modèles de souris humanisées. Le plus connu et le plus utilisé à ce jour est le modèle de souris humanisée pour l'allèle de prédisposition HLA-DRB1*0402 associé au pemphigus (Eming et al., 2014) (Figure 19C). Des souris déficientes en CMH de classe II endogène murine ($I\text{-}A\beta^{-/-}$) ont été modifiées pour exprimer de manière transgénique le HLA-DRB1*0402. Après immunisation avec la DSG3 humaine recombinante, les souris transgéniques HLA-DRB1*0402 développent une réponse immunitaire dépendante des LT $CD4^+$ conduisant à la production d'IgG humains anti-DSG3. Ces Ac sont capables d'induire *in vitro* une perte d'adhésion inter-kératinocytaire et une acantholyse sur des biopsies cutanées humaines. L'introduction d'un obstacle à la communication T/B par différents Ac monoclonaux anti-CD4, anti-CD40L ou encore anti-CD20 impacte fortement la production d'IgG anti-DSG3 démontrant ainsi que l'interaction des LB et des LT est indispensable au déclenchement de la réponse auto-immune. De plus, cette reconnaissance de la DSG3 par les LT est spécifique des allèles HLA de classe II de prédisposition, puisque l'immunisation des souris transgéniques avec un peptide de la DSG3 non reconnu par le HLA-DRB1*0402 (Wucherpfennig et al. 1995) ne conduit pas à une réponse auto-immune. Ce modèle constitue donc un outil précieux pour analyser d'une part les

interactions entre LT et LB mais aussi entre les peptides de la DSG3 humains et les molécules HLA associées au PV.

D. *Rôle des auto-anticorps*

Le pemphigus est une des rares MAI pour laquelle la pathogénicité des auto-Ac a été clairement démontrée par des observations et essais cliniques (Abasq et al. 2009; Hébert et al. 2019; Joly et al. 2017) et dans les diverses études expérimentales précédemment décrites. Les recherches récentes se sont portées sur la compréhension des mécanismes pathologiques des Ac qui conduit à l'acantholyse mais également sur le rôle hypothétique des auto-Ac « non DSG » dans la survenue des lésions, et particulièrement chez les patients ayant une discordance immnuno-clinique, c'est-à-dire une maladie active malgré l'absence d'Ac anti-DSG.

a. *Les anticorps anti-desmogléine*

Les profils d'expression intra-épithéliaux de la DSG1 et de la DSG3 sont différents dans la muqueuse buccale et dans la peau (Amagai 2003; Stanley and Amagai 2006). Dans la peau, la DSG1 est exprimée dans tout l'épiderme mais plus abondamment dans les couches superficielles, alors que la DSG3 est presque exclusivement exprimée dans les couches cellulaires basales et parabasales. Dans les muqueuses, la DSG1 et la DSG3 sont toutes deux exprimées mais les taux de DSG1 sont beaucoup plus faibles que ceux de la DSG3. Le profil des auto-anticorps dirigés contre la DSG1 et la DSG3 correspond en grande partie à des caractéristiques cliniques spécifiques.

Ainsi, les patients atteints de pemphigus foliacé ne présentent essentiellement que des auto-anticorps anti-DSG1; les patients atteints de pemphigus vulgaire à dominante muqueuse ont principalement, voire uniquement, des autoanticorps anti-DSG3; tandis que ceux atteints du type de pemphigus vulgaire cutané ont à la fois des autoanticorps anti-DSG3 et anti-DSG1.

On peut trouver des anticorps IgG anti-DSG1 et anti-DSG3 circulant dans le sérum et se liant à la surface des kératinocytes de la peau et des muqueuses chez les patients atteints de pemphigus, même dans des épithéliums qui semblent normaux. Cependant, l'application d'une pression latérale sur cette peau péri-lésionnelle d'apparence normale peut induire des

bulles/érosions et une division de l'épiderme (signe de Nikolsky positif), révélant ainsi une adhésion cellulaire compromise.

b. *La théorie de la compensation*

La corrélation entre le profil d'autoanticorps et le phénotype clinique peut être expliquée physiologiquement par la théorie de la compensation de la DSG, qui repose sur la découverte que la DSG1 et la DSG3 peuvent se compenser l'une l'autre lorsqu'elles sont co-exprimées dans la même cellule et que la fonction adhésive est altérée uniquement dans l'une d'entre elles (Amagai 1999; Mahoney et al. 1999; Stanley and Amagai 2006). La théorie de compensation de la DSG fournit une base logique pour comprendre comment les auto-anticorps pathogènes induisent le phénotype des cas typiques de pemphigus vulgaire et de pemphigus foliacé (Figure 20).

Conformément à cette théorie, les toxines exfoliantes produites par Staphylococcus aureus en cas de syndrome d'épidermolyse staphylococcique ou d'impétigo bulleux, clivent spécifiquement la desmogléine 1 et ne provoquent ainsi que des bulles superficielles cutanées, la muqueuse buccale étant épargnée du fait de l'expression de niveaux élevés de DSG3.

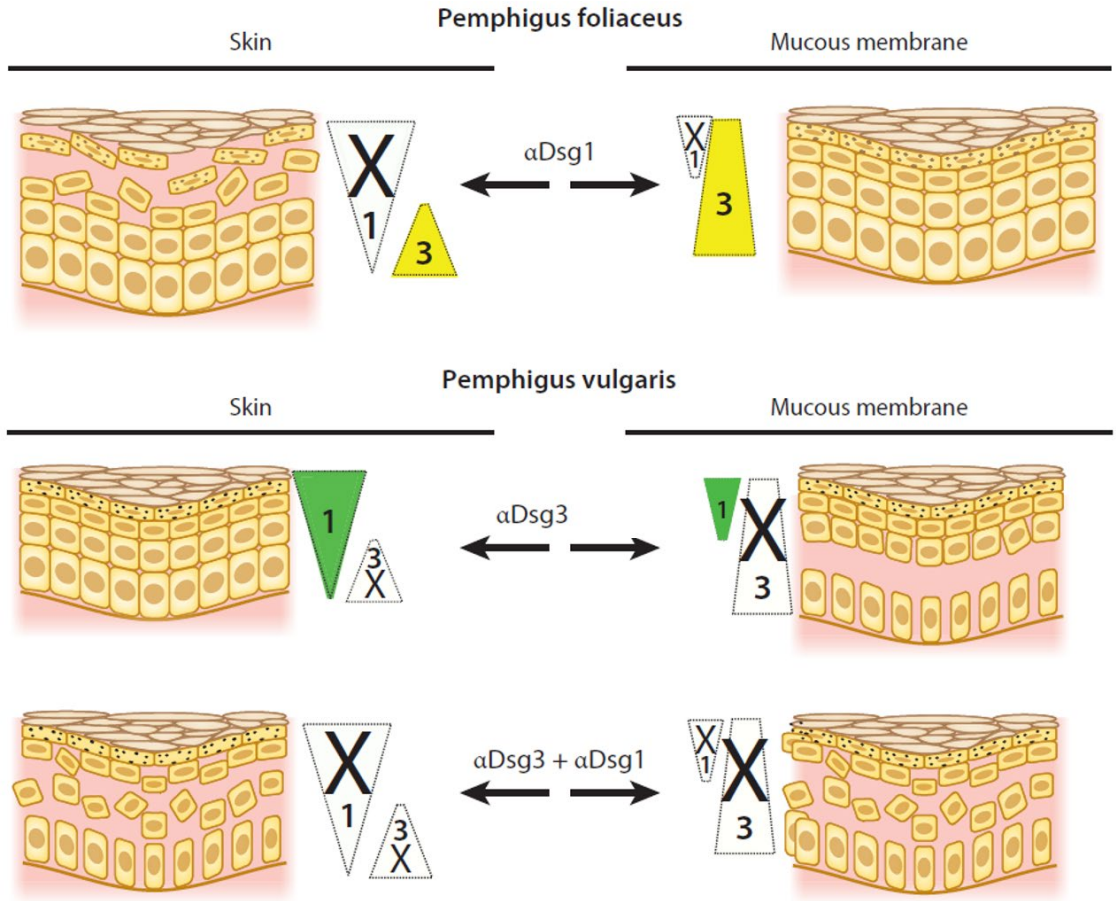


Figure 20 : La théorie de la compensation de la desmogléine et les sites de formation des bulles dans le pemphigus
1 signifie desmogléine (DSG) 1 et 3 signifie DSG3. L'antigène du pemphigus foliacé, la DSG1, est principalement exprimé dans l'épiderme supérieur tandis que l'antigène du pemphigus vulgaire, 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 (Hammers and Stanley, 2016).

c. *Détail des anticorps anti-desmogléine*

Bien que les concentrations sériques d'IgG anti-DSG soient généralement corrélées à l'activité du pemphigus, certains patients présentent une rémission clinique en gardant des titres d'IgG anti-DSG élevés, ce qui reflète l'existence d'Ac anti-DSG non pathogènes (Abasq et al. 2009b; Belloni-Fortina et al. 2009). Ces IgG anti-DSG non pathogènes ont également été détectés chez des parents au premier degré de patients PV (Kricheli et al. 2000). Les études sur le *fogo selvagem*, précédemment décrites, ont établi un lien entre la pathogénicité des Ac et leurs caractéristiques isotypiques et antigéniques. Ainsi, les individus sains vivants en zone endémique

présentent des IgG1 dirigées contre le domaine EC5 de la DSG1 alors que les malades présentent des IgG4 réactives aux domaines EC1/EC2 de la DSG1 (Culton et al. 2008).

- ***Les isotypes d'immunoglobulines***

Comme évoqué précédemment, les modèles murins de pemphigus ont montré que les auto-Ac anti-DSG pouvaient agir indépendamment de l'activation du voie du complément (Anhalt et al. 1986). En effet, les fragments d'Ac monovalents (Fab), bivalents (Fab'2) ou monocaténaires recombinants (scFV : *single chain variable fragment*) des IgG spécifiques des DSG sont capables d'induire la dissociation des kératinocytes *in vitro* et *in vivo* (España et al. 1997; Payne et al. 2005; Rock et al. 1989b). Par conséquent, le fragment Fc des Ac pathogènes du pemphigus ne semble avoir qu'une importance mineure.

Quant au profil sérologique des patients, il montre essentiellement la présence d'IgG4 et IgG1 (96% et 76%, respectivement) en phase active de la maladie, contre environ 10 à 20% concernant les autres sous classes IgG2 et des IgG3 (Futei et al. 2001; Jones et al. 1988) alors que les autres isotypes IgE et/ou IgA sont rarement retrouvés (Nagel et al. 2010a; Spaeth et al. 2001).

Fait intéressant, les IgG4 sont, à l'état physiologique, la plus petite fraction (< 5%) des IgG et présentent de faibles propriétés d'activation du complément ou des leucocytes (Tao et al. 1993). Considérée comme immunologiquement inerte (Figure 21), l'IgG4 est d'ordinaire associée à une fonction anti-inflammatoire survenant généralement après une exposition chronique à l'antigène (Aalberse et al. 1983). Sa production est stimulée par les cytokines de polarisation Th2 telles que l'IL-4, l'IL-13 mais également par l'IL-21 ou la cytokine immuno-régulatrice IL-10 (Cho et al. 2015). Sa pathogénicité passe en général par le blocage des interactions protéine/antigène cible (Aalberse et al. 1983).

	Sérum (%)	Structure	Fixation au Complément	Opsoniation	Passage placentaire	Autres fonctions	Récepteur Fc
IgG	75%	Monomère	Oui	Oui	Oui	Réponse secondaire/ Neutralisation des toxines et des virus	$Fc\gamma R$ I, II, III
IgG1	67% d'IgG	Monomère	Oui +	Oui +++	Oui ++		$Fc\gamma R$ I, II, III
IgG2	22% d'IgG	Monomère	Oui +	Oui +/-	Oui +/-		$Fc\gamma R$ II
IgG3	7% d'IgG	Monomère	Oui ++	Oui +++	Oui ++		$Fc\gamma R$ I, II, III
IgG4	4% d'IgG	Monomère	Non	Non	Oui ++		$Fc\gamma R$ I, II

Figure 21 : Structures et fonctions des différents isotypes d'IgG

L'effet pathogène de l'IgG4 dans le PV a été prouvé dans le modèle murin de transfert passif (Rock et al. 1989). *In vitro*, l'IgG4 est plus pathogène que les autres fractions d'IgG sériques et sa déplétion des sérums réduit leurs effets pathogènes (Funakoshi et al. 2012). Ainsi, la liaison des auto-Ac peut directement compromettre la fonction desmosomale. Néanmoins, les IgG1 dirigées contre la DSG1 ou 3 peuvent également contribuer à la pathogénicité via un encombrement également, suggérant que l'IgG4 n'est pas l'entité pathogène exclusive (Lo et al. 2016).

A propos de la variation des isotypes en fonction du statut clinique des patients, les résultats divergent dans la littérature. Alors que des travaux ont montré une évolution isotypique avec une proportion croissante d'IgG1 en phase de rémission (Ayatollahi et al. 2004a; Bhol et al. 1995; Spaeth et al. 2001), d'autres travaux n'ont pas retrouvé un tel résultat (Dhandha et al. 2012; Futei et al. 2001). En revanche, les isotypes IgE et IgA des Ac anti-DSG semblent être associés uniquement à la phase active de la maladie (Nagel et al. 2010a; Spaeth et al. 2001).

- ***La spécificité antigénique***

L'étude des Ac anti-DSG au cours du pemphigus a permis de renseigner certaines de leurs propriétés (Amagai et al. 1995; Bhol et al. 1995). Ces travaux ont démontré que la réponse anti-DSG est polyclonale avec des Ac ayant des propriétés distinctes. Il a pu être réalisé une cartographie des épitopes immuno-dominants grâce à des protéines chimériques de la DSG1 et de la DSG3, montrant ainsi que que les Ac anti-DSG se lient préférentiellement aux épitopes N-

terminaux des domaines EC1 et EC2 dont la conformation est dépendante du Ca^{2+} (Figure 22) (Didona and Di Zenzo 2018).

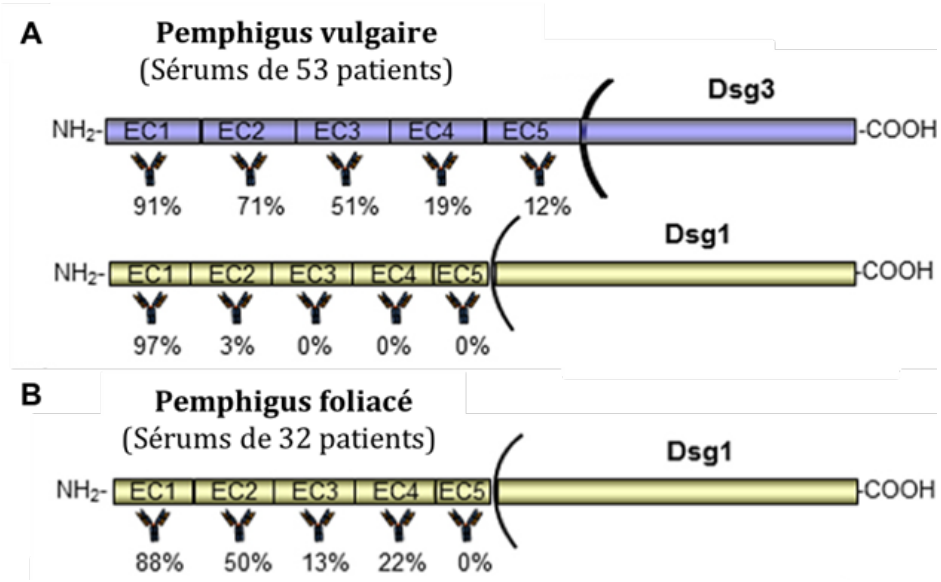


Figure 22 : Régions antigéniques ciblées par les anticorps anti-DSG
Représentation schématique des régions antigéniques reconnues par les auto-anticorps sériques des patients atteints de pemphigus vulgaire (A) ou de pemphigus foliacé (B) au moment du diagnostic. Le pourcentage exprimé représente le pourcentage relatif de réactivité (Didona and Di Zenzo 2018; Ohyama et al. 2002).

La purification d'Acm issus des modèles murins puis de patients atteints de pemphigus a permis d'établir leur pathogénicité en évaluant leur capacité à provoquer l'acantholyse *in vitro* et *in vivo*. En utilisant le modèle murin de PV généré par immunisation d'une souris DSG3 KO, l'inoculation des splénocytes dans un modèle de souris myélomateuse a permis de générer plusieurs dizaines d'hybridomes produisant des Acm murins anti-DSG3. Parmi eux, l'Acm murin AK23 présente une activité hautement pathogène en se liant à la partie N-terminale du domaine EC1 de la desmogléine 3 (Tsunoda et al. 2003).

Les premières analyses du répertoire B auto-réactif de patients ont pu ensuite être réalisées grâce à la production d'un certain nombre d'Acm pathogènes et non pathogènes humains anti-DSG sous forme de fragment d'scFV via la méthode des « *phage display* », à partir de cellules mononuclées du sang périphérique isolés de patients atteints de PV ou de PF (Ishii et al. 2008; Payne et al. 2005). En utilisant des LB immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (EBV), l'équipe de Di Zenzo a caractérisé des Acm anti-DSG3 pathogènes de patients atteints de pemphigus

(Zenzo et al. 2012). Les épitopes pertinents identifiés dans les modèles murins ont été confirmés et l'activité pathogène de ces Acm humains est liée, là aussi, à la reconnaissance de la région N-terminale du domaine EC1 (Yeh et al. 2006).

Les études cristallographiques et biochimiques des cadhérines classiques ont montré que les domaines EC1 et EC2 constituent l'interface adhésive assurant les interactions *trans* et *cis* et que les Acm anti-DSG pathogènes de patients ou de l'hybridome AK23 se lient directement aux résidus qui interviennent dans l'interface adhésive (Figure 23) (Boggon et al. 2002). C'est cette reconnaissance antigénique qui conduit à un encombrement stérique de l'interaction des cadhérines desmosomales qui d'une part perturbe l'adhérence du desmosome et d'autre part, déclenche une signalisation intracellulaire aboutissant à la déstabilisation/internalisation des desmogléines (Zenzo et al. 2012).

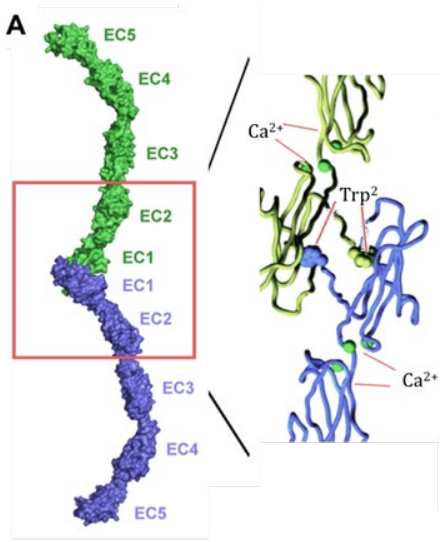


Figure 23 : Modélisation de l'interface d'adhésion des domaines extracellulaires des cadhérines et des épitopes ciblés par des anticorps pathogènes anti-DSG3
Analyse cristallographique de l'interface d'adhésion entre les domaines extracellulaire (EC) N-terminaux des cadhérines classiques avec un agrandissement de l'interaction des domaines EC1-2. Les sphères vertes représentent les ions calcium (Ca^{2+}) permettant aux domaines EC des cadhérines d'adopter une conformation rigidifiée et fonctionnelle (Boggon et al. 2002; Zenzo et al. 2012).

Néanmoins, les Acm décrits comme non pathogènes peuvent contribuer à la pathogénicité par un effet synergique. En effet, lorsque des hybridomes d'Acm murins reconnaissant différents épitopes à l'extérieur de l'interface adhésive ont été inoculés en combinaison, les souris immunodéficientes $Rag2^{-/-}$ receveuses ont développé un phénotype pemphigus (Kawasaki et al.

2006). Ainsi, tous les Ac anti-DSG ont un potentiel pathogène à travers la réticulation de l'antigène ou d'autres mécanismes induisant une signalisation (Saito et al. 2012; Yoshida et al. 2017).

L'étude des Ac de patients pemphigus par spectrométrie de masse a confirmé la polyclonalité de la réponse anti-DSG. Cependant, certains clones de LB dominants produisent la plus grande partie des Ac circulants chez chaque patient (Chen et al. 2017a) et ceux-ci peuvent persister pendant des années avec des variations dans leur répartition. Ainsi, ceci peut en partie expliquer que les titres des Ac anti-DSG en ELISA ne soient pas toujours corrélés à la sévérité clinique (Hammers et al. 2018).

- ***Les anticorps non anti-desmogléine***

D'après les moodèles expérimentaux, il est suggéré que la concentration d'autoanticorps anti-DSG1 et DSG3 est probablement beaucoup plus élevée que la concentration *in vivo* chez les patients. Cela suggère la possibilité que, chez les patients, des auto-anticorps ciblant d'autres antigènes soient également nécessaires pour provoquer la maladie. Un certain nombre de cas de PV aiguës avec des anticorps anti-kératinocytes positifs par immunofluorescence directe et/ou indirecte mais des DSG1 et DSG3 négatifs par ELISA ont été rapportés, ce qui indique que le niveau d'anticorps anti-DSG circulants n'est pas suffisamment détectable dans ces cas ou que des anticorps non-DSG peuvent à eux seuls être responsables du développement de la maladie.

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

Contrairement aux auto-anticorps ciblant DSG1 et DSG3, la capacité pathogène des anticorps non anti-desmogléine reste incertaine. Le développement d'immuno-adsorbeurs spécifiques de DSG1 et DSG3 semble être une approche rationnelle pour l'étude du sérum des patients atteints de pemphigus présentant une forte activité de la maladie (Langenhan et al. 2014). Cependant, il a été démontré que les fractions d'autoanticorps dépourvues d'autoanticorps dirigés contre DSG1 et DSG3 peuvent être pathogènes et que les fractions IgG comprenant ces anticorps peuvent provoquer la perte de cohésion dans des conditions où la DSG3 n'est pas présente (Nguyen

et al. 2000). Sur la base de ces résultats, il a été proposé qu'une combinaison de différents auto-anticorps puisse être nécessaire au développement du pemphigus, au moins chez certains sous-ensembles de patients. Cependant, d'autres études fonctionnelles utilisant des KO, des anticorps monoclonaux dérivés de patients pemphigus ou des modèles murins de pemphigus ciblant un seul antigène non-Dsg ou non-Dsc font défaut à l'heure actuelle et seraient certainement nécessaires pour établir la pertinence des auto-anticorps non-Dsg/Dsc. Seuls les antigènes pour lesquels les auto-Ac ont fait la preuve d'une éventuelle pathogénicité possible sont décrits.

Les desmocollines

Les desmocollines sont des cadhérines dépendantes du calcium qui jouent un rôle important dans l'adhésion de cellule à cellule de par leur liaison avec les desmogléines afin de structurer le desmosome.

Un exemple, bien que rare, est le pemphigus Dsc3, dans lequel les auto-anticorps ciblant Dsc3, même en l'absence d'anticorps dirigés contre DSG1 ou DSG3, se sont avérés pathogènes *in vitro* et *in vivo* (Mao et al. 2010a; Rafei et al. 2011; Spindler et al. 2009). En accord avec cela, des souris déficientes en Dsc3 ont développé un phénotype de PV sévère (Chen et al. 2008). L'ensemble de ces données suggère la nécessité et la suffisance des anticorps ciblant la Dsc3, au moins dans ces rares cas de PV. Selon les études, la prévalence d'Ac anti-Dsc oscille entre 2 et 20% chez les patients atteints de PV ou PF (Kalantari-Dehaghi et al. 2013b).

Les récepteurs cholinergiques

L'épiderme humain possède un système cholinergique non neuronal faisant intervenir des enzymes kératinocytaires impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'acétylcholine (ACh), et des récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'acétylcholine (AChR). Les voies de signalisation de ces récepteurs activent ou inhibent des cascades de kinases régulant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire telles que les cadhérines et les intégrines (Grando 2006).

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (mAChR) sont des glycoprotéines transmembranaires dont certains contrôlent les niveaux intracellulaires de Ca2+ dans le kératinocyte. Des expériences in vitro ont montré que l'activation des mAChR peut prévenir, arrêter et inverser l'acantholyse médiée par les anticorps du pemphigus (Grando and Dahl 1993). Des auto-anticorps contre les mAChR ont été identifiés dans le sérum de 85 à 100 % des patients

atteints de pemphigus (Nguyen et al. 2000c). Une étude sérologique prospective sur 45 patients atteints de pemphigus suivis longitudinalement pendant 15 mois a étudié la corrélation entre les titres d'Ac anti DSG1/DSG3, anti-récepteur de l'ACh de type 3 (anti-M3 mAChR) et la sévérité de la maladie. Ils ont constaté que les titres d'anticorps étaient significativement corrélés à l'activité de la maladie et que les anticorps anti-M3 mAChR étaient présents dans tous les cas (Lakshmi et al. 2017).

Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (NAChR) sont des membres de la superfamille des protéines de canaux ioniques et sont présents à la surface des kératinocytes mais aussi sur la membrane externe des mitochondries. Ils peuvent contrôler diverses voies induisant l'apoptose intrinsèque (Lykhmus et al. 2014). De plus, les Ac de patients atteints de PV sont capables de se lier aux nAchR à la membrane cellulaire et mitochondriales et peuvent déclencher la voie apoptotique impliquée dans l'acantholyse (Chernyavsky et al. 2015) (Figure 24).

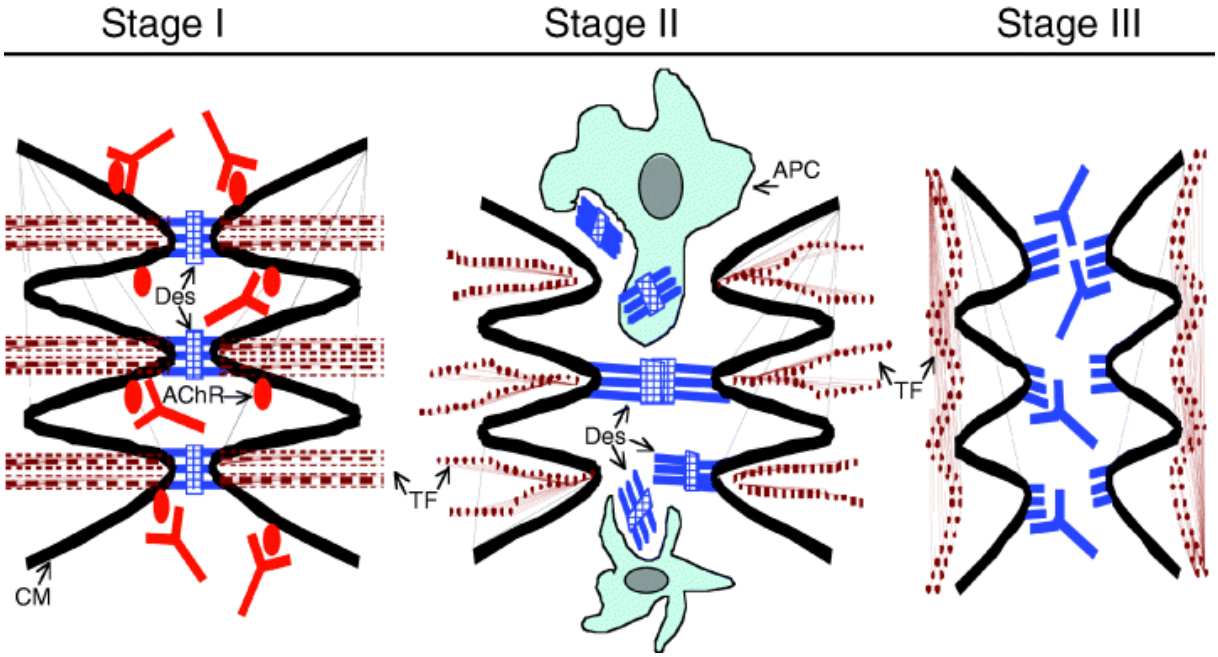


Figure 24 : Schéma hypothétique de l'évolution temporelle des événements pathogènes conduisant à l'acantholyse dans le pemphigus
Au stade I, les anticorps dirigés contre les récepteurs cellulaires de l'acétylcholine (ACh) bloquent la signalisation de l'ACh qui maintient la forme polygonale des cellules et l'adhésion intercellulaire. Cela augmente la phosphorylation des molécules d'adhésion avec leur dissociation ultérieure des unités d'adhésion et initie également la mort cellulaire programmée via les voies apoptotiques et/ou oncotiques.
Au stade II, le cytosquelette s'effondre et les kératinocytes rétrécissent, ce qui s'accompagne d'un décollement des morceaux de membrane cellulaire contenant les cadhérines desmosomales, ce qui déclenche une réponse auto-immune aux antigènes de la desmogléine.
Au stade III, les anticorps anti-desmogléine se fixent à leurs cibles sur la membrane cellulaire des kératinocytes, empêchant ainsi la formation de nouvelles jonctions intercellulaires.

(Chernyavsky et al. 2015).

Les protéines mitochondriales

Les protéines mitochondriales jouent un rôle important dans la fonction cellulaire. Les patients atteints de pemphigus présentent des Ac qui pénètrent dans les kératinocytes *via* les FcR néonataux (Chen et al. 2015) et réagissent contre une grande variété de protéines mitochondriales (Kalantari-Dehaghi et al., 2011, 2013). Le rôle pathogène de ces Ac anti-mitochondriaux dans le PV a été illustré par une réduction de l'activité acantholytique *in vitro* et *in vivo* après leur adsorption des IgG de patients atteints de PV (Marchenko et al. 2010). La pathogénicité induite par ces auto-Ac est également étayée par la diminution des lésions chez les souris traitées par des médicaments protecteurs des mitochondries (Kalantari-Dehaghi et al., 2013b). Enfin, ces Ac anti-mitochondriaux peuvent induire des événements pro-apoptotiques entrainant la libération du cytochrome C et l'activation de la caspase-9 (Kalantari-Dehaghi et al. 2013c; Marchenko et al. 2010). Au total, le déclenchement des voies intrinsèques de la mort cellulaire par les Ac anti-mitchondiaux peut compléter les actions pro-acantholytiques des autres auto-Ac concourant à l'apparition des lésions.

SPCA1

Le gène ATP2C1 code pour l'enzyme SPCA1 qui est une protéine Mg2+-dépendante jouant un rôle dans le transport du Ca2+ intracellulaire. Cette pompe Ca2+ est exprimée dans l'appareil de Golgi et est impliquée dans le transport des ions calcium et manganèse du cytosol vers la lumière du Golgi. Les mutations du gène ATP2C1 entraînent une déplétion des réserves de Ca2+ dans le Golgi et une augmentation du Ca2+ dans le cytosol. Une faible concentration de Ca2+ dans le Golgi pourrait nuire au traitement post-traductionnel d'importantes protéines desmosomales telles que DSG et Dsc. En conséquence, l'acantholyse se développe. De telles mutations ont été retrouvées dans la maladie de Hailey-Hailey, dermatose acantholytique comme le pemphigus. Compte tenu des similitudes dans le phénotype clinique et du rôle de la désadhésion cellulaire dans ces deux maladies, il est tentant de suspecter que les auto-anticorps anti-SPCA1 puissent jouer un rôle actif dans le PV.

Des auto-anticorps contre la SPCA1 sont observés chez 43% des patients atteints de PV, contre 8 % chez les témoins appariés (Kalantari-Dehaghi et al. 2013b). Chernyavsky et al. ont récemment démontré que le transfert passif d'IgG anti-Dsc, anti-récepteur muscarinique de type 3

(CHRM3) et anti-SPCA1 pouvait induire un phénotype de pemphigus en synergie, et ce, sans anticorps ciblant les DSG (Chernyavsky et al. 2019). Un modèle de peau humaine *in vitro* exposée à des anti-CHRM3 et anti-SPCA1 a aussi développé une acantholyse. Des travaux menés par notre équipe sont en cours afin de préciser le rôle des Ac anti-SPCA1 dans la pathogénicité du pemphigus.

6. *La réponse immunitaire au cours du pemphigus*

Nous avons montré précédemment qu'il était clairement établi que la perte de fonction desmosomale, et donc l'acantholyse, était directement liée à la fixation des auto-Ac sur les desmogléines. Cependant, l'émergence d'auto-Ac anti-DSG n'est que la conséquence d'une perte de tolérance constituée d'une cascade d'évènements majeurs parmi lesquels i) la présentation antigénique aux LT, ii) l'activation et la différenciation des LT auxiliaires (Th : *T helper*) et T folliculaires auxiliaires (Tfh : *T follicular helper*) puis iii) l'interaction T/B conduisant à iv) l'activation et la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'auto-Ac pathogènes (Figure 25).

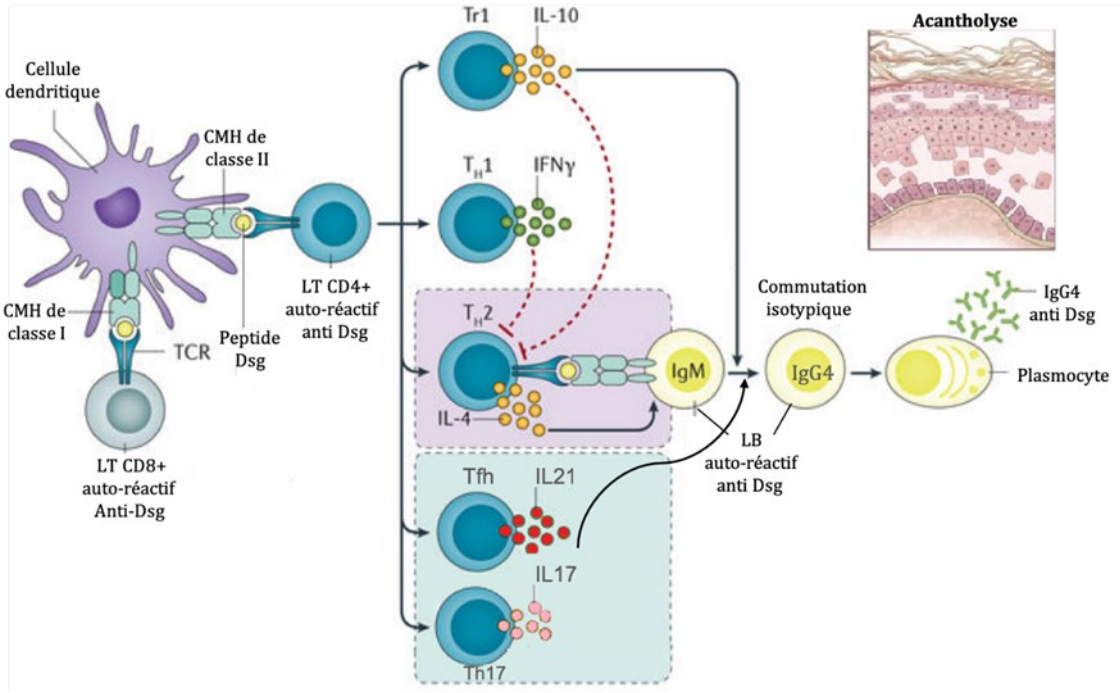


Figure 25 : Schéma simplifié des mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie du pemphigus
Schéma de la réponse auto-immune humorale conduisant à de la production d'auto-anticorps (Ac) et à l'acantholyse dans le pemphigus. La présentation des peptides antigéniques dérivés des DSGes (DSG) 1

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

A. *Rôle de l'immunité innée*

a. *Les kératinocytes*

En plus de leur rôle primordial dans la fonction de barrière physique de la peau, les kératinocytes constituent une défense immunologique toute aussi importante (Nestle et al. 2009). Ils possèdent des PRR (*pattern recognition receptor*) qui leurs permettent de moduler l'environnement chimique et cellulaire de la peau. Ils produisent certaines cytokines ou chimiokines de manière constitutive ou induite ce qui leur permet de moduler la réponse immunitaire (Noske 2018). A l'état physiologique, les kératinocytes n'expriment pas le CMH de classe II mais sa présence a été observée dans certaines conditions inflammatoires et notamment dans le pemphigus (Nickoloff and Turka 1994, Picut et al. 1987). Ainsi, les kératinocytes participent probablement à l'activation locale des LT par la présentation antigénique mais leur rôle précis reste à déterminer.

b. *Les cellules présentatrices d'antigène*

La peau est un organe très riche en CPA professionnelles qui jouent un rôle clé dans la spécialisation de l'immunité adaptative. Les DC ainsi que le sous-groupe des cellules de Langerhans constituent les principales populations de CPA dans l'épiderme. Les CPA de la peau sont très dynamiques et peuvent circuler depuis la peau vers les tissus et les ganglions lymphatiques drainants via la circulation sanguine (Kim et al. 2001). Elles permettent alors

l'activation, la stimulation et la polarisation des LT via: i) l'interaction entre le complexe CMH/peptide et le TCR/CD3 ii) les molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) qui vont se lier à leurs ligands correspondants (CD28, CD40L) et iii) la production cytokinique. Tout ceci aboutit à une expansion clonale des cellules effectrices spécifiques de l'antigène capables de migrer vers l'épiderme (Jung 2004).

Outre leur rôle immunogène primordial, les DC peuvent aussi avoir un rôle dans la tolérance périphérique. Leur rôle est dépendant de l'état de maturation et/ou d'activation de la DC présentant l'antigène (Lutz and Schuler 2002). Ainsi, une expression insuffisante des molécules de co-stimulation peut aboutir à l'anergie des LT auto-réactifs (Khan and Ghazanfar 2018).

Le rôle des CPA dans le pemphigus est mal connu. Il a cependant été montré que les patients pemphigus présentaient un infiltrat inflammatoire plus riche en DC que dans la peau saine (Chiossi et al. 2004; Petzelbauer et al. 1993). Comme évoqué précédemment, des essais *in vitro* ont démontré que les CPA de patients mais également d'individus sains HLA-DRB1*0402 peuvent apprêter la DSG3 et activer les Th, soulignant ainsi l'importance du type de CMH de classe II (Hertl et al. 1998b). Enfin, il a été démontré que des LT $CD4^+$ de patients pemphigus peuvent proliférer en présence de lymphocytes NK exprimant les molécules du CMH de classe II et le peptide de la DSG3 (Stern et al. 2008; Takahashi et al. 2007). Ces observations préliminaires soulignent l'importance des cellules de l'immunité innée dans le contrôle du devenir de la réponse adaptative auto-immune dans le pemphigus.

B. *Rôle de l'immunité adaptative*

a. *Les lymphocytes T dans le pemphigus*

Naturellement, du fait des phénomènes de tolérance centrale et périphérique, les LT ne devraient pas réagir pas contre les auto-antigènes. Pourtant, des LT spécifiques autoréactifs ont été détectés dans le sang de patients pemphigus mais aussi de porteurs sains exprimant le HLA-DRB1*0402 (Hertl et al., 1998b). Ces clones T auto-réactifs reconnaissent un ensemble limité de peptides de la DSG3 situés dans les domaines EC de la DSG3, associés aux HLA-DRB1*0402 et HLA-DQB1*0503 (Veldman et al. 2004a).

Bien que la DSG1 (Mouquet et al., 2008) et la DSG3 (Skogberg et al. 2015) soient exprimées dans le thymus, des LT auto-réactifs échappent au mécanisme de délétion thymique et sont présents en périphérie chez les patients mais également chez certains individus sains. La

tolérance centrale par délétion clonale étant imparfaite et incomplète, la neutralisation des LT auto-réactifs repose sur la tolérance périphérique.

La présentation des peptides par les CPA ainsi que l'environnement cytokinique conduisent les Th auto-réactifs naïfs à se polariser en cellules effectrices selon certaines sous-populations. Celles-ci sont définies selon des phénotypes et des fonctions spécifiques (O'Shea and Paul 2010) (Figure 26). Au cours du pemphigus, l'implication des lymphocytes T CD4$^+$ Th1 et Th2 est plus décrite mais les Treg et plus récemment les Th17 et les LT folliculaires *Helper* (Tfh) semblent avoir une importance jusqu'alors sous-estimée (Hertl et al. 2006; Holstein et al. 2021; Kim et al. 2020a; Maho-Vaillant et al. 2021; Pan et al.).

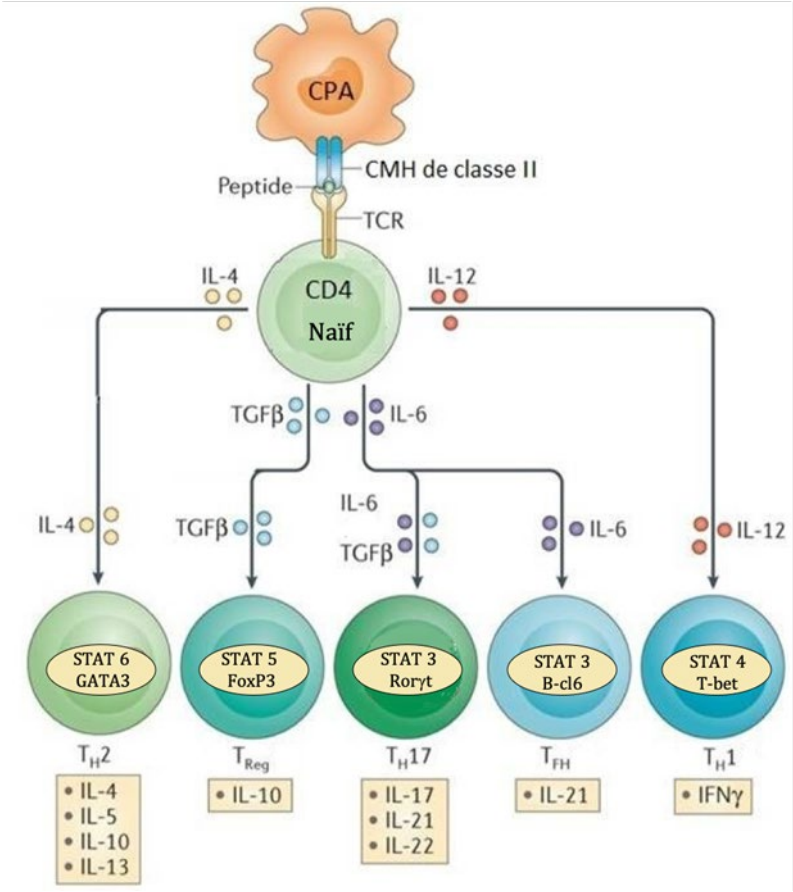


Figure 26 : Différenciation des lymphocytes CD4$^+$ naïfs
Représentation schématique de la polarisation des lymphocytes T Helper (Th). Selon l'environnement cytokinique conditionné par la cellule présentatrice d'antigène (CPA), le LT CD4$^+$ naïf se différencie en Th de type Th1, Th2, Th17, Tfh ou Treg. Chaque Th est associé à l'expression d'un facteur de transcription « signature » et est caractérisé par un profil de sécrétion de cytokines distinctes. Bcl6 : B-cell lymphoma 6 ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité humain ; Foxp3 : Forkhead box P3 ; GATA3 : GATA binding protein 3 ; IFN : interféron ; IL : interleukine ; Rorγt : Retinoid related orphan receptor γ thymus ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; Tbet : T-box transcription factor ; TCR : T cell receptor ; Tfh : lymphocyte T follicular helper ; TGF : transforming growth factor ; TNF : Tumor necrosis factor ; Treg : Lymphocyte T régulateur.

- ***Polarisations Th1 et Th2***

L'équilibre Th1/Th2 sembler jouer un rôle crucial dans les réponses immunitaires. Un environnement riche en IL-12 et IFN-γ induit une polarisation de type Th1 sous la dépendance des facteurs de transcription T-bet (*Tbox transcription factor*) et STAT4 (*Signal transducer and activator of transcription*). Les Th1 orchestrent la réponse immune à médiation cellulaire responsable de l'activation des macrophages et des LT $CD8^+$ cytotoxiques, privilégiée dans les réponses anti-tumorales ou antivirales. Les Th1 produisent de l'IL-2, de l'IFN-γ et du TNF-α et expriment les récepteurs aux chimiokines CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) et CXCR3 (*C-X-C chemokine receptor type 3*).

A l'inverse, un environnement riche en IL-4 oriente vers la voie Th2 sous la dépendance des facteurs de transcription STAT5 et GATA3 (*GATA binding protein 3*). Les Th2 favorisent la réponse immunitaire humorale privilégiée lors des réponses contre des pathogènes extracellulaires, en particulier dans la lutte antiparasitaire mais également dans les réactions allergiques. Les Th2 expriment le récepteur de chimiokines CCR4 (*C-C chemokine receptor type 4*) et vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5, de L'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Luckheeram et al., 2012 ; Zhu and Paul, 2008).

Si les prédispositions HLA au pemphigus contribuent à la reconnaissance des DSG et à l'émergence des LT auto-réactifs chez les patients atteints de pemphigus et chez les individus sains, Veldman a démontré que les LT auto-réactifs dirigés contre la DSG3 présentent une réponse de type Th1 chez les individus en bonne santé, différente de celle des patients atteints de PV qui est à prédominance Th2 (Veldman et al. 2003). La réponse Th2 semble donc avoir un rôle dans la pathogenèse du pemphigus, comme en témoigne l'étude immunohistochimique des infiltrats lymphocytaires et l'étude de l'expression des gènes des cytokines dans des lésions de PV et de PF (Caproni et al. 2001; Santi and Sotto 2001). La majorité des études réalisées sur les profils cytokiniques ont également souligné une régulation à la hausse de la voie Th2, avec une augmentation des taux sériques d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-10 chez les patients pemphigus par rapport aux contrôles et une diminution du taux d'IFN-γ associée au profil Th1 (Bhol et al. 2000; D'Auria et al. 1997; Lee et al. 2017; Satyam et al. 2009). Le modèle murin de pemphigus va également dans ce sens avec une prédominance de la réponse Th2 et de la cytokine IL-4 (Takahashi et al. 2009; Takahashi et al. 2008).

Ces LT auto-réactifs contribuent, par les signaux tels que les cytokines et les molécules de co-stimulation, à l'activation des LB naïfs auto-réactifs agissant alors comme CPA, leur différenciation en LB mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Le rapport Th1/Th2 influence également la commutation isotypique des Ig. En effet, les cytokines Th1 tels que l'IFN-γ favorisent la commutation vers l'istotype IgG1 tandis que les cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 favorisent la commutation vers l'isotype IgG4 qui est associé à la pathogénicité des Ac anti-DSG (Armitage et al. 1993). Des travaux ont montré que l'activité des LT Th2 anti-DSG3 était liée à l'activité du pemphigus et aux taux d'Ac anti-DSG3 (Rizzo et al. 2005). Ainsi, pendant la phase aiguë de la maladie, le rapport Th1/Th2 est le reflet d'un déséquilibre de la réponse immunitaire. Cette balance évolue au cours des phases de rémission ou de rechute (Zhu et al. 2012).

- ***Les LT régulateurs***

Les Treg jouent un rôle clé dans la tolérance périphérique. Les Treg peuvent être divisés en deux sous-groupes : i) les Treg naturels qui sont sélectionnés par des interactions de haute affinité dans le thymus (*tTreg*) ; ii) les Treg induits qui sont issus de la différenciation des LT $CD4^+$ naïfs à la périphérie (*pTreg*) après une présentation antigénique et sous l'influence de l'IL-10 et du TGF-β (*transforming growth factor β*). Ces deux sous-ensembles de Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 ainsi que la molécule CD25, sous-unité du récepteur de l'IL-2. Les Treg peuvent exercer une action répressive sur les LT $CD4^+$ et $CD8^+$, les NK ou les LB. Cela passe par la production de cytokines immuno-suppressives telles que l'IL-10 et le TGF-β ou du contact cellulaire par le biais de molécules immuno-modulatrices comme CTLA-4 (Zhao et al., 2017). Il existe un troisième sous-ensemble de Treg appelés les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) exprimant les molécules CD4+$CD25^{fort}$FOXP3- et sécrétant de l'IL-10 (Roncarolo et al. 2006).

La fonction régulatrice est fréquemment impactée dans les maladies auto-immunes (Alice Long and Buckner 2011). Chez les patients PV, les analyses par cytométrie en flux ont révélé que la proportion de Treg $CD4^+$ $CD25^{fort}$ était diminuée par rapport aux témoins sains (Sugiyama et al. 2007). Des Tr1 spécifiques de la DSG3 ont été retrouvés chez des témoins sains porteurs des HLA de classe II associés au PV, capables de réguler la réponse des LT auto-réactifs. De plus, ces Tr1 spécifiques de la DSG3 n'ont été que rarement détectés chez les malades (Veldman et al. 2004b). L'observation d'un *ratio* Th2/Tr1 fort chez les patients atteints de PV et d'un *ratio* faible chez les témoins sains suggère qu'il peut exister un équilibre physiologique entre les Th2 et les Tr1

spécifiques de la DSG3 nécessaire au maintien de la tolérance périphérique (Veldman et al. 2006). Récemment, un travail de notre équipe a montré que les patients atteints de PV qui rechutaient précocement après utilisation de rituximab avaient un taux de Treg au moment du diagnostic significativement plus bas que les patients qui allaient maintenir une rémission complète (Mignard et al. 2020).

La modulation des Treg constitue donc une piste thérapeutique pertinente. Celle-ci a d'abord été étudiée d'après le modèle murin de pemphigus par transfert de splénocytes de souris DSG3-KO immunisées à la DSG3. Yokoyama et al. ont montré que le transfert adoptif de Tregs et la déplétion des Tregs endogènes ont supprimé et augmenté, respectivement, la production d'anticorps anti-DSG3 (Yokoyama et al. 2011). Dans une autre étude, dans un modèle de souris transgénique HLA-DRB1*04:02 de PV, les cellules Treg périphériques ont été modulées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dépléteurs ou expanseurs (superagoniste CD28) de Treg, respectivement. Les résultats montrent que, *in vivo*, bien que non significatif, les Treg exercent un effet régulateur sur la réponse des cellules T induite par la DSG3 et, par conséquent, sur la formation d'anticorps IgG spécifiques de DSG3 (Schmidt et al. 2016a).

- ***Les Th 17***

Les Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22 et l'expression du facteur de transcription RORγt ainsi que des récepteurs aux chimiokines CCR6 et CCR4 (Harrington et al. 2005). La polarisation vers la voie Th17 est sous l'influence d'un réseau de cytokines comprenant principalement le TGF-β, l'IL-1β et l'IL-6. Les Th17 présentent des propriétés pro-inflammatoires marquées et jouent un rôle important dans la réponse immune lors d'infections bactériennes et fongiques (Li et al. 2018a).

Certains travaux suggèrent l'implication de la voie Th17 dans la pathogenèse du pemphigus. Ceux-ci ont montré i) une augmentation de la fréquence des Th17 dans le sang des patients pemphigus par rapport aux témoins (Hennerici et al. 2016; Holstein et al. 2021; Xu et al. 2013b) : ii) une augmentation des expressions géniques de RORγt et de CCR6 dans le sang mais aussi dans les biopsies cutanées des patients atteints de PV par rapport aux témoins (Asothai et al. 2015) ; iii) une accumulation de lymphocytes producteurs d'IL-17 dans la peau, en immunohistochimie, sur biopsies de lésions de pemphigus (Arakawa et al. 2009; Holstein et al. 2021) et iv) une augmentation des taux sériques d'IL-17 et d'IL-21 chez les patients atteints de pemphigus (Asothai et al. 2015; Holstein et al. 2021; Maho-Vaillant et al. 2021; Timoteo et al.

2017). Alors que les taux d'IL-17 n'étaient pas corrélés aux titres des auto-Ac (Żebrowska et al., 2017) , les taux d'IL-21 l'étaient (Maho-Vaillant et al. 2021).

Les mécanismes d'action des Th17 dans le pemphigus sont mal connus. L'hypothèse chez la souris selon laquelle les Th17 pourraient participer à la prolifération des LB et influencer la commutation isotypique des Ig (Mitsdoerffer et al. 2010; Patakas et al. 2012) a récemment été renforcée chez l'homme par Holstein et al (Holstein et al. 2021).

- ***Les Tfh***

Les Tfh constituent un groupe de Th récemment décrits, localisés essentiellement dans les centres germinatifs (CG) des organes lymphoïdes secondaires (Breitfeld et al. 2000). C'est dans ces CG qu'ont lieu les différentes étapes permettant la génération d'auto-Ac de haute affinité (Crotty 2019). Les Tfh produisent de l'IL-21, leur cytokine « signature », qui agit de façon autocrine mais qui est aussi indispensable au développement du CG et des plasmocytes (Eto et al. 2011; Zotos et al. 2010). Bien que les Tfh puissent produire des cytokines caractéristiques des autres sous-ensembles Th, ils représentent une lignée distincte dont le développement est défini par l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) et STAT3 (Ray et al. 2014; Yu et al. 2009). Les Tfh sont caractérisés par une combinaison de molécules effectrices essentielles à leur développement et à leur fonction comprenant le CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor 5*), des molécules de co-stimulation ICOS, CD40L, CD28, PD-1 (*Programmed cell death 1/*CD279) (Choi et al. 2011).

Différents mécanismes sont impliqués dans la génération des Tfh. D'abord, l'environnement cytokinique joue un rôle important ; principalement la présence d'IL-6, mais aussi l'IL-12, l'IL-21, l'IL-23, l'IL-27, le TGF-b (Read et al., 2016). Au contraire, l'IL-2 va favoriser l'expression du facteur de transcription Blimp-1 qui va réprimer l'expression de Bcl6 et bloquer la différentiation en Tfh (Ballesteros-Tato et al. 2012).

L'intensité du signal des TCR joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T. En effet, Fazilleau et al. ont montré que les lymphocytes T auxiliaires présentant la liaison spécifique entre le peptide et le CMH de classe II la plus intense et la diversité de jonction des TCR la plus restreinte se développent préférentiellement dans le compartiment Tfh spécifique de l'antigène (Fazilleau et al. 2009).

L'interaction avec les cellules dendritiques est généralement nécessaire pour la différenciation des Tfh mais n'est pas suffisante. La différenciation des cellules Tfh est donc un processus multifactoriel en plusieurs étapes. La différenciation des cellules Tfh nécessite généralement deux CPA : les DC et les cellules B (Crotty 2014). Les DC sont généralement nécessaires pour la différenciation précoce des cellules Tfh naïfs en pré-Tfh, tandis que les cellules B sont nécessaires pour les événements ultérieurs et la maturation complète des cellules Tfh au sein des CG. Des signaux similaires sont fournis par les DC et les lymphocytes B, mais les lymphocytes B sont généralement incapables d'amorcer les réponses des lymphocytes T CD4+ en raison de la rareté des lymphocytes B spécifiques de l'antigène (et donc présentant l'antigène) au début de la réponse immunitaire, contrairement aux DC. De plus, les DC se localisent principalement dans les zones de lymphocytes T et ont donc le plus de chances d'interagir avec les lymphocytes T CD4+. Néanmoins, les cellules B sont d'excellents producteurs d'un large éventail de cytokines, notamment l'IL-6 qui facilite la différenciation des cellules Tfh (Karnowski et al. 2012).

Lors de l'amorçage par les DC, les cellules T CD4+ recevant des signaux inducteurs de cellules Tfh régulent à la hausse Bcl6 (Choi et al. 2011). Cela facilite l'expression du récepteur de chimiokine CXCR5 et la répression de Blimp-1 et CCR7 entre autres molécules, permettant la migration vers la frontière T-B (Figure 27). Ces cellules Tfh en cours de différenciation migrent et interagissent avec les cellules B (Figure 28).

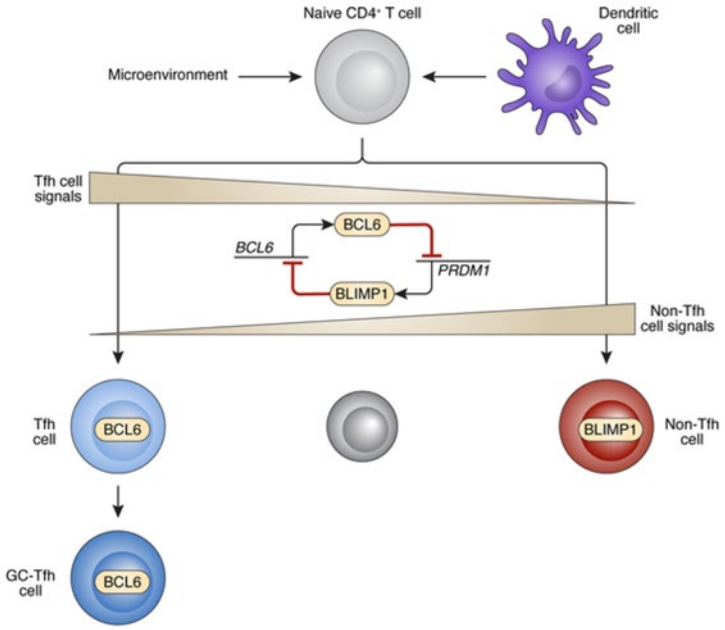


Figure 27 : Différenciation des LT CD4 naïfs
La différenciation des cellules CD4 naïves en Tfh est induite par les CD en présence d'antigènes et de signaux provenant du microenvironnement. La différenciation des Tfh par rapport aux cellules non-Tfh est précoce, en fonction de l'équilibre entre les signaux inducteurs et inhibiteurs. Les Tfh précoces se différencient ensuite en cellules GC-Tfh.

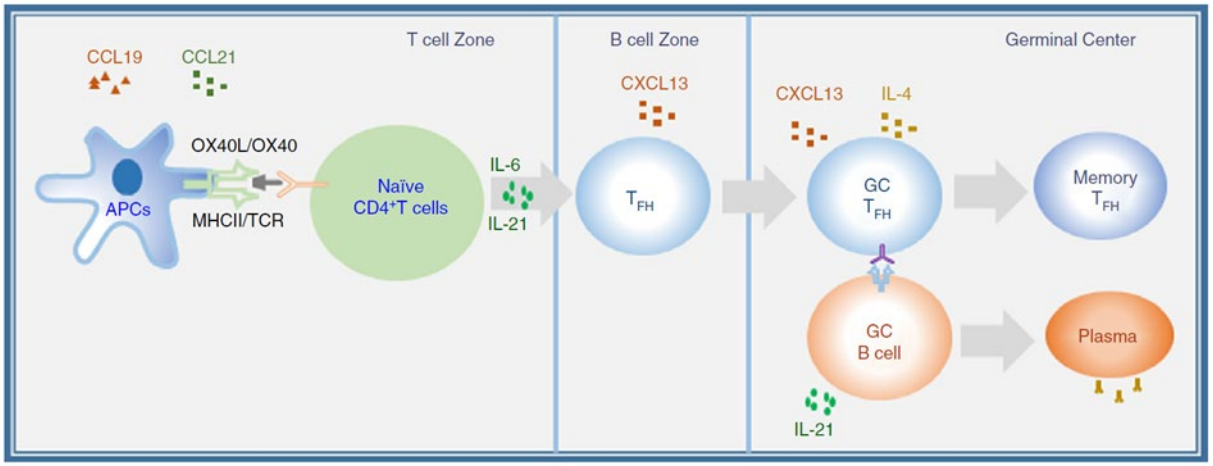


Figure 28 : Circulation et localisation des cellules Tfh
Processus de différenciation des cellules Tfh mettant en évidence les chimiokines nécessaires au trafic des cellules T CD4+ dans les zones T et B. L'expression des récepteurs de chimiokines à la surface des cellules T joue un rôle décisif dans la migration des cellules Tfh. CXCL13 est le ligand de CXCR5 et est sécrété par les follicules et les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. En revanche, CCL19 et CCL21, les ligands de CCR7, sont fortement présents dans la zone T.

Les signaux supplémentaires émis par les cellules B apparentées du CG, via notamment les connexions ICOS:ICOSL et TCR:CMH/peptide, favorisent la différenciation terminale des Tfh et le développement des CG (Crotty 2019) (Figure 29). Au sein des CG, les Tfh contribuent à la survie, à la prolifération, à l'hypermutation somatique, à la commutation isotypique et à la différenciation des LB spécifiques de l'antigène (Ma et al. 2012; Tangye et al. 2013; Ueno et al. 2015).

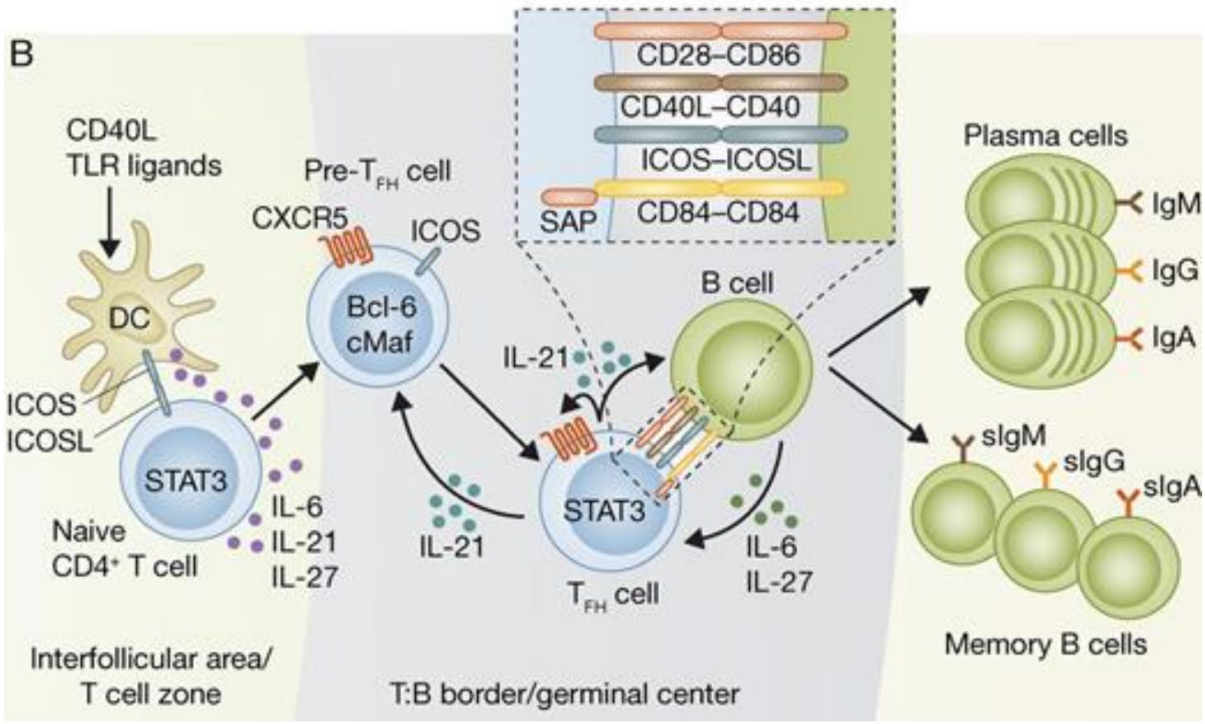


Figure 29 : Génération des cellules Tfh
L'amorçage initial des cellules T CD4+ naïves par les CD induit l'expression de Bcl-6 et CXCR5 ; ceci nécessite des interactions ICOS/ICOS-L. Les CD peuvent produire de l'IL-6 et de l'IL-27, qui favorisent l'expression de Bcl-6 ainsi que la production d'IL-21 par les cellules T CD4+, d'une manière dépendante de STAT3. La relocalisation médiée par CXCR5 des cellules pré-Tfh Bcl-6+CXCR5+ à la frontière entre les cellules T et les cellules B permet des interactions avec les cellules B spécifiques de l'Ag. Le programme Tfh est ensuite imprimé avec les cellules B dans le CG. Les interactions dépendent de la formation de conjugaisons stables entre cellules T et cellules B, qui nécessite une signalisation intrinsèque aux cellules T CD4+ via des récepteurs d'association SAP (CD84) et implique CD40L/CD40, ICOS/ICOS-L et CD28/CD86. L'IL-21 produite par les cellules Tfh peut agir de manière autocrine pour maintenir les cellules Tfh à divers stades de différenciation. De même, l'IL-6 dérivée des cellules B, et peut-être l'IL-27, pourraient contribuer au maintien des cellules Tfh. Les cellules Tfh médient la différenciation des cellules B du CG en cellules mémoire et plasmocytaires via l'apport de CD40L et d'IL-21 (d'après Ma et al. 2012).

L'analyse des Tfh chez l'Homme a été facilitée par la caractérisation de Tfh $CD4^+$ $CXCR5^+$ mémoires circulants (cTfh) dans le sang qui partagent les propriétés fonctionnelles des Tfh

(Simpson et al. 2010). Ces cTfh comprennent plusieurs populations présentant des phénotypes et des fonctions différentes selon leur polarisation. En utilisant l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 classiquement associés aux Th1 et Th17, les cTfh peuvent être classés en trois principaux sous-ensembles : i) les Tfh1 exprimant le CXCR3, le facteur de transcription T-bet et produisant de l'IFN-γ ; ii) les Tfh17 exprimant le CCR6, le facteur de transcription RORγt et produisant de l'IL-17A et de l'IL-22 et iii) les Tfh2 ($CXCR3^-/CCR6^-$) exprimant le facteur de transcription GATA3 et produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Schmitt et al. 2014).

Ces sous-ensembles de Tfh produisent tous de l'IL-21. Cependant, il existe une hétérogénéité de chacun d'eux quant à leur capacité d'activation des LB. Les travaux de Morita et al sur la dermatomyosite juvénile ont démontré que les LB naïfs sont stimulés par les Tfh2 et Tfh17, mais pas par les Tfh1. De plus, ces différents sous-ensembles de Tfh semblent jouer des rôles différents dans la biologie du CG en régulant notamment la commutation isotypique des Ig. Ainsi, les Tfh2 favorisent la sécrétion d'IgG et d'IgE, tandis que les Tfh17 induisent la production d'IgG et d'IgA (Morita et al. 2011). Ces résultats suggèrent que les Tfh influencent de différentes façons l'immunité humorale.

Il existe maintenant des preuves convaincantes que la dérégulation des Tfh contribue à la pathogenèse de MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Choi et al. 2015; Kim et al. 2018), la polyarthrite rhumatoïde (Arroyo-Villa et al. 2014) ou la maladie associée aux IgG4 (Akiyama et al. 2015; Chen et al. 2018). Dans ces études, l'activité de la maladie et/ou les titres des auto-Ac semblent corrélés à une altération de l'équilibre des sous-ensembles Tfh avec une dominance des Tfh2 et/ou Tfh17 par rapport aux Tfh1.

Comme évoqué précédemment, les LB à l'origine des auto-Ac anti-DSG pathogènes dans le pemphigus sont majoritairement commutés vers l'isotype IgG4 et sont aussi hypermutés et de haute affinité (Cho et al. 2014; Ellebrecht et al. 2018), ce qui suggère l'implication des Tfh dans le processus de différenciation. De plus, sur un modèle murin de PV par transfert adoptif de splénocytes (cf plus haut), le blocage de l'interaction T/B par un Acm anti-CD40L administré avant le transfert adoptif, permet d'induire une tolérance prolongée illustrée par l'inhibition de la production d'auto-Ac et la prévention des lésions cutanées (Aoki-Ota et al. 2006). Fait intéressant, l'utilisation de cet Acm après transfert adoptif ne permettait pas d'induire cette tolérance. Une autre étude plus récente a montré une fréquence plus élevée de cTfh dans le sang des patients pemphigus par rapport aux donneurs sains mais aussi une élévation des taux des sériques d'IL-21 et IL-27 associée aux Tfh. Dans ce même travail, des LT auto-réactifs producteurs d'IL-21 ont

également été mise en évidence par ELISPOT après stimulation *ex vivo* avec de la DSG3 (Hennerici et al. 2016).

Par ailleurs, il a été découvert des formations dermiques proches des CG appelées structures lymphoïdes tertiaires sur des biopsies de lésions de pemphigus. Celles-ci associent, comme un CG, la présence de LB, de plasmocytes à IgG spécifiques des DSG et des LT $CD4^+$. Ces LT $CD4^+$ infiltrant la peau produisent de l'IL-21 mais également de l'IL-17. Cependant, ils n'expriment pas le Bcl-6 ou le CXCR5 comme des Tfh classiques (Yuan et al. 2017a). Partant de ce constat, de la topographie préférentielle des lésions initiales et observées lors des rechutes et enfin de l'efficacité des traitements topiques dans certaines formes de pemphigus ; Zou et al. ont mis en évidence la présence de cellules T résidentes mémoires (Trm) CD69+CD103+CCR7- dans la peau des patients PV qui ont un phénotype transcriptomique de « cellules B-*helper* » c'est-à-dire proche de celui des Tfh et qui sont capables d'induire localement la production d'Ac anti-DSG sous la dépendance de l'IL-21, elle-même dépendante de l'expression du facteur de transcription IRF4 (Zou et al. 2021) (Figure 30).

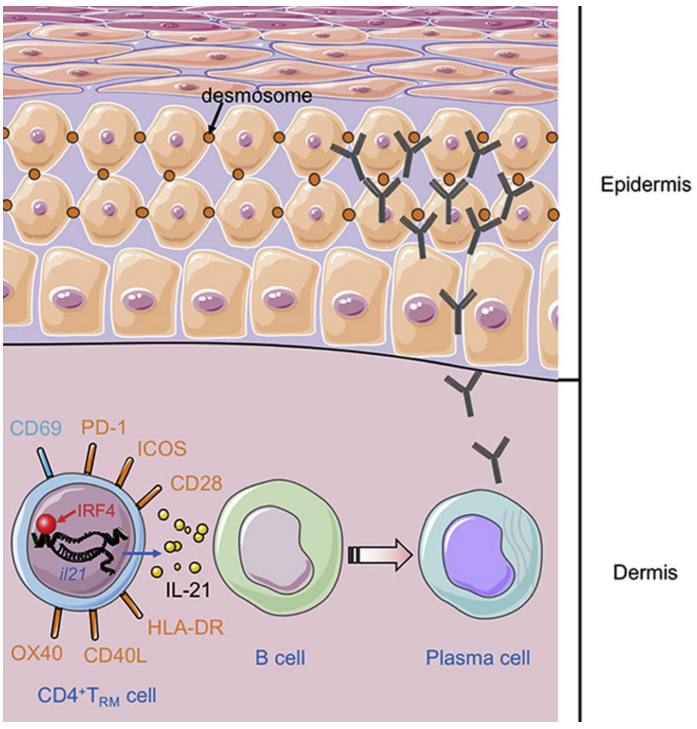


Figure 30 : Localisation et mécanismes régissant l'action des lymphocytes T résidents mémoires dans les lésions cutanées de pemphigus

Récemment, dans un modèle murin de PV établi par transfert adoptif de cellules immunitaires provenant des ganglions lymphatiques ou de la rate de souris DSG3-/- greffées par de la peau exprimant DSG3, vers des souris Rag1-/- ; les cellules Tfh de souris et les cellules T CD4+ des PBMC de patients PV ont été analysées (Kim et al. 2020b). Parmi les cellules T CD4+ du modèle murin, les cellules Tfh ICOS+ étaient associées à la différenciation des cellules B et étaient nécessaires à l'induction de la maladie. Puis, en utilisant un tétramère du CMH de classe II, les cellules Tfh ICOS+ spécifiques de la DSG3 se sont avérées être associées à la production d'anticorps anti-DSG3, même en l'absence de transfert de cellules B. Chez les patients PV, la fréquence des cellules T CD4+ mémoire ICOS+CXCR5+PD1+ était corrélée au niveau d'auto-anticorps et le traitement avec un Acm anti-ICOS permettait de diminuer le niveau d'Ac anti-DSG3 et retarder la progression de la maladie *in vivo*.

Une analyse post hoc de l'étude Ritux 3, réalisée par notre équipe, a montré que le rituximab induisait une diminution significative des cellules B mémoire commutées IgG (C27+IgG+) spécifiques de la DSG3 illustrée par la disparition des cellules sécrétrices d'Ac (ASC) anti-DSG3 après traitement. Grâce à un marquage tétramérique peptide-HLADRB1∗0402, nous avons pu identifier des Tfh anti-DSG3 circulants, et observer leur diminution après rituximab, parallèlement aux ASC anti-DSG3. Ces résultats suggèrent que la réponse durable observée après rituximab dans le pemphigus pourrait reposer, en partie, sur la diminution des Tfh anti-DSG3, qui conduirait à l'absence de renouvellement prolongé des cellules B autoréactives mémoires commutées IgG, puis à la disparition des ASC anti-DSG3 (Maho-Vaillant et al. 2021).

Hennerici et al. ont montré une augmentation des cellules Tfh chez les patients pemphigus, parallèlement à des concentrations plasmatiques croissantes d'IL-21, produite par les Th17 et Tfh. De plus, ils ont pu détecter des cellules T autoréactives spécifiques de la DSG3 produisant de l'IL-21 lors d'une stimulation *ex vivo* avec la DSG3, suggérant que les cellules T autoréactives productrices d'IL-21 sont impliquées dans la pathogenèse du pemphigus (Hennerici et al. 2016).

Holstein et al. ont montré par l'analyse du transcriptome de biopsies cutanées de patients PV une signature immunitaire dominée par l'IL-17A chez les patients. Une expression accrue d'IL-17A et des cytokines associées a également été détectée par PCR quantitative. Ils ont ensuite montré que les patients avaient des fréquences augmentées de Tfh17 et Th17 qui étaient corrélées aux niveaux de LB mémoires spécifiques de la DSG, et que les patients PV en phase active présentaient des niveaux plus élevés de Tfh17 spécifiques à la DSG3. Des expériences de coculture

ont finalement révélé que les cellules Tfh17 étaient principalement responsables de l'induction de la production d'auto-anticorps par les LB (Holstein et al. 2021).

- ***Les Tfr***

Les cellules T CD4+ régulatrices folliculaires (Tfr), sont une population de Treg exprimant le facteur de transcription Bcl6 et le récepteur de chimiokine CXCR5 qui se localisent principalement dans les CG après une infection ou une immunisation. Des études ont proposé une régulation des Tfh par ce sous-ensemble de Tfr partageant les caractéristiques des Treg et exprimant donc le Foxp3 (Chung et al. 2011; Linterman et al. 2011a; Wollenberg et al. 2011).

Au départ, il était établi que les Tfr se formaient après exposition à l'Ag, lorsque des précurseurs Foxp3+ cooptent la voie de différenciation des cellules Tfh, acquérant un phénotype de type Tfh qui inclut l'expression de Bcl-6, CXCR5, PD-1 et ICOS. Bien que les cellules Tfr partagent certaines caractéristiques des cellules Tfh, elles n'expriment pas les « molécules auxiliaires » des cellules B, à savoir l'IL-21, l'IL-4 et le CD40L, qui sont caractéristiques des cellules Tfh. En revanche, en plus de Foxp3, les cellules Tfr expriment une série de protéines typiques des cellules Treg, telles que Blimp-1 et CTLA-4 (Chung et al. 2011; Linterman et al. 2011b; Wollenberg et al. 2011) (Figure 31).

Une étude a montré que les cellules Tfr étaient spécifiques de l'Ag immunisant, qu'il s'agisse d'un Ag du soi ou du non-soi. Ce travail a également révélé que les cellules Tfr pouvaient dériver de cellules Treg induites dans la périphérie (*pTreg*) en plus des cellules Treg dérivées du thymus (*tTreg*), via la signalisation PDL1 (Aloulou et al. 2016).

Il a été suggéré que les cellules Tfr suppriment les réponses immunitaires excessives, comme celles qui se produisent dans le cadre de l'autoréactivité, grâce à un processus médié par le corécepteur inhibiteur CTLA-4 (Sage et al. 2014; Wing et al. 2014). Cependant, le rôle des cellules Tfr dans la régulation de la sélection des lymphocytes B spécifiques de l'antigène au sein du CG n'est actuellement pas claire. Le paradigme existant suggère que les cellules Tfr sont inhibitrices et freinent les réponses globales du CG, y compris les réponses des cellules B spécifiques de l'antigène (Botta et al. 2017; Clement et al. 2019; Sage et al. 2016; Wing et al. 2014; Wu et al. 2016). Cependant, certains travaux n'ont signalé aucun effet évident sur les réponses d'anticorps spécifiques de l'antigène en l'absence de cellules Tfr (Fu et al. 2018). A ce jour, le rôle précis des Tfr n'est donc pas complètement élucidé.

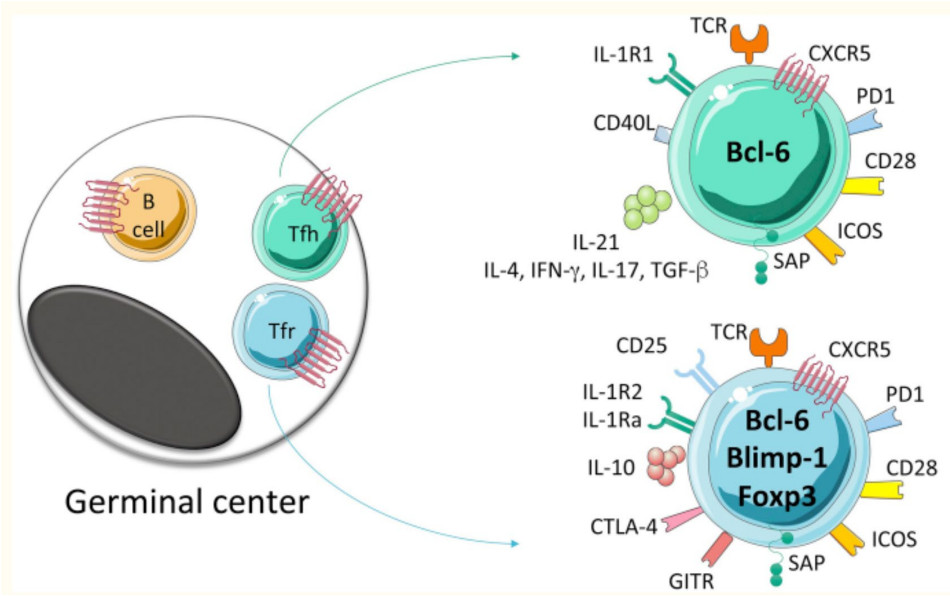


Figure 31 : Molécules de base exprimées par les cellules Tfh et Tfr
Les cellules Tfh et Tfr agissent à l'intérieur des CG (à gauche) et s'y localisent, avec les cellules B des CG, grâce à l'attraction de CXCL13, qui se lie à CXCR5 à la surface des cellules Tfh, Tfr et B. Les fonctions des cellules Tfh et des cellules Tfr impliquent l'expression de diverses molécules et la sécrétion de facteurs solubles (à droite). Toutes ces fonctions ne sont pas exclusives aux cellules Tfh et Tfr (Aloulou et al., 2019).

b. *Les lymphocytes B dans le pemphigus*

Les LB sont les seules cellules capables de se différencier en cellules sécrétrices en ASC appelées plasmablastes ou plasmocytes. Outre cette fonction, les LB assurent également l'homéostasie immunitaire par la présentation antigénique et la production de cytokines (Crawford et al. 2006; Harris et al. 2000). Les LB peuvent influencer le développement des réponses des LT $CD4^+$ effecteurs et mémoires par la production de cytokines telles que l'IL-6, l'IFN-γ et le TNF ou au contraire les rétreindre par leur capacité à produire de l'IL-10 (Lund and Randall 2010). Les cytokines dérivées des LB sont essentielles pour l'ontogenèse, l'homéostasie et l'organisation structurelle des organes lymphoïdes secondaires en particulier dans la formation du CG, ainsi que pour le développement de tissus lymphoïdes tertiaires ectopiques (LeBien and Tedder 2008). Les LB sont, par conséquent, les acteurs principaux de la réponse humorale et sont au cœur de la réponse auto-immune dans le pemphigus. Ce rôle central a été conforté par les premiers essais thérapeutiques utilisant le RTX. L'utilisation de cet Acm chimérique anti-CD20 provoque une déplétion profonde des LB et permet d'obtenir une rémission clinique chez la plupart des patients atteints de pemphigus (Ahmed et al. 2006; Cianchini et al. 2007; Joly et al. 2007).

Comme décrit plus haut, l'analyse histologique des lésions cutanées de patients pemphigus montre un infiltrat lymphocytaire B dermique faible, la présence de plasmocytes et de LT suspectés d'être des Tfh puisque producteurs d'IL-21 (Yuan et al. 2017a). Les LB constituant cet infiltrat lymphocytaire B tissulaire, bien que faible, étaient capables de secréter des IgG anti-DSG. Dans le sang de patients pemphigus, la stimulation antigénique *in vitro* par la DSG3 permet aux LB mémoires CD27+IgG+ anti-DSG de se différencier en ASC (Nishifuji et al. 2000). Dans ce même travail, les auteurs ont montré chez la souris cette fois, que la fréquence des ASC anti-DSG3 est plus élevée dans la rate et la moelle osseuse que dans les ganglions lymphatiques ou le sang, suggérant ainsi que les auto-Ac circulants ne représenteraient qu'une petite portion des LB auto-réactifs. Lors des périodes d'activité de la maladie, ceux-ci semblent être libérés vers la circulation périphérique ; leur taux circulant devenant ainsi un reflet de l'activité de la maladie.

Ces quinze dernières années, l'étude des sous-populations lymphocytaires B a été affinée grâce à l'analyse des effets du traitement par RTX chez des patients pemphigus (Joly et al. 2007). La molécule cible, le CD20, est uniquement exprimée sur les LB, qui vont donc être éliminés dans les jours suivant la perfusion de RTX. Cependant, le CD20 n'est pas exprimé sur les progéniteurs des LB ni sur les plasmocytes, permettant d'une part, la reconstitution lymphocytaire B et d'autre part, le maintien de l'immunité humorale issue des plasmocytes (Riley and Sliwkowski 2000). Notre équipe a démontré que le RTX entraîne une déplétion profonde ; quasi- voire totale, des LB circulants, et pour une durée allant de 6 à 9 mois. Cette déplétion s'accompagne d'une diminution des taux d'IgG anti-DSG isolée, sans diminution de l'immunité humorale contre les réponses anti-infectieuses et notamment vaccinales, excepté concernant les IgM (Colliou et al., 2013; Mouquet et al., 2008). Cette diminution spécifique peut s'expliquer par le fait que les IgM sont principalement produites par les plasmablastes et plasmocytes à courte durée de vie, alors que les IgG sont produites par des plasmocytes à longue durée de vie (Manz et al. 2004). L'effet du RTX sur le taux des IgG anti-DSG semble indiquer que les IgG anti-DSG émanent des cellules plasmocytaires à courte durée de vie continuellement réapprovisionnées à partir du pool de LB mémoires, lui-même impacté par le RTX car exprimant le CD20. Cela pourrait également expliquer l'obtention de nombreuses rémissions sérologiques prolongées après RTX (Ellebrecht and Payne 2017a; Joly et al. 2017a; Maho-Vaillant et al. 2021).

Le retour des LB après le traitement par RTX est caractérisé par la présence de LB naïfs, présentant transitoirement un phénotype transitionnel ($CD19^{+}CD24^{fort}CD38^{fort}$). Ainsi, le *ratio* LB naïfs/LB mémoires est modifié et ceci, de façon prolongée (Colliou et al. 2013b). Notre équipe a étudié la fréquence des LB circulants spécifiques de la DSG1 et de la DSG3 par cytométrie en flux

grâce à l'utilisation de protéines recombinantes ainsi que l'expression de leurs Ig de surface (IgM, IgG). Chez les patients en rémission complète après RTX, nous observons une disparition presque complète des LB IgG^+ anti-DSG circulants, corrélée à une diminution du taux d'IgG anti-DSG alors que les LB IgM^+ spécifiques des DSG sont toujours détectables. Sur le long terme, l'effet bénéfique du traitement par RTX semble être associé à un blocage de la maturation des LB et du processus de commutation isotypique d'IgM à IgG. Nous avons également mis en évidence chez les patients en rémission complète que la population résurgente de LB transitionnels est sécrétrice d'IL-10. Elle pourrait donc jouer un rôle dans l'effet tolérogène du RTX.

- ***L'homéostasie B***

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

particulier vers l'isotype IgA (Zhang et al. 2015). BCMA fournit les signaux essentiels à la survie des plasmablastes et des plasmocytes (O'Connor et al. 2004).

Dans de nombreuses MAI telles que le lupus érythémateux systémique (Zhang et al. 2001), la polyarthrite rhumatoïde (Cheema et al. 2001), le syndrome de Sjögren (Groom et al. 2002) ou encore la PB (Asashima et al. 2006a), le taux de BAFF est élevé dans le sérum des patients. Celui-ci peut être corrélé avec les titres des auto-Ac. Ces études suggèrent que BAFF joue un rôle essentiel dans l'induction de la MAI en favorisant la survie des LB auto-réactifs. Les données actuelles sur le pemphigus n'ont pas mis en évidence de différence entre les taux de BAFF chez les patients atteints de PV et chez les témoins (Asashima et al. 2006a).

Ainsi, la présence de LB anti-DSG pourrait résulter d'une sélection négative réduite et/ou d'une sélection positive plus importante conduisant à un répertoire naïf orienté vers l'auto-réactivité.

- ***Le répertoire antigénique et isotypique***

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

Les recombinaisons VDJ

La recombinaison somatique des gènes VDJ codant pour les chaines lourdes et légères de l'Ig a lieu au cours du développement des LB dans la moelle osseuse (Tonegawa 1983). Les différents loci des Ig nécessitent des réarrangements géniques pour donner lieu à des gènes fonctionnels à l'aide des enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2. Les réarrangements des gènes des Ig s'effectuent dans un ordre séquentiel, avec le réarrangement des chaînes lourdes en premier, suivi par le réarrangement des chaînes légères. Les réarrangements génèrent une grande diversité, grâce à un grand nombre de combinaisons possibles entre les différents segments V(D)J (supérieure à 10^9), mais aussi grâce à différents mécanismes moléculaires qui introduisent un degré supérieur de diversité par des mutations ponctuelles, des insertions et des délétions de nucléotides dans les zones de jonction des segments des gènes réarrangés (Desiderio et al. 1984). A la fin de la recombinaison, si le réarrangement V(D)J conduit à une Ig non fonctionnelle ou ayant une affinité potentielle pour des auto-antigènes, le LB peut subir une réédition du BCR. Il s'agit d'une

recombinaison supplémentaire du gène de la chaîne légère afin de générer une Ig fonctionnelle non auto-réactive (Mostoslavsky et al. 2004; Nemazee 2017b; Radic et al. 1993). L'assemblage productif des chaînes lourdes (H) et légères (L) permet l'expression d'une IgM à la membrane des LB nouvellement générés. Après des différenciations supplémentaires et l'expression de l'IgD, les LB émergeants migrent vers des organes lymphoïdes secondaires, où ils initient la phase du développement dépendante de l'antigène.

L'hypermutation somatique

L'hypermutation somatique est un processus qui consiste à modifier, par des mutations, les locus de la région variable réarrangée de l'Ig pour générer un répertoire B diversifié de haute affinité (Papavasiliou and Schatz 2002). Ce processus se produit majoritairement dans la zone sombre du CG où les centroblastes expriment fortement l'enzyme AID (Muramatsu et al. 2000). Ces modifications sont retrouvées majoritairement dans les régions hypervariables des CDR (*complementarity-determining regions*). A l'issue de ce processus, les LB ayant augmenté l'affinité de leur BCR pour l'antigène sont sélectionnés positivement par les CD folliculaires et les Tfh dans la zone claire du CG.

La commutation isotypique

La commutation isotypique correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN permettant de changer d'isotype (IgM ou IgD en IgG, IgA ou IgE) afin de produire des Ac de même spécificité épitopique mais aux propriétés effectrices diversifiées. Il peut se produire à l'intérieur ou à l'extérieur des CG. L'induction de la commutation isotypique nécessite des stimuli « primaires » qu'ils soient dépendants ou indépendants des LT et des stimuli « secondaires ». Les stimuli primaires, tels que l'interaction du CD40 au CD40L exprimé sur des LT activés et/ou l'engagement du BCR et/ou des voies de signalisation de TLR, induisent la commutation isotypique par l'expression de l'AID (Zan and Casali 2015). En synergie avec les stimuli primaires, une combinaison spécifique de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 l'IL-10, l'IL-13, l'IL-21, l'INF-α et/ou le TGF-β (Defrance et al. 1992; Gascan et al. 1991; Pène et al. 2004; Punnonen et al. 1993; Zan et al. 1998) et de signaux co-stimulateurs tels que TACI et BAFF-R (Castigli et al. 2005; Litinskiy et al. 2002) détermine l'isotype vers lequel les LB vont s'orienter.

Les voies de la commutation isotypique menant aux IgG4 présentent un intérêt fondamental pour la pathogenèse du pemphigus. Les études *in vitro* sur les LB ont suggéré l'implication de l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et/ou du TGF-β dans la commutation vers l'IgG4. (Gascan et al. 1991; Jeannin et al. 1998; Pène et al. 2004; Punnonen et al. 1993; Tsuboi et al. 2012). Ces observations sont en concordance avec la réponse de type Th2 jusqu'alors privilégiée dans le pemphigus (Gebhard et al. 2005; Veldman et al. 2003).

- ***Le répertoire B anti-DSG***

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

Dans le pemphigus, l'analyse génétique a montré que les Ac anti-DSG1 et anti-DSG3 utilisent préférentiellement certains gènes V pour la chaîne lourde (VH) et plus particulièrement ceux des familles VH1 et VH3 pour le PF et VH1, VH3 et VH4 pour le PV (Ishii et al. 2008; Payne et al. 2005). La majorité des clones B IgG et IgM présentent des profils de mutation somatique compatibles avec un processus d'augmentation d'affinité dirigé par un antigène (Qian et al. 2007). Identifiés chez des patients non apparentés, certains clones B utilisant le gène VH1-46 présentent peu de mutations somatiques, voire aucune mutation pour acquérir une auto-réactivité vis-à-vis de la DSG3 (Cho et al. 2014). Il a donc été proposé que ces clones B anti-DSG3 portant le gène VH1-46 apparaissent naturellement. Ils peuvent survivre et échapper à la délétion ou à l'anergie car la DSG3 n'est pas exprimée de manière centrale dans la moelle osseuse, son expression est limitée à la périphérie aux épithéliums stratifiés, de sorte que les LB ne rencontrent probablement pas suffisamment d'antigène de la DSG3 pour subir une délétion clonale (Cho et al. 2016). Ces clones pourraient être importants au début du développement de l'auto-immunité du pemphigus.

Notre équipe a étudié la distribution des longueurs du CDR3 chez des patients atteints de pemphigus par immunoscope et a révélé une expansion clonale B en phase active de la maladie

dans les familles VH3 et/ou VH4 (Mouquet et al. 2008b). Après leur première prise de RTX, les patients en rémission complète présentent un répertoire B normal de type gaussien. En phase active de la maladie, l'analyse des séquences des CDR3 a démontré la présence de séquences hautement récurrentes.

Le criblage à haut débit des LB anti-DSG chez les patients atteints de PV a confirmé la prédominance des lignées IgG4, suivie par des IgA1, IgG1 et IgA2. L'analyse phylogénétique de ces clones B anti-DSG a montré que la plupart des clones B anti-DSG de type IgG4 n'ont pas de relation clonale avec les autres sous-classes IgA1, IgG1 et IgA2. Les IgG1 évoluent vers des IgA1 puis vers des IgA2 mais ne sont pas à l'origine des IgG4. Les clones d'IgA réagissent avec les cinq domaines EC des DSG, tandis que les IgG4 reconnaissent préférentiellement l'EC1. Ainsi, malgré la coexistence d'auto-Ac IgG1 et IgG4 dans les sérums des patients atteints de pemphigus, la commutation de classe d'IgG1 n'est pas une voie dominante pour la production d'IgG4 (Ellebrecht et al. 2018).

Ces observations confortent l'hypothèse d'un répertoire B naïf naturellement orienté vers l'auto-réactivité créant par recombinaison V(D)J à des fréquences rares des IgM anti-DSG non pathogènes. Cela corrobore nos observations sur l'effet à long terme du RTX sur la diminution du nombre de LB IgG anti-DSG mais pas celui des IgM chez les patients en rémission complète par rapport à des patients ayant un pemphigus récemment diagnostiqué (Colliou et al. 2013b).

La présence de clones auto-réactifs IgM ne semble donc pas être suffisante pour induire une auto-immunité cliniquement parlante. Par conséquent, des signaux immunitaires supplémentaires sont nécessaires pour initier l'activation des clones B auto-réactifs et conduire à la différenciation en ASC. La voie d'activation de ces LB responsables de la production des IgG anti-DSG n'est pas encore clairement établie car il reste difficile de déterminer si ces ASC pathogènes sont dérivés d'une réponse extra-folliculaire ou au sein d'un CG voire des deux voies en parallèle. Cette question est essentielle pour le traitement du pemphigus. Si les patients atteints de pemphigus présentent un défaut persistant de tolérance, de nouveaux clones B anti-DSG pourrait se développer et conduire à une rechute. Mais si l'origine des LB anti-DSG pathogènes est un événement ponctuel périphérique, l'élimination de ces LB pourraient permettre une rémission définitive.

Les analyses longitudinales des répertoires B IgG anti-DSG ont démontré une persistance des clones B anti-DSG identifiés par leur CDR3 chez deux patients atteint de PV lors des rechutes après un traitement par corticothérapie et mycophénolate mofétil (Hammers et al., 2015). Cette

étude n'a détecté qu'un seul nouveau clone B au cours du temps suggérant que l'émergence de LB IgG anti-DSG n'est pas un processus fréquent, ni continu (Hammers et al. 2018). De plus, l'un de ces patients a été traité par RTX en deuxième intention. Après 4 perfusions, plus aucun clone IgG auto-réactif n'est détecté. L'observation de l'absence de clone B anti-DSG a été confortée chez deux autres patients atteints de PV en rémission complète longue après RTX soulignant qu'une déplétion complète des LB pathogènes est possible. Ces résultats corroborent nos données cytométriques sur la baisse de fréquence dans le sang des LB IgG anti-DSG après le traitement par RTX (Colliou et al. 2013b). Néanmoins, nous avons constaté dans cette étude à 5 ans que de nombreux patients (80%) ont rechuté après un seul cycle d'injection de RTX. Il est probable que des LB anti-DSG nichés dans la peau (Yuan et al. 2017a), dans la moelle osseuse et/ou les organes lymphoïdes secondaires ne soient pas totalement éliminés par un seul cycle de RTX. Ces cellules pourraient proliférer et se différencier en ASC entrainant une élévation des titres d'Ac anti-DSG généralement constatée lors des rechutes (Ellebrecht and Payne 2017a).

- ***Les fonctions effectrices des LB***

Le rôle des LB dans les MAI est largement associé à la production d'auto Ac. Cependant, l'auto-immunité est plus complexe et met en jeu les autres fonctions des LB à savoir la production de cytokines, de chimiokines et la présentation antigénique. Les LB peuvent donc influencer profondément la réponse auto-immune, notamment par leurs interactions directes ou indirectes aves les LT et les CD et ainsi moduler l'organisation des structures lymphoïdes.

Dans le pemphigus, la présence de structures lymphoïdes a été suggérée devant la présence de cellules sécrétrices d'IL-21 (Yuan et al. 2017a). Ces organes lymphoïdes tertiaires cutanés pourraient permettre l'activation locale des LT auto-réactifs et ainsi le développement de LB auto-réactifs, pouvant favoriser l'inflammation locale (Iwata et al. 2009). La réponse immune humorale ainsi localisée permettrait une production d'auto-Ac directement au sein de la peau pouvant expliquer que les manifestions cutanées ou muqueuses soient limitées et récidives dans certaines zones (Debes and McGettigan 2019).

Dans les tissus ou dans les ganglions lymphatiques, la génération de CG repose sur des interactions entre les Tfh et les LB qui sont indispensables à la différenciation des Tfh par la présentation antigénique, la sécrétion des cytokines (l'IL-6 et l'IL-27) et l'expression des molécules de co-stimulation (ICOSL, CD84) (Deenick et al. 2010; Ma et al. 2012). L'importance de la présence des LB au développement des Tfh a été indirectement démontrée par la diminution

de la fréquence de Tfh après l'administration de rituximab dans plusieurs MAI (Zhao et al. 2017; (Xu et al. 2013a) ; Zhao et al. 2017) et très récemment dans le pemphigus par notre équipe, notamment sur la population de Tfh auto-réactifs (Maho-Vaillant et al. 2021).

En effet, les LB sont capables, via leur BCR, d'internaliser un antigène pour ensuite le présenter aux LT auxiliaires grâce à l'expression du CMH de classe II (Janeway et al. 1987; Lanzavecchia 1985). Ils peuvent alors influencer la polarisation des LT et la formation des LT mémoires grâce aux signaux de co-stimulation et la production de cytokines. La sécrétion de cytokines par les LB semble, quant à elle, régulée par le microenvironnement cytokinique ainsi qu'une combinaison d'évènements incluant sa signalisation BCR et/ou TLR et/ou CD40 (Duddy et al. 2004; Vazquez et al. 2015).

Eming et al. ont montré dans le pemphigus que l'utilisation de rituximab permet une diminution de la fréquence de LT auto-réactifs de type Th1 producteurs d'IFN- γ et Th2 producteurs d'IL-4, après stimulation *in vitro* par la DSG3, sans diminution de la fréquence des LT non spécifiques (Eming et al. 2008a). Dans le même temps, notre équipe a mis en évidence l'émergence d'une population de LB secrétant de l'IL10 après rituximab, et qui a la faculté de réguler la réponse auto-immune (Breg) (Colliou et al. 2013b).

- ***Les lymphocytes B régulateurs***

Les Breg représentent une sous-population de LB capables de réguler la réponse auto-immune via la production d'IL-10 (Fillatreau et al. 2002; Lin et al. 2014; Oleinika et al. 2019). La voie d'induction des Breg la plus décrite met en jeu l'engagement du BCR et une co-stimulation *via* le TLR9 et/ou le CD40 (Bouaziz et al. 2010; Mauri and Bosma 2012) mais aussi l'environnement cytokinique dans lequel se différencient les LB (Giordani et al. 2009; Huang et al. 2017; Menon et al. 2016; Rosser et al. 2014; Yang et al. 2010; Yoshizaki et al. 2012). Actuellement, les populations Breg comprennent des LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ (Blair et al. 2010; Flores-Borja et al. 2013), des LB mémoires $CD24^{fort}$ $CD27^{+}$ (Iwata et al. 2011; Lin et al. 2014), des LB $CD25^{+}CD71^{+}$ (van de Veen et al. 2013) et les plasmablastes $CD27^{int}$ $CD38^{+}$ (Masson et al. 2015; Matsumoto et al. 2014). Cette hétérogénéité du phénotype des Breg conforte l'hypothèse selon laquelle les Breg seraient « induits » et non pas spécifiques d'une lignée.

Les Breg sont ainsi capables de : i) inhiber la prolifération des LT (Bouaziz et al. 2010), ii) moduler la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT, iii) supprimer la polarisation Th1 (Blair et al. 2010) et Th17 (Flores-Borja et al. 2013), iv) convertir les LT $CD4^{+}$ en iTreg ou

en Tr1 (Flores-Borja et al. 2013; Kessel et al. 2012), v) contrôler le phénotype des DC en réprimant leur profil pro-inflammatoire (Lemoine et al. 2011; Morva et al. 2012). Il a été aussi démontré que les Breg pouvaient réprimer le développement des Tfh au profit des Tfr (Achour et al. 2017). Comme évoqué plus haut, la fonction régulatrice des LB est associée à la production d'IL-10 mais d'autres cytokines ont récemment été décrites comme anti-inflammatoires telles que l'IL-35 (Shen and Fillatreau 2015), le TGF-β (Nouël et al. 2015). Enfin, les Breg peuvent également moduler les réponses adaptatives par l'expression de PD-L1, ligand du récepteur de mort PD-1 sur les LT (Khan et al. 2015) ou encore induire l'apoptose *via* une expression accrue de FasL (Hahne et al. 1996).

D'un point de vue fonctionnel, la diminution de la fréquence de Breg et/ou de leur capacité régulatrice ont été décrites dans de plusieurs MAI telles que le LES (Wang et al. 2014), la polyarthrite rhumatoïde (Xu et al. 2017), le psoriasis (Hayashi et al. 2016) ou encore la SEP (Lemoine et al. 2011).

Notre équipe a mis en évidence, chez des patients pemphigus suivis plusieurs années après l'administration de rituximab, que les patients maintenant une rémission complète avaient une proportion de de LB transitionnels $CD24^{fort}$ $CD38^{fort}$ sécréteurs d'IL-10 plus élevée que les patients ayant une maladie considérée comme active (Colliou et al. 2013b). L'émergence de Breg a également été montrée chez des patients pemphigus en rémission complète après traitement par IgIV (Kabuto et al. 2016) ou corticothérapie orale (Kabuto et al. 2017).

Au contraire, un contingent particulier de LB incapable de produire de l'IL-10 et exprimant le marqueur CD11c constitue une sous-population distincte des LB et enrichie en LB mémoire sur-exprimant les gènes impliqués dans l'activation et la présentation antigénique. Les LB CD11c+ ont une capacité à se différencier plus rapidement en cellules présentatrices d'Ac, suggérant un stade plus avancé dans la différenciation plasmocytaire. Dans le pemphigus, les patients atteints présentent initialement une fréquence de LB CD11c+ augmentée et qui diminue après traitement par rituximab (Golinski et al. 2020).

7. Les Traitements

A l'instar de nombreuses MAI, la corticothérapie systémique a longtemps été la base du traitement du pemphigus. Son utilisation, dans les années 1950, a changé le pronostic du

pemphigus, permettant de diminuer la mortalité à 1 an de 75% à 30%. Le principal inconvénient de l'utilisation d'une corticothérapie générale au long cours, comme c'est le cas dans le cadre d'une MAI chronique comme le pemphigus, est la survenue d'effets indésirables dits « cortico-induits » sévères comme le diabète, l'hypertension artérielle, la prise de poids, l'immunodépression anti-infectieuse. Afin de limiter ces effets indésirables, les dermatologues ont essayé de leur associer certains traitements immunosuppresseurs à visée d'épargne cortisonique tels que l'azathioprine, le mycophénolate mofétil ou encore le méthotrexate, sans preuve d'un réel intérêt. Depuis une quinzaine d'années, le rituximab, s'est progressivement imposé comme le traitement de référence du pemphigus, le plus souvent en association aux corticoïdes.

A. *Les glucocorticoïdes (GC)*

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

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

De manière synthétique, les GC peuvent orienter les DC vers un phénotype tolérogène par une faible expression du CMH de classe II, des molécules co-stimulatrices et des cytokines (IL-1β, IL-6) influençant ainsi la polarisation des Th (Szatmari and Nagy 2008). Les GC inhibent rapidement la voie de transmission du signal engagée par le TCR (Boldizsar et al. 2010). Ils répriment la différenciation des Th1 et Th17 favorisant la polarisation vers les Th2 (Cain and Cidlowski 2017; Elenkov 2004; Jones et al. 2015) et induisent des Treg (Cari et al. 2019).

Les effets des GC sur les LB sont moins bien connus. Récemment , il a été démontré que les GC peuvent altérer la signalisation en amont du BCR et des TLR (Franco et al. 2019). Ils peuvent réduire la transcription de loci d'Ig pouvant avoir une incidence sur la production d'Ac. De plus, les CG peuvent induire l'expression des gènes codant pour la cytokine immuno-modulatrice IL-10 liée aux fonctions des Breg (Franco et al. 2019). Enfin, le traitement par GC provoque une diminution du taux de BAFF (Hébert et al. 2021; Kamhieh-Milz et al. 2018) jouant sur la survie et la maturation des LB, la production d'Ac et la commutation isotypique ainsi que sur la survie des LB auto-réactifs (Youinou and Pers 2010).

Les effets des GC sont dose-dépendants et l'efficacité clinique des molécules thérapeutiques nécessite généralement l'utilisation de doses élevées et prolongées. Cependant, une dose cumulée élevée de GC est associée à différents effets indésirables tels que l'ostéoporose, la myopathie cortisonique, le glaucome, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie, le surpoids ou encore le diabète et des maladies cardio-vasculaires (Caplan et al. 2017; Kridin 2018c).

Actuellement, l'HAS recommande de commencer le traitement des patients atteints de pemphigus modérés à sévères par de la prednisone/prednisolone à la dose initiale de 0,5 à 1 mg/kg par jour en association au rituximab, et ce pour une durée de 3 à 6 mois (Jelti et al. 2019b; Joly et al. 2017). Les patients répondent généralement à cette thérapie dans un délai de deux à trois semaines.

L'administration systémique de GC dans le pemphigus permet d'obtenir en quelques jours un contrôle de l'acantholyse dans la peau et la muqueuse du patient pendant le stade aigu de la maladie, malgré un titre élevé d'auto-Ac circulants. Cet effet thérapeutique rapide des GC est associé à une transcription accrue des DSG et d'autres molécules d'adhésion cellulaire dans les kératinocytes (Nguyen et al., 2004). De plus, l'utilisation des GC, même en monothérapie, permet une diminution des taux d'auto-Ac (Abasq et al. 2009b; Barnadas et al. 2015).

L'efficacité des GC dans le pemphigus est bien démontrée (Almugairen et al. 2013; Harman et al. 2002) mais son utilisation est limitée par la survenue d'effets indésirables potentiellement graves, qui dictent maintenant le pronostic de la maladie (Kridin et al. 2017).

B. *Le rituximab (RTX)*

Le RTX (Mabthera®/Laboratoire Roche) est un Acm IgG1 chimérique qui cible le CD20, un canal calcique transmembranaire impliqué dans l'activation, la prolifération et la différenciation

des LB. Le CD20 s'observe pendant le développement des LB du stade pré-B au stade B mature puis son expression diminue sur les plasmablastes pour disparaître totalement de la surface des plasmocytes (Riley and Sliwkowski 2000). Par conséquent, le RTX épargne les progéniteurs B et les plasmocytes, ce qui permet notamment de ne pas endommager la mémoire immunitaire à long terme.

Le fragment Fab du RTX d'origine murine se lie à la molécule CD20 et le fragment Fc d'origine humaine permet le recrutement des différents effecteurs du système immunitaire aboutissant à la déplétion des LB (Reff et al. 1994). Son mécanisme d'action repose sur l'induction d'apoptose, sur l'activation des processus de cytotoxicité dépendante du complément et par l'ADCC dépendante des FcγR à la surface des granulocytes, des macrophages et des NK (Boross and Leusen 2012; Maloney et al. 2002) (Figure 32).

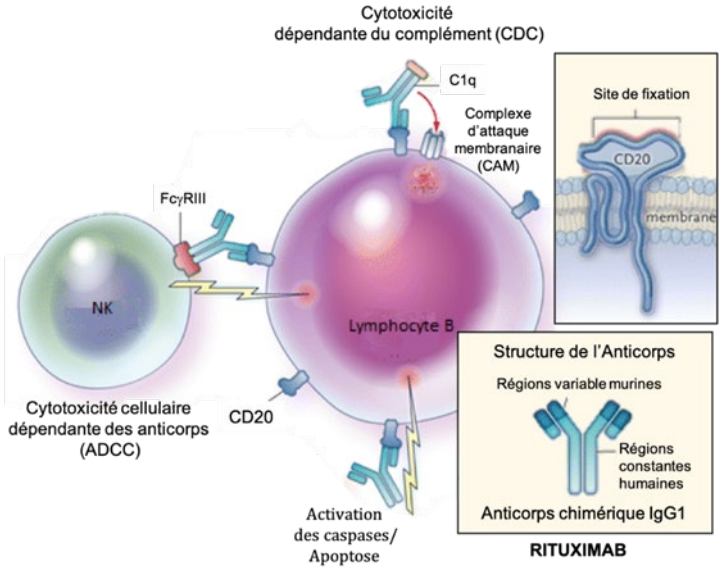


Figure 32 : Structure et mécanismes d'action du rituximab
(Maloney 2012).

Initialement, le rituximab était utilisé dans le traitement des hémopathies lymphoïdes telles que les lymphomes B non-hodgkiniens, les lymphomes B diffus à grandes cellules et la leucémie lymphoïde chronique (Plosker and Figgitt 2003). Il a ensuite été utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la vascularite à ANCA, et plus récemment le pemphigus et les autres dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) (Cohen et al. 2006; Stone et al. 2010).

Dans les DBAI, l'utilisation du rituximab a d'abord été rapportée dans les années 2000 chez des patients atteints de formes sévères de pemphigus, cortico-dépendantes ou cortico-résistantes ainsi que dans les pemphigus résistants aux immunosuppresseurs conventionnels (Ahmed et al. 2006; Arin et al. 2005; Cianchini et al. 2012; Joly et al. 2007; Lunardon et al. 2012). Certaines données immunologiques ont permis d'éclaircir le mécanisme d'action du RTX dans le pemphigus. En résumé, le RTX entraine une déplétion prolongée des LB périphériques pendant au moins six mois permettant une élimination des LB auto-réactifs. L'arrêt de la restitution du pool de plasmablastes /plasmocytes auto-réactifs conduit à la réduction des taux d'Ac anti-DSG chez la majorité des patients. La reconstitution des LB est caractérisée par la présence prolongée de LB naïfs (Mouquet et al. 2008). En raison de l'interaction étroite entre les LB et les LT, la déplétion de LB induite par le RTX impacte la présentation antigénique, la production de cytokines ainsi que les co-signaux d'activation nécessaires aux LT, entrainant indirectement la réduction des LT auto-réactifs (Eming et al. 2008a). Le déséquilibre LB naïfs/LB mémoires est maintenu sur le long terme même 5 ans après la première injection de RTX. Le nombre de LB IgG^+ spécifique des DSG est fortement diminué chez les patients en rémission complète par rapport à des patients nouvellement diagnostiqués pour le pemphigus contrairement au LB IgM^+ suggérant qu'un blocage dans le processus de commutation isotypique participe à l'effet bénéfique du traitement par RTX (Maho-Vaillant et al. 2021). En outre, l'émergence de cellules régulatrices pourrait avoir un rôle dans l'effet immunosuppresseur du RTX (Colliou et al. 2013) (Figure 33).

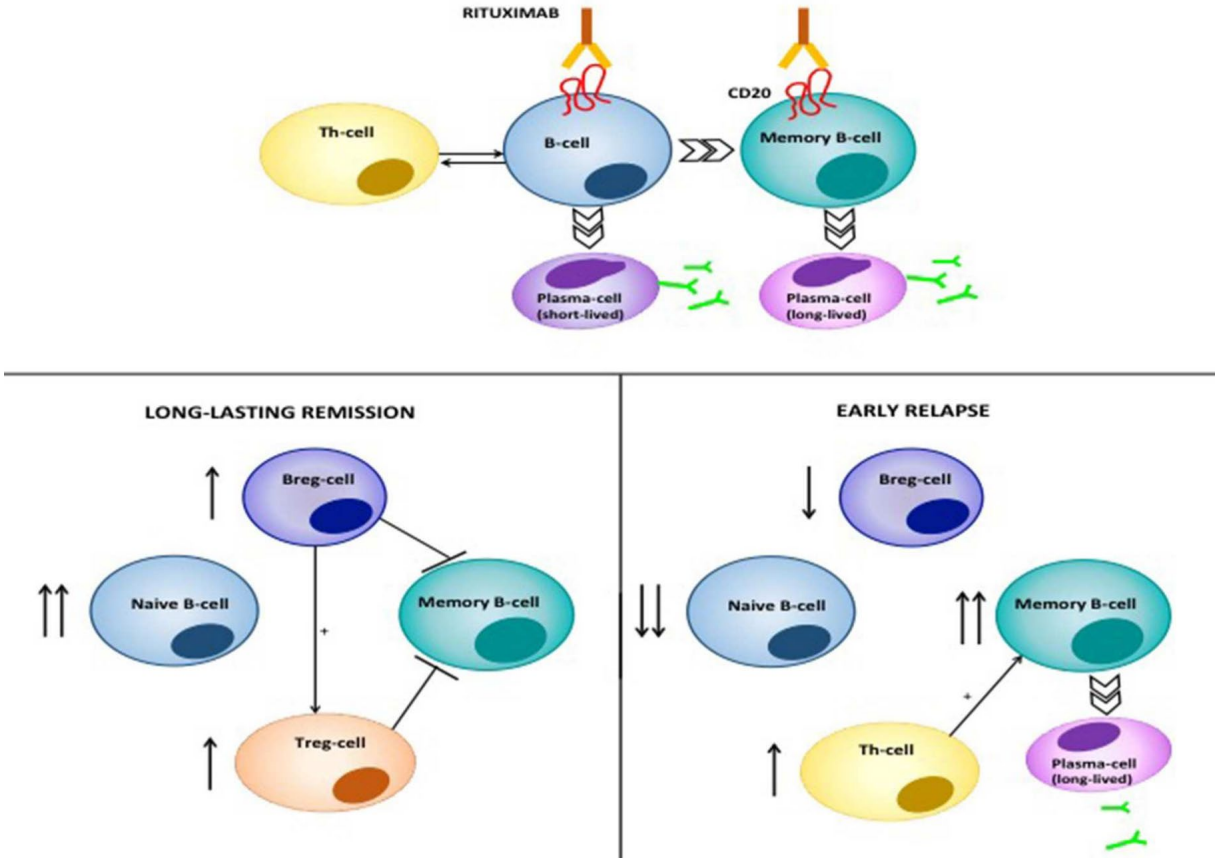


Figure 33 : Mode d'action du RTX dans le pemphigus
Le RTX induit une déplétion des cellules B et des cellules B mémoires.
De plus, le RTX diminue significativement la fonction des cellules T, en déplaçant les cellules B présentatrices d'antigènes. Les patients qui obtiennent des réponses durables présentent un rapport cellules B naïves/cellules B mémoires plus élevé. Les cellules B régulatrices (Breg) et les cellules T régulatrices (Treg) sont également augmentées et inhibent les cellules B mémoires spécifiques de la DSG3.
Au contraire, les patients présentant des rechutes précoces après un retour des LB ont un ratio cellules B naïves/mémoire diminué. La réapparition de cellules T autoréactives, spécifiques de DSG3, contribue à l'activation des cellules B autoréactives et à la production ultérieure d'IgG anti-DSG.

Les rechutes sont fréquentes après la reconstitution des LB, de 40 à 80% selon la durée du suivi (Ahmed et al. 2015; Ahmed et al. 2009; Colliou et al. 2013b; Joly et al. 2007). Il a été démontré que les rechutes après le RTX étaient associées aux mêmes clones B anti-DSG que ceux observés dans le phase active (Hammers et al., 2015). Cela suggère que les rechutes peuvent être liées à une déplétion incomplète des clones B anti-DSG, notamment ceux situés dans des « niches » non atteignables par le RTX (Nishifuji et al. 2000; Yuan et al. 2017a).

Le taux de rechutes est inversement corrélé au nombre de perfusions reçues de RTX (Colliou et al. 2013; Kim et al. 2017). En effet, les études utilisant plusieurs cycles de RTX n'observent que peu de rechutes (Ahmed et al. 2015; Ahmed et al. 2009; Kim et al. 2011) mais au prix d'un risque iatrogène majoré. La rechute de la maladie est désormais la principale

préoccupation du clinicien, étant donné l'exceptionnelle efficacité du traitement d'attaque. Le but est maintenant de trouver un moyen d'anticiper la rechute afin de proposer un traitement préventif par une perfusion additionnelle de RTX puisqu'il a été montré que, suite à une rechute, que la ré-administration de RTX pouvait entraîner une amélioration voire une rémission à long terme (Colliou et al. 2013; Kim et al. 2017).

Ces résultats plaident en faveur d'une utilisation du RTX répétée en plusieurs cycles dès les premiers signes de la maladie puis, si possible, avant les premiers signes de rechute.

Un essai randomisé contrôlé multicentrique français mené par notre équipe a ensuite démontré la supériorité du rituximab associé à de petites doses corticoïdes oraux par rapport à la corticothérapie standard à fortes doses chez les patients atteints de pemphigus nouvellement diagnostiqués, en termes d'efficacité mais également de tolérance, grâce à son effet d'épargne cortisonique (Joly et al. 2017) (ANNEXE 1). Grâce à cette étude, le rituximab a obtenu par la FDA (agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en juin 2018 puis par l'EMA (agence européenne des médicaments) en mars 2019 une autorisation de mise sur le marché dans le traitement des pemphigus modérés à sévères. Ainsi, il est maintenant indiqué en France en première intention dans le traitement des pemphigus vulgaires modérés à sévères seul ou en association à une corticothérapie orale et/ou locale.

- **Contre-indications et précautions d'emploi**

Les contre-indications au rituximab sont une hypersensibilité connue au rituximab, une infection sévère et/ou évolutive, un antécédent de cancer solide de moins de 5 ans ou de cancer viro-induit, un déficit immunitaire sévère, une insuffisance cardiaque sévère (New York Heart Association Classe IV) ou une maladie cardiaque sévère non contrôlée.

Avant de débuter le traitement, les patients doivent être à jour de leurs vaccinations et une vaccination anti-grippale (annuelle) et anti-pneumococcique (tous les 5 ans) sont recommandées. Les vaccins vivants sont contre-indiqués pendant le traitement par rituximab. Les vaccins doivent être effectués au maximum 15 jours avant de débuter le traitement par rituximab et 4 semaines pour les vaccins vivants. Une double vaccination contre le SARS-CoV2 est recommandée avant la première injection de rituximab et une troisième dose est recommandée chez les patients ayant déjà reçu du rituximab depuis moins de 18 mois.

En cas d'association du rituximab à un autre traitement immunosuppresseur (méthotrexate, mycophénolate mofétil), il est recommandé une prophylaxie anti-pneumocystose systématique par trimétoprime 800 mg-sulfaméthoxazole 160 mg (BACTRIM®) une fois par jour.

Un arrêt des antihypertenseurs est recommandé 12 heures avant la perfusion, du fait de l'effet potentiellement hypotenseur du rituximab.

Concernant les femmes en âge de procréer, aucun risque malformatif n'a été décrit. Cependant, une contraception efficace est recommandée pendant le traitement et jusqu'à un an après le traitement du fait d'un risque de faiblesse de l'immunité chez l'enfant à naître pendant les 6 premiers mois de vie. Actuellement, il n'existe aucune donnée sur le retentissement d'un traitement par rituximab sur la fertilité mais un avis auprès d'un Centre d'Etudes et de Conservation des Oeufs et du Sperme (CECOS) peut être nécessaire pour discuter un prélèvement d'ovocytes ou de sperme avant traitement.

- **Posologie et modalités d'administrations**

Traitement d'attaque :

La posologie initiale de rituximab administrée dans le pemphigus vulgaire est de deux perfusions de 1g par voie intraveineuse espacées de 2 semaines d'intervalle (soit J0 et J14). Il s'agit de la posologie administrée dans la plupart des pathologies auto-immunes, contrairement aux hémopathies lymphoïdes ou la posologie est de 375mg/m^2 une fois par semaine.

Traitement d'entretien :

Une perfusion d'entretien de 500 mg doit être administrée aux 12ème et 18ème mois. En effet, certaines études ont souligné l'intérêt de réaliser des perfusions d'entretien de rituximab pour prévenir la survenue de rechutes ultérieures (Joly et al. 2017).

Selon les taux d'anticorps anti-desmogléines 1 et 3 et l'évaluation clinique 3 mois après le premier cycle de rituximab (soit 1g à J0 et J14), une nouvelle perfusion de rituximab peut être administrée au 6ème mois afin de prévenir la survenue de rechutes (Jelti et al. 2019c; Mignard et al. 2020).

- **Effets indésirables**

Réactions à la perfusion

Les réactions à la perfusion se caractérisent par les symptômes suivants : tachycardie, hypotension, douleur thoracique, rash cutané, prurit, céphalées, vertiges et malaise. Une surveillance rapprochée pendant la perfusion est donc nécessaire. Ces réactions à la perfusion surviennent principalement lors des premières perfusions et régressent rapidement après l'arrêt de l'administration de rituximab. Ils seraient la conséquence d'une réaction anaphylactique à la composante murine de l'Ac. Dans la majorité des cas, un traitement par corticoïdes et anti-histaminiques permet une reprise de la perfusion avec un débit plus lent et sans récidive des symptômes. Un arrêt complet des perfusions est rarement nécessaire. Une pré-médication par voie intraveineuse avec du paracetamol 1g, de la diphenhydramine 5 mg, et de la méthylprednisolone 100 mg est systématiquement prescrite une heure avant la perfusion de rituximab afin de réduire le risque d'effets indésirables (Hébert and Joly 2018).

Autres effets indésirables

Le rituximab induit une déplétion des lymphocytes B circulants débutant dans les 3 jours après la perfusion. Le taux de lymphocytes B est ensuite indétectable jusqu'au 6ème mois après la première perfusion de rituximab et les perfusions d'entretien au 12ème et au 18ème mois permettent une disparition complète des lymphocytes B jusqu'au 24ème mois. Cette déplétion des lymphocytes B entraîne une majoration du risque d'infections. Le répertoire de lymphocytes B se reconstitue progressivement entre 6ème et 9ème mois après la dernière perfusion, bien que le taux de lymphocytes B circulants reste très bas jusqu'à 2 ans après la dernière perfusion. La réalisation de perfusions de rituximab en traitement d'entretien ne semble pas augmenter le risque de survenue d'infections (Hébert and Joly 2018).

Les autres effets indésirables principalement rapportés sont les réactions anaphylactiques, les décompensations de pathologies cardiaques pré-existantes, et les toxidermies à type de nécrose épidermique toxique (NET). Certains cas de réactivations virales et de leucoencéphalopathies multifocales progressives (LEMP) ont été décrits, extrêmement rares cependant dans le cadre des maladies auto-immunes et principalement en cas de traitement répété et associé à d'autres immunosuppresseurs (Hébert and Joly 2018).

C. *Les autres traitements utilisés :*

Des adjuvants immunosuppresseurs, le plus souvent l'azathioprine ou le mycophénolate mofétil, peuvent être utilisés en association aux GC pour leurs effets épargneurs cortisonique, bien que seuls quelques essais cliniques randomisés aient prouvé leur efficacité qui reste malgré tout moindre que celle observée avec le RTX (Atzmony et al. 2015; Werth et al. 2021).

Chez les patients réfractaires au traitement initial ou présentant des contre-indications aux corticoïdes, des options thérapeutiques de deuxième intention ciblant les auto-Ac ou les LB sont recommandées. Les traitements tels que l'injection d'IgIV (Enk et al. 2016), la plasmaphérèse (Søndergaard et al. 1997; Tan-Lim and Bystryn 1990) ou l'immunoadsorption des IgG (Meyersburg et al. 2012) permettent une réduction très rapide des auto-Ac dans le sérum des patients avec souvent réponse clinique rapide mais transitoire.

D. *Les traitements émergents :*

De nombreux traitements sont à l'essai dans le pemphigus ciblant des acteurs différents de la pathogénicité de la maladie (Figure 34).

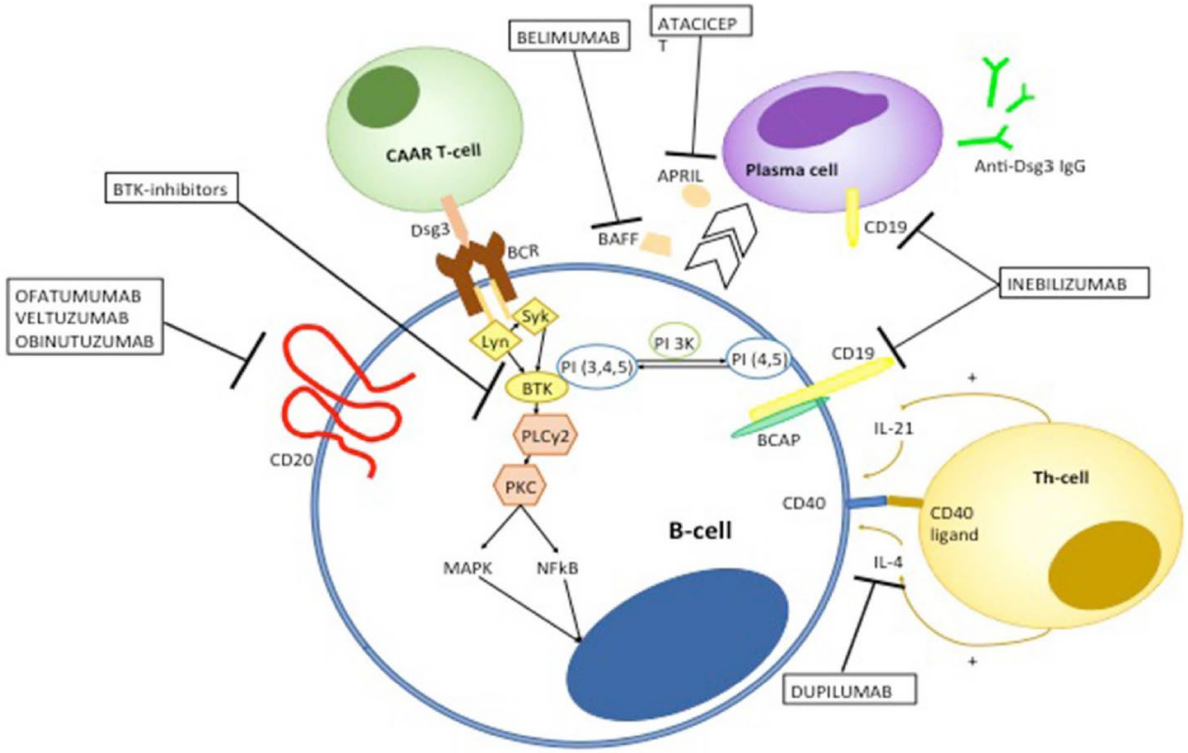


Figure 34 : Mécanismes d'action des thérapies émergentes pour le traitement du pemphigus (Ref didona et al. 2019).

a. *Les traitements ciblant les LB autres que le RTX*

Bien que le RTX ait considérablement amélioré le pronostic global du pemphigus, un échec du traitement ou une rechute précoce peuvent être observés. Comme nous l'avons dit, le RTX est un anticorps monoclonal chimérique, dont la composante murine serait responsable des réactions allergiques observées pendant la perfusion. Cependant, il est également responsable de l'apparition d'anticorps humains anti-chimères (HACAT), qui peuvent potentiellement limiter l'efficacité du médicament (Lunardon and Payne 2012). Au cours des dernières années, différents anticorps monoclonaux ciblant le CD20 ont été développés. Les Acm anti-CD20 de deuxième génération diffèrent du RTX en ce qu'ils sont humanisés ou entièrement humains, ce qui leur permet d'être moins immunogènes (Du et al. 2017). Parmi les anticorps monoclonaux anti-CD20 de deuxième génération, l'ofatumumab a été le premier à être autorisé. Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-CD20 qui cible la partie extracellulaire du CD20 proche de la membrane des cellules B, ce qui entraîne une cytotoxicité dépendante du complément plus puissante que celle du RTX (Karlin and Coiffier 2015). L'ofatumumab a démontré son efficacité chez un patient atteint de pemphigus, chez qui le RTX perd de son efficacité, vraisemblablement en raison de l'apparition du HACAT (Rapp

et al. 2018). Malheureusement, un essai contrôlé randomisé de l'ofatumumab dans le pemphigus a été prématurément interrompu en raison de restrictions financières. De même, Ellebrecht et al. ont décrit un succès thérapeutique avec le veltuzmab sous-cutané chez un patient atteint de pemphigus qui n'avait obtenu qu'une rémission partielle avec le RTX (Ellebrecht et al. 2014). Le veltuzumab est un anticorps monoclonal humanisé anti-CD20 qui possède des régions déterminantes complémentaires similaires à celles du RTX, mais une avidité de liaison et un effet sur la cytotoxicité dépendante du complément 2,7 fois supérieurs à ceux du RTX. Il peut également être administré par voie sous-cutanée, ce qui entraîne des effets secondaires moins importants que le RTX par voie intraveineuse (Du et al. 2017).

D'autres traitements intéressants comprennent le belimumab et l'atacicept, un anticorps IgG1 humain monoclonal et une protéine de fusion recombinante entièrement humaine, qui ciblent respectivement BAFF et un ligand induit par la prolifération (APRIL), qui sont impliqués dans la différenciation des cellules B dans les plasmocytes produisant des anticorps (Hébert et al. 2021; Kaul et al. 2016; Stohl 2017). Il convient de mentionner qu'un anticorps monoclonal antirécepteur BAFF (VAY736) fait l'objet d'un essai multicentrique randomisé, en aveugle partiel, contrôlé par placebo (NCT01930175) (Musette and Bouaziz 2018).

Les inhibiteurs de la kinase de Bruton (BTK) constituent également une thérapie prometteuse ciblant les cellules B dans le pemphigus. La BTK est un membre de la famille des kinases Tec, qui est principalement exprimée sur les cellules B, à l'exclusion des plasmocytes producteurs d'anticorps. L'activation de la BTK après reconnaissance de l'antigène par le BCR active différentes molécules en aval, notamment p38MAPK, MEK/ERK et NFkB, dont les signaux associés sont des régulateurs clés de la survie, de la prolifération, de la maturation et de la présentation de l'antigène des cellules B (Corneth et al. 2016; Crofford et al. 2016). Les inhibiteurs de BTK tels que l'ibrutinib ont montré des réponses cliniques impressionnantes chez les patients atteints de tumeurs malignes à cellules B, mais sont également prometteurs pour le traitement des troubles auto-immuns. En particulier, il a été démontré que la suractivation de BTK entraîne l'auto-immunité en augmentant la production d'auto-anticorps et le changement de classe, en favorisant le « dialogue croisé » entre les cellules B-T et la perte de tolérance des cellules B périphériques (Crofford et al. 2016). De plus, l'expression accrue de BTK dans les cellules B induit la différenciation des cellules auxiliaires folliculaires T, dont on a montré qu'elles étaient impliquées dans la pathogenèse du pemphigus. Fait intéressant, l'ibrutinib a été utilisé avec succès dans deux cas de PNP associés à des tumeurs malignes à cellules B (Ito et al. 2018; Vidal-Crespo et al. 2017).

L'efficacité du PRN1008, un inhibiteur oral de la BTK, est actuellement évaluée dans le cadre d'un essai clinique (NCT02704429).

Les anticorps monoclonaux ciblant les cellules CD19+ (une molécule de surface des cellules B qui est également exprimée sur les plasmocytes produisant des anticorps), tels que l'inebilizumab, constitueraient une stratégie efficace dans le pemphigus, étant donné que la persistance de plasmablastes à longue durée de vie produisant des auto-anticorps IgG anti-DSG fait probablement partie des mécanismes de résistance de la maladie au traitement par RTX (Musette and Bouaziz 2018).

b. *Récepteur chimérique d'auto-anticorps (CAR)-cellules T*

La thérapie par cellules T à récepteur d'antigène chimérique (CAR) a montré une efficacité remarquable dans les hémopathies malignes (Salter et al. 2018). Actuellement, deux thérapies par cellules CAR-T dirigées contre le CD19, le tisagenlecleucel et l'axicabtagene ciloleucel, ont été approuvées pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë réfractaire/récidivante et des lymphomes agressifs à cellules B. L'activité antitumorale remarquable des cellules CAR-T dans les hémopathies malignes a récemment conduit à étudier l'application clinique potentielle de cette thérapie dans les tumeurs solides (gliome, mélanome); un scénario intéressant a également été proposé dans les maladies auto-immunes (Flemming 2016). La thérapie cellulaire CAR-T est un exemple de thérapie par transfert adoptif de cellules : les cellules T dérivées du patient sont modifiées ex-vivo pour exprimer un CAR, qui permet la reconnaissance sélective de l'antigène d'intérêt et la destruction consécutive, sans restriction du CMH, des cellules porteuses de l'antigène (Wegner 2017).

Les CAR sont des protéines de fusion dont la structure comprend trois domaines : (i) le domaine extracellulaire, qui consiste en un fragment variable à chaîne unique et sert de domaine de reconnaissance de l'antigène ; (ii) le domaine transmembranaire ; et (iii) le domaine intracellulaire, qui consiste en la chaîne zêta (ζ) du CD3, un composant du récepteur endogène des cellules T (Dai et al. 2016). Dans les CAR de deuxième et troisième générations, le domaine intracellulaire est lié à des molécules costimulatrices, en particulier 4-IBB et CD28, qui favorisent la survie et la prolifération des cellules CAR-T après la reconnaissance de l'antigène, ce qui se traduit par une plus grande efficacité clinique (Long et al. 2018). La production de cellules CAR-

T nécessite différentes étapes. En bref, la protéine CAR est clonée dans des plasmides lentiviraux ou rétroviraux. Les vecteurs viraux sont ensuite transfectés dans des lignées cellulaires de conditionnement afin d'obtenir de grandes quantités de plasmides porteurs de CAR. Les cellules T du patient, obtenues par leucaphérèse, sont incubées avec le vecteur viral, qui pénètre dans les cellules et introduit l'ARN codant pour le CAR. Ce dernier est rétro-transcrit dans l'ADN et s'intègre de manière stable dans le génome des cellules T. La protéine CAR peut alors être transcrite et traduite et finalement exprimée à la surface des cellules T. Les cellules CAR-T sont finalement expansées, concentrées et cryoconservées pour être ensuite réinjectées au patient.

Récemment, Ellebrecht et al. ont créé un "récepteur d'auto-anticorps chimérique" (CAAR), dont le domaine extracellulaire était constitué de fragments de DSG3 (Ellebrecht et al. 2016) (Figure 35). Il a été démontré que les cellules T modifiées pour exprimer le CAAR DSG3 ciblent sélectivement les cellules B humaines anti-DSG3 in vitro. Les anticorps anti-DSG3 dérivés de sérums de patients n'ont pas aboli l'activité des cellules CAAR-T. Dans un modèle murin de PV, les cellules CAAR-T ont réduit les anticorps IgG pathogènes et amélioré la sévérité de la maladie. Hormis la possibilité que les cellules CAAR-T DSG3 puissent potentiellement cibler les kératinocytes exprimant les desmocollines et les desmogléines, qui se lient physiologiquement à DSG3, les auteurs n'ont pas observé de toxicité significative contre les kératinocytes. Enfin, les auteurs ont signalé une activité similaire contre les lymphocytes B anti-DSG3 entre les cellules CAAR-T et les cellules CAR-T CD19+, ce qui suggère que le ciblage sélectif des lymphocytes B autoréactifs n'entraîne pas une réduction de l'efficacité du traitement. Plus récemment, dans un modèle murin de PV actif avec production d'IgG anti-DSG3, le CAAR-T DSG3 a inhibé les réponses anticorps contre les épitopes DSG3 pathogènes et la liaison des auto-anticorps aux tissus épithéliaux, ce qui a conduit à la résolution clinique et histologique des lésions (Lee et al. 2020).

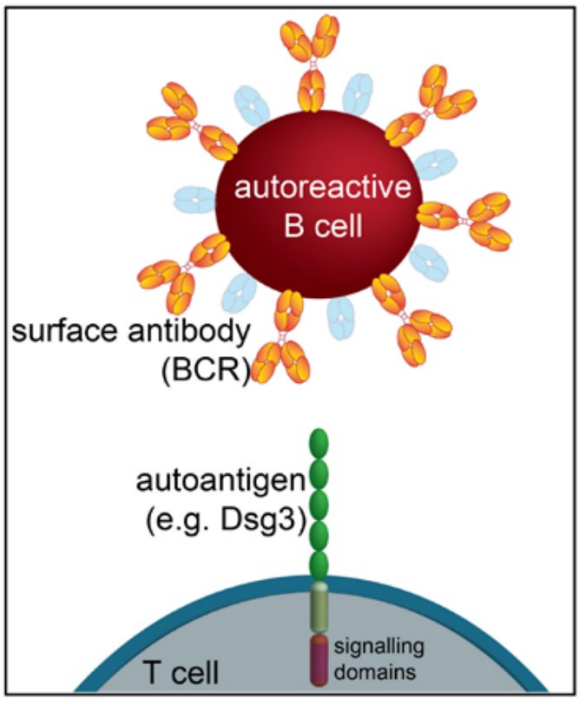


Figure 35 : Structure de l'anti-DSG3 CAAR T
(Ellebrecht et al. 2016).

Un avantage majeur de la thérapie par cellules CAAR-T dans le PV implique la possibilité de cibler les cellules B mémoires, responsables de la rechute observée après les thérapies anti-CD20. Un deuxième avantage de la thérapie par cellules CAAR-T est une immunosuppression réduite, puisque les cellules B normales ne sont pas censées être tuées. Comme les cellules B auto-réactives dans le pemphigus ne représentent qu'un sous-ensemble mineur des cellules B totales, il est peu probable que le traitement par cellules CAAR-T puisse entraîner des effets indésirables graves comme cela a été observé dans le cadre onco-hématologique.

Une limitation potentielle de la thérapie par cellules CAAR-T DSG3 dans le pemphigus est l'auto-immunité induite par les IgG non seulement contre DSG3 mais aussi contre la DSG1. Il a été démontré que les patients présentant un PV pouvaient éventuellement rechuter sous forme de PF (ou vice versa). Ces résultats soulignent l'importance de cibler simultanément les cellules B réactives DSG1 et DSG3. L'un des principaux défis de la thérapie cellulaire CAR-T dans le cancer est la capacité des cellules néoplasiques à s'échapper en régulant à la baisse l'expression de l'antigène cible. Une nouvelle stratégie pour surmonter la perte de l'antigène tumoral consiste à modifier les cellules T individuelles avec deux molécules CAR distinctes (CAR à double signal) ou avec une molécule CAR contenant deux domaines de liaison différents, appelée CAR en tandem

(Wang et al. 2017; Zah et al. 2016). Ainsi, une stratégie similaire pourrait être adoptée pour développer des cellules T CAR ciblant en même temps les cellules B réactives DSG1 et DSG3.

Enfin, une autre perspective thérapeutique intéressante consisterait à développer des cellules CAR-Treg pour réguler à la baisse la réaction immunitaire en cours contre la DSG (Schmidt et al. 2016b; Zhang et al. 2018).

Les coûts exorbitants constituent une autre limite de la thérapie par cellules CAAR-T dans le pemphigus.

c. *Cibler le récepteur Fc néonatal dans le pemphigus*

Le FcRn est un récepteur impliqué dans le transport des IgG de la mère au fœtus. Différentes études ont cependant montré que le FcRn joue également un rôle critique dans la régulation de l'homéostasie des IgG ; par conséquent, lorsque les IgG entrent dans les cellules exprimant le FcRn, la liaison IgG-FcRn dans les endosomes évite la dégradation des IgG et permet le recyclage et la libération ultérieure des IgG dans l'espace extracellulaire. Le blocage de l'interaction entre le FcRn et les auto-anticorps pathogènes dans les maladies auto-immunes pourrait ainsi accélérer le catabolisme des auto-anticorps pathogènes (Sesarman et al. 2010). Il est intéressant de noter que les kératinocytes expriment le FcRn (Cauza et al. 2005). En effet, différentes études ont démontré un rôle critique du FcRn dans le pemphigus. Les souris dépourvues de FcRn ne développent pas d'acantholyse par transfert passif d'anticorps anti-DSG (Li et al. 2005). L'efficacité thérapeutique des IgIV peut être au moins en partie attribuée à la saturation du FcRn, permettant une dégradation plus rapide des auto-anticorps anti-DSG (Li et al. 2005). Une étude récente a démontré que le FcRn induit l'entrée d'anticorps anti-mitochondriaux, qui sont également présents dans les sérums de pemphigus et contribuent au rétrécissement des kératinocytes dû aux dommages mitochondriaux. Dans cette étude, le blocage du FcRn a aboli la capacité des sérums de PV à provoquer le décollement des kératinocytes in vitro (Chen et al. 2015). Dans l'ensemble, ces études soulèvent des preuves d'un bénéfice potentiel du ciblage du FcRn dans le pemphigus. En 2018, les résultats d'une première étude randomisée en double aveugle contre placebo sur l'efgartigimod, un antagoniste du FcRn, incluant 62 volontaires sains, ont montré que le médicament était efficace pour réduire les taux d'IgG d'environ 75% après plusieurs doses (Ulrichts et al. 2018). Le traitement a été bien toléré et aucun événement indésirable grave n'a été enregistré. Une étude de phase II évaluant la sécurité et l'efficacité de l'ARGX-113, un fragment

Fc dérivé d'IgG1 humaine se liant au FcRn chez des patients atteints de PV et de PF est actuellement en cours (NCT03334058).

d. *Cibler les cellules T et le « crosstalk » entre les cellules T et B dans le pemphigus*

Nous avons montré que les cellules T autoréactives jouent un rôle important dans la physiopathologie du pemphigus et que les résultats divergent quant à l'implication des différentes polarisations et plus particulièrement les voies Th2 et Th17 (Echigo et al. 2006; Hennerici et al. 2016; Holstein et al. 2021). Concernant la voie Th2, plusieurs travaux suggèrent l'implication de cette voie sous différentes approches : i) les patients atteints de PV développaient une réponse de type Th2 prédominante contre DSG3 (Schmidt et al. 2018); ii) une augmentation d'IL-4 sérique a été trouvée chez les patients atteints de pemphigus et iii) la présence d'IgE ciblant DSG3 chez des patients atteints de pemphigus (Nagel et al. 2010b). Il est intéressant de noter que le dupilumab, un anticorps monoclonal ciblant l'IL-4, s'est récemment révélé efficace dans la pemphigoïde bulleuse, une maladie dans laquelle les cellules Th2 ciblant la protéine BP180, et les IgG et IgE contre la BP180 jouent également un rôle pathogène important (Kaye et al. 2018). Aucune étude n'a encore examiné l'efficacité du dupilumab dans le pemphigus même si les preuves pathogéniques suggèrent que le médicament pourrait être d'un bénéfice potentiel.

Parallèlement à l'activation des cellules T effectrices, on observe dans le pemphigus une régulation négative marquée des cellules Treg exprimant Foxp3 et spécifiques de la DSG. Dans des expériences sur souris, les cellules Treg créées chez des souris DSG3-/- et transférées chez des souris atteintes de PV ont été capables de réduire la production d'auto-anticorps (Yokoyama et al. 2011). Ainsi, l'amélioration des fonctions Treg dans le pemphigus semble être une stratégie prometteuse pour restaurer la tolérance immunitaire perdue contre la DSG. La perfusion de cellules T régulatrices polyclonales autologues est actuellement étudiée dans le cadre d'un essai multicentrique ouvert de phase 1 chez des patients atteints de PV et de PF (NCT03239470).

Comme mentionné précédemment, le RTX a un effet inhibiteur sur la co-stimulation des cellules B et T autoréactives dans le pemphigus par la déplétion des cellules B qui agissent comme cellules présentatrices d'antigènes (Eming et al. 2008b; Maho-Vaillant et al. 2021). Dans ce processus, on pense que l'interaction entre le CD40 exprimé à la surface des cellules B et le CD40L exprimé à la surface des cellules T joue un rôle essentiel. Il est intéressant de noter que le ciblage du CD40L a démontré son efficacité dans un modèle de PV chez la souris. Plus précisément, des

souris Rag2 KO exprimant la DSG3 et traitées avec un anticorps monoclonal ciblant CD40L n'ont pas développé de PV après avoir reçu des splénocytes de souris DSG3 KO immunisées à la DSG3 (Aoki-Ota et al. 2006). Toutefois, cet effet régulateur ne s'est pas produit lorsque l'anticorps monoclonal a été administré après le transfert des splénocytes, ce qui suggère que le ciblage de la communication T/B peut être un outil efficace pour prévenir les récidives de la maladie chez les patients qui ont déjà obtenu une rémission.

e. *L'hypothèse d'un traitement local*

Vinay et al. ont rapporté le cas de 3 patients présentant des lésions de PV orales réfractaires aux immunosuppresseurs, y compris le RTX intraveineux, chez qui des injections intralésionnelles de RTX ont conduit à une amélioration clinique significative, suggérant un effet immunomodulateur local du médicament (Vinay et al. 2018). Un article de Yuan et al. a démontré une accumulation de LB spécifiques de la DSG3 et de la DSG1 dans la peau des lésions de pemphigus (Yuan et al. 2017). De plus, ils ont montré que la peau peut servir d'organe lymphoïde tertiaire dans lequel l'interaction entre les cellules T CD4+ productrices d'IL-21 et d'IL17A et les LB conduit à la production locale d'auto-anticorps anti-DSG par des LB auto-réactifs. Il est possible que la formation de cet organe lymphoïde tertiaire dans la peau puisse contribuer à la résistance des lésions de pemphigus aux traitements immunosuppresseurs, y compris le RTX. La découverte de Yuan et al. peut également fournir une explication plausible à l'utilisation réussie du RTX intralésionnel dans les lésions de pemphigus oral observées par Vinaj et al. Il est intéressant de noter que la sécrétion d'IL-21 est associée à l'activation de JAK1 et JAK3. Ainsi, le tofacinib, un inhibiteur de JAK1 et de JAK3, a été suggéré comme un traitement possible du pemphigus.

OBJECTIFS

L'Etude Ritux 3 a clairement que le rituximab associé à une corticothérapie orale de courte durée était plus efficace que la corticothérapie standard à fortes doses. De plus, la répétition des perfusions permet un effet prolongé permettant ainsi de diminuer la survenue de rechutes tardives.

Au moment de débuter cette thèse, les objectifs ont été établis à partir des problèmes et questionnements auxquels les dermatologues faisaient face dans la prise en charge du pemphigus.

Ainsi la première problématique rencontrée était la survenue de rechutes fréquentes (>20%) chez les patients la première année après l'introduction du traitement. Nous avons donc, en comparant les données cliniques, sérologiques et cellulaires des patients rechuteurs et nons rechuteurs de l'étude Ritux 3, essayer de déterminer des facteurs prédictifs de rechute à court terme (Article n°1).

Parralèlement à ce premier travail, des données de la litérature émergaient quant à la possiblie implication de la cytokine BAFF dans les MAI et plus particulièrement dans le pemphigus, illustré notamment par le lancement d'un essai de phase II utilisant un antagoniste du BAFF-récepteur dans le pemphigus. Certains travaux suggéraient même un rôle particulier de BAFF dans les rechutes après utilisation de rituximab dans les MAI. Ainsi, nous avons concentré ce second travail sur l'implication de l'axe BAFF/BAFF-R en utilisant les données sérologiques de BAFF circulant, et les données transcriptomiques et cytométriques de l'expression du BAFF-R au sein des LB autoréactifs avant et après traitement par rituximab ou corticoïdes seuls (Article n°2).

La seconde problématique majeure issue des résultats de l'étude Ritux 3 et d'autres travaux ayant utilisé le RTX dans le pemphigus est d'expliquer les phénomènes de rémission complète prolongée observée chez bon nombre de patients, même plusieurs années après la dernière perfusion de RTX. L'objectif a alors été de trouver éléments permettant de répondre à cette question et à la problématique pratique qui en découle à savoir, comment expliquer/prédire les rechutes à long terme ?

Pour y répondre, nous avons :

- Procédé à une analyse transcriptomique de certains gènes d'intérêt sur des LB auto-réactifs et non auto-réactifs en cellule unique, avant et après traitement par RTX (Article n°3).

- Étudié la répartition des sous-classes d'isotype IgG anti-DSG3 en fonction des traitements reçus et du statut clinique (Article n°4).

- Étudié l'évolution sous traitement par RTX, en termes de fréquence et de niveau d'activation, des lymphocytes Tfh et Tfr auto-réactifs chez les patients présentant le HLADRB1*0402 de susceptibilité au PV (Article n°5).

RÉSULTATS

I. Article 1 : *Pronostic factors of relapse in patients treated by Rituximab in first line treatment of pemphigus*

Mignard C, Maho-Vaillant M, Bénichou J, Joly P, ***Hébert V***

Journal of the American Medical Association of Dermatology, 2020

Nous avons montré dans l'étude précédente que le rituximab associé à une corticothérapie orale de courte durée était plus efficace que la corticothérapie orale standard à fortes doses avec un taux de rémission complète à 2 ans de 89% contre 34% et un taux de rechute à 24 mois de 23% (11/46 patients) contre 46% (20/44 patients), respectivement.

Fait remarquable, 9 des 11 rechutes observées après 2 ans de traitement dans le bras rituximab sont survenues durant la première année après le début du traitement, et plus particulièrement entre les 6ème et 12ème mois, c'est-à-dire entre le début de la reconstitution lymphocytaire B et l'administration de la 1ère perfusion d'entretien de rituximab à M12. Aussi, nous pensions qu'une perfusion additionnelle de rituximab à 6 mois pouvait permettre d'éviter ces rechutes du fait de la cinétique observée des LB chez les rechuteurs.

Ainsi, nous avons donc tenté de déterminer des facteurs pronostiques de rechute chez les patients traités par rituximab. Nous avons montré que la présence d'au moins un des critères suivants : PDAI ≥ 45 au diagnostic et/ou la présence d'Ac anti-DSG1 ≥ 20UI/mL et/ou anti-DSG3 ≥ 130UI/mL entre le 3ème et le 6ème mois permettait de prédire une rechute à court terme avec une VPP de 50% et une VPN de 94%. Ainsi le traitement des patients présentant au moins l'un de ces critères permettrait potentiellement d'éviter 1 rechute sur 2. Au contraire, le risque de rechute encouru de ne pas traiter systématiquement un patient qui ne présente aucun de ces critères serait faible, de l'ordre de 5%.

Ce travail a conduit à une modification des recommandations françaises en ce sens et l'étude observationnelle PRéRi (*Pemphigus Relapse Ritux*) est en cours afin de valider ces modifications de bonnes pratiques.

JAMA Dermatology | Original Investigation

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

Claire Mignard, MD; Maud Maho-Vaillant, PhD; Marie-Laure Golinski, PhD; Pierre Balayé, MD; Catherine Prost-Squarcioni, MD, PhD; Estelle Houivet, MSc; Sébastien Calbo, PhD; Bruno Labeille, MD, PhD; Catherine Picard-Dahan, MD; Maria Polina Konstantinou, PhD; Guillaume Chaby, MD; Marie-Aleth Richard, MD, PhD; Jean-David Bouaziz, MD, PhD; Sophie Duvert-Lehembre, MD; Emmanuel Delaporte, MD, PhD; Philippe Bernard, MD, PhD; Frédéric Caux, MD, PhD; Marina Alexandre, MD; Saskia Ingen-Housz-Oro, MD, PhD; Pierre Vabres, MD, PhD; Gaëlle Quereux, MD, PhD; Alain Dupuy, MD, PhD; Sébastien Debarbieux, MD; Martine Avenel-Audran, MD; Michel D'Incan, MD, PhD; Christophe Bédane, MD, PhD; Nathalie Bénéton, MD; Denis Jullien, MD, PhD; Nicolas Dupin, MD, PhD; Laurent Misery, MD, PhD; Laurent Machet, MD, PhD; Marie Beylot-Barry, MD, PhD; Olivier Dereure, MD, PhD; Bruno Sassolas, MD; Jacques Benichou, MD, PhD; Pascal Joly, MD, PhD; Vivien Hébert, MD; for the French Study Group on Autoimmune Bullous Skin Diseases

IMPORTANCE Rituximab and short-term corticosteroid therapy are the criterion standard treatments for patients with newly diagnosed moderate to severe pemphigus.

OBJECTIVE To examine factors associated with short-term relapse in patients with pemphigus treated with rituximab.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This post hoc analysis of a randomized clinical trial (Comparison Between Rituximab Treatment and Oral Corticosteroid Treatment in Patients With Pemphigus [RITUX 3]) conducted from January 1, 2010, to December 31, 2015, included patients from 20 dermatology departments of tertiary care centers in France from the RITUX 3 trial and 3 newly diagnosed patients treated according to the trial protocol. Data analysis was performed from February 1 to June 30, 2019.

EXPOSURE Patients randomly assigned to the rituximab group in the RITUX 3 trial and the 3 additional patients were treated with 1000 mg of intravenous rituximab on days 0 and 14 and 500 mg at months 12 and 18 combined with a short-term prednisone regimen.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Baseline (pretreatment) clinical and biological characteristics (Pemphigus Disease Area Index [PDAI] score, ranging from 0-250 points, with higher values indicating more severe disease) and changes in anti–desmoglein (DSG) 1 and anti-DSG3 values as measured by enzyme-linked immunosorbent assay during the 3 months after rituximab treatment were compared between patients with disease relapse and those who maintained clinical remission during the first 12 months after treatment. The positive and negative predictive values of these factors were calculated.

RESULTS Among 47 patients (mean [SD] age, 54.3 [17.0] years; 17 [36%] male and 30 [64%] female) included in the study, the mean (SD) baseline PDAI score for patients with relapsing disease was higher than that of the patients with nonrelapsing disease (54 [33] vs 28 [24]; $P = .03$). At month 3, 7 of 11 patients with relapsing disease (64%) vs 7 of 36 patients with nonrelapsing disease (19%) had persistent anti-DSG1 antibody values of 20 IU/mL or higher and/or anti-DSG3 antibody values of 130 IU/mL or higher ($P = .01$). A PDAI score of 45 or higher defining severe pemphigus and/or persistent anti-DSG1 antibody values of 20 IU/mL or higher and/or anti-DSG3 antibody values of 130 IU/mL or higher at month 3 provided a positive predictive value of 50% (95% CI, 27%-73%) and a negative predictive value of 94% (95% CI, 73%-100%) for the occurrence of relapse after rituximab.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE The findings suggest that initial PDAI score and changes in anti-DSG antibody values after the initial cycle of rituximab might help differentiate a subgroup of patients with high risk of relapse who might benefit from maintenance rituximab infusion at month 6 from a subgroup of patients with low risk of relapse who do not need early maintenance therapy.

TRIAL REGISTRATION NCT00784589

JAMA Dermatol. 2020;156(5):545-552. doi:10.1001/jamadermatol.2020.0290
Published online March 18, 2020.

CME Quiz at jamacmelookup.com and CME Questions page 608

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Group Information: The members of the French Study Group on Autoimmune Bullous Skin Diseases appear at the end of the article.

Corresponding Author: Claire Mignard, MD, Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, INSERM U1234, 1 Rue de Germont, 76031 Rouen Cedex, France (c.mignard@orange.fr).

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

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

In the past decade, more than 1000 patients with severe recalcitrant or relapsing cases of pemphigus have been treated with rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody. The efficacy and safety of rituximab as first-line treatment in patients with moderate to severe forms of pemphigus have been recently demonstrated in a large randomized clinical trial (Comparison Between Rituximab Treatment and Oral Corticosteroid Treatment in Patients With Pemphigus [RITUX 3]) in which 90 patients were randomly assigned to receive a standard regimen of corticosteroids vs rituximab associated with a short-term corticosteroid regimen.[16] In that trial, the 2-year rate of complete remission while not receiving therapy was 89% in the rituximab arm vs 34% in the standard corticosteroid arm. After 24 months of follow-up, 11 relapses (23%) occurred in the rituximab arm vs 20 relapses (46%) in the standard corticosteroid regimen arm. Relapses have been consistently reported in the literature in patients who received an initial cycle of rituximab without maintenance infusions during their disease.[17-21] In the RITUX 3 trial, only 3 of the 11 relapses (27%) in the rituximab group occurred after the 2 maintenance infusions at months 12 and 18, whereas 8 of 11 relapses (73%) occurred between months 6 and 12, which might suggest a clinical benefit of a first maintenance infusion at month 6 in some patients.

The aims of the present study were to evaluate factors associated with short-term relapse of pemphigus and to identify a subgroup of patients who might benefit from an additional infusion of rituximab at month 6 after the initial cycle of rituximab. Because of the cost and immunosuppressive effect of rituximab, the identification of factors associated with early relapse may inform the risk and benefit considerations of an additional infusion of rituximab and its use only in patients with a high risk of relapse.

Key Points

Question What are the factors associated with short-term relapse in patients with pemphigus who receive rituximab as first-line therapy?

Findings This post hoc analysis of a randomized clinical trial that included 47 patients treated with rituximab as first-line therapy identified 2 factors associated with early relapse: a baseline Pemphigus Disease Area Index score of 45 or higher corresponding to severe pemphigus, and persistent anti–desmoglein 1 antibody enzyme-linked immunosorbent assay level greater than 20 IU/mL and/or anti–desmoglein 3 antibody enzyme-linked immunosorbent assay level greater than 130 IU/mL 3 months after rituximab treatment. These factors had a positive predictive value of 50% and a negative predictive value of 94% for the occurrence of early relapse.

Meaning The findings suggest that these 2 factors might help differentiate a subgroup of patients with high risk of relapse who might benefit from maintenance rituximab infusion at month 6 from a subgroup of patients with low risk of relapse who do not need early maintenance therapy.

Methods

Study Design and Participants

This secondary analysis of a randomized clinical trial uses data obtained from patients from 20 dermatology departments of tertiary care centers in France in the rituximab group of the RITUX 3 trial, conducted from January 1, 2010, to December 31, 2015, and from 3 patients with newly diagnosed pemphigus who underwent first-line treatment with rituximab according to the same regimen outside the RITUX 3 trial. Patients with newly diagnosed pemphigus were treated with 1 infusion of 1000 mg of intravenous rituximab on days 0 and 14 and 1 infusion of 500 mg at months 12 and 18 combined with a short-term prednisone regimen (0.5 mg/kg daily for moderate pemphigus and 1 mg/kg daily for severe pemphigus). At the time of the study, classification of pemphigus severity was based on the criteria of Harman et al.[7] Severe pemphigus was defined as skin involvement of more than 5% of the body surface area, significant mucosal involvement defined as more than 10 mucosal erosions, diffuse gingivitis or confluent large erosions, or involvement of 2 or more mucosal sites. The initial prednisone dose was maintained for 1 month and thereafter gradually reduced after achievement of disease control, with the aim to stop prednisone therapy after 3 months in patients with moderate pemphigus and after 6 months in patients with severe pemphigus. Data analysis was performed from February 1 to June 30, 2019. The CPP Nord-Ouest Ethics Committee approved the study. All patients provided written informed consent.

Clinical and Immunologic Settings

Clinical data (age, sex, body mass index [calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared], and pemphigus type) and pemphigus severity were recorded from patients' case report forms and patients' medical files. Baseline pemphigus severity was assessed using the Pemphigus Disease Area Index (PDAI) score.[22] This score was created by a panel of international experts to provide an objective measurement of pemphigus activity.[23] It takes into account the number of skin and mucosal lesions, their extent, and the number of anatomical skin and mucosal areas involved. The PDAI activity score ranges from 0 to 250 points (120 points for skin, 10 for scalp, and 120 for mucosal activity). Cutoff values of 15 and 45 points have been proposed to define mild, moderate, and severe types of the disease.[22] The PDAI score has high interrater reliability and is therefore a robust tool to accurately assess pemphigus activity.[24] A relapse was defined as the reappearance

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

of at least 3 new lesions in a month that did not heal spontaneously within 1 week.[23] Short-term relapse was defined as a relapse that occurred during the first year after the initial cycle of rituximab.

Anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values were measured using a commercially available DSG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (EUROIMMUN Desmoglein test, Medizinische Labordiagnostika) according to the manufacturer's instructions. Blood samples were collected on days 0, 30, 90, 180, 270, and 360. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from whole blood by Ficoll-Paque gradients (GE Healthcare Lifescience) and cryopreserved. The phenotype of the peripheral blood mononuclear cells was determined by flow cytometry with monoclonal antibodies against CD19 phycoerythrin, CD4 electron-coupled dye, CD3 phycoerythrincyanin 5, and CD8 fluorescein isothiocyanate (Beckman Coulter) for T and B cells and CD4 peridinin chlorophyll protein, CD25 phycoerythrin, and CD127 fluorescein isothiocyanate (eBioscience, Becton Dickinson, and Beckman Coulter) for regulatory T cells. B cells were defined as $CD19^+$, T cells were defined as $CD3^+CD4^+$, and regulatory T cells as $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$. Rituximab serum concentrations were measured using a commercially available ELISA (LISA-TRACKER Duo Rituximab, Theradiag) on days 30, 60, 90, and 180 after initial treatment with rituximab.

Statistical Analysis

To determine factors associated with short-term relapse after rituximab therapy, we compared baseline (pretreatment) clinical characteristics of age, sex, type of pemphigus (pemphigus vulgaris vs pemphigus foliaceus), type of involvement (skin, mucosal, or both), and PDAI severity score between patients who maintained complete remission for the first year of treatment and those who experienced disease relapse during the first year after the initial cycle of rituximab. Then we compared the evolution of anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values during the 6-month period after rituximab treatment between patients who maintained complete remission and those who experienced disease relapse during the first year.

To determine the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of anti-DSG antibodies and PDAI score, we used previously published cutoff values. The cutoff value for the PDAI score differentiating severe from nonsevere pemphigus was determined from the study conducted by Boulard et al[22] (severe pemphigus was defined by a PDAI score ≥45).[22] According to the study by Abasq et al,[25] cutoff values of 130 IU/mL for anti-DSG3 antibodies and 20 IU/mL for anti-DSG1 antibodies were used because they provide high positive predictive values (84% for anti-DSG3 and 79% for anti-DSG1) and negative predictive values (81% for anti-DSG3 and 84% for anti-DSG1) for the occurrence of mucosal and skin relapses.[25] To evaluate these cutoff values from the literature on the present series of patients with pemphigus, a receiver operating characteristic curve was calculated. A cutoff value of 20 IU/mL for anti-DSG1 antibodies and 120 IU/mL for anti-DSG3 antibodies gave optimal sensitivity and specificity. These cutoff values were equal for anti-DSG1 antibodies (20 vs 20 IU/mL) and close for anti-DSG3 (120 vs 130 IU/mL) to those reported by Abasq et al.[25] Positive and negative predictive values of factors associated with relapse were calculated based on the 23% rate of relapse observed in patients assigned to the rituximab arm in the RITUX 3 trial.

We also compared rituximab serum concentrations depending on time (from day 14 to day 180) between patients with relapsing and nonrelapsing disease (area under the concentration-time curve) by the trapezoidal method (Prism software, version 7; GraphPad Software Inc). We compared the proportions of B cells, CD4 T cells, and regulatory T cells between patients with relapsing and nonrelapsing disease from baseline to the month 6 evaluation using Prism software (2-way analysis of variance with Sidak posttest).

The Fisher exact test was used to compare qualitative variables, and the *t* test or Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables. For all tests, 2-sided $P < .05$ was considered to be statistically significant. All analyses were performed with R statistical software, version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing).

Results

Baseline Characteristics and Clinical Course

A total of 47 patients (mean [SD] age, 54.3 [17.0] years; 17 [36%] male and 30 [64%] female) were treated with rituximab plus short-term oral prednisone. Forty-four of these patients were included in the RITUX 3 trial, and the other 3 patients were treated with the same regimen of rituximab plus short-term oral prednisone after the end of the RITUX 3 study.

During the 12 months after the initial infusion of 2 g of rituximab, 11 of the 47 patients (23%; 95% CI, 13%-39%) experienced relapse, including 2 patients with pemphigus foliaceus and 9 patients with pemphigus vulgaris, after a median delay of 219 days (interquartile range, 154-277 days). All relapses occurred after month 6. There were 6 mucosal, 3 cutaneous, and 2 mucocutaneous disease relapses.

Mean (SD) age (50.10 [18.12] vs 55.58 [16.34] years; $P = .30$), sex (5 [45.5%] male and 6 [54.5%] female vs 12 [33.3%] male and 24 [66.7%] female; $P = .49$), mean (SD) body mass index (24.9 [3.9] vs 24.8 [3.7]; $P = .37$), type of pemphigus (9 [81.8%] vs 31 [86.1%] with pemphigus vulgaris vs 2 [18.2%] vs 5 [13.9%] with pemphigus foliaceus; $P = .66$), and median (range) delay between disease onset and first rituximab infusion (94 [35-563] days vs 112 [2-1604] days for cutaneous involvement, $P = .47$ vs 84 [27-324] days vs 123 [14-605] days for mucosal involvement, $P = .75$) were not significantly different between patients with disease relapse vs those without relapse (Table). Patients with disease relapse had an initially more severe pemphigus than those without relapse (mean [SD] baseline PDAI score, 54 [33] vs 28 [24]; $P = .03$) (Table). Accordingly, 6 of the 11 patients with disease relapse (55%) had severe pemphigus (baseline PDAI score ≥45) vs 5 of the 36 patients without relapse (14%) ($P = .01$).

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

Table. Baseline Clinical Characteristics of Patients With Relapsing and Nonrelapsing Disease[a]

Characteristic	Relapsing Disease (N = 47)		P Value
	Yes	No	
Patients	11 (23.4)	36 (76.6)	NA
Age, mean (SD), y	50.10 (18.12)	55.58 (16.34)	.30
Sex			
Male	5 (45.5)	12 (33.3)	.49
Female	6 (54.5)	24 (66.7)	
BMI, mean (SD)	24.9 (3.9)	24.8 (3.7)	.37
Type of pemphigus			
Vulgaris	9 (81.8)	31 (86.1)	.66
Foliaceus	2 (18.2)	5 (13.9)	
Initial presentation			
Mucosal	1 (9.1)	8 (22.2)	.66
Cutaneous	2 (18.2)	6 (16.7)	>.99
Mucocutaneous	8 (72.7)	22 (61.1)	.72
PDAI score, mean (SD)	54.41 (33.3)	28.5 (23.9)	.03
Delay between disease onset and first rituximab infusion, median (range), d			
Cutaneous involvement	94 (35-563)	112 (2-1604)	.47
Mucosal involvement	84 (27-324)	123 (14-605)	.75

Abbreviations: BMI, body mass index (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared); NA, not applicable; PDAI, Pemphigus Disease Area Index.

[a] Data are presented as number (percentage) of patients unless otherwise indicated.

Anti-DSG Antibodies

Mean anti-DSG1 values decreased from 257 IU/mL at baseline to 20 IU/mL at month 3 and 7 IU/mL at month 6, and mean anti-DSG3 values decreased from 850 IU/mL at baseline to 88 IU/mL at month 3 and 38 IU/mL at month 6 (Figure 1). To identify a subgroup of patients with a higher relapse risk who could benefit from a first maintenance infusion of rituximab at month 6, we compared the mean anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody levels at baseline and at the month 3 evaluation between the subgroups of patients with relapsing and nonrelapsing disease.

Mean (SD) anti-DSG1 antibody values were not significantly higher in patients with relapsing disease compared with those with ongoing remission at baseline (520 [747] IU/mL vs 245 [280] IU/mL; $P = .28$) and month 3 (46 [76] IU/mL vs 16 [42] IU/mL; $P = .28$). Similar findings were observed for anti-DSG3 antibodies at baseline (1444 [1525] IU/mL vs 914 [1114] IU/mL; $P = .35$) and month 3 (193 [280] IU/mL vs 80 [133] IU/mL; $P = .27$).

B and T Cells

B Cells

At baseline, patients who had disease relapse had a higher mean percentage of $CD19^+$ B cells than did patients with nonrelapsing disease (22.11% vs 9.80%; $P < .001$) (Figure 2A). Complete B-cell depletion was observed in patients with relapsing and nonrelapsing disease at the month 1 evaluation after rituximab treatment. At month 6, the frequency of B cells was still close to 0 in patients with relapsing and nonrelapsing disease (0.07% vs 0.16%; $P > .99$).

T Cells

The mean percentage of $CD4^+$ T cells measured from baseline to month 6 was not significantly different between patients with relapsing and nonrelapsing disease (Figure 2B). The percentage of $CD25^{hi}$ $CD127^{low}$ regulatory T cells at baseline was higher in patients without disease relapse than in those with disease relapse (5.71% vs 2.91%, $P < .001$). However, the difference between the 2 subgroups was no longer statistically significant after rituximab treatment (month 6: 4.7% vs 3.6%, $P = .35$) (Figure 2C).

Rituximab Serum Concentrations

Rituximab serum concentrations in samples measured from day 30 to day 180 were not significantly different between patients with relapsing and nonrelapsing disease (area under the curve: 3056 [95% CI, 2261-3851] vs 3062 [95% CI, 1956-4168]) (Figure 3).

Factors Associated With Relapse

At baseline, a PDAI score of 45 or higher (corresponding to severe pemphigus) had a positive predictive value of 55% (95% CI, 23%-83%) for the occurrence of a relapse during the 12-month period after the initial cycle of rituximab treatment. Patients with a PDAI score less than 45 had a high negative predictive value (86%; 95% CI, 71%-95%) for the absence of relapse.

At month 3, according to the study by Abasq et al,[25] cut-off values of 130 IU/mL for anti-DSG3 antibodies and 20 IU/mL for anti-DSG1 antibodies were used because they provide high positive predictive values (84% for anti-DSG3 and 79% for anti-DSG1) and negative predictive values (81% for anti-DSG3 and 84% for anti-DSG1) for the occurrence of mucosal and skin relapses. At month 3, 7 of the 11 patients with disease relapse (64%) had antibody values higher than 20 IU/mL for anti-DSG1 and/or 130 IU/mL for anti-DSG3 vs 7 of the 36 patients (19%) who had persistent clinical remission ($P = .01$).

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

This set of 2 criteria (ie, baseline PDAI score ≥45 and/or persistent anti-DSG1 antibody levels ≥20 IU/mL and/or anti-DSG3 antibody levels ≥130 IU/mL) 3 months after the initial cycle of rituximab provided a sensitivity of 91% (95% CI, 59%-100%), a specificity of 60% (95% CI, 39%-79%), a positive predictive value of 50% (95% CI, 27%-73%), and a negative predictive value of 94% (95% CI, 73%-100%) for the occurrence of a relapse after the initial cycle of rituximab treatment.

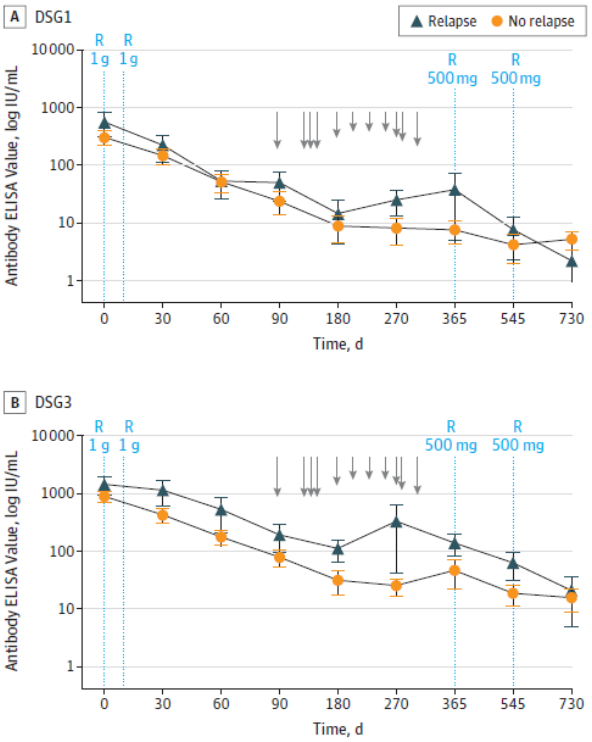
Discussion

This study identified 2 factors associated with short-term relapse after initial treatment with rituximab: the initial PDAI score, which reflects the severity of pemphigus, and the evolution of anti-DSG antibody values 3 months after the initial cycle of rituximab. These findings are important because rituximab has been recently approved as first-line treatment of moderate to severe pemphigus.[26] The set of criteria identified in the present study provided a 50% positive predictive value. Assuming that a maintenance infusion of rituximab at month 6 would be consistently effective, our results suggest the possibility of treating 2 patients with a maintenance infusion of rituximab at month 6 to avoid relapse in 1 patient. Conversely, the 94% negative predictive value indicates that a maintenance infusion of rituximab could be avoided in approximately half of the patients treated with first-line therapy. Avoiding early relapse after an initial cycle of rituximab is also important because 20% of patients experienced relapse between months 6 and 12 in a clinical trial,[16] whereas only a few relapses (3 of 11) occurred between month 12 and the end of the study at month 24.

The PDAI score was reported as an easy-to-use and robust tool to accurately assess pemphigus severity, with high interrater reliability and good correlation over time with other markers of pemphigus severity.[22,24] Our findings suggest that initial pemphigus severity might be associated with early relapse after first-line treatment with rituximab because patients with disease relapse had a 2-fold higher baseline PDAI severity score compared with patients without disease relapse during the 12-month period after the initial cycle of rituximab. Patients with a PDAI score of 45 or higher had a positive predictive value of 55% for the occurrence of a relapse during the year after the initial infusion of rituximab, whereas those with a PDAI score less than 45 had an 86% negative predictive value for the absence of relapse after rituximab therapy.

A change in anti-DSG1 and, to a lesser degree, anti-DSG3 antibody levels has been reported to correlate with the course of pemphigus skin and mucosal lesions.[7,25,27,28] Despite the fact that the number of circulating B lymphocytes was close to 0 from 3 to 6 months after the initial cycle of rituximab treatment in patients with and without disease relapse, we observed that patients with relapse had higher anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody levels at the month 3 evaluation than did those without relapse after rituximab therapy. This time point was chosen because it is often used by practitioners to assess the epithelialization of skin and mucosal lesions after the delay of action of rituximab and because measurement of anti-DSG antibodies at month 3 allows a new, early infusion of rituximab to be scheduled if necessary.

Figure 1. Anti-Desmoglein (DSG) 1 and Anti-DSG3 Antibody Values During the 24-Month Period After Initial Treatment With Rituximab in Patients With Relapsing and Nonrelapsing Disease

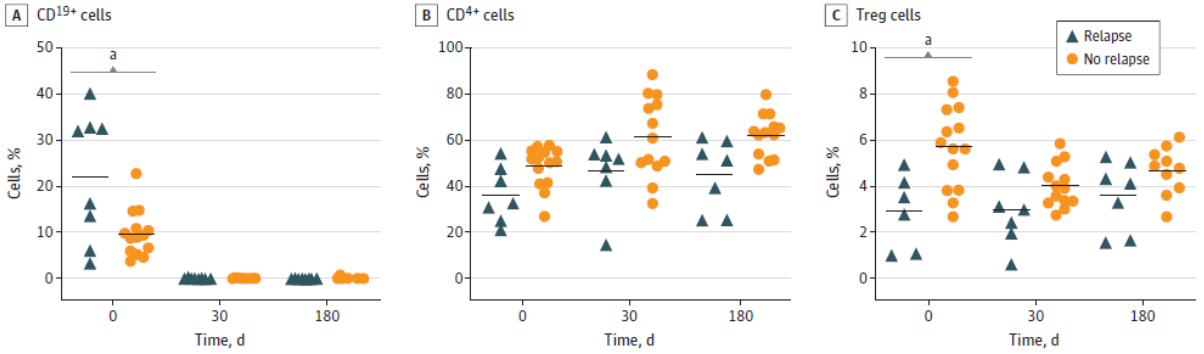


ELISA indicates enzyme-linked immunosorbent assay; R, rituximab infusions; arrows, relapses; and error bars, SDs.

Owing to the poor specificity of anti-DSG3 antibody level, we used cutoff values corresponding to 20 IU/mL for anti-DSG1 and 130 IU/mL for anti-DSG3, which have been reported to provide high positive and negative predictive values for the occurrence of skin and mucosal relapses, respectively.[25] These cutoff values were close to those that we calculated using a receiver operating characteristic curve. The persistence of anti-DSG1 antibody values of 20 IU/mL or higher and/or anti-DSG3 antibody values of 130 IU/mL or higher at the month 3 evaluation provided a positive predictive value of 50% and a negative predictive value of 88%, which were close to those calculated from the initial PDAI score. Despite the difference between baseline anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values not reaching statistical significance, which was likely related to the low number of patients with relapse, the mean baseline anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values from patients with disease relapse (520 anti-DSG1 antibodies and 1444 anti-DSG3 antibodies) were almost twice as high as those observed in patients without relapse (245 anti-DSG1 antibodies and 914 anti-DSG3 antibodies). Additional studies are needed to validate whether baseline anti-DSG1 and anti-DSG3 antibody values are a significant indicator of relapse.

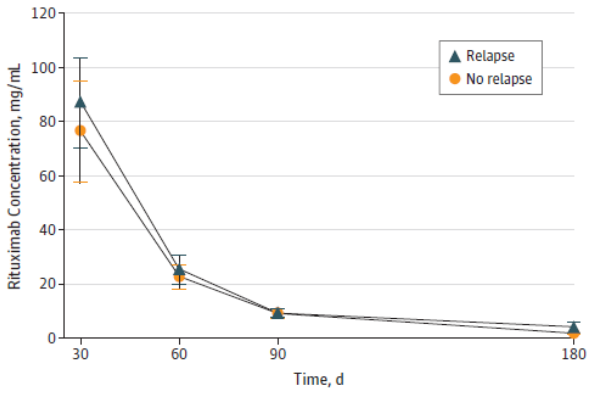
© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

Figure 2. Frequencies of CD19+ B Cells, CD4+ T Cells, and Regulatory T (Treg) Cells in Peripheral Blood Lymphocytes During Follow-up



[a] $P < .001$.

Figure 3. Comparison of Rituximab Serum Concentrations Between Patients With Relapsing and Nonrelapsing Disease



Area under the curve of rituximab serum concentrations depending on time.

We assessed changes in peripheral blood B lymphocyte counts after treatment with rituximab because early B-cell recovery has been reported to precede the occurrence of a clinical relapse in some autoimmune diseases, in particular rheumatoid arthritis.[29-31] We observed that at baseline, the mean percentage of peripheral blood CD19+ B cells was higher in patients with disease relapse than in those who maintained clinical remission. However, the significance of this finding is uncertain because we were not able to record patients' blood cell counts and therefore were unable to determine the absolute number of blood B lymphocytes. Nevertheless, patients with relapsing and nonrelapsing disease had complete B-cell depletion during the first 3 months after rituximab treatment.

The CD4+ T-cell frequency was not different between patients with relapsing and nonrelapsing disease in our study, unlike the study by Albers et al,[31] which found that relapses were associated with a lower number of circulating CD4+ T cells. However, in that study, T-cell counts were measured in patients previously treated with corticosteroids and or immunosuppressants, which induce T-cell lymphopenia; thus, one may hypothesize that the lower rate of CD4 T cells observed in patients with relapsing disease from their study was at least partly associated with the cumulative dose of corticosteroids and/or immunosuppressants previously received by these patients. Conversely, in the present study, a higher frequency of regulatory T cells was found in patients with nonrelapsing disease compared with those with relapsing disease, which is in accordance with regulatory mechanisms previously described in autoimmune diseases.[32] Differences in serum concentrations of rituximab between patients with relapsing and nonrelapsing disease also were not found, which is in accordance with the absence of an association between the detection of rituximab human antichimeric antibodies and the occurrence of relapses reported in a recent study.[33]

The interest of using multiple infusions of rituximab during the initial phase of treatment[34] or as maintenance therapy has been suggested in previous studies.[35,36] Sanchez et al[36] reported that maintenance infusions of rituximab (1 g every 6 months) for patients with clinical remission until negative serum anti-DSG antibody titers was associated with the maintenance of long-lasting complete remission, with good tolerance.[36] Although there is increasingly more evidence that maintenance therapy with rituximab is useful to maintain complete remission, the exact modalities of this maintenance therapy remain to be determined. However, despite the short-term tolerance of these maintenance regimens using multiple infusions of rituximab appearing to be good, the use of repeated infusions of rituximab beyond 4 cycles may be costly and may be associated with prolonged B-cell depletion that is probably avoidable in some patients.

The rapid tapering of corticosteroid doses, which was planned in the protocol to demonstrate the interest of first-line treatment with rituximab, may have been associated with the occurrence of relapses after 6 months, which in addition corresponded to the time of B-cell recovery. Many clinical data are available from dermatologists to support the rapid tapering of corticosteroid doses without rituximab leading to a high rate of relapses, justifying the progressive tapering of corticosteroid doses (and consequently the high cumulative doses of corticosteroids); this treatment strategy was widely recommended in the treatment of pemphigus before the use of rituximab. Nevertheless, despite this rapid tapering of cortico-

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

steroid doses, the relapse rate in the rituximab arm was twice as low as that observed in the standard corticosteroid arm (24% vs 45%), in which patients were initially prescribed high corticosteroid doses that were then progressively tapered.

Limitations

The main limitation of our study was the low number of patients with relapsing disease. However, the present study was a post hoc analysis of a randomized clinical trial that was primarily designed to assess the rate of complete remission while not undergoing therapy, and the relapse rate was a secondary end point. Despite the number of patients with short-term relapse being low (n = 8), this number corresponds to almost 20% of patients receiving rituximab as first-line therapy. Thus, the potential prevention of these relapses is a major consideration to take into account in the treatment of patients with pemphigus. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that the low number of patients with relapsing disease might not have led to the identification of other factors associated with relapse. This study focused on short-term relapses, which can be considered another limitation. We are currently studying the long-term outcomes in patients from the RITUX 3 trial and have observed that two-thirds of patients who experienced a long-term relapse previously had a short-term relapse within the first 12 months after the start of rituximab treatment, thus reinforcing interest in identifying those patients with the highest risk of short-term relapse to offer them a maintenance infusion of rituximab at month 6.

Conclusions

The presence of at least 1 of the 2 factors associated with relapse of pemphigus may help identify a group of patients with high risk for relapse who may benefit from a maintenance infusion of rituximab at month 6. Additional studies are needed to determine the optimal doses of maintenance therapy with rituximab.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: January 30, 2020.

Published Online: March 18, 2020. doi:10.1001/jamadermatol.2020.0290

Author Affiliations: Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, INSERM U1234, Rouen, France (Mignard, Maho-Vaillant, Golinski, Calbo, Joly, Hébert); Department of Biostatistics and Clinical Research, Rouen University Hospital, Rouen, France (Balayé, Houivet, Benichou); Centre de référence des maladies bulleuses auto-immunes, Avicenne Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Department of Dermatology, University of Paris 13, Bobigny, France (Prost-Squarcioni, Caux, Alexandre); Department of Dermatology, University of Saint Etienne, Saint Etienne, France (Labeille); Department of Dermatology, Bichat Hospital, University of Paris X, Paris, France (Picard-Dahan); Department of Dermatology, University of Toulouse, Toulouse, France (Konstantinou); Department of Dermatology, University of Amiens, Amiens, France (Chaby); Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Department of Dermatology, Aix Marseille University, UMR 911, INSERM CRO2, Marseille, France (Richard); Department of Dermatology, St Louis Hospital, Paris 7 Sorbonne Paris Cité University, Paris, France (Bouaziz); Department of Dermatology, University of Lille, Lille, France (Duvert-Lehembre, Delaporte); Department of Dermatology, University of Reims, Reims, France (Bernard); Department of Dermatology, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Henri Mondor Hospital, Créteil, France (Ingen-Housz-Oro); Department of Dermatology, Dijon University Hospital, Dijon, France (Vabres); Department of Dermatology, University of Nantes, Nantes, France (Quereux); Department of Dermatology, University of Rennes, Rennes, France (Dupuy); Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, Lyon, France (Debarbieux); Department of Dermatology, University of Angers, Angers, France (Avenel-Audran); Department of Dermatology, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France (D'Incan); Department of Dermatology, University of Limoges, Limoges, France (Bédane); Department of Dermatology, Le Mans General Hospital, Le Mans, France (Bénéton); Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, Lyon Claude Bernard University, Lyon, France (Jullien); Department of Dermatology, University of Paris V, Paris, France (Dupin); Department of Dermatology, Brest University Hospital, Brest, France (Misery); Department of Dermatology, Tours University Hospital, Tours, France (Machet); Department of Dermatology, University of Bordeaux, Bordeaux, France (Beylot-Barry); Department of Dermatology, University of Montpellier, Montpellier, France (Dereure); Department of Internal Medicine, Brest University Hospital, Brest, France (Sassolas).

Author Contributions: Drs Mignard and Hébert had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.
Concept and design: Mignard, Maho-Vaillant, Picard-Dahan, Bouaziz, Dupin, Joly, Hébert.
Acquisition, analysis, or interpretation of data: All authors.
Drafting of the manuscript: Mignard, Bouaziz, Joly, Hébert.
Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All authors.
Statistical analysis: Mignard, Maho-Vaillant, Balayé, Houivet, Benichou, Hébert.
Obtained funding: Chaby, Joly.
Administrative, technical, or material support: Mignard, Maho-Vaillant, Golinski, Calbo, Richard, Caux, Debarbieux, Bédane, Joly.
Supervision: Picard-Dahan, Delaporte, Quereux, Misery, Joly, Hébert.

Conflict of Interest Disclosures: Dr Joly reported serving as a consultant for Principa Bio, Biogene, Roche, and Argenx. No other disclosures were reported.

Funding/Support: Roche provided the rituximab and partly funded the extension of the follow-up period of the study. The French Society of Dermatology partially funded the study.

Role of the Funder/Sponsor: The funding sources had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

Group Members: The members of the French Study Group on Autoimmune Bullous Skin Diseases are as follows: Catherine Prost-Squarcioni, MD, PhD, Bruno Labeille, MD, PhD, Catherine Picard-Dahan, MD, Maria Polina Konstantinou, PhD, Guillaume Chaby, MD, Marie-Aleth Richard, MD, PhD, Jean-David Bouaziz, MD, PhD, Sophie Duvert-Lehembre, MD, Emmanuel Delaporte, MD, PhD, Philippe Bernard, MD, PhD, Frédéric Caux, MD, PhD, Marina Alexandre, MD, Saskia Ingen-Housz-Oro, MD, PhD, Pierre Vabres, MD, PhD, Gaëlle Quereux, MD, PhD, Alain Dupuy, MD, PhD, Sébastien Debarbieux, MD, Martine Avenel-Audran, MD, Michel D'Incan, MD, PhD, Christophe Bédane, MD, PhD, Nathalie Bénéton, MD, Denis Jullien, MD, PhD, Nicolas Dupin, MD, PhD, Laurent Misery, MD, PhD, Laurent Machet, MD, PhD, Marie Beylot-Barry, MD, PhD, Olivier Dereure, MD, PhD, Bruno Sassolas, MD, and Pascal Joly, MD, PhD.

Additional Contributions: Nikki Sabourin-Gibbs, BEd HONS, Rouen University Hospital, Rouen, France, helped with editing the manuscript. She was not compensated for her work.

REFERENCES

1. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. 1991;67(5):869-877. doi:10.1016/0092-8674(91)90360-B

2. Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1443-1448. doi:10.1172/JCI114036

3. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*. 1982;306(20):1189-1196. doi:10.1056/NEJM198205203062001

4. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris—incidence and mortality in the

© 2020 American Medical Association. All rights reserved.

II. Article 2 : *Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor axis in patients with pemphigus treated with rituximab versus standard corticosteroid regimen*

***Hébert V**, Maho-Vaillant M, Golinski ML, Petit M, Riou G, Boyer O, Musette P, Calbo S, Joly P.*

Frontiers in immunology, 2021

Le facteur d'activation des cellules B (BAFF) est une cytokine déterminante pour la survie des cellules B, la commutation isotypique, la sélection B autoréactive ou encore la survie des plasmocytes à longue durée de vie. Autant d'étapes clés dans l'activité d'une maladie auto-immune et du pemphigus.

Par ailleurs, un taux de rechute élevé a été régulièrement rapporté dans la littérature chez les patients atteints de pemphigus qui n'ont reçu qu'un seul cycle de rituximab, ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes. On a émis l'hypothèse que certaines rechutes après rituximab pourraient être dues à l'augmentation des taux sériques de BAFF, qui pourrait favoriser le retour des cellules B auto-réactives.

Dans ce travail, nous avons donc étudié le rôle de BAFF et son récepteur BAFF-R dans la physiopathologie du pemphigus, à partir des prélèvements sanguins et sérologiques longitudinaux de notre cohorte de patients de l'étude Ritux3.

Nous avons d'abord montré que les taux sériques basaux de BAFF étaient plus élevés chez les patients atteints de pemphigus que chez les donneurs sains et plus particulièrement chez les patients ayant connu une rechute précoce par rapport aux autres. Ensuite, nous avons observé que le rituximab et la corticothérapie orale à fortes doses avaient des effets distincts sur l'axe BAFF/BAFF-R. En effet, le rituximab entraînait une augmentation des taux de BAFF associée à une diminution d'expression transcriptomique et cytométrique de BAFF-R à la fois sur les LB non-autoréactifs et autoréactifs. La corticothérapie orale permettait quant à elle une diminution transitoire des taux sériques de BAFF suivie d'une ré-ascension lors de la décroissance des doses sous un seuil de 20mg/j, sans modification de l'expression de BAFF-R dans les cellules B autoréactives et non autoréactives.

Nos résultats suggèrent que l'activation des cellules B autoréactives au début du pemphigus pourrait être liée à la présence de taux sériques élevés de BAFF et que la diminution de l'expression du BAFF-R après rituximab retarderait le retour de cellules B mémoires, se traduisant par une période assez longue d'activité légère du pemphigus après rituximab. Inversement, la déplétion

incomplète des cellules B et l'expression persistante de BAFF-R associées à des taux sériques élevés de BAFF pourraient expliquer le nombre élevé de rechutes chez les patients traités par corticothérapie seule.

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 14 May 2021
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[1,2*], *Maud Maho-Vaillant*[1,2†], *Marie-Laure Golinski*[1,2†], *Marie Petit*[1†], *Gaëtan Riou*[1], *Olivier Boyer*[1†], *Philippe Musette*[3†], *Sébastien Calbo*[1†] *and Pascal Joly*[1,2†]

[1] Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1234, FOCIS Center of Excellence PAn'THER, Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France, [2] Department of Dermatology, French Reference Center for Auto Immune Blistering Diseases, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France, [3] 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 ± 13 pg/mL versus 252 ± 28 pg/mL, p=0.037) and in patients with early relapse compared who didn't (368 ± 92 vs 297 ± 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 ± 7.6 AU vs Month 36: 3.3 ± 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, Corticosteroïd

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

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 1st year and 13 during the 2nd 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™, Oslo, Norway). Then, B cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Invitrogen™, 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 ± SD) measured at baseline were significantly higher in pemphigus patients than in HD (308 ± 13 pg/mL vs 252 ± 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 ± 92 vs 297 ± 118 pg/mL, p=0.036) (**Figure 1B**). A ROC curve showed that a BAFF level ≥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 ± 7.6 AU at Day 0 to 3.3 ± 4.3 AU at Month 36, p=0.01, which corresponded to values close to those measured in HD (2.2 ± 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**).

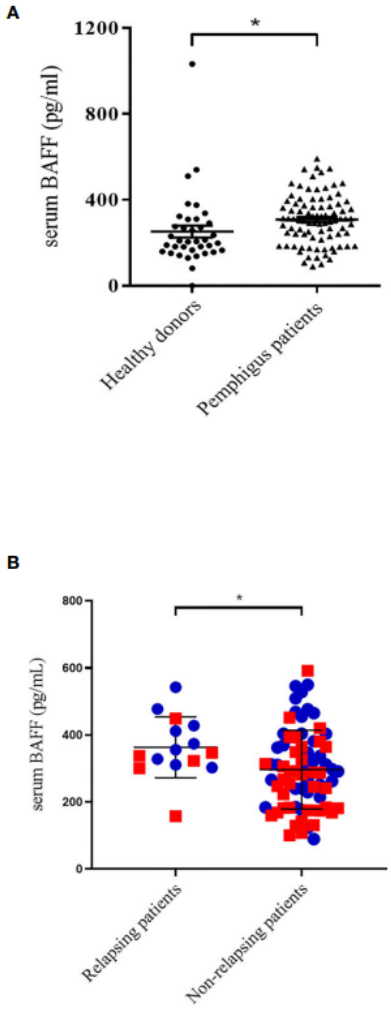


FIGURE 1 | **(A)** Comparison of serum BAFF levels between healthy donors and pemphigus patients at baseline. **(B)** Comparison of baseline serum BAFF levels between short-term relapsing patients and non-relapsing patients. Blue circles represent rituximab-treated patients. Red squares represent corticosteroids-treated 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 ± 2.1 AU vs 10.1 ± 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 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

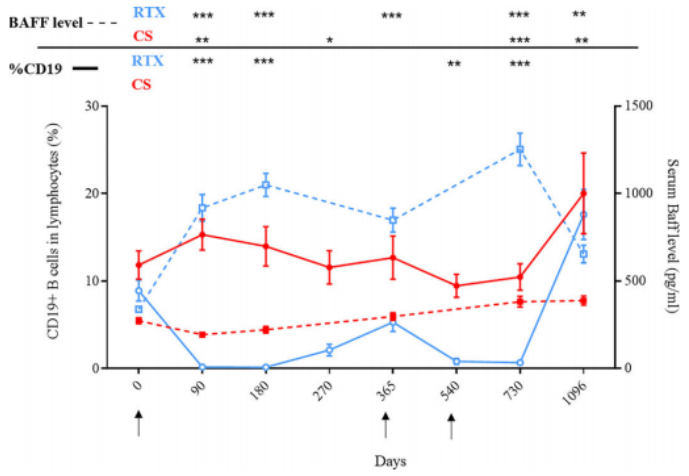


FIGURE 2 | Evolution of serum BAFF levels and CD19+ B cells according to treatments: rituximab (blue curves) or corticosteroids (red curves). Mean percentages of CD19+ B cells among peripheral blood lymphocytes were measured by flow cytometry and are indicated in full lines. Mean serum BAFF levels were measured by ELISA and are indicated in dashed lines. Arrows correspond to rituximab infusions. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

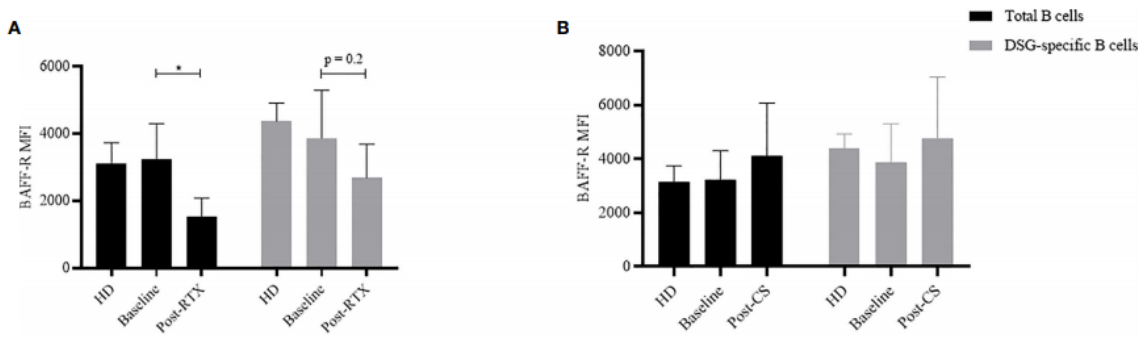


FIGURE 3 | Evolution of B-cells BAFF-R expression according to treatment by rituximab **(A)** or corticosteroids **(B)**. **(A)** Evolution of the mean cytometric BAFF-R MFI expression in total B cells (black) and autoreactive DSG-specific B cells (grey) before (n = 22) and after rituximab (n = 11) and 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

1. 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
2. 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.
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Mühle C, Martinez-Gamboa 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
8. 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
9. 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
10. 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.
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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.
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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.

III. Article 3 : *Modifications of the transcriptomic profile of autoreactive B cells from pemphigus patients after treatment with rituximab or a standard corticosteroid regimen*

***Hébert V**, Petit M, Maho-Vaillant M, Golinski ML, Riou G, Derambure C, Boyer O, Joly P, Calbo S*

Frontiers in immunology, 2019

Les travaux précédemment mentionnés ont permis d'une part de montrer que le rituximab était nettement supérieur à la corticothérapie orale, et d'autre part d'en affiner un peu plus son utilisation en tentant d'améliorer son principal point faible, à savoir un taux de rechute précoce relativement élevé (>20%).

Ce travail et les autres qui suivront auront pour unique et même but de comprendre les mécanismes immunologiques qui régissent les périodes d'activité et de rémission du pemphigus, à partir des prélèvements sanguins et sérologiques de l'étude Ritux 3.

Dans l'article qui va suivre, nous nous sommes intéressés à l'expression transcriptomique au sein des cellules B spécifiques et non spécifiques de la desmogléine, et à l'échelle unicellulaire, d'un panel de 33 gènes d'intérêt préalablement déterminé d'après la littérature. Ces gènes faisaient majoritairement référence à des cytokines pro-inflammatoires et à des marqueurs d'activation exprimés par les LB. Le but était d'essayer de caractériser plus précisément ce qui différencie les LB auto-réactifs des LB non auto-réactifs et comment évoluent ces populations en fonction du traitement reçu, rituximab + corticothérapie orale faible ou corticothérapie orale forte.

Nous avons montré que les LB spécifiques de la DSG présentaient initialement un profil pro-inflammatoire par rapport aux LB non auto-réactifs, avec une augmentation de la fréquence d'expression de trois gènes codant pour les cytokines IL-1β, IL-12p35 et IL-23p19 ainsi que pour le gène de l'IRF5. Étonnamment, le rituximab n'induisait que peu de changement d'expression génique au sein des LB spécifiques des DSG, à l'exception de l'IL-1β et du CD27 tous deux « *down-régulés* ». Chez les patients du bras corticoïdes, on observait une diminution de la fréquence d'expression des gènes codant pour l'IL-1β et l'IL-23p19 après traitement. La diminution d'expression transciptomique du marqueur mémoire CD27 observée au sein des LB autoréactifs, était confirmée en cytométrie, en corrélation avec la rémission clinique.

Nous avons montré que les LB spécifiques des DSG ont un profil d'expression génique différent de celui des LB non auto-réactifs et que le RTX et la CS ont des effets distincts sur

l'expression des gènes des LB spécifiques des DSG. Les diminutions d'expression de l'IL-1β (dans les deux bras) et du marqueur mémoire CD27 (propre au bras rituximab) étaient corrélées à l'activité du pemphigus.

frontiers in Immunology

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

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

Vivien Hébert[1,2*], *Marie Petit*[1], *Maud Maho-Vaillant*[1,2], *Marie-Laure Golinski*[1,2], *Gaëtan Riou*[1], *Céline Derambure*[3], *Olivier Boyer*[1], *Pascal Joly*[1,2] *and Sébastien Calbo*[1]

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

OPEN ACCESS

Edited by:
J. Michelle Kahlenberg, University of Michigan, United States

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

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

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

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

Citation:
Hébert V, Petit M, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Riou G, Derambure C, Boyer O, Joly P and Calbo S (2019) Modifications of the Transcriptomic Profile of Autoreactive B Cells From Pemphigus Patients After Treatment With Rituximab or a Standard Corticosteroid Regimen. Front. Immunol. 10:1794. doi: 10.3389/fimmu.2019.01794

Pemphigus Vulgaris is an autoimmune disease of the skin and mucous membranes, which is due to the production of pathogenic autoantibodies targeting desmoglein (DSG) 1 and 3, which are adhesion proteins of the keratinocytes. Rituximab is an anti-CD20 mAb which induces a prolonged depletion of blood B cells. We recently showed that rituximab was more effective than a standard oral corticosteroid (CS) treatment, allowing 90% of patients to achieve complete remission (CR). Additionally, we showed that DSG-specific-B (DSG positive) cells were still detectable during the B cell recovery which follows the initial rituximab-induced B cell depletion, even in patients in CR. In order to characterize DSG positive B cells in patients in CR after rituximab or CS treatment relative to those detectable at baseline in patients with an active pemphigus, we studied the expression profile of 31 genes of interest related to inflammatory cytokines, TNF receptors and activation markers. Using quantitative Polymerase Chain Reaction performed on one cell with a microfluidic technique, we found that patients' autoreactive B cells collected at baseline had a significantly higher expression of genes encoding for IL-1β, IL-23p19, and IL-12p35 pro-inflammatory cytokines and the IRF5 transcription factor, than non-autoreactive B cells. Surprisingly, the gene expression profile of DSG positive B cells collected after rituximab treatment in patients in CR was close to that of DSG positive B cells at baseline in patients with active pemphigus, except for the IL-1β and the CD27 memory marker genes, which were under-expressed after rituximab compared to baseline. Conversely, we observed a decreased expression of genes encoding for IL-1β and IL-23p19 in patients treated with CS relative to baseline. This study showed that: (i) DSG positive autoreactive B cells have a different gene expression profile than non-autoreactive B cells; (ii) rituximab and CS have different effects on the genes' expression in autoreactive DSG positive B cells from pemphigus patients.

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

INTRODUCTION

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

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

Rituximab is a chimeric murine-human monoclonal antibody that binds to the CD20 antigen of B-lymphocytes (anti-CD20 mAb), which is expressed by pre-B-cell and pre-plasma cells. A stop in the renewal of the plasma cell pool is thought to be one of the main mechanisms of the short-term action of rituximab (12, 13). However, the long-term clinical course of pemphigus patients treated with rituximab has not been extensively assessed yet. In particular, apart from a reversal of the naïve/memory 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, IFNγ, TGF β2, 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 ΔCT 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-1β, 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-1β 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-1β (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.

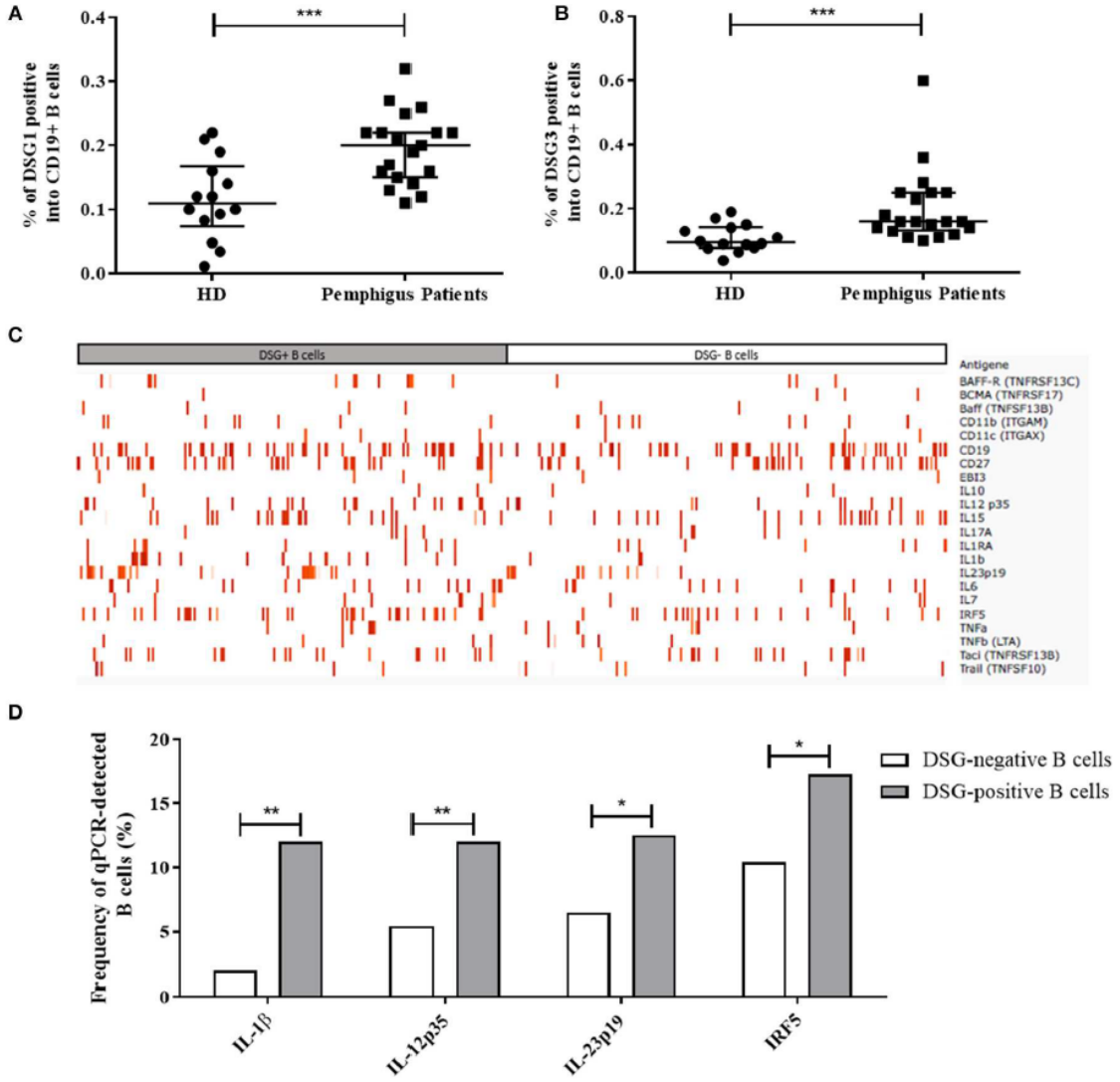


FIGURE 1 | (A,B) Percentage of autoreactive DSG1-positive (CD19+DSG1+) B cells **(A)** and DSG3-positive B cells (CD19+DSG3+) **(B)** among total B cells (CD19+) collected in 14 healthy donors and 20 pemphigus patients at baseline. Median with interquartile range were compared using the Mann-Whitney *t*-test. **(C)** Intensity of gene expression in one-cell sorted DSG-positive B cells (in gray $n = 191$ cells) and non-autoreactive DSG-negative B cells (in white, $n = 201$ cells) from pemphigus patients. The color intensity in each sorted cell depended on the ΔCT value relative to GAPDH house-keeping gene expression. Non-detected genes in one-cell qPCR were excluded from the map. **(D)** Comparison of the baseline frequencies of cells expressing the IL-1β, IL-12p35, IL-23p19 genes, and the transcription factor IRF5 gene between DSG-positive autoreactive B cells (gray columns, $n = 191$ cells) and non-autoreactive DSG-negative B cells (white columns, $n = 201$ cells) from pemphigus patients. Frequencies were compared using the Fisher's exact test.

After treatment with systemic corticosteroids (**Figure 5**), IL-1β 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-1β, and CD27 genes, as other genes from the panel studied.

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

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

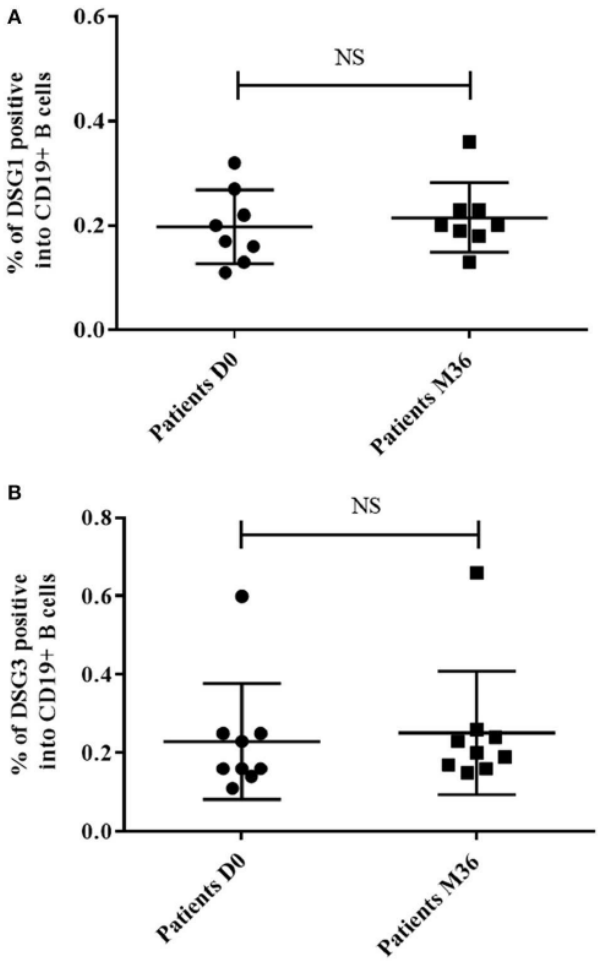


FIGURE 2 | Percentage of autoreactive DSG1-positive B cells (CD19+DSG1+) **(A)** and DSG3-positive B cells (CD19+DSG3+) **(B)** among total B cells (CD19+) collected in pemphigus patients at baseline and at Month 36 after rituximab treatment. Means ± standard deviations were compared using the Wilcoxon paired test.

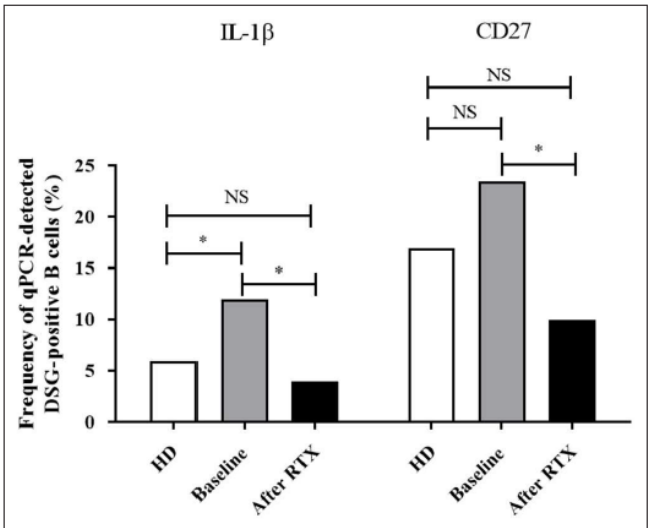


FIGURE 3 | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1β and CD27 in one-cell sorted desmoglein-positive autoreactive B cells from healthy donors (white columns $n = 107$ cells) compared to pemphigus patients before treatment (gray columns, $n = 191$ cells) or after rituximab treatment (black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

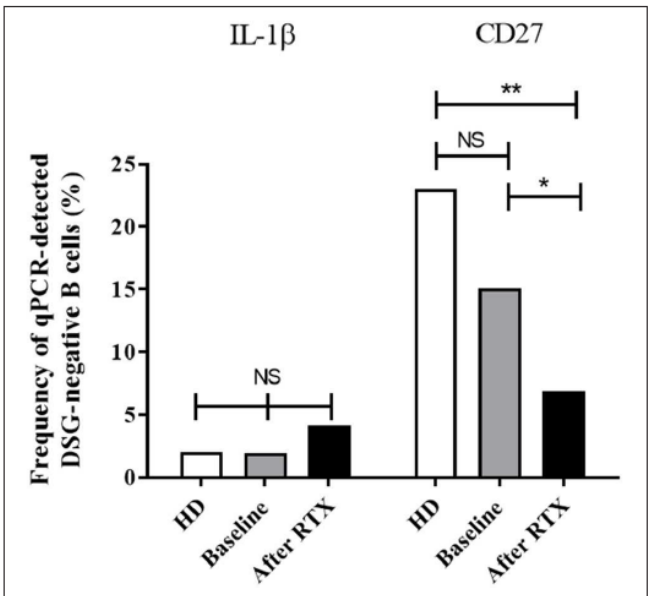


FIGURE 4 | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for the IL-1β and CD27 genes in one-cell sorted desmoglein-negative B cells from healthy donors (white columns, $n = 69$ cells) and pemphigus patients at baseline (gray columns, $n = 201$ cells) and after rituximab treatment (black columns,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

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

ELISA Assays

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

We observed a non-significant decrease of serum IL-1β 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).

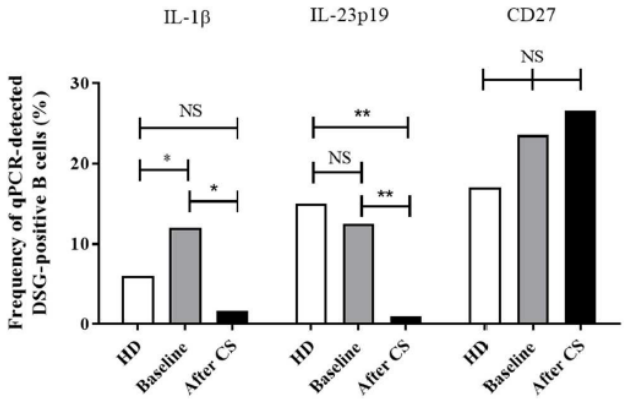


FIGURE 5 | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1β, IL-23p19, and CD27 in one-cell sorted desmoglein-positive from healthy donors (white columns, $n = 107$ cells) compared to pemphigus patients before treatment before (gray columns, $n = 191$ cells) and after CS treatment (black columns,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

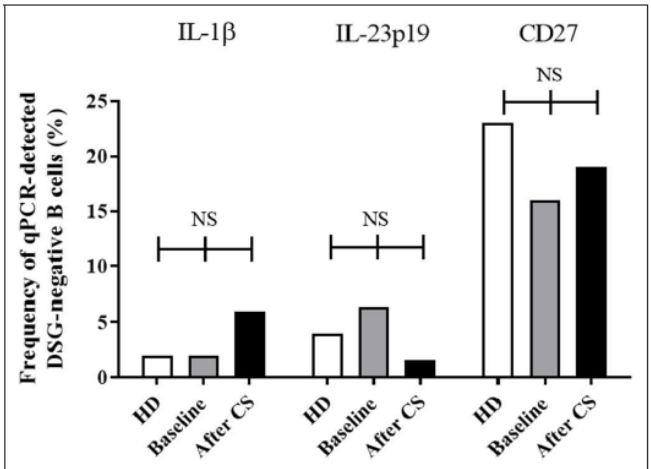


FIGURE 6 | Frequency of cells with detectable mRNA encoding for IL-1β, IL-23p19, and CD27 in one-cell sorted desmoglein-negative B cells from healthy donors (white columns, $n = 69$ cells), and pemphigus patients at baseline before treatment (gray columns, $n = 201$ cells) or after corticosteroids treatment (black columns, $n = 123$ cells). Frequencies were compared using the Fisher's exact test.

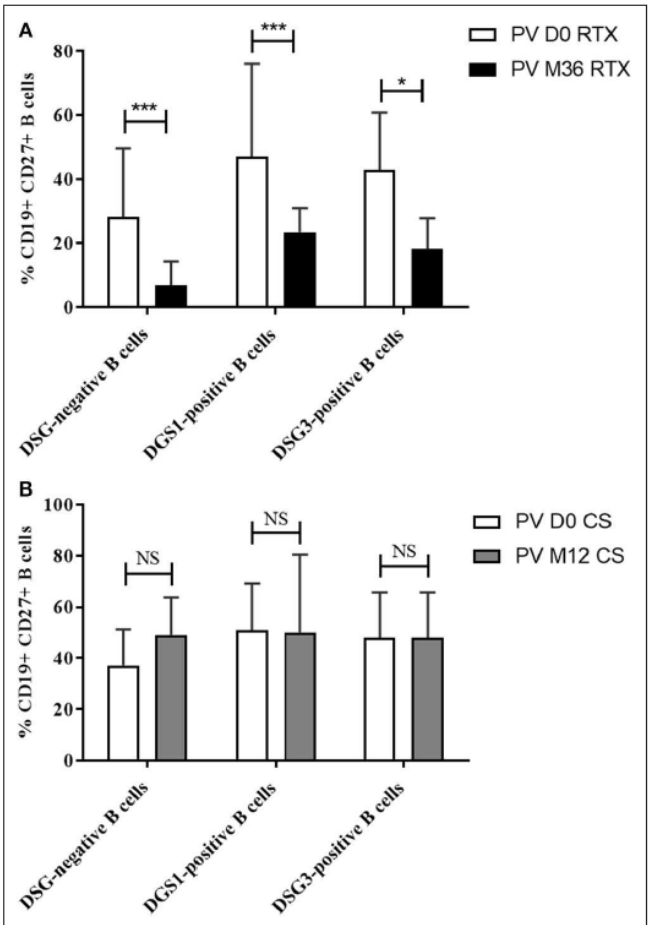


FIGURE 7 | (A) Percentage of memory B cells among non-desmoglein specific, desmoglein 1-specific (DSG1+), and desmoglein three-specific (DSG3+) B cells before (white columns) and after treatment with rituximab (black columns). **(B)** Percentage of memory B cells among non-desmoglein specific, desmoglein 1-specific (DSG1+), and desmoglein 3-specific (DSG3+) B cells before (white columns) and after treatment with corticosteroids (gray columns). Means ± standard deviations were compared using the Wilcoxon paired test.

DISCUSSION

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

This methodology has several major interests. First, it allowed to study *ex vivo* autoreactive B-lymphocytes, since pemphigus is one of the rare autoimmune diseases in humans in which autoantibodies directed against DSG are pathogenic (15). Second, auto-reactive DSG positive B cells are the pre-stage of 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-1β, 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

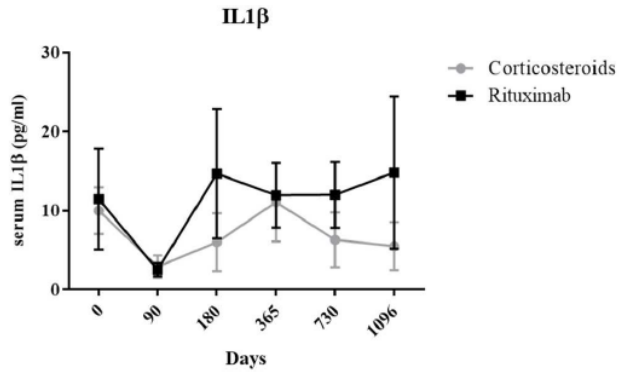


FIGURE 8 | Longitudinal analysis of mean serum IL-1β level in rituximab (black) and corticosteroids-treated (gray) patients. Means ± standard error of the mean were compared with baseline level in each group (RTX and CS) using one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post-hoc* test.

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-1β 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 refund from autoreactive switched memory B cells (CD20+IgG+CD27+) (13, 16). Thus, changes in CD27 expression which correlates with the disappearance of circulating DSG-positive IgG(+) B lymphocytes are likely responsible for the decreased production of anti-DSG autoantibodies, that contributes to the long lasting clinical remission of the disease after rituximab treatment (14). Another argument which supports this hypothesis is the fact that by using an ELISPOT assay, we showed that DSG3+CD27+ B cells but not DSG3+CD27− B cells are able to differentiate into antibody secreting cells after 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-1β 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-1β 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-1β is a pro-inflammatory cytokine mainly produced by hematopoietic cells such as blood monocytes, tissue macrophages and skin dendritic cells in response to TLR ligand, activated complement components or other cytokines such as TNF-α and IL-1β itself (17, 18). In our work, we observed a slight decrease of serum IL-1β 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-1β has previously been suggested by Feliciani et al. who demonstrated that an IL-1β KO mouse model was less susceptible to passive transfer of IgG isolated from the serum of a PV patient. Moreover, Increased concentrations of IL-1α and IL-1β 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-1α and IL-1β decreased in patients in clinical remission after treatment with IVIG. Finally, IL-1β promotes Th17 polarization, which correlates with disease activity (19–24).

Since the frequency of autoreactive B cells in pemphigus patients was surprisingly only doubled compared to healthy donors, it is likely that the different gene expression profiles of IL-1β 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 analyse the serum concentration of cytokines relevant for B cell activation such as BAFF, APRIL, or IL-6, because we did not observe any modification of the gene expression of these cytokines by autoreactive DSG-positive B cells in our transcriptomic analyses.

Overall, this study showed that self-reactive and non-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-1β, 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-1β 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-1β and Il-23p19 were quantified by ELISA (RD and ebioscience, respectively), according to the manufacturer's protocol.

Phenotyping of Desmoglein-Specific B Cells

In order to analyse DSG1 and DSG3 specific B cells, B cells were isolated using Dynabeads Untouched Human B-cells kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. Then, purified B cells were incubated for 30 min at 4°C with histidine-tagged recombinant DSG1 or DSG3 (30 ng/µl). After washing, B cells were stained with anti-human IgG antibodies (BD Biosciences). Cells were then incubated with Fc Block (eBioscience), LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies), anti-human antibodies directed against CD19, CD27, IgM (BD Biosciences). Anti-histidine coupled with phycoerythrin (R&D Systems) was used to identify desmoglein-specific B cells.

One-Cell Sorting and Pre-amplification

DSG-positive single B cells were sorted using FACS ARIA III into 96-well plates containing 10µL 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 (**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, IFNγ, TGFβ2, and APRIL. This absence of detection was due to a too low RNA amount since positive control wells containing 100 CD19+ cells showed detectable expression levels of all tested cytokine genes. We compared the frequency of cytokine gene expressing B cells using qPCR between treatment groups.

ΔCt Analysis

The ΔCt analysis allows to determine the intensity of the gene of interest expression in cells by comparing its threshold of detection (Ct) with the Ct of the housekeeping gene.

Statistical Analysis

Statistical comparison of the frequency of gene expressing cells was performed with Fisher's exact test. Statistical comparison of percentages of autoreactive B cells in flow cytometry were calculated using the Mann-Whitney *t*-test to compare healthy donors and pemphigus patients; and using the Wilcoxon *t*-test to compare patients before and after treatment. All analyses were performed using the GraphPad Prism Software. A p-value ≤ 0.05

was considered as significant. The *, **, *** refer to statistical values explained in the legends.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VH: transcriptomic, cytometric acquisitions, analyses, ELISA assays, and writer. MP: transcriptomic acquisitions. MM-V: transcriptomic, cytometric acquisitions, and ELISA assays. M-LG: cytometric acquisitions. GR: cytometric analyses. CD: 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

1. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell.* (1991) 67:869–77. doi: 10.1016/0092-8674(91)90360-B
2. Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest.* (1989) 83:1443–8. doi: 10.1172/JCI114036
3. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med.* (1982) 306:1189–96. doi: 10.1056/NEJM198205203062001
4. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris–incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ.* (2008) 337:a180. doi: 10.1136/bmj.a180
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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
9. 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
10. Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update. *Drugs.* (2015) 75:271–84. doi: 10.1007/s40265-015-0353-6
11. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet Lond Engl.* (2017) 389:2031–40. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30070-3
12. 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
13. Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L, Jacquot S, Lemercier B, Lim A, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *J Invest Dermatol.* (2008) 128:2859–69. doi: 10.1038/jid.2008.178
14. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. 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
15. 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
16. Ellebrecht CT, Payne AS. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. *JCI Insight.* (2017) 2:e92021. doi: 10.1172/jci.insight.92021
17. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* (2011) 117:3720–32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
18. 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
19. Feliciani C, Toto P, Amerio P, Pour SM, Coscione G, Shivji G, et al. *In vitro* and *in vivo* expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. *J Invest Dermatol.* (2000) 114:71–7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00835.x
20. 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
21. Santarlasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. IL-1 and T helper immune responses. *Front Immunol.* (2013) 4:182. doi: 10.3389/fimmu.2013.00182
22. 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
23. 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
24. 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.

IV. Article 4 : *The diversity of anti-DSG3 IgG subclasses in pemphigus patients' serum has a major impact on pemphigus activity and is predictive of relapses in rituximab-treated patients*

Soumis à *Frontiers in immunology*

Marie-Laure Golinski[1, 2], Alexandre Lemieux[1,3], Maud Maho-Vaillant[1, 2], Marion Barray[1], Laurent Drouot[1], Damien Schapman[4], Marie Petit[1], Mickael Hertl[5], Olivier Boyer[1,6], Sébastien Calbo[1], Pascal Joly[1, 2], Vivien Hébert[1,2]

1: INSERM U1234, PANTHER, Normandie University, Rouen, France

2: Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France

3: Department of Dermatology, Montreal University Hospital Center, Montreal, Quebec

4: PRIMACEN, Normandie University, Rouen, France

5: Department of Dermatology and allergology, Philipps University, Marburg, Germany

6: Department of Immunology, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France

Corresponding author:

Vivien Hébert.

Email: Vivien.hebert@chu-rouen.fr

Keywords: Desmoglein 3, immunoglobulin subclasses, pathogenicity, pemphigus.

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que le niveau et la distribution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 au cours de l'évolution du pemphigus pouvaient être impliqués dans la

persistance de l'activité de la maladie ou dans l'obtention d'une rémission clinique, et pourraient expliquer la persistance paradoxale des anticorps anti-DSG3 chez certains patients en rémission clinique durable. Nous avons donc étudié la distribution et l'évolution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 chez les patients atteints de PV à l'aide d'un test ALBIA, et avons corrélé la distribution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 avec l'évolution clinique des patients inclus dans l'essai Ritux 3. Ensuite, nous avons analysé la pathogénicité *in vitro* des sérums correspondants en utilisant des tests de dissociation des kératinocytes et d'immunofluorescence.

Comme évoqué, les isotypes d'anticorps anti-DSG3 les plus fréquemment détectés étaient les IgG4 seuls ou en association avec les IgG1 (16,7 %), les IgG2 (8,3 %) et les IgG3 (10,0 %). La plupart des sérums des patients en rémission clinique ne contenaient qu'une seule sous-classe d'IgG anti-DSG3 (principalement IgG4), alors que la majorité des sérums des patients en maladie active présentaient au moins 2 sous-classes d'anti-DSG3 différentes, dont l'IgG4. Le RTX, conformément à son excellente activité clinique, a permis de réduire le nombre moyen de sous-classes d'IgG anti-DSG3 alors que la corticothérapie orale seule non. La présence de ≥3 sous-classes d'IgG anti-DSG3 au diagnostic, principalement en cas de présence d'IgG3, permettait de prédire une rechute avec une VPP de 62,5% et une VPN de 92%.

Ensuite, nous avons confirmé *in vitro* que les IgG4 anti-DSG3 pouvaient être pathogènes à elles seules, en fonction de leur taux. Concernant les patients en rémission clinique malgré la persistance d'IgG4 seuls, nous avons montré que leurs auto-Abs étaient toujours pathogènes *in vitro* à condition que leur taux soit artificiellement réaugmenter à celui observé au diagnostic. Dans certains cas, notamment en cas de présence d'IgG3 et de faibles taux d'IgG4, les IgG3 anti-DSG3 avaient un effet pathogène et leur élimination permettait de supprimer l'activité pathogène du sérum.

Ces résultats montrent que des sous-classes d'IgG anti-DSG3 autres que les IgG4 sont fréquemment détectées chez les patients atteints de pemphigus actif. En particulier, les IgG3 anti-DSG3 ont une activité pathogène *in vitro*.

Abstract

Introduction: We studied the distribution and evolution of anti-DSG3 IgG subclasses in patients with PV, and correlated their distribution and in vitro pathogenicity with the clinical course of patients.

Methods: Sera of PV patients from the Ritux3 trial were analyzed at baseline and after treatment with corticosteroids (CS) alone or combined with rituximab (RTX). We longitudinally studied the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses with an ALBIA (Addressable Laser Bead ImmunoAssay) assay. The in vitro pathogenicity of corresponding sera was assessed using a dispase-dissociation test and by immunofluorescence staining of DSG3.

Results: 65 patients were assessed at baseline (33 treated with RTX and 32 treated with CS). Relapses occurred in 21.2% patients treated with RTX and 62.5% patients treated with CS. The most frequently detected isotypes of anti-DSG3 Abs were IgG4 either alone (36.7%) or with IgG1 (16.7%), IgG2 (8.3%), and IgG3 (10.0%). Most sera from patients in CR contained only one anti-DSG3 IgG subclass (mainly IgG4), while 75.0% of sera from patients in active disease had ≥2 anti-DSG3 subclasses. RTX allowed to reduce the mean number of anti-DSG3 IgG subclasses whereas CS not. The presence of ≥3 anti-DSG3 IgG subclasses, mainly in case of presence of IgG3, predicted a relapse with a PPV of 62.5% and a NPV of 92%. We confirmed that anti-DSG3 IgG4 alone could be pathogenic. For patients in CR despite the persistence of IgG4 alone, we showed that their auto-Abs were still pathogenic in vitro when the titer was corrected from the one at baseline. In some cases, anti-DSG3 IgG3 Abs had an in vitro pathogenic effect, and their removal suppressed the pathogenic activity of this serum.

Conclusion: These results showed that anti-DSG3 IgG subclasses other than IgG4 are frequently detected in patients with active pemphigus. In particular, anti-DSG3 IgG3 are pathogenic activity in vitro.

Introduction

Pemphigus vulgaris (PV) is a potentially life-threatening autoimmune blistering disease caused by IgG autoantibodies directed against desmoglein (DSG) 1 and DSG3 (1). The binding of anti-DSG auto-antibodies (Abs) impairs desmosomal function.

Clinically, the initial severity of pemphigus foliaceus (PF) and PV is correlated with anti-DSG1 and anti-DSG3 Ab serum levels, respectively (2–4). Moreover, the evolution of anti-DSG1 Abs and to a lesser degree anti-DSG3 Abs can predict the evolution of disease activity(5,6). Indeed, while a re-increase or persistent high levels of anti-DSG1 Abs are closely correlated with the occurrence of skin relapses, anti-DSG3 Abs are less specific. In particular, anti-DSG3 Abs can be occasionally observed in some PV patients in clinical remission (4,5,7–10).

A preferential use of certain IgG subclasses has been identified in pemphigus patients. Classically, anti-DSG3 IgG4 Abs are predominantly found in PV sera from patients with active disease, followed by IgG1, and occasionally IgG2 and IgG3 (11–15). In humans, the IgG4 subclass is the smallest IgG fraction (< 5 %) and has paradoxically weak complement activation properties (16). The pathogenic effect of anti-DSG IgG4 Abs has been demonstrated in a PV mouse model (17), as well as in vitro assays (18). Additionally, it has been demonstrated that anti-DSG IgG1 may also contribute to the pathogenic effect of pemphigus sera (19). Finally, the potential pathogenic effect of anti-DSG IgG2 and IgG3 subclasses has never been assessed in pemphigus.

The evolution of anti-DSG IgG subclasses according to the patient's clinical status has provided controversial results in the literature. While some studies reported a switch from IgG4 to IgG1 in patients in clinical remission (7,20,21), other studies did not find such results (15,22).

We hypothesized that the level and distribution of anti-DSG3 IgG subclasses during the course of pemphigus may be implicated in the persistence of disease activity or achievement of clinical remission, and might explain the paradoxical persistence of anti-DSG3 Abs in some patients in sustained clinical remission. Thus, we studied the distribution and the evolution of anti-DSG3 IgG subclasses in patients with PV using a sensitive Addressable Laser Bead Immuno Assay (ALBIA), and correlated the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses with the clinical course of patients included in the Ritux 3 trial. Finally, we analyzed the in vitro pathogenicity of corresponding sera using keratinocyte dissociation and immunofluorescence assays.

Patients and methods

Population of patients

We analyzed the sera from 33 and 32 PV patients assigned to the rituximab (RTX) and standard corticosteroids (CS) arms of the Ritux 3 trial, respectively (23).

The longitudinal analysis was performed in 26 of these 65 PV patients (9 treated with RTX and 17 treated with CS) corresponding to those who had persistent anti-DSG3 Abs measured using the Euroimmun ELISA assay, whether or not they relapsed. Additionally, sera from 36 healthy donors (HD), 6 PF, 9 patients with bullous pemphigoid (BP) and 5 PV patients with negative anti-DSG3 Abs after RTX treatment were used as negative controls.

Determination of the IgG subclasses of serum anti-DSG3 Abs

Sera from patients were analyzed before treatment at baseline, after treatment and at the time of relapse if applicable. To detect and quantify anti-DSG3 Abs IgG subclasses, we developed an ALBIA-DSG3, which consisted of coupling human recombinant DSG3 protein to fluorescent beads (LiquiChip Ni-NTA Beads; Qiagen) according to the manufacturer's protocol. To determine the isotype of serum anti-DSG3 Abs, DSG3-coated beads were incubated with sera diluted at 1:150, then incubated with anti-IgG1 (1:125), anti-IgG2 (1:125), anti-IgG3 (1:200) or anti-IgG4 (1:200) biotinylated secondary antibody (SouthernBiotech), and finally with streptavidin-R-phycoerythrin (Qiagen). The mean fluorescence intensity (MFI) was determined on a Bio-Plex apparatus using Manager software version 4.0 (Bio-Rad). Negative control with no serum and positive control □anti-DSG3 Calibrator of ELISA kit (euroimmun)□ were included in every assay. The anti-DSG3 Ab levels were determined with the following formula: $(MFI^{serum}/MFI^{Calibrator}) \times 100$, in which the calibrator was the anti-DSG3 positive control previously mentioned that was use on every 96-well plates and set arbitrarily to 100 arbitrary units (AU). For each isotype, we considered a positivity threshold corresponding to + 3 standard deviations relative to the mean value obtained from the sera of 36 HD.

IgG purification with ÄKTA-Start

Purification of IgG was performed by affinity chromatography, using ÄKTA-Start. The HiTrap protein G column (GE Healthcare) was equilibrated with 10 mL of Phosphate buffer saline (PBS) 1X, at pH 7.4. The 1/5 pre-diluted sera were added and IgG were eluted using glycine buffer 0.1M, pH 2.7, followed by neutralization with 1M Tris pH 9. Analyses were performed using

UNICORN 7.0 software to collect IgG-containing fractions. Purified IgG were quantified using BCA protein assay kit (Pierce™) according to the manufacturer's instructions.

Keratinocyte Dissociation Assay

HaCaT cells were cultivated in 24-well-plates with DMEM + GlutaMAX (Gibco) containing 1mM $CaCl_2$ in a humidified atmosphere (5 % CO_2) at 37°C. Twenty-four hours after reaching confluency, positive control AK23 (10µg/mL), HD IgG (50µg), PV IgG (50µg) or IgG-depleted fractions collected from IgG-specific affinity purification (50µg) were added and incubated for 24 hours. The amount of IgG was adjusted for the level of anti-DSG3 Abs in some patients. Subsequently, the cells were treated with dispase solution (2.4 U/ml; Sigma) at 37°C until monolayers were released from plates. Monolayers were stained with crystal violet (Sigma Aldrich) and subjected to mechanical stress by pipetting 7 times with a 1 mL pipette. Cell fragments were fixed, photos were taken from each well and cell fragments were counted manually. All experiments were performed in triplicate.

Immunofluorescence assays

HaCaT cells were cultivated on 4-chamber Labteck with 50 000 cells per cm^2 in DMEM + GlutaMAX (Gibco) containing 10 % fetal bovine serum and 1mM $CaCl_2$ per chamber until they reached at least 75 % confluency. Cells were washed and incubated for 20 hours with 50µg of HD IgG, PV IgG or IgG-depleted fractions collected from IgG-specific affinity purification. Then, cells were fixed with 100 % ethanol for 10 minutes, permeabilized with 0.3 % Triton for 10 minutes and washed after each step. Rat serum diluted at 1 % was used for blocking. Cells were then incubated with a primary rabbit antibody anti-DSG3 coupled to Alexa-Fluor® 647 (Santa Cruz) for 90 minutes in the dark under slow agitation. Cells were finally washed, dried for 15 minutes and one drop of mounting medium with DAPI (Invitrogen) was added per condition. Photos were taken using a multiphoton confocal microscope Leica TCS SP8.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Correlations were assessed using Pearson's rank correlation coefficient. The number of anti-DSG3 IgG subclasses were compared between relapsing and non-relapsing patients using the Student's t-test. In PV patients with exclusively anti-DSG3 IgG4 Abs, the level of anti-

DSG3 IgG4 at baseline and during the evolution was compared using paired t-test. Differences were considered significant when $p<0.05$.

Results

Patients

Out of the 90 patients of the Ritux 3 trial, 18 patients with PF were excluded, as well as 7 PV patients whose sera were not available. Thus, sera from 65 patients were assessed at baseline (33 treated with RTX and 32 treated with CS).

The longitudinal analysis was performed in 26 of these 65 PV patients (9 treated with RTX and 17 treated with CS) corresponding to those who had persistent anti-DSG3 Abs measured using the Euroimmun ELISA assay, whether or not they relapsed.

One or more relapses occurred in 7 of 33 (21.2%) patients treated with RTX and 20 of 32 (62.5%) patients treated with the standard CS regimen. Among the 20 patients with persistent active disease after CS treatment, only 10 sera still contained anti-DSG3 Abs and thus could be analyzed. The distribution of anti-DSG3 IgG subclasses was also analyzed according to the patients' clinical status, i.e.: in patients who achieved CR (n = 16: 9 after RTX treatment and 7 after CS treatment) and in patients who were in active disease (n = 17: 10 CS-treated patients in persistent disease activity and 7 early-relapsing patients in RTX arm) (Figure 1).

Validation of the anti-DSG3 ALBIA test

We first assessed the specificity and sensitivity of our ALBIA for the detection of anti-DSG3 IgG subclasses. For this, we compared anti-DSG3 ALBIA performed with anti-DSG3 Abs containing sera from 65 PV patients with 56 control sera (36 HD, 6 PF, 5 PV with negative anti-DSG3 Abs after RTX treatment, and 9 BP). 0ur ALBIA had 92.31% sensitivity and 85.71% specificity for the detection of anti-DSG3 Abs.

Since IgG1 and IgG4 are the main anti-DSG3 IgG subclasses, we then correlated anti-DSG3 IgG1 and IgG4 serum levels measured by ALBIA with anti-DSG3 Ab levels measured by ELISA in sera from the same patients with active disease. A high correlation was observed for both IgG1 ($r=0.60$, $p<0.0001$) and IgG4 ($r=0.55$, $p<0.0001$) anti-DSG3 Abs (Figure 2).

Distribution of anti-DSG3 IgG subclasses in PV patients before treatment (onset of disease)

At baseline, anti-DSG3 IgG4 and IgG1 were detected in 90.8% and 40.0% of sera, respectively, whereas IgG2 and IgG3 were both detected in 26.2% of sera.

The most frequently detected isotypes of anti-DSG3 Abs were IgG4 either alone (36.7%) or most often combined with IgG1 (16.7%), IgG2 (8.3%), and IgG3 (10.0%) (Figure 3). The combination of 3 or 4 IgG subclasses of anti-DSG3 Abs (including IgG4 in all cases) was observed in 26.6% of sera. Only one serum (1.7%) did not contain anti-DSG3 IgG4 Abs.

Evolution of the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses under treatment

After treatment, at Month 36, only 26 patient' sera (9 treated with RTX and 17 treated with CS) still contained anti-DSG3 Abs and were analyzed. We also analyzed sera from 17 patients in active disease (either relapse, either persistent active disease), and from 16 patients in CR with persistent anti-DSG3 Abs at the end of the study at Month 36 (Figure 1).

Most sera (64.3%) from patients in CR contained only one anti-DSG3 IgG subclass (corresponding to IgG4 in all but one case), as compared with 25.0% of sera from patients with persistent disease activity, and 36.7% of baseline sera. In contrast, 35.7% of sera from patients in CR contained at least 2 or more anti-DSG3 IgG subclasses, as compared with 75.0% of sera from patients with persistent active disease and 63.3% of baseline sera (data not shown).

In accordance with the high rate of relapses or persistent disease activity in patients treated with CS, most sera (80%) tested at Month 36 from these patients still contained 2 or more anti-Dsg3 IgG subclasses, as did the corresponding baseline sera (62.5%), while on the contrary, most sera (57.1%) tested at Month 36 from patients treated with RTX only contained anti-Dsg3 IgG4 exclusively (data not shown).

Baseline anti-DSG3 IgG subclasses diversity as a predictive factor of relapse

Since RTX is approved as a first line treatment of pemphigus, we assessed whether the number and the isotype of anti-DSG3 IgG subclasses in sera from patients at the onset of pemphigus might predict the occurrence of relapses under treatment or after treatment withdrawal.

The mean number of anti-DSG3 IgG subclasses in the baseline sera was higher in patients who further relapsed than in patients who maintained a sustained clinical remission (2.6 ± 0.8 vs 1.5 ± 0.9; $p=0.01$) (Figure 4A). In particular, 5 of the 7 (71.4%) patients who relapsed had 3 or more anti-DSG3 IgG subclasses in their baseline serum versus 3 of the 26 (11.5%) patients who maintained a prolonged remission ($p=0.004$), corresponding to a positive predictive value of 62.5% (95% CI 0.31-0.86) and a negative predictive value of 92% (95% CI 0.75-0.99) for the occurrence of relapse (Figures 4B and 4C).

Moreover, the occurrence of relapses was particularly frequent in patients whose baseline serum contained anti-DSG3 IgG3 Abs, since the baseline sera from 5 of the 7 relapsing patients (71.4%) contained anti-DSG3 IgG3 Abs versus 3 out of the 26 sera from non-relapsing patients (11.5%, p=0.004) (Figures 4B and 4C).

The distribution of the other anti-DSG3 IgG subclasses (IgG1, IgG2 and IgG4) were not associated with the occurrence of relapse (p>0.99, p=0.39 and p=0.58).

Demonstration of the pathogenic activity of anti-DSG3 IgG3 and IgG4 subclasses

Among the 16 patients who had exclusive anti-DSG3 IgG4 at baseline and did not further relapse, we selected 4 sera which still contained anti-DSG3 IgG4 while patients were in sustained CR. Figure 5A shows the decrease of anti-DSG3 IgG4 level from these 4 patients (identified in red) relative to the 12 other sera which did not contain anti-DSG3 Abs anymore after treatment.

Moreover, in patients whose serum contained anti-DSG3 IgG4 exclusively after treatment, the mean anti-DSG3 IgG4 Ab serum level in patients with persistent active disease was higher than that in patients in CR (5.56 ± 5.99 AU versus 19.70 ± 13.26 AU; p=0.026) (data not shown).

Figure 5B shows that a serum collected at baseline (containing 98.2 AU of anti-DSG3 IgG4 by ALBIA) induced a strong keratinocyte dissociation, whereas the serum from the same patient collected at the time of CR (containing 1.0 AU of anti-DSG3 IgG4) did not induce a keratinocyte dissociation anymore. Interestingly, this latter serum recovered its pathogenic activity in keratinocyte dissociation assay after adjustment of the IgG4 level to the one at baseline (Figure 5B), suggesting that anti-DSG3 IgG4 were pathogenic but the amount of antibody was not sufficient to induce in vitro keratinocyte dissociation.

We then tested a serum which contained at baseline a combination of anti-DSG3 IgG3 and IgG4 at rather low levels (IgG3:16.5 AU; IgG4: 10.8 AU), and only contained IgG4 at the time of CR after treatment (6.4 AU). Purified IgG from the baseline serum but not from the serum collected at the time of CR induced a keratinocyte dissociation, while both sera contained rather close levels of anti-DSG3 IgG4 Abs (10.8 AU and 6.4 AU respectively). Interestingly, when removing IgG3 Abs from the baseline serum, the purified IgG did not induce keratinocyte dissociation anymore, whereas the purified IgG3 fraction alone did (Figure 5C), suggesting the role of anti-DSG3 IgG3 subclass in the pathogenic activity of this patient' serum, in addition to IgG4.

We then tested this latter serum using an immunofluorescence assay to further assess its pathogenic activity. Figure 5D shows that, in contrast with the purified IgG from a HD and from the patient' IgG collected at the time of CR which both showed a linear labelling of DSG3 on the HaCaT cell plasma membrane, the baseline purified IgG fraction which contained a combination of anti-DSG3 IgG3 and IgG4 induced the disappearance of the DSG3 labelling, confirming the pathogenic activity of this baseline serum. Finally, removing the IgG3 fraction from the baseline patients' serum led to the reappearance of the DSG3 staining, with a labelling close to that observed with control sera from HD, while the IgG3 fraction induced the disappearance of the DSG3 labelling (Figure 5D).

Discussion

This study shows that while anti-DSG3 IgG4 were detected in more than 90% of pemphigus sera at baseline, this IgG4 subclass was also present in sera from all but one patients in sustained CR who still had positive circulating anti-DSG3 Abs. The main evolution in anti-DSG3 IgG subclasses that we observed during the evolution of patients is that while 61% of sera collected at the onset of disease and 75% of sera from relapsing patients contained two or more IgG subclasses (including IgG1, IgG2 and IgG3 in 40%, 26% and 26% of sera respectively), in contrast, 64.3% of sera collected in patients in CR had only one anti-DSG3 IgG subclass, mainly corresponding to IgG4.

It has been suggested that the absence of pathogenic activity of pemphigus sera, which still contained anti-DSG3 Abs, was related to a switch of anti-DSG3 IgG subclasses from IgG4 to IgG1 (7,20). We did not observe such an evolution, since anti-DSG3 IgG4 Abs were the exclusive IgG subclass (with no other anti-DSG3 IgG subclass) which was detected in the majority of sera (57.1%) from patients in CR. In contrast, we observed a close correlation between the clinical status (active disease versus remission) and the level of anti-DSG3 IgG4 Abs, whose mean level was 5.56 AU in patients in CR versus 19.70 AU in patients with persistent active disease ($p=0.026$), suggesting that the level of anti-DSG3 IgG4 Abs rather than a switch in anti-DSG3 IgG subclasses is involved in disease activity. In accordance with these findings, we showed that the in vitro pathogenic activity of sera collected in patients in CR, which exclusively contained anti-DSG3 IgG4 was highly dependent upon the level of anti-DSG3 IgG4. In particular, we showed that adjustment of anti-DSG3 IgG4 level to the one at baseline restored the pathogenic activity of a serum collected in a patient in CR, as recently reported (24). This observation might explain the persistence of anti-DSG3 Abs in some patients in CR, and the poor specificity (between serum level and disease activity) of DSG3 ELISA assays (5,10).

It is likely that the combination of multiple anti-DSG3 IgG subclasses may be involved in the pathogenic activity of patients' sera. This is first suggested by the fact that most sera (63.3%) collected at the onset of pemphigus or in patient with persistent disease activity under treatment (75%) contained two or more anti-DSG3 IgG subclasses, while on the contrary, most sera (64.3%) from patients in CR contained only one anti-DSG3 IgG subclass (corresponding to IgG4 in all but one case). In addition, we showed that a baseline serum, which contained both anti-DSG3 IgG3 and IgG4 Abs, induced keratinocyte dissociation, whereas a serum collected in the same patient in CR, which contained exclusively anti-DSG3 IgG4 at a level close to that at baseline, had no pathogenic activity.

In accordance with the high clinical activity of RTX versus a standard CS regimen, we observed an almost two-fold decrease in the mean number of anti-DSG3 IgG subclasses from 1.8 at the onset of disease to 1.1 in patients treated with RTX, whereas the number of anti-DSG3 IgG subclasses did not change much in patients treated with the standard CS regimen (1.9 versus 1.7).

As a result of these previous findings, we assessed whether the number of anti-DSG3 IgG subclasses and their isotype in baseline sera might predict the occurrence of persistent disease activity or relapse under treatment. We observed that the mean number of anti-DSG3 IgG subclasses in the baseline sera was higher in patients who further relapsed than in patients who maintained a sustained remission (2.6 ± 0.8 vs 1.5 ± 0.9; $p=0.01$), corresponding to a positive predictive value of 62.5% and a negative predictive value of 92%. Interestingly, relapses were particularly frequent in patients whose baseline serum contained anti-DSG3 IgG3 Abs, since anti-DSG3 IgG3 Abs were detected at baseline in sera from 71.4% of patients who further relapsed, as compared with 11.5% of patients who maintained CR ($p=0.004$). In accordance with these findings, we showed that anti-DSG3 IgG3 Abs had an in vitro pathogenic effect, and that their removal from a baseline serum which contained rather low level of anti-DSG3 IgG4, removed the pathogenic activity of this serum.

Finally, our findings should help physicians in the management of pemphigus patients. Indeed, taking into account the isotype(s) of anti-DSG3 IgG subclasses might help physicians to better predict the patients with a high relapse risk. Our findings also raise the question of the epitopes recognized by the different IgG subclasses on the DSG3 protein. In particular, it might be hypothesized that the different anti-DSG3 IgG subclasses might target different epitopes on DSG3, thus promoting the pathogenicity of anti-DSG3 Abs, as suggested by Cho et al. (9).

References:

1. Mascaró JM, España A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. Clin Immunol Immunopathol. oct 1997;85(1):90-6.

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

3. Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, Kern JS, Zambruno G, Feliciani C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br J Dermatol. juill 2016;175(1):142-9.

4. Hébert V, Boulard C, Houivet E, Duvert Lehembre S, Borradori L, Della Torre R, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. J Invest Dermatol. 2019;139(1):31-7.

5. Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch Dermatol. mai 2009;145(5):529-35.

6. Tovanabutra N, Bax CE, Feng R, Kushner CJ, Payne AS. Temporal outcomes after rituximab therapy for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol. 25 oct 2021;S0022-202X(21)02292-2.

7. Bhol K, Mohimen A, Ahmed R. Correlation of Subclasses of IgG with Disease Activity in Pemphigus vulgaris. Dermatology. 1994;189(Suppl. 1):85-9.

8. Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. 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. 2000;143(2):337-42.

9. Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, et al. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. Cell Rep. 23 2019;28(4):909-922.e6.

10. 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. 18 mars 2020;

11. Brooks WS, Lee Y-Y, Abell E, Deng J-S. Comparison of igg subclasses and complement binding activity of autoantibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus. J Clin Lab Anal. 1989;3(5):307-11.

12. David M, Katzenelson V, Hazaz B, Ben-Chetrit A, Sandbank M. Determination of IgG subclasses in patients with pemphigus with active disease and in remission. Arch Dermatol. juin 1989;125(6):787-90.

13. Yamada H, Hashimoto T, Nishikawa T. IgG subclasses of intercellular and basement membrane zone antibodies: the relationship to the capability of complement fixation. J Invest Dermatol. avr 1989;92(4):585-7.

14. Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. J Clin Immunol. janv 1988;8(1):43-9.

15. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. J Dermatol Sci. mai 2001;26(1):55-61.

16. Tao MH, Smith RI, Morrison SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. J Exp Med. 1 août 1993;178(2):661-7.

17. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). N Engl J Med. 1 juin 1989;320(22):1463-9.

18. Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O'Leary CE, Payne AS. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. Br J Dermatol. déc 2012;167(6):1245-53.

19. Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, Ellebrecht CT, Yu X, Posner MR, et al. Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. PLoS ONE [Internet]. 15 juin 2016 [cité 19 févr 2020];11(6). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909199/

20. Ayatollahi M, Joubeh S, Mortazavi H, Jefferis R, Ghaderi A. IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004;18(2):241-2.

21. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. Br J Dermatol. juin 2001;144(6):1183-8.

22. Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. Autoimmunity. nov 2012;45(7):516-26.

23. 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. 20 mai 2017;389(10083):2031-40.

24. Zhao WL, Ishii K, Egami S, Xu Z, Funakoshi T, Takahashi H, et al. Analysis of clinical characteristics, prognosis and antibody pathogenicity of pemphigus patients positive for anti-desmoglein IgG autoantibodies in remission: a retrospective cohort study. J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV. 27 oct 2021;

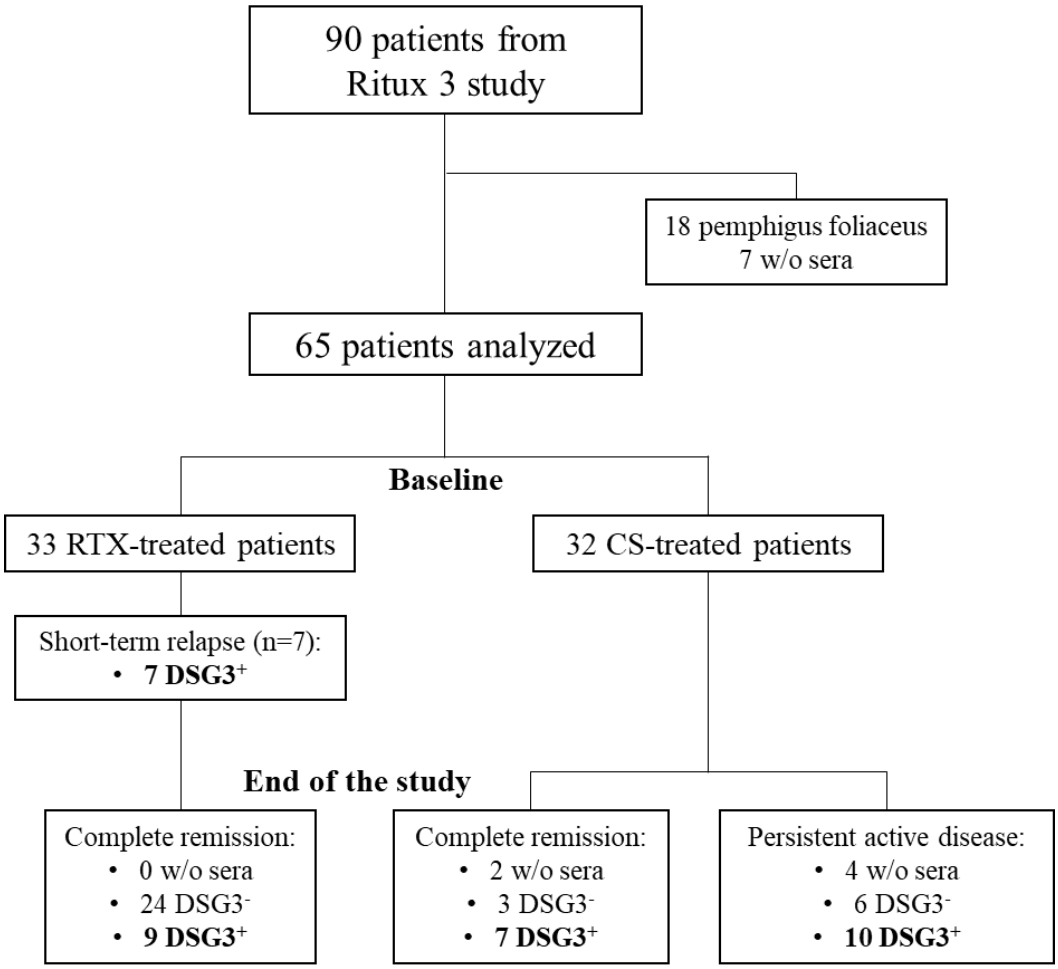


Figure 1: Flow chart of the study.

CS, corticosteroids; DSG3, desmoglein 3; RTX, rituximab

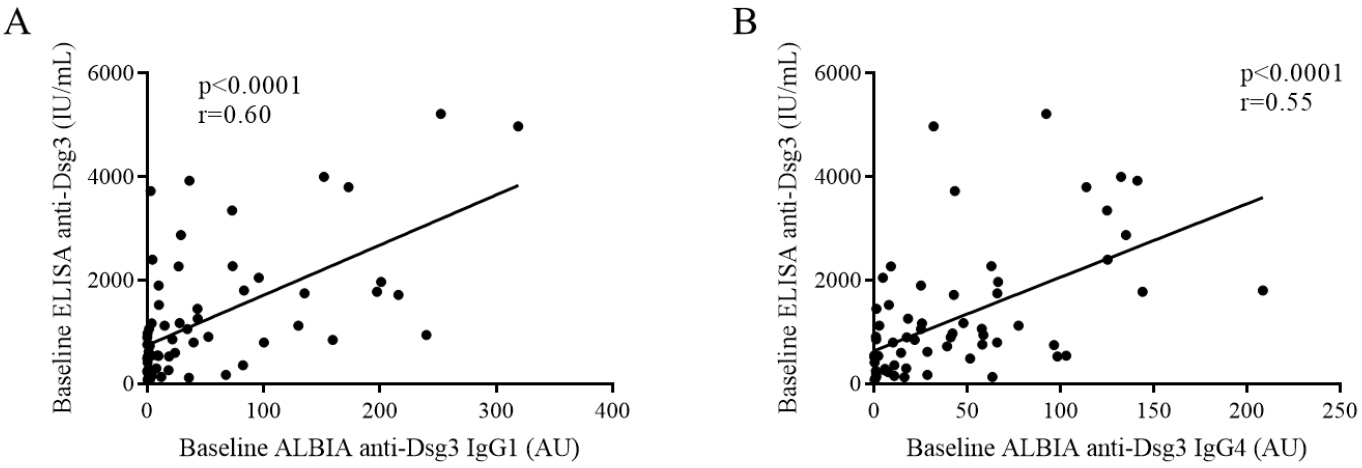


Figure 2: Specificity of ALBIA test in comparison with ELISA anti-DSG3 results in pemphigus patients at baseline (n=65).

Correlation between ELISA anti-DSG3 IgG and ALBIA anti-DSG3 IgG1 (A) or IgG4 (B) values was assessed using Pearson's rank correlation coefficient.

ALBIA, addressable laser bead immunoassay; AU, arbitrary units; DSG, desmoglein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IU, international unit.

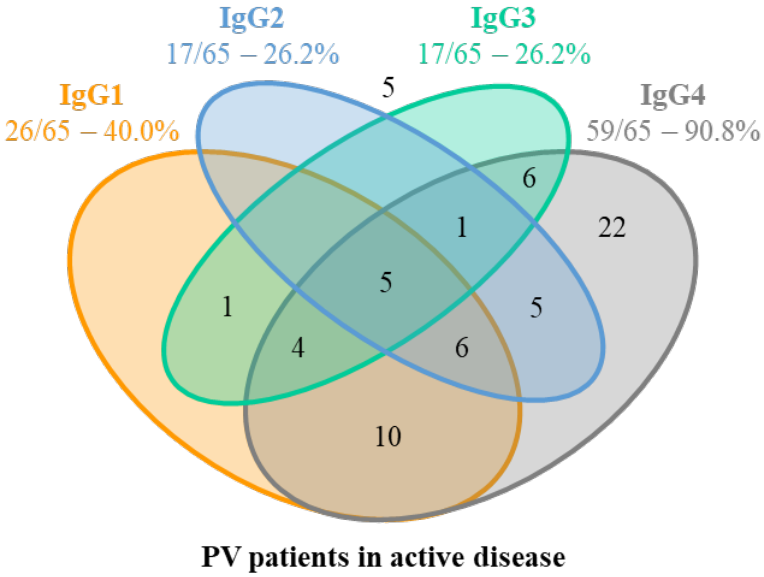


Figure 3: Baseline repartition of anti-desmoglein 3 IgG subclasses in pemphigus vulgaris patients. Distribution of anti-DSG3 IgG subclasses in the 65 PV patients in active disease. Five out of 65 patients in active disease were negative for each of the anti-DSG3 IgG subclasses (number shown outside).

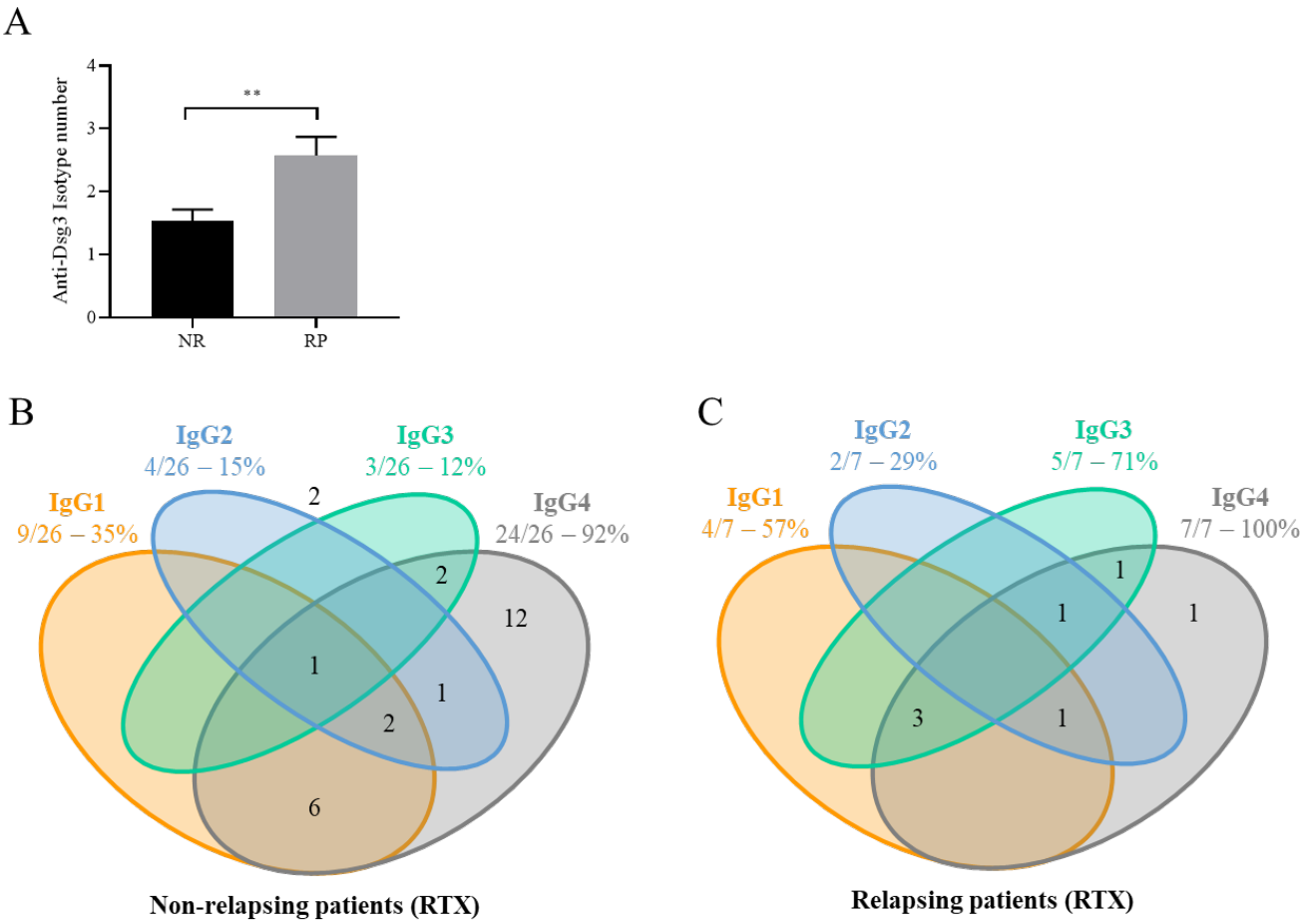


Figure 4: The number of anti-desmoglein (DSG) 3 IgG subclasses as well as the presence of anti-DSG3 IgG3 in pemphigus vulgaris (PV) patients at baseline are associated with early relapse after rituximab (RTX) treatment.

In the 33 PV patients treated by RTX, the distribution of anti-DSG3 IgG subclasses in the 26 non-relapsing (NR) (A) compared to the 7 early relapsing patients (RP) (B) show that, RP have more IgG subclasses ($p<0.01$) (C), and have a higher frequency of IgG3 than NR patients (71% vs 12%; $p=0.004$). Two out of 26 non-relapsing patients were negative for each of the anti-DSG3 IgG subclasses (number shown outside). Mean ± SEM were compared using unpaired t-test. Frequencies of anti-Dsg3 subclasses were compared using Fisher's exact test.

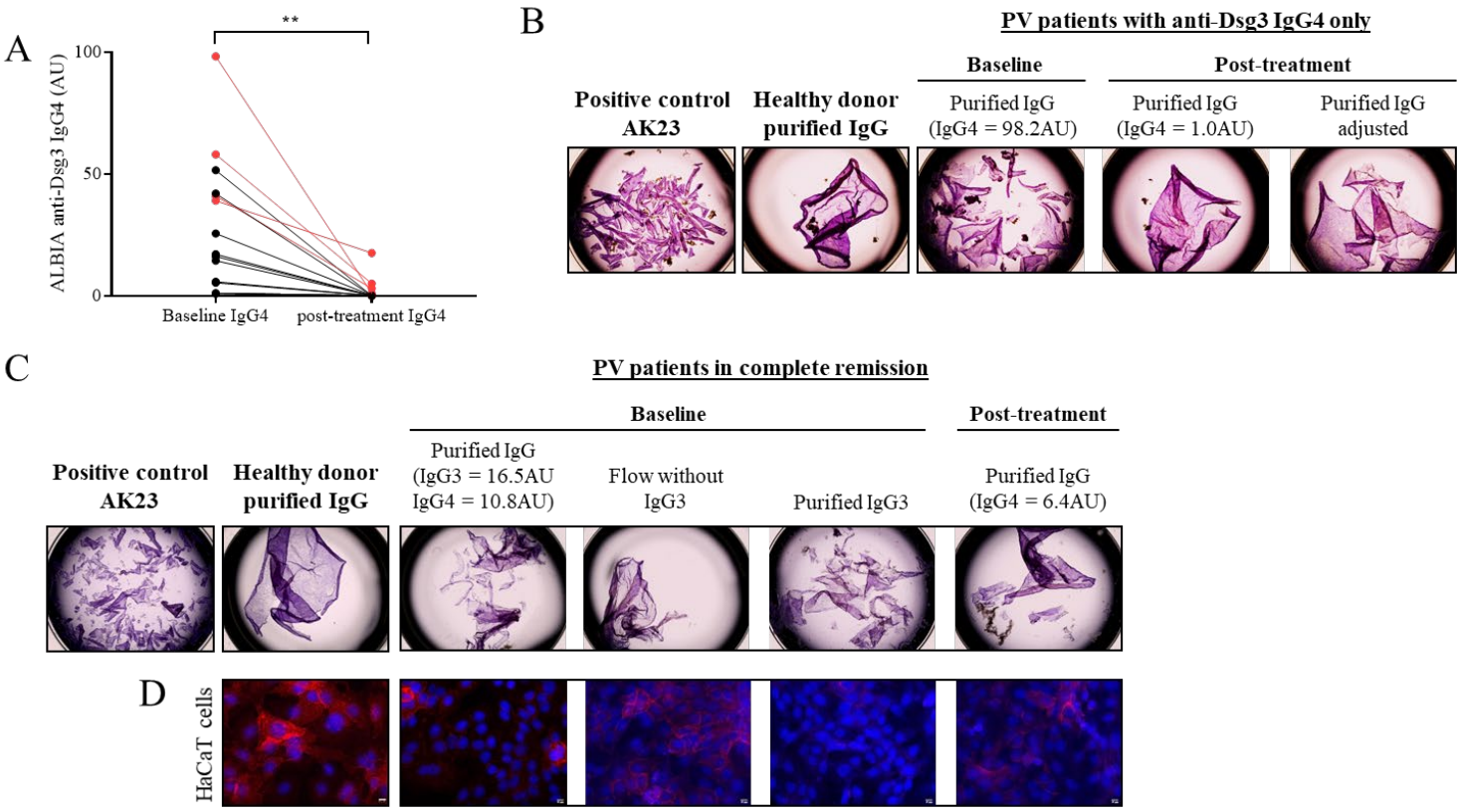


Figure 5: Pathogenicity evaluation of IgG3 and IgG4 anti-desmoglein 3 autoantibodies in pemphigus patients by dispase test and immunofluorescence.

(**A**) IgG4 anti-DSG3 level (AU) were significantly decreased after remission (in RTX and CS groups) in pemphigus patients who had IgG4 only at baseline (n=16) ($p<0.01$). The four patients who still contained anti-DSG3 IgG4 after treatment are identified in red. Mean were compared using paired t-test. HaCaT cells pre-incubated for 24h with positive control (AK23) or purified IgG of healthy donor (negative control) or PV patients with anti-DSG3 IgG4 only (**B**) or anti-DSG3 IgG3 and IgG4 (**C**) were dissociated from the plate with dispase and the monolayers were mechanically disrupted. (**D**) HaCaT keratinocytes immunostaining incubated with healthy donor IgG shows that DSG3 (red) is localised at the plasma membrane.

V. Article 5 : *Impact of rituximab on follicular helper and regulatory T cells in patients with pemphigus vulgaris*

En cours de rédaction

Vivien Hébert[1,2], Julien Novarino[3], Maud Maho-Vaillant[1,2], Corine Perals[3], Cyrielle Borries[3], Fanny Martinez[3], Pascal Joly[1,2], Nicolas Fazilleau[3]

1: INSERM U1234, PANTHER, Normandie University, Rouen, France

2: Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Normandie University, Rouen, France

3: Toulouse Institute for infectious and inflammatory diseases (Infinity), INSERM U1291, CNRS U5051, University of Toulouse, Toulouse, France

Dans ce travail, nous avons étudié l'impact du RTX sur les lymphocytes T folliculaires spécifiques de l'antigène DSG3 chez les patients atteints de pemphigus. A travers l'évolution sous traitement et en fonction du statut clinique, nous avons essayé de déterminer le rôle de ces populations.

Un premier travail de Maho-Vaillant et al avait montré la présence d'un contingent de Tfh spécifiques de la DSG3 circulants. De plus, il avait été observé une diminution de la fréquence de cette population parallèlement à la diminution de la fréquence des LB autoréactifs mémoires commutés CD27+IgG+ et à l'obtention d'une rémission clinique. De façon intéressante, cette évolution était propre aux patients ayant reçu du RTX puisque non constatée chez les patients ayant reçu une CS.

Nous avons montré que les polarisations Tfh17 et Tfh1* étaient sur-représentées au sein des Tfh autoréctifs par rapport aux Tfh non spécifiques de la DSG3 et avaient un profil finalement assez proche des Tfh des donneurs sains. Par ailleurs, le RTX n'avait pas d'impact sur la polarisation des Tfh.

Par la suite, nous avons montré l'émergence d'une population de Tfr spécifiques de la DSG3 suractivés après traitement par RTX permettant de modifier le ratio Tfr/Tfh au à la faveur des Tfr.

L’émergence de cette population de Tfr suractivés autoréactifs pourrait expliquer les rémissions prolongées observées chez les patients pemphigus traités par RTX, bloquant ainsi la différenciation des LB autoréactifs au sein des centres germinatifs.

Abstract

Introduction: Pemphigus is characterized by pathogenic auto-Ac targeting interkeratinocytes desmoglein (DSG) cadherins 1 and 3, and by a HLADRB1-0402 predisposition. Rituximab combined with short corticosteroid therapy is the treatment for moderate to severe forms (Ritux3 trial). We report the effect of rituximab on the circulating component of antigen(Ag)-specific T lymphocytes that specifically regulate the B response: follicular helper (Tfh) and regulatory T lymphocytes (Tfr).

Method: 74 longitudinal samples (D0-M60) from pemphigus patients (Ritux 3 cohort) and 19 healthy donors were studied. Using the HLADRB1-0402 tetramer loaded with the DSG3 immunodominant peptide, we analyzed by cytometry: i) the polarization (Tfh1, 1*, 2, 17) via the expression of CCR6 and CXCR3 chemokine receptors, ii) the frequency and iii) the activation (PD1, ICOS, and CD25) of the Ag-specific Tfh and Tfr autoreactive populations.

Results: At D0, we showed that the phenotypes of autoreactive and non-autoreactive Tfh of patients were very different with a predominance of Tfh1* and Tfh17 phenotypes in autoreactive Tfh and, on the contrary, an underrepresented Tfh2 phenotype. Use of rituximab had no effect on Tfh polarization during follow-up, despite achievement of clinical remission in all patients. We then demonstrated the progressive emergence of an Ag-specific Tfr population after rituximab use and thus the increase in the Tfr/Tfh ratio, to the benefit of regulatory populations. Within this emerging Ag-specific Tfr population, the surface activation markers PD1, ICOS, and CD25 were significantly overexpressed relative to autoreactive Tfh but also relative to non-antigen-specific Tfr.

Discussion: Rituximab allows the delayed emergence of a large and hyper-activated Ag-specific Tfr cells population, which may explain its long-term efficacy.

Introduction

Pemphigus vulgaris is a life-threatening autoimmune disease of the skin and mucosae due to the production of antibodies (Abs) directed against the desmosomal protein desmoglein 3 (DSG3), an adhesion molecule of the epidermis (Kasperkiewicz et al. 2017; Schmidt et al. 2019). We reported that first-line treatment with rituximab (RTX), the anti-CD20 mAb, enables more patients to achieve long-lasting remission off therapy than corticosteroids (CS) alone (Joly et al. 2017). In order to better understand the immunological mechanisms that mediate long-lasting clinical remission after RTX treatment, we recently showed, using peptide-HLADRB1∗0402 tetramer staining, that DSG-3–specific T follicular helper (Tfh) cells decreased after RTX, correlating with a sustained depletion of IgG-switched memory autoreactive B cells, leading to the disappearance of anti-Ds3 antibody-secreting cells (ASC) (Maho-Vaillant et al. 2021).

Indeed, maturation of B cells responses are regulated by Tfh (Fazilleau et al. 2009a), leading to a progressive increase in the affinity of Abs over time through different process occurring in the germinal centers (GCs) of secondary lymphoid organs such as TCR-MHC interactions, co-stimulation molecules and cytokines (Fazilleau et al. 2009b). Finally, only the "fittest" B cells, those able to capture antigen via surface Ig and best present it on surface through MHCII, are supported and selected by Tfh cells (Victora and Nussenzweig 2012). In addition to Tfh cells, follicular regulatory CD4+ T (Tfr) cells, a population of regulatory T (Treg) cells that express the transcription factors BCL6 and FOXP3 and the chemokine receptor CXCR5, colocalize to the B follicle and the GC (Chung et al. 2011; Linterman et al. 2011; Wollenberg et al. 2011). There, Tfr cells control autoimmunity by suppressing excessive immune responses through a process mediated by the inhibitory coreceptor CTLA-4 (Sage et al. 2014; Wing et al. 2014). However, it exists a paradigm suggesting that Tfr cells are inhibitory and restrain overall GC responses, including antigen-specific B cell responses (Clement et al. 2019; Sage et al. 2016) whereas other studies reported no obvious effect on antigen-specific Ab responses in the absence of Tfr cells (Botta et al. 2017; Fu et al. 2018).

The present study suggests that, in addition to a decrease of DSG3-specific Tfh cells, a late emergence of DSG3-specific Tfr cells in RTX-treated patients could explain long-lasting remissions in the absence of any other treatments.

Results

Clinical course of patients

All patients were issued from the 'Ritux 3' study (Joly et al. 2017), which enrolled 90 newly-diagnosed pemphigus patients: 46 patients were initially randomly assigned to the RTX plus short-term prednisone group. At the M36 evaluation, 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. We could benefit from 18 blood samples from baseline.

Additionally, 35 patients from the RTX-arm accepted to participate to the M60-M90 extension visit. Among them, we could analyze blood samples from 17 patients. All were in complete remission off therapy at this M60-M90 extension visit, without any relapse recorded since the last M36 evaluation. Additionally, we had 4 M60-M90 blood samples from patients initially enrolled in the CS-arm. Two of them relapsed before the present M60-M90 extension, at M30 and M50, and received RTX infusions, i.e. 58 months and 39 months before their M60-M90 visit, respectively. The two others maintained prolonged complete remission off-therapy without having received RTX at any time of their follow-up.

The 'Ritux 3' study led to the approval of the FDA as well as the EMA for the use of RTX in first line treatment of moderate to severe pemphigus. Therefore, we focused our analyses on the impact of RTX, and not from CS, on the follicular T cells Tfh and Tfr.

Serum Abs against DSG3

Relative to our recent publication (Maho-Vaillant et al. 2021), which reported the monitoring of biological parameters until M36, we studied serum anti–DSG3 Ab ELISA values of patients from the RTX group at the M60-M90 visit. Interestingly, anti-DSG3 autoAb titers remained negative in all RTX-treated patients (17/17) despite any maintenance RTX infusions since at least 3 years. On the contrary, the two patients from the CS-arm (2/4) who had received RTX for relapses still had positive anti-DSG3 Abs, at 42 and 305 IU/mL, respectively.

Baseline phenotype of DSG3-specific Tfh cells

Using the tetramer HLA DRB1∗0402 loaded with the immunodominant peptide of DSG3 (190-204), we studied by flow cytometry Tfh and Tfr cells either DSG3–specific or not at baseline, M6 and M60-90. All patients were previously assessed for carrying the HLA-DRB1∗0402 pemphigus vulgaris (PV) susceptibility allele. Using the expression of the chemokine receptors CXCR3 and CCR6 (Figure 1A), we assessed the baseline polarisation (Tfh1 (CXCR3+CCR6-), Tfh1* (CXCR3+CCR6+), Tfh2 (CXCR3-CCR6-), Tfh17 (CXCR3-CCR6+)) on DSG3-specific CD4+CD45RA-Tetramer+CXCR5+CD127-FoxP3- Tfh cells and compared it to the one of non-autoreactive CD4+CD45RA-Tetramer-CXCR5+CD127-FoxP3- Tfh cells from pemphigus patients and 19 healthy donors (HD) (Figure 1B). The baseline frequency of autoreactive Tfh1 cells was not different from those observed in non-autoreactive Tfh1 cells from PV patients or HD. Interestingly, Tfh1* and Tfh17 subsets were over-represented in DSG3-specific Tfh cells compared to non-autoreactive Tfh cells from PV patients, without being different compared to non-autoreactive Tfh cells from HDs. On the contrary, Tfh2 subset was under-represented in autoreactive compared to non-autoreactive Tfh cells from PV patients. However, such observed differences between autoreactive and non-autoreactive Tfh cells in PV patients were not found in comparing with non-autoreactive Tfh cells from HD. Thus, cell polarisation in autoreactive Tfh cells were clearly different from the one observed in non-autoreactive Tfh cells in PV patients but relatively close to the one observed in non-autoreactive Tfh cells from HDs.

Evolution of polarisation in DSG3-specific Tfh cells after rituximab treatment

We demonstrated that the long-term efficacy of RTX was associated to a deep and prolonged decrease of switched memory IgG+CD27+DSG3-specific B cells and therefore anti-DSG3 auto-Abs. Since Tfh polarisation plays a crucial role in B cell differentiation and Ig class switch, we sought to assess the evolution of autoreactive Tfh under RTX treatment. Irrespective of whether it was for Tfh1, Tfh1*, Tfh2 or Tfh17 phenotype, RTX had no significant impact on Tfh cell polarisation even long-term after treatment, between M60 and M90 (Figure 2A).

It has been demonstrated in other Ab-mediated autoimmune diseases such as juvenil dermatomyositis, Sjogren syndrome or systemic lupus erythematous that the Tfh2+Tfh17/Tfh1 ratio of blood circulating Tfh cells is significantly above 1 in active phase and around 1 in complete remission (Morita et al. 2011). We found that this ratio among DSG3-specific Tfh cells was significantly superior to 1 at baseline in PV patients (Figure 2B). Interestingly, RTX treatment

had no impact on the balance between Tfh2/Tfh17 and Tfh1 autoreactive cells (mean±SEM; baseline: 2.98±1.07; M60-M90: 2.62±0.41; p=0.58) (Figure 2B).

Impact of rituximab on DSG3-specific Tfh and Tfr cells frequencies

At this time of the study, no RTX effects on DSG3-specific Tfh cells were susceptible to explain the long-term efficacy of RTX in PV patients. We therefore focused our work on a potential impact on DSG3-specific Tfr cells. Strikingly, long-term follow-up of DSG3-specific follicular T cells allowed us to evidence a progressive emergence of Tfr cells (Tetramer+CXCR5+CD127-FoxP3+) after RTX (Figure 3A). These Ag-specific Tfr cells appeared later on after RTX since almost none of these cells were observed at baseline and M6 (data not shown). Logically, in parallel to the emergence of these Tfr cells, we observed that the frequencies of bona-fide Tfh cells, FoxP3- cells among follicular DSG3-specific T cells (Tetramer+CXCR5+CD127+), durably decreased at M60-M90 after RTX compared to baseline (baseline: 94.61± 5.02, M60-M90: 85.68±9.06; p<0.001), whereas no infusion was performed since several years (Figure 3B).

Activation of emerging DSG3-specific Tfr cells

After having evidenced a new Ag-specific population of Tfr cells that appeared after RTX treatment, we evaluated the activation state of this population in order to get better insight on the long-term clinical remission. Activation was assessed by comparing ICOS, HLA-DR and CD25 membrane expression (gMFI) between Tfr and bona-fide Tfh cells. Due to the very small frequencies of DSG3-specific Tfr cells at baseline, the activation could only be assessed at M60-M90. We found that DSG3-specific Tfr cells were significantly overactivated as compared to DSG3-specific Tfh cells for the three activation markers (Figure 4). In order to understand if this overactivated state was related to a general state of the whole Tfr popualtion, we found that DSG3-specific Tfr cells expressed higher levels of ICOS, HLA-DR and CD25 as compared to the ones at the surface of non-Ag-specific Tfr cells, suggesting that this over-activation was peculiar to the DSG3-specific Tfr cells (Figure 4).

What about CS-treated patients?

Blood samples from four patients of the CS-arm of the princeps study were analyzed at M60-M90. Among them, 2 patients (PV46 and PV56) have received RTX during the course of their disease, due to clinical relapses, at M30 and M50 after study inclusion, respectively. The two others (PV65 and PV69) have never received RTX due to a prolonged clinical remission. All were in complete remission off therapy at the M60-M90 evaluation excepted PV46 who was considered in “almost complete remission off therapy”. Interestingly, the Tfr/Tfh ratio in DSG3-specific T cells in these patients was very low, close to those observed in PV patients at baseline (Figure 5).

Discussion

This study shows that long-lasting efficacy of RTX in patients with pemphigus is associated with the progressive emergence of blood circulating DSG3-specific Tfr cells and the decrease of DSG3-specific Tfh cells leading to an unbalance between Tfr and Tfh, in favour of Tfr cells.

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, (Arroyo-Villa et al. 2014; Chen et al. 2018; Choi et al. 2015). In pemphigus, an effect of RTX on decreasing DSG-specific T cells from patients with pemphigus was previously reported using ELISPOT assay (Eming et al. 2008); and more recently, our team demonstrated the decrease of DSG3-specific Tfh cells in patients treated by RTX. On the other hand, Tfr cells can suppress excessive immune responses, such as those occurring in autoreactivity (Chung et al. 2011; Clement et al. 2019; Linterman et al. 2011; Wing et al. 2014)

Taking together, our findings are in accordance with the literature and the unbalance between Tfr and Tfh seems to be directly responsive of the prolonged disappearance of circulating anti–DSG3 IgG-secreting B cells and, consequently, the anti–DSG-3 IgG+ Abs, as already demonstrated (Colliou et al. 2013; Maho-Vaillant et al. 2021).

Surprisingly, the polarisation of autoreactive Tfh cells does not reflect the “type 2” bias in the physiopathology of pemphigus which was suggested by anti-DSG3 Abs IgG4 (Armitage et al. 1993; Tao et al. 1993), the presence of a T cell population with a prevalent type 2 cytokine pattern in lesional skin of patients (Caproni et al. 2001) or the type2-related cytokines induced ex-vivo after T cells stimulation by the recombinant DSG3 (Rizzo et al. 2005; Veldman et al. 2003). On the contrary, we find an under-representation of Tfh2 population whereas Tfh1* and Tfh17 phenotypes were over-represented in autoreactive Tfh cells compared to non-Ag-specific Tfh cells. However, such discrepancies in blood Tfh2 profile could be explained by the different technics used in the past two decades compared to the recent technologies that now raise to be more specific in autoreactive T cells isolation.

Also, we find an unbalance between Tfh2+Tfh17 on the one hand, and Tfh1 on the other hand, as already demonstrated in Ab-mediated autoimmune diseases (Morita et al. 2011). However, such unbalance correlates with clinical status. Thus, this bias in polarisation seems to be more a “signature” of autoimmunity rather than a causal mechanism of pathogenicity. Moreover, this absence of change in the autoreactive Tfh cell profile of pemphigus patients after

RTX is in accordance with the absence of significant modifications on the transcriptomic profiles already observed in autoreactive B cells after RTX (Hébert et al. 2019b).

Interestingly, we could study 4 blood samples from patients initially randomized in the CS-arm of the Ritux 3 study. Two of them received RTX in their disease course due to clinical relapses, at M30 and M50 i.e. 58 months and 39 months before their M60-M90 visit, respectively. And both of the others never received RTX. We showed that all of them had a weaker Tfr/Tfh cell ratio than patients from the RTX-arm. Thus, the use of RTX in a second-line therapy or the non-use of RTX seem to limit the emergence of the Ag-specific Tfr population. This finding could explain the observed poorer clinical response to RTX when used in second or more line of treatment (Zambruno and Borradori 2008).

From this work, the only significant change induced by RTX and susceptible to be responsible to the long-term clinical complete remission off therapy observed several years after the last RTX infusions is the emergence of an important Tfr cell population. Moreover, the overactivation of circulating Ag-specific Tfr cells observed at M60-M90 suggests that these cells have recently been activated, in contrast with the weaker activation of Ag-specific Tfh or non-Ag-specific Tfr cells. Thus, the tolerance to DSG3 induced by Tfr cells seems to be a delayed and continuous process, even several years after achievement of a clinical remission.

Methods

Patients

A total of 90 patients, 74 with pemphigus vulgaris and 16 with pemphigus foliaceus, were included in the princeps randomized clinical trial (RITUX3; 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 or M18, 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 initially followed 36 months and an extension study was approved by ethic committees to assess the long-term clinical and immunological status of patients. Because inclusion period of Ritux 3 lasted almost 3 years, this extension visit allowed to record data from 5 years (M60) for the last included patients, to almost 8 years for the first included patients (M90) in Ritux 3. Thus, this visit will be called M60-M90.

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 M60-M90.

Anti-DSG-3 Tfh and Tfr cells stainings

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, Duren, 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 Tfh and Tfr cells were only characterized in patients with

pemphigus vulgaris with the HLADRB1*0402 genotype. Frequency and phenotype of DSG3-specific Tfh and Tfr cells were determined by flow cytometry using mAbs against CD3, CD4, CD45RA, CXCR5, CD127 and FoxP3 (Miltenyi Biotec and BD Biosciences) and a tetramer-based detection system using HLADRB1*0402- tetramers loaded with the DSG3 190-204 immunodominant peptide (LNSKIAFKIVSQEPA, obtained from NIH Tetramer core facility, Emory University, Atlanta, GA). An irrelevant CMHII tetramer (PVSKMRMATPLLMQA, NIH Tetramer core facility, Emory University, Atlanta, GA) was used as negative control for the cytometric gating strategy. The percentages of DSG3-specific Tfh and Tfr cells were determined using FlowJo software.

Tfh phenotypes

The frequencies of different phenotypes of follicular helper T cells (Tfh1, Tfh1*, Tfh2, Tfh17) were determined by flow cytometry using mAbs against CCR6 and CXCR3 (Miltenyi Biotec). Each polarisation was defined as following: Tfh1:CXCR3+CCR6-; Tfh1*: CXCR3+CCR6+; Tfh17: CXCR3-CCR6+; Tfh2: CXCR3-CCR6-.

Tfh and Tfr cells activation

Tfh and Tfr cells activation was assessed by the mean fluorescence intensity (gMFI) in flow cytometry using mAbs against C25, HLA-DR and ICOS FoxP3 (Miltenyi Biotec and BD Biosciences).

Statistical analysis

Data are presented as mean SEM. Prism software (Graph Pad, San Diego, CA) was used for statistical analysis. 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.

References:

Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch. Dermatol. 2009;145(5):529–35

Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 1993;150(9):3671–80

Arroyo-Villa I, Bautista-Caro M-B, Balsa A, Aguado-Acín P, Bonilla-Hernán M-G, Plasencia C, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicullar helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2014;16(6):500

Ayatollahi M, Joubeh S, Mortazavi H, Jefferis R, Ghaderi A. IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2004;18(2):241–2

Bhol K, Mohimen A, Ahmed R. Correlation of Subclasses of IgG with Disease Activity in Pemphigus vulgaris. Dermatology. 1994;189(Suppl. 1):85–9

Botta D, Fuller MJ, Marquez-Lago TT, Bachus H, Bradley JE, Weinmann AS, et al. Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. Nat. Immunol. 2017;18(11):1249–60

Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, Kern JS, Zambruno G, Feliciani C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br. J. Dermatol. 2016;175(1):142–9

Brooks WS, Lee Y-Y, Abell E, Deng J-S. Comparison of igg subclasses and complement binding activity of autoantibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus. J. Clin. Lab. Anal. 1989;3(5):307–11

Caproni M, Giomi B, Cardinali C, Salvatore E, Pestelli E, D'Agata A, et al. Further Support for a Role for Th2-like Cytokines in Blister Formation of Pemphigus. Clin. Immunol. 2001;98(2):264–71

Chen Y, Lin W, Yang H, Wang M, Zhang P, Feng R, et al. Aberrant Expansion and Function of Follicular Helper T Cell Subsets in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ. 2018;70(11):1853–65

Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, et al. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. Cell Rep. 2019;28(4):909-922.e6

Choi J-Y, 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. Hoboken NJ. 2015;67(4):988–99

Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. Nat. Med. 2011;17(8):983–8

Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, Diallo A, Blazar BR, Kuchroo VK, et al. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. Nat. Immunol. 2019;20(10):1360–71

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

David M, Katzenelson V, Hazaz B, Ben-Chetrit A, Sandbank M. Determination of IgG subclasses in patients with pemphigus with active disease and in remission. Arch. Dermatol. 1989;125(6):787–90

Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. Autoimmunity. 2012;45(7):516–26

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(12):2850–8

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. FOLLICULAR HELPER T CELLS: LINEAGE AND LOCATION. Immunity. 2009a;30(3):324–35

Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. Nat. Immunol. 2009b;10(4):375–84

Fu W, Liu X, Lin X, Feng H, Sun L, Li S, et al. Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. J. Exp. Med. 2018;215(3):815–25

Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O'Leary CE, Payne AS. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. Br. J. Dermatol. 2012;167(6):1245–53

Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. J. Dermatol. Sci. 2001;26(1):55–61

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

Hébert 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. 2019a;139(1):31–7

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

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

Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. J. Clin. Immunol. 1988;8(1):43–9

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. Nat. Rev. Dis. Primer. 2017;3:17026

Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. 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. 2000;143(2):337–42

Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat. Med. 2011;17(8):975–82

Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, Ellebrecht CT, Yu X, Posner MR, et al. Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. PLoS ONE. 2016;11(6) Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909199/

Maho-Vaillant M, Perals C, Golinski M-L, Hébert V, Caillot F, Mignard C, et al. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. J. Invest. Dermatol. 2021;

Mascaró JM, España A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. Clin. Immunol. Immunopathol. 1997;85(1):90–6

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;

Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity. 2011;34(1):108–21

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(6):1043–6

Rizzo C, Fotino M, Zhang Y, Chow S, Spizuoco A, Sinha AA. Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. Clin. Exp. Dermatol. 2005;30(5):535–40

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). N. Engl. J. Med. 1989;320(22):1463–9

Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. Immunity. 2014;41(6):1026–39

Sage PT, Ron-Harel N, Juneja VR, Sen DR, Maleri S, Sungnak W, et al. Suppression by T FR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. Nat. Immunol. 2016;17(12):1436–46

Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. The Lancet. Elsevier; 2019;394(10201):882–94

Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. 2001;144(6):1183–8

Tao MH, Smith RI, Morrison SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. J. Exp. Med. 1993;178(2):661–7

Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M. Dichotomy of Autoreactive Th1 and Th2 Cell Responses to Desmoglein 3 in Patients with Pemphigus Vulgaris (PV) and Healthy Carriers of PV-Associated HLA Class II Alleles. J. Immunol. American Association of Immunologists; 2003;170(1):635–42

Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews; 2012;30(1):429–57

Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. Immunity. 2014;41(6):1013–25

Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2011;187(9):4553–60

Yamada H, Hashimoto T, Nishikawa T. IgG subclasses of intercellular and basement membrane zone antibodies: the relationship to the capability of complement fixation. J. Invest. Dermatol. 1989;92(4):585–7

Zambruno G, Borradori L. Rituximab immunotherapy in pemphigus: therapeutic effects beyond B-cell depletion. J. Invest. Dermatol. 2008;128(12):2745–7

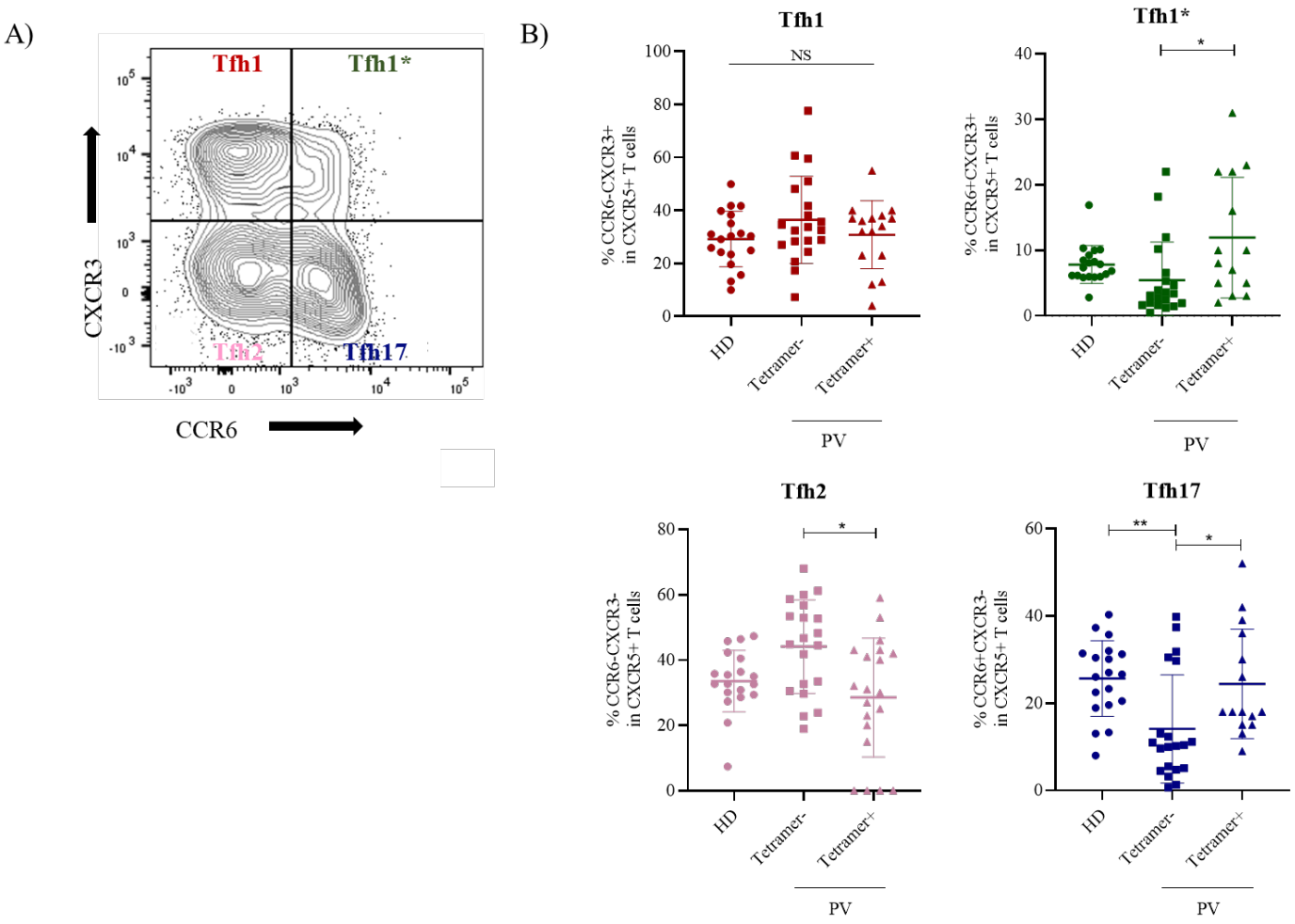


Figure 1: **Baseline polarisation of circulating HLA-DRB0402 DSG3+ Tfh cells in pemphigus patients**

A) Strategy of assessment for CD4+CD45RA-CXCR5+ Tfh cells polarisation according to the expression of the chemokine receptors CXCR3 and CCR6.

B) Frequencies of Tfh1 (red), Tfh1* (green), Tfh2 (pink) and Tfh17 (blue) cells in Ag-specific (Tetramer+) Tfh cells from PV patients (n= 20, triangular symbols) compared to non-Ag-specific (Tetramer-) Tfh cells from the same PV patients (square symbols) and HDs (n=17, circle columns).

Only blood samples allowing to assess at least100 DSG3-specific Tfh cells were analyzed

$*P < 0.05$; $**P < 0.01$; DSG, desmoglein; Tfh, T follicular helper

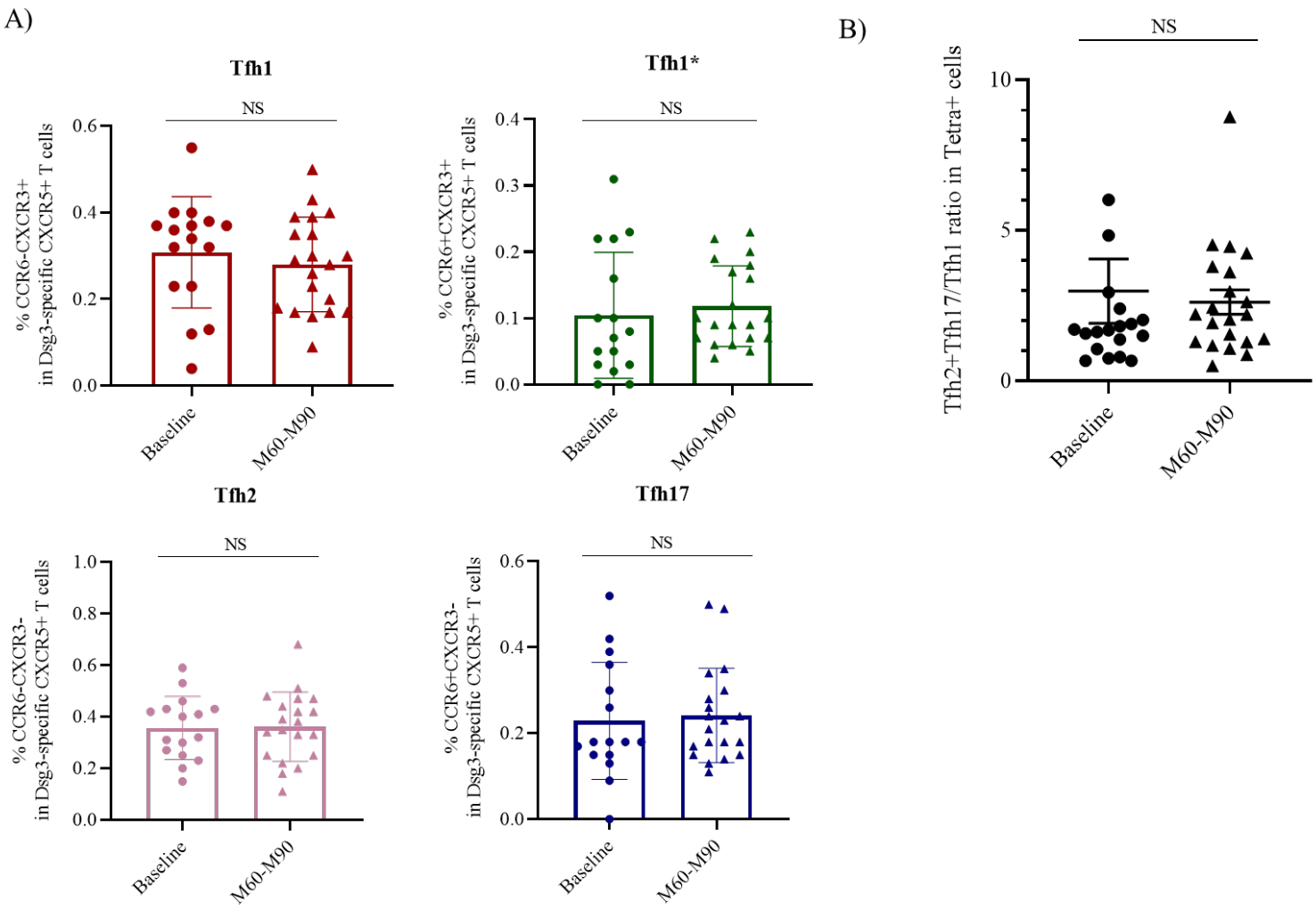


Figure 2: **Evolution of polarization of circulating DSG3–specific Tfh cells in pemphigus patients after RTX treatment**

A) Study of the impact of the use of RTX on the polarization of DSG3-specific Tfh cells. Frequencies of each phenotype Tfh1(red), Tfh1* (green), Tfh2 (pink), Tfh17 (blue) were compared during time between baseline (circle symbols) and M60-M90 (triangular symbols). Results are presented as frequencies of each polarization according to CXCR3 and CCR6 chemokine receptors, among CD4+CD45RA-Tetra+CXCR5+ T cells.

B) Comparaison of the evolution of Tfh2+Tfh17/Tfh1 ratio from baseline (circle symbols) to after RTX at M60-M90 (triangular symbols).

Only blood samples allowing to assess more than 100 DSG3-specific Tfh cells were analyzed

DSG, desmoglein; Tfh, T follicular helper; RTX, ritxumab

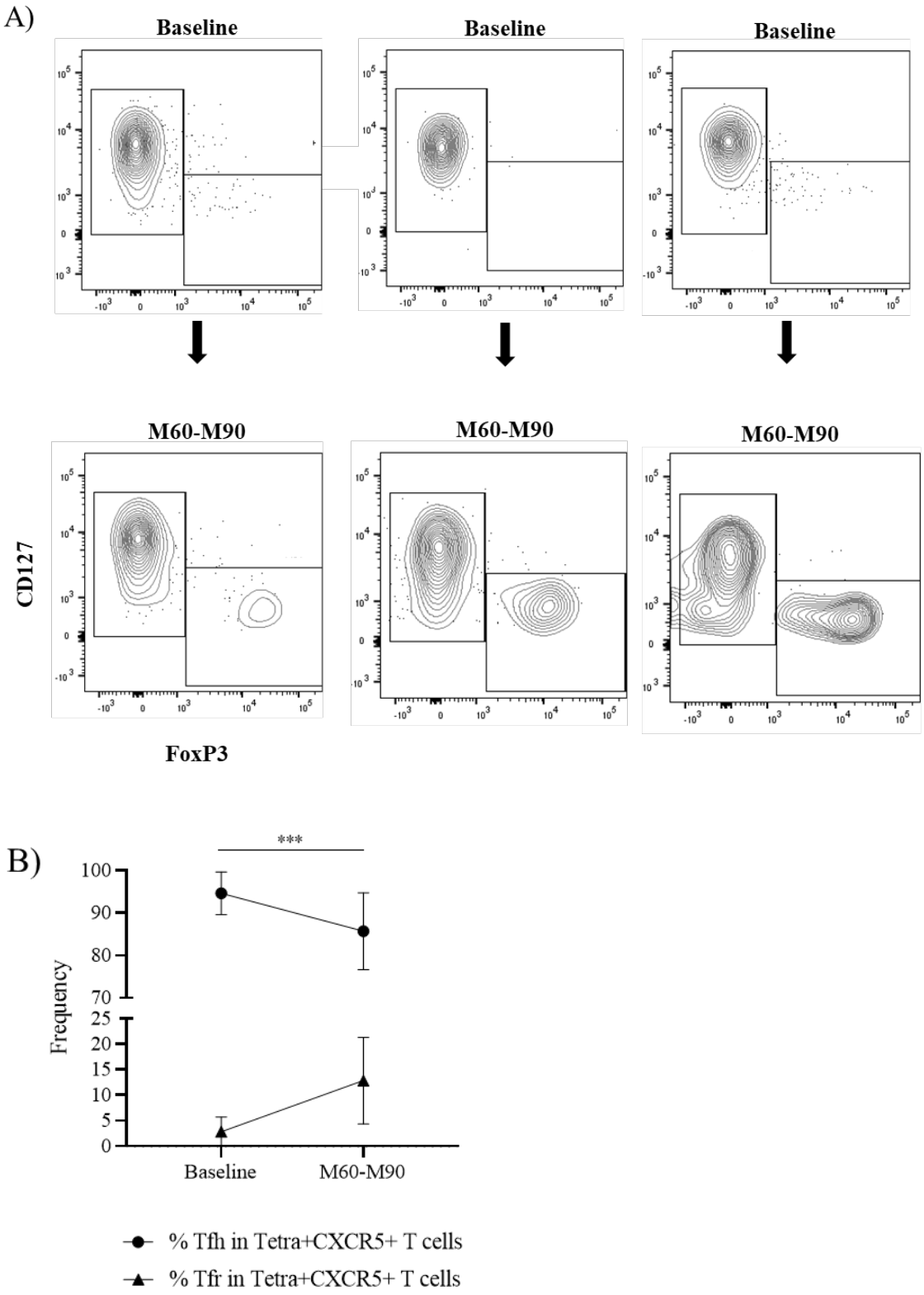


Figure 3: **Evolution of the DSG3-specific Tfr cells after RTX in pemphigus patients**

A) Flow cytometry images: examples of emerging DSG3-specific Tfr cells CD4+CD45RA-Tetramer+CXCR5+CD127-FoxP3+ in 3 patients at M60-M90 visit (on the bottom) compared to baseline visit (on the top).

B) Course of the DSG3-specific Tfh (circle symbols) and Tfr (triangular symbols) cells after RTX between baseline and post-RTX M60-M90 time points.

Only blood samples allowing to assess more than 100 DSG3-specific Tfh cells were analyzed

**** P < 0.001; DSG, desmoglein; Tfh, T follicular helper; T follicular regulator*

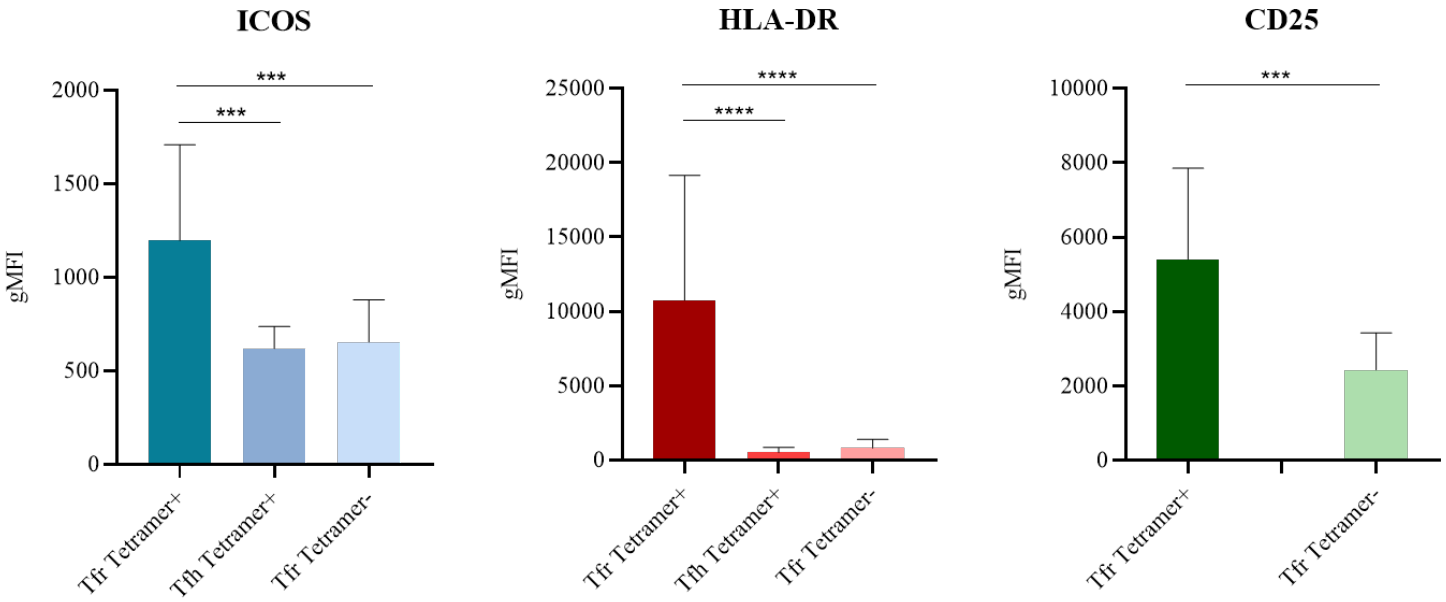


Figure 4: **Activation of autoreactive DSG3-specific Tfr cells compared to DSG3-specific Tfh and non-autoreactice Tfr cells in PV patients after RTX**

Activation was measured using mean fluorescence intensity (gMFI) of ICOS (blue), HLA-DR (red) and CD25 (green) expressions by flow cytometry. gMFI were compared between Tfr Tetramer+ (CD4+CD45RA-Tetra+CXCR5+CD127-FoxP3+), Tfh Tetramer+ (CD4+CD45RA-Tetra+CXCR5+CD127+FoxP3-) and Tfr Tetramer- (CD4+CD45RA-Tetra-CXCR5+CD127-FoxP3+) at the M60-M90 visit.

**P< 0.005; ***P < 0.001; ****P< 0.0001; DSG, desmoglein; Tfh, T follicular helper; Tfr, T follicular regulator; Tetra+, Ds3-specific; Tetra-, non-DSG3-specific*

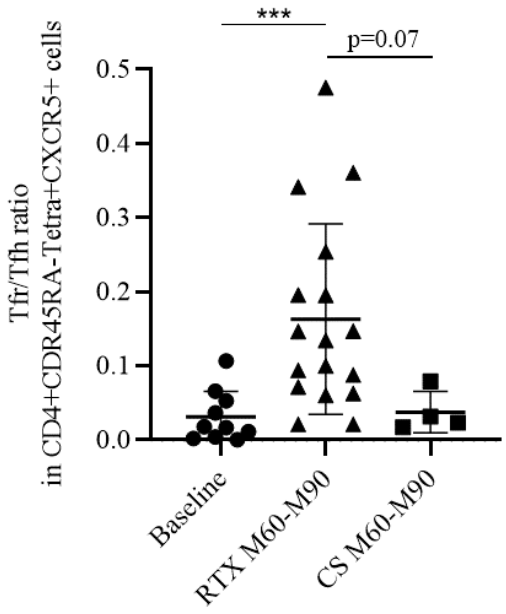


Figure 5: **Comparaison of the Tfr/Tfh ratio in DSG3-specific cells after first-line use of RTX or CS in pemphigus patients**

Comparaison of the DSG3-specific Tfr/Tfh ratio in treated PV patients at M60-M90 versus baseline (circle symbols), according to the first-line treatment used: RTX (black triangular symbols) or CS (square symbols).

**** P < 0.001; DSG, desmoglein; Tfh, T follicular helper; T follicular regulator; RTX, rituximab; CS, corticosteroids*

DISCUSSION

I. Détermination des facteurs de risque de rechute précoce après RTX

Cette étude a permis d'identifier 2 facteurs associés à une rechute à court terme après un traitement initial par RTX : le score PDAI initial, qui reflète la gravité du pemphigus ; et l'évolution des valeurs des anticorps anti-DSG 3 mois après le premier cycle de RTX. Ces résultats sont essentiels car le RTX a été approuvé comme traitement de première intention du pemphigus modéré à sévère.

L'ensemble des critères identifiés dans la présente étude fournit une valeur prédictive positive de rechute de 50 % la première année. En supposant qu'une perfusion d'entretien de RTX au 6ème mois serait constamment efficace, nos résultats suggèrent la possibilité de traiter deux patients avec une perfusion d'entretien de RTX au 6ème mois pour éviter une rechute chez un patient. Inversement, la valeur prédictive négative de 94 % indique qu'une perfusion d'entretien de RTX pourrait être évitée chez environ la moitié des patients traités par RTX en 1ère intention. Ces facteurs prédictifs offrent la possibilité d'éviter une rechute précoce après un premier cycle de RTX, observée chez 20 % des entre le 6ème et le 12ème mois, alors que seules quelques rechutes (2 sur 11) sont survenues entre le 12ème mois et la fin de l'étude au à 2 ans (Joly et al. 2017).

Le score PDAI est considéré comme un outil robuste pour évaluer avec précision la sévérité du pemphigus, avec une fiabilité inter-observateurs élevée et une bonne corrélation dans le temps avec d'autres marqueurs de sévérité du pemphigus (Boulard et al. 2016; Hébert et al. 2019). Nos résultats suggèrent que la sévérité initiale du pemphigus pourrait être associée à une rechute précoce après un traitement de première ligne par RTX, car les patients rechuteurs avaient un score de sévérité PDAI de base deux fois plus élevé que les patients sans rechute au cours de la période de 12 mois après le cycle initial du RTX. Les patients dont le score PDAI était ≥45 avaient une valeur prédictive positive de 55 % pour la survenue d'une rechute au cours de l'année suivant la perfusion initiale de RTX, tandis que ceux dont le score PDAI était inférieur à 45 avaient une valeur prédictive négative de 86 % pour l'absence de rechute après le traitement par RTX.

Il a été rapporté à de nombreuses reprises que l'évolution des taux d'anticorps anti-DSG1 et, à un moindre degré, anti-DSG3, est corrélée avec celle des lésions cutanées et muqueuses du pemphigus (Abasq et al. 2009a; Nakahara et al. 2014; Patsatsi et al. 2014). En dépit du fait que le nombre de lymphocytes B circulants était proche de 0 entre 3 et 6 mois après le cycle initial de

RTX chez les patients avec et sans rechute de la maladie, nous avons observé que les patients rechuteurs avaient des niveaux d'anticorps anti-DSG1 et anti-DSG3 plus élevés lors de l'évaluation du 3ème mois que ceux sans rechute. Ce point temporel a été choisi car il est souvent utilisé par les praticiens pour évaluer l'épithélialisation des lésions cutanées et muqueuses après le délai d'action du RTX et parce que la mesure des anticorps anti-DSG au 3ème mois permet de programmer une nouvelle perfusion précoce de RTX si nécessaire, au 6ème mois.

En raison de la faible spécificité du taux d'anticorps anti-DSG3, nous avons utilisé des valeurs seuils correspondant à 20 UI/mL pour les anti-DSG1 et à 130 UI/mL pour les anti-DSG3. Ces seuils avaient déjà été calculés comme fournissant des valeurs prédictives positive et négative élevées pour la survenue de rechutes cutanées et muqueuses, respectivement (Abasq et al. 2009a). La persistance de niveaux d'anticorps anti-DSG1 ≥ 20 UI/mL et/ou de valeurs d'anticorps anti-DSG3 ≥ 130 UI/mL lors de l'évaluation au 3ème mois a fourni une valeur prédictive positive de 50 % et une valeur prédictive négative de 88 %, qui étaient proches de celles calculées à partir du score PDAI initial. Bien que la différence entre les valeurs initiales des anticorps anti-DSG1 et anti-DSG3 n'ait pas atteint le seuil de signification statistique, ce qui était probablement lié au faible nombre de patients en rechute, les valeurs initiales moyennes des anticorps anti-DSG1 et anti-DSG3 des patients en rechute (520 UI/mL pour les anti-DSG1 et 1444 UI/mL pour les anti-DSG3) étaient presque deux fois plus élevées que celles observées chez les patients sans rechute (245 UI/mL pour les anti-DSG1 et 914 UI/mL pour les anti-DSG3). Des études supplémentaires sont nécessaires pour valider si les valeurs de base des anticorps anti-DSG1 et anti-DSG3 pourraient être utilisées comme un indicateur significatif de rechute.

Nous avons également évalué les changements dans la numération des LB du sang périphérique après RTX car il a été rapporté qu'une ré-ascension précoce des LB précède l'apparition d'une rechute clinique dans certaines maladies auto-immunes, en particulier la polyarthrite rhumatoïde.(Albers et al. 2017; Leandro et al. 2006; Trouvin et al. 2015). Nous avons observé qu'au départ, le pourcentage moyen de cellules B CD19+ du sang périphérique était plus élevé chez les patients rechuteurs que chez ceux qui ont maintenu une rémission clinique. Néanmoins, les patients atteints de maladie récurrente et non récurrente présentaient une déplétion complète des lymphocytes B au cours des 3 premiers mois RTX.

Dans notre étude, la fréquence des lymphocytes T CD4+ n'étaitt pas différente entre les patients rechuteurs et ceux qui ne l'étaient pas, contrairement à l'étude d'Albers et al, qui a trouvé que les rechutes étaient associées à un nombre plus faible de lymphocytes T CD4+ circulants (Albers et al. 2017). Cependant, dans cette étude, le nombre de lymphocytes T a été mesuré chez

des patients préalablement traités par corticostéroïdes et/ou des immunosuppresseurs, qui induisent une lymphopénie T ; on peut donc supposer que le taux plus faible de lymphocytes T CD4 observé chez les patients atteints d'une maladie récidivante était au moins partiellement associé à la dose cumulée de corticostéroïdes et/ou d'immunosuppresseurs reçue précédemment par ces patients. Inversement, dans notre travail, une fréquence plus élevée de lymphocytes T régulateurs a été observée chez les patients maintenant une rémission prolongée par rapport aux patients rechuteurs, ce qui est en accord avec les mécanismes de régulation précédemment décrits dans les maladies auto-immunes. Aucune différence dans les concentrations sériques de RTX entre les patients rechuteurs et non rechuteurs n'a été observée, ce qui est en accord avec l'absence d'association entre la détection d'anticorps humains anti-chimérique du RTX et la survenue de rechutes rapportée dans une étude récente (Chen et al. 2020).

L'intérêt d'utiliser des perfusions multiples de RTX pendant la phase initiale du traitement ou comme traitement d'entretien a été suggéré dans des études antérieures (Ahmed et al. 2006; Cianchini et al. 2012; Sanchez et al. 2018). Sanchez et al. ont rapporté que des perfusions d'entretien de RTX (1 g tous les 6 mois) chez des patients en rémission clinique, jusqu'à l'absence de positivité des taux d'anti-DSG étaient associées au maintien d'une rémission complète de longue durée, avec une bonne tolérance (Sanchez et al. 2018). Bien qu'il y ait de plus en plus de preuves que le traitement d'entretien par RTX est utile pour maintenir une rémission complète, les modalités exactes de ce traitement d'entretien restent à déterminer. Et bien que la tolérance à court terme de ces régimes d'entretien utilisant des perfusions multiples de RTX semble être bonne, l'utilisation de perfusions répétées de RTX au-delà de 4 cycles est coûteuse et peut être associée à une déplétion prolongée des cellules B immunosuppressive, probablement évitable chez certains patients.

La diminution rapide des doses de corticoïdes, prévue dans le protocole pour démontrer l'intérêt d'un traitement de première ligne par RTX, a pu être associée à la survenue de rechutes après 6 mois, délai correspondant par ailleurs au temps de recouvrement des LB. De nombreuses données cliniques montrent qu'une diminution rapide des doses de corticostéroïdes sans RTX conduit à un taux élevé de rechutes, justifiant la diminution progressive des doses de corticostéroïdes. Cette stratégie thérapeutique était largement recommandée dans le traitement du pemphigus avant l'utilisation du RTX. Néanmoins, malgré cette diminution rapide des doses de corticostéroïdes, le taux de rechute dans le groupe RTX était deux fois plus faible que celui observé dans le groupe corticostéroïdes standard (24 % contre 45 %), dans lequel les patients se voyaient

initialement prescrire des doses élevées de corticostéroïdes qui étaient ensuite progressivement diminuées.

Ce travail a abouti à la modification du protocole national de soins (PNDS) pemphigus (Jelti et al. 2019b). Ainsi, il est désormais recommandé de réaliser une perfusion d'entretien de RTX, dont la dose reste à l'appréciation du dermatologue, chez les patients présentant l'un des facteurs prédictifs de rechute déterminés. Et, au contraire, le PNDS révisé préconise de ne pas traiter davantage les patients ne présentant ces facteurs prédictifs de rechute. Une étude (PRéRi, Pemphigus Relapse RTX) est actuellement en cours afin de valider ce nouveau PNDS révisé. Les premiers résultats confirment largement l'intérêt d'une perfusion additionnelle de RTX chez ces patients à risque de rechute et l'absence de perte de chances de ne pas traiter les patients jugés à faible potentiel de rechute précoce.

II. Analyse transcriptomique longitudinale des LB spécifiques de la DSG3

Dans ce travail, nous avons évalué les profils transcriptomiques de 33 gènes d'intérêt potentiel dans le pemphigus sur des cellules B autoréactives triées chez des patients atteints de pemphigus à différents stades de leur maladie, en particulier pendant la phase aiguë de la maladie, et après traitement par corticostéroïdes systémiques seuls ou associés au RTX.

La méthodologie utilisée présente plusieurs intérêts. Cela nous a d'abord permis d'étudier ex vivo les lymphocytes B autoréactifs, le pemphigus étant l'une des rares maladies auto-immunes chez l'homme dans laquelle les auto-anticorps dirigés contre l'auto-Ag sont directement clairement pathogènes. Deuxièmement, les lymphocytes B autoréactifs positifs à la DSG constituent le stade préliminaire des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, qui ne peuvent malheureusement pas être facilement étudiés ex vivo chez l'homme du fait de leur localisation au sein des organes lymphoïdes. Troisièmement, les essais de tri à l'échelle *« single cell »* sont probablement pertinents puisqu'un très faible nombre de cellules B autoréactives circulantes dans le sang périphérique suffit à déclencher la maladie.

Nous avons mis en évidence que les profils transcriptomiques des cellules B autoréactives et non autoréactives prélevées pendant la phase active de la maladie étaient différents. Quatre des 31 gènes étudiés (IL-1β, IL-12p35, IL-23p19, IRF5) étaient surexprimés dans les cellules B autoréactives par rapport aux cellules B non autoréactives. Les résultats nous ont surpris à deux égards. D'une part, nous avons observé que les cellules B spécifiques de la DSG3 étaient toujours détectables après traitement par RTX, ce qui plaide contre un simple mécanisme de suppression des cellules autoréactives pour expliquer l'efficacité de ce traitement. D'autre part, le profil d'expression génétique des cellules B autoréactives après RTX chez les patients en rémission complète était en fait assez proche de celui des cellules B autoréactives recueillies au départ chez les patients ayant alors un pemphigus actif, à l'exception des gènes codant pour l'IL-1β et CD27, qui étaient régulés à la baisse après le RTX par rapport au départ.

La régulation à la baisse du gène du marqueur de mémoire CD27 observée dans l'analyse transcriptomique a été confirmée par la cytométrie en flux, qui a montré une plus faible expression de la protéine CD27 à la surface cellulaire des cellules B autoréactives RTX ainsi que dans les cellules B non autoréactives. Ainsi, la diminution de l'expression du gène CD27 après RTX n'était pas spécifique des cellules B positives au DSG. Cependant, la diminution de l'expression du marqueur CD27 reflète le blocage de la maturation des cellules B, entraînant une repopulation

prolongée avec des cellules B naïves, et une réapparition retardée des cellules B mémoires. Il a été démontré que les auto-anticorps sont produits par une sous-population transitoire de plasmablastes autoréactifs qui sont continuellement renouvelés par les cellules B mémoires commutées autoréactives (CD20+IgG+CD27+) (Ellebrecht and Payne 2017b; Mouquet et al. 2008). Ainsi, les changements dans l'expression de CD27, corrélés avec la disparition des lymphocytes B circulants IgG+ spécifiques de la DSG3, sont probablement responsables de la diminution de la production d'auto-anticorps anti-DSG3, ce qui contribue à la rémission clinique durable de la maladie après RTX (Colliou et al. 2013a; Maho-Vaillant et al. 2021). Un autre argument qui soutient cette hypothèse est le fait qu'en utilisant un ELISPOT, nous avons montré par la suite que les cellules B DSG3+CD27+, mais pas les cellules B DSG3+CD27-, étaient capables de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps après 72 h de stimulation par IL-2 et R848, un ligand de TLR7 et TLR8 ((Maho-Vaillant et al. 2021). Ce mécanisme est spécifiquement lié au RTX, puisqu'il n'a pas été observé chez les patients traités par CS seul, qu'ils soient en rémission complète ou incomplète.

A l'inverse, les modifications du CD27 n'influencent pas la production d'anticorps allo-réactifs qui sont produits par des plasmocytes à longue durée de vie n'exprimant pas le marqueur CD20, expliquant l'absence de modification des taux sériques d'IgG totaux après RTX chez la plupart des patients.

Nous avons également observé que l'expression du gène IL-1β dans les cellules B spécifiques de la DSG, qui était plus élevée dans les échantillons initiaux des patients que chez les individus sains, est revenue à des valeurs normales après un traitement par RTX ou CS. Cette observation pourrait suggérer le rôle potentiel de l'IL-1β dans la pathogénicité du pemphigus, puisque la *down-regulation* observée dans les cellules B autoréactives était parallèle à la rémission de la maladie, que les patients soient traités par RTX ou par CS. En effet, IL-1β est une cytokine pro-inflammatoire principalement produite par les cellules hématopoïétiques telles que les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques cutanées en réponse au ligand TLR, aux composants activés du complément ou à d'autres cytokines telles que le TNF-α et IL-1β lui-même. Dans notre travail, nous avons observé une légère diminution de l'IL-1β sérique pendant les 3 premiers mois de traitement dans les groupes traités par CS et RTX, probablement liée à l'effet des fortes doses de CS. Elle a ensuite été suivie d'une ré-augmentation des taux sériques jusqu'aux valeurs de base lorsque les doses de corticostéroïdes ont été diminuées. Le rôle de l'IL-1β a été suggéré précédemment par Feliciani et al. qui ont démontré qu'un modèle de souris KO pour l'IL-1β était moins sensible au transfert passif d'IgG isolées du sérum d'un

patient PV(Feliciani et al. 2000). De plus, des concentrations accrues d'IL-1α et d'IL-1β ont été détectées dans le sérum de patients PV non traités présentant une maladie active par rapport à des témoins sains. Enfin, il a été montré que la production *in vivo* et *in vitro* d'IL-1α et d'IL-1β diminue chez les patients en rémission clinique après un traitement par IgIV et que l'IL-1β favorise la polarisation Th17, qui est corrélée à l'activité de la maladie (Asothai et al. 2015; Hennerici et al. 2016; Xu et al. 2013).

Étant donné que la fréquence des cellules B autoréactives chez les patients atteints de pemphigus n'était étonnamment que doublée par rapport aux donneurs sains, il est probable que les différents profils d'expression génique de l'IL-1β et du CD27 jouent un rôle majeur dans l'apparition du pemphigus en favorisant l'émergence/apparition des cellules mémoire B DSG+ CD27+ IgG+, qui n'ont été détectées que chez les patients atteints de pemphigus mais pas chez les individus sains.

Bien que nous ayons observé une différence dans l'expression basale de l'IL-12p35 entre les cellules B DSG+ et DSG-, nous n'avons pas observé de modification significative de l'expression de l'ARN chez les patients en rémission complète après RTX, ni de variation de la concentration sérique de l'IL-12p35 au cours du suivi des patients, ce qui ne soutient pas un rôle majeur de l'IL-12p35 dans la physiopathologie du pemphigus.

Globalement, cette étude a montré que les populations de cellules B autoréactives et non autoréactives des patients atteints de pemphigus n'expriment pas les mêmes gènes pendant la phase aiguë de la maladie, en particulier les gènes codant pour IL-1β, IL-12p35, IL-23p19 et IRF5. De plus, des cellules B autoréactives peuvent encore être observées chez les patients en rémission complète, même chez ceux traités par RTX, lorsque les lymphocytes B réapparaissent après la déplétion initiale induite par RTX. De manière surprenante, l'expression génétique des cellules B autoréactives chez les patients en rémission était proche de celle observée au départ, à l'exception du gène CD27 qui était régulé à la baisse chez les patients traités par RTX, et du gène IL-1β, qui était régulé à la baisse dans les deux groupes de traitement, probablement lié à l'effet de la CS.

Au total, ce travail suggère l’absence de grandes variations transcriptomiques au sein de la population B autoréactive après traitement, alors même que les patients sont passés d’un statut de maladie active à un statut de rémission. Ce travail renforce un peu l’idée selon laquelle les LB ré-émergeants après déplétion auraient un phénotype proche de celui observé au moment du diagnostic (Chen et al. 2017; Hammers et al. 2015) et que le phénomène de tolérance passerait par d’autres mécanismes tels que la régulation. La limite principale de ce travail réside dans la petite

taille du panel de gènes qui a été utilisé et qui mériterait d'être élargi à l'aide d'une étude pangénomique.

III. Impact de l'axe BAFF/BAFF-récepteur dans la physiopathologie du pemphigus

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois, dans une cohorte plus importante que dans les études précédentes, que les patients atteints de pemphigus avaient des taux sériques de BAFF plus élevés que les donneurs sains (Asashima et al. 2006b; Nagel et al. 2009). De plus, nous avons observé que les patients ayant fait une rechute précoce présentaient des taux sériques de BAFF plus élevés que les patients n'ayant pas rechuté au cours de la première année de suivi, et ce quel que soit le traitement utilisé. Il est intéressant de noter que nous avons calculé que les patients dont le taux sérique initial de BAFF était inférieur à 300 pg/mL avaient 98 % de chances de rester en rémission clinique pendant la première année de traitement. L'analyse par groupes de traitement, par RTX ou corticostéroïdes, montre que les patients qui ont rechuté à court terme avaient un taux sérique moyen de BAFF au diagnostic plus élevé que les patients qui n'ont pas rechuté, bien que ces différences n'aient pas atteint la signification statistique, probablement dû à un faible nombre de rechutes.

Nous avons montré que le RTX et de fortes doses de CS seuls avaient des effets différents sur l'axe BAFF/BAFF-R. Comme attendu, l'évolution des taux sériques de BAFF était négativement corrélée au nombre de cellules B dans le groupe RTX et les taux sériques de BAFF ont commencé à diminuer lorsque les cellules B ont commencé à réémerger. Il est intéressant de noter que la plupart des rechutes observées dans le groupe RTX se sont produites précisément pendant la période où les cellules B étaient de nouveau présentes, et étaient en présence des niveaux sériques de BAFF les plus élevés, c'est-à-dire entre le 6ème et le 9ème mois (Joly et al. 2017a; Mignard et al. 2020). Au contraire, la corticothérapie seule a entraîné une diminution transitoire des taux sériques de BAFF, suivie d'une ré-augmentation dès que les doses de CS ont été réduites à moins de 20 mg/jour, ce qui correspond à la période pendant laquelle la plupart des patients ont rechuté.

Outre les taux sériques augmentés chez les patients au diagnostic par rapport aux donneurs sains, ces résultats suggèrent fortement un rôle de l'axe BAFF/BAFF-R dans la physiopathologie du pemphigus, sous différents aspects selon les traitements utilisés. Ainsi, dans le groupe RTX, les fortes concentrations de BAFF au moment du retour des LB pourraient participer à la survie des LB autoréactifs. Quant au groupe des patients traités par corticoïdes, la diminution des taux de BAFF circulants corrèle avec la diminution des taux d'auto-Ac et l'amélioration clinique jusqu'à un certain stade qui correspond au seuil de posologie de corticoïdes autour de 20mg/j.

Nos résultats suggèrent qu'une thérapie combinée associant des anticorps monoclonaux anti-CD20 et anti-BAFF pourrait être intéressante dans le pemphigus. Ces produits biologiques, qui agissent par des mécanismes complémentaires, pourraient entraîner une déplétion accrue des lymphocytes B autoréactifs circulants et résidants des tissus lorsqu'ils sont administrés ensemble. En particulier, il serait logique d'utiliser le traitement anti-BAFF lorsque les lymphocytes B commencent à réémerger, alors que les taux sériques de BAFF sont encore très élevés, autour du sixième mois après la perfusion initiale de RTX. Le schéma thérapeutique actuellement proposé pour prévenir les rechutes à court terme après le cycle initial de RTX dans le pemphigus, consiste à effectuer des perfusions supplémentaires de RTX chez des patients présentant des facteurs de risque de rechute (cf supra (Mignard et al. 2020). Une autre stratégie pour prévenir ces rechutes à court terme pourrait être d'associer la perfusion d'entretien de RTX et le traitement anti-BAFF, ou d'utiliser le traitement anti-BAFF seul comme traitement d'entretien. Une étude de phase 3 est actuellement menée pour évaluer et comparer l'efficacité et la tolérance d'injections sous-cutanées de belimumab en association avec 2 cycles de RTX ou un placebo chez des patients atteints de lupus systémique, après des résultats prometteurs dans les formes réfractaires (Kraaij et al. 2020; Teng et al. 2019).

Aussi, nous avons montré que le RTX entraînait une diminution de l'expression transcriptomique et protéomique de BAFF-R dans les cellules B non autoréactives. Une telle modification a déjà été rapportée sur les cellules B totales de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de purpura thrombocytopénique idiopathique (Becerra et al. 2015; de la Torre et al. 2010). Nous avons également observé une diminution, bien que non significative, de l'expression phénotypique de BAFF-R sur les cellules B autoréactives après traitement. Néanmoins, on peut émettre l'hypothèse que la diminution de l'expression de BAFF-R après RTX pourrait être responsable de la génération retardée de cellules B mémoires, ce qui se traduit par une période assez longue d'activité légère du pemphigus après RTX. Il est intéressant de noter que ces modifications de l'axe BAFF/BAFF-R semblent vraisemblablement liées à un effet spécifique du RTX puisque nous n'avons pas observé ces modifications chez les patients traités par corticothérapie seule.

La principale force de ce travail est le nombre élevé de sérums dans lesquels des dosages de BAFF ont été effectués de manière longitudinale, en particulier chez les patients traités par RTX, qui est, rappelons-le, le traitement de référence des formes modérée à sévère de pemphigus. Notre principale limite a été le faible nombre de cellules B autoréactives qui ont pu être analysées en raison de la rareté de cette population cellulaire dans le sang des patients, et le délai assez long

après lequel certains échantillons congelés ont été analysés, ce qui a encore diminué le nombre de cellules autoréactives que nous avons pu étudier. En particulier, un nombre plus élevé de cellules B autoréactives triées nous aurait permis d'atteindre une différence statistiquement significative, notamment en ce qui concerne la sous-expression du récepteur BAFF au sein des cellules B autoréactives.

IV. Relation entre la diversité des sous-classes d'IgG anti-DSG3 et l'activité du pemphigus.

Cette étude montre que si les IgG4 anti-DSG3 sont présentes dans plus de 90 % des sérums de pemphigus au début de la maladie, cette sous-classe d'IgG4 anti-DSG3 est également présente chez tous les patients, sauf un, en rémission durable, qui ont encore des anticorps anti-DSG3 circulants positifs. La principale évolution des sous-classes d'IgG anti-DSG3 observée est que la majorité des sérums collectés en phase active de la maladie (61 % des sérums au diagnostic et 75 % des sérums au temps rechute) contenaient au moins deux sous-classes d'IgG. Au contraire, 64 % des sérums collectés chez les patients en rémission complète (RC) ne présentaient qu'une seule sous-classe d'IgG anti-DSG3, correspondant principalement à IgG4. Il a été suggéré que l'absence d'activité pathogène des sérums de pemphigus présentant encore des Ac anti-DSG3 était liée à un passage des sous-classes IgG4 aux IgG1 (Ayatollahi et al. 2004b; Bhol et al. 1994). Nous n'avons pas observé une telle évolution, puisque la plupart des sérums (64,3 %) de patients en RC contenant des anti-DSG3 présentaient uniquement des IgG4 anti-DSG3, sans autre sous-classe d'IgG. En revanche, nous avons observé une corrélation étroite entre l'état clinique (maladie active versus rémission) et le taux d'anticorps IgG4 anti-DSG3.

Conformément à ces résultats, nous avons montré que l'activité pathogène in vitro des sérums collectés chez les patients en RC, qui ne contenaient que des IgG4 anti-DSG3, dépendait fortement du taux d'IgG4 anti-DSG3. En particulier, nous avons montré que l'ajustement du niveau d'IgG4 anti-DSG3 à celui retrouvé au diagnostic permet de restaurer l'activité pathogène d'un sérum collecté chez un patient en RC. Cette observation pourrait expliquer la persistance d'anticorps anti-DSG3 chez certains patients en rémission et la faible spécificité des tests ELISA DSG3 (Abasq et al. 2009a; Mignard et al. 2020).

Il est probable que la combinaison de plusieurs sous-classes d'IgG anti-DSG3 en plus des IgG4, particulièrement fréquente au début de la maladie, puisse également être impliquée dans la pathogénicité des sérums. En particulier, nous avons montré qu'un sérum collecté au diagnostic qui contenait à la fois des IgG3 et des IgG4 anti-DSG3, induisait une dissociation des kératinocytes, alors qu'un sérum recueilli chez le même patient en RC, qui contenait exclusivement des IgG4 anti-DSG3 à un niveau proche de celui de base, n'avait aucune activité pathogène.

Conformément à l’excellente efficacité du RTX en pratique, nous avons observé qu’il permettait une diminution du nombre moyen de sous-classes d'IgG anti-DSG3 (passant de 1,8 au

début de la maladie à 1,1 chez les patients en RC). Par ailleurs, on ne retrouvait pas un tel changement chez les patients traités par corticothérapie générale seule, dont 62,5 % ont rechuté au cours de l'évolution.

Étant donné que la plupart des sérums recueillis au début de la maladie, tout comme ceux des patients en rechute, contenaient deux sous-classes d'IgG ou plus, alors que la majorité des sérums recueillis chez les patients en RC ne contenaient qu'une seule sous-classe d'IgG anti-DSG3 ; nous avons évalué si le nombre de sous-classes d'IgG anti-DSG3 et leur isotype dans les sérums collectés au diagnostic pouvaient prédire la survenue d'une activité persistante de la maladie ou d'une rechute. Nous avons observé que le nombre moyen de sous-classes d'IgG anti-DSG3 dans les sérums de référence était plus élevé chez les patients qui ont rechuté que chez ceux qui ont maintenu une rémission durable (2,6 ± 0,8 vs 1,5 ± 0,9 ; p=0,01), correspondant à une valeur prédictive positive de 62,5 % et une valeur prédictive négative de 92 %. Il est intéressant de noter que les rechutes étaient particulièrement fréquentes chez les patients dont le sérum initial contenait des IgG3 anti-DSG3, puisque cet isotype a été détecté, dès le diagnostic, dans le sérum de 71,4 % des patients qui ont rechuté contre 11,5 % des patients qui ont maintenu une RC (p=0,004).

En accord avec ces résultats, nous avons démontré que les IgG3 anti-DSG3 avaient un effet pathogène in vitro, et que leur élimination d'un sérum qui contenait un niveau plutôt faible d'IgG4 anti-DSG3, supprimait l'activité pathogène de ce sérum.

Enfin, nos résultats devraient aider les dermatologues dans la prise en charge des patients atteints de pemphigus. En effet, la prise en compte du ou des isotypes des sous-classes d'IgG anti-DSG3 pourrait aider les médecins à mieux caractériser les patients présentant un risque élevé de rechute. Nos résultats soulèvent également la question des épitopes reconnus par les différentes sous-classes d'IgG sur la protéine DSG3. En particulier, on peut émettre l'hypothèse que les différentes sous-classes d'IgG anti-DSG3 pourraient cibler différents épitopes sur la protéine DSG3, favorisant ainsi la pathogénicité des anticorps anti-DSG3, comme l'ont suggéré Cho et al. (Cho et al. 2019).

V. Impact du RTX sur les cellules T folliculaires auxiliaires et régulatrices chez les patients atteints de pemphigus vulgaire

Cette étude montre que l'efficacité durable du RTX chez les patients atteints de pemphigus est associée à l'émergence progressive de cellules Tfr spécifiques de la DSG3 circulants et à la diminution des cellules Tfh spécifiques de la DSG3 conduisant à un déséquilibre entre Tfr et Tfh, en faveur des cellules Tfr.

En raison de leur capacité à réguler la maturation des cellules B en cellules B mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'IgG, les cellules Tfh ont été suspectées d'être impliquées dans plusieurs maladies auto-immunes, (Arroyo-Villa et al. 2014 ; Chen et al. 2018 ; Choi et al. 2015). Dans le pemphigus, un effet du RTX sur la diminution des cellules T spécifiques de la DSG3 chez les patients atteints de pemphigus a été précédemment rapporté en utilisant le test ELISPOT (Eming et al., 2008) ; et plus récemment, par notre équipe, en montrant la diminution des cellules Tfh spécifiques de la DSG3 chez les patients traités par RTX.

Les cellules T CD4+ régulatrices folliculaires Tfr sont une population de cellules T régulatrices exprimant le facteur de transcription Bcl6 et le récepteur de chimiokine CXCR5 et se localisant dans le follicule et le CG après une infection ou une immunisation. Des études ont proposé une régulation des Tfh par ce sous-ensemble de Tfr partageant les caractéristiques des Treg et exprimant donc le Foxp3 (Chung et al. 2011; Linterman et al. 2011a; Wollenberg et al. 2011). Bien que les cellules Tfr partagent certaines caractéristiques des cellules Tfh, elles n'expriment pas les « molécules auxiliaires » des cellules B, à savoir l'IL-21, l'IL-4 et le CD40L, qui sont caractéristiques des cellules Tfh. En revanche, en plus de Foxp3, les cellules Tfr expriment une série de protéines typiques des cellules T régulatrices (Treg), telles que Blimp-1 et CTLA-4 (Chung et al. 2011; Linterman et al. 2011b; Wollenberg et al. 2011)

Il a été suggéré que les cellules Tfr suppriment les réponses immunitaires excessives, comme celles qui se produisent dans le cadre de l'autoréactivité, grâce à un processus médié par le corécepteur inhibiteur CTLA-4 (Sage et al. 2014; Wing et al. 2014). Cependant, le rôle des cellules Tfr dans la régulation de la sélection des lymphocytes B spécifiques de l'antigène au sein du CG n'est actuellement pas claire. Le paradigme existant suggère que les cellules Tfr sont inhibitrices et freinent les réponses globales du CG, y compris les réponses des cellules B spécifiques de l'antigène (Botta et al. 2017; Clement et al. 2019; Sage et al. 2016; Wing et al. 2014; Wu et al.

2016). En revanche, d'autres groupes n'ont signalé aucun effet évident sur les réponses d'anticorps spécifiques de l'antigène en l'absence de cellules Tfr (Fu et al. 2018).

Dans l'ensemble, nos résultats sont en accord avec la théorie selon laquelle les Tfr ont un rôle régulateur de la réponse B puisque le déséquilibre entre Tfr et Tfh semble répondre directement à la disparition prolongée des cellules B circulantes sécrétant des IgG anti-DSG3 et, par conséquent, des IgG anti-DSG3 (Colliou et al. 2013 ; Maho-Vaillant et al. 2021).

De manière surprenante, la polarisation des cellules Tfh autoréactives ne reflète pas le biais de " type 2 " dans la physiopathologie du pemphigus qui a été suggéré par : la présence majoritaire d'IgG4 anti-DSG3 (Armitage et al. 1993 ; Tao et al. 1993), la présence d'une population de cellules T avec un profil prédominant de cytokines de type 2 dans les lésions cutanées des patients (Caproni et al. 2001) ou la production de cytokines de type 2 induites ex-vivo après stimulation des cellules T par la DSG3 recombinante (Rizzo et al. 2005 ; Veldman et al. 2003). Au contraire, nous trouvons une sous-représentation de la polarisation Tfh2 alors que les phénotypes Tfh1* et Tfh17 étaient sur-représentés dans les cellules Tfh autoréactives par rapport aux cellules Tfh non spécifiques à l'Ag. Cependant, la polarisation Th17 est de plus en plus suggérée dans le pemphigus, en témoignent les travaux de Hennerici et al. qui ont montré une augmentation des cellules Tfh chez les patients pemphigus, parallèlement à des concentrations plasmatiques croissantes d'IL-21, produite par les Th17 et Tfh. De plus, ils ont pu détecter des cellules T autoréactives spécifiques de DSG3 produisant de l'IL-21 lors d'une stimulation ex vivo avec DSG3, cytokine produite par les Th17 et Tfh (Hennerici et al. 2016). Par ailleurs, Holstein et al. ont montré par l'analyse du transcriptome de biopsies cutanées de patients PV une signature immunitaire dominée par l'IL-17A chez les patients. Ils ont ensuite montré que les patients avaient des fréquences augmentées de Tfh17 et Th17 qui étaient corrélées aux niveaux de LB mémoire spécifiques de la DSG, et que les patients PV en phase active présentaient des niveaux plus élevés de Tfh17 spécifiques à la DSG3. Des expériences de coculture ont finalement révélé que les cellules Tfh17 étaient principalement responsables de l'induction de la production d'auto-anticorps par les LB (Holstein et al. 2021). De telles divergences dans le profil Tfh2 sanguin pourraient être expliquées par les différentes techniques utilisées au cours des deux dernières décennies par rapport aux technologies récentes qui permettent maintenant d'être plus spécifiques dans l'isolement des cellules T autoréactives.

De plus, nous trouvons un déséquilibre entre Tfh2+Tfh17 d'une part, et Tfh1 d'autre part, comme cela a déjà été démontré dans les maladies auto-immunes (Morita et al. 2011). Cependant, ce déséquilibre n'était pas corrélé au statut clinique. Ainsi, ce biais de polarisation semble être

davantage une " signature " de l'auto-immunité plutôt qu'un mécanisme causal de la pathogénicité. Enfin, l'absence de modification du profil des cellules Tfh autoréactives des patients atteints de pemphigus après RTX est en accord avec l'absence de modifications significatives sur les profils transcriptomiques déjà observés dans les cellules B autoréactives après RTX (Hébert et al. 2019).

De façon intéressante, nous avons pu étudier 4 échantillons sanguins de patients initialement randomisés dans le bras CS de l'étude Ritux 3. Deux d'entre eux ont finalement reçu tardivement du RTX au cours de leur maladie en raison de rechutes cliniques et les deux autres n'ont jamais reçu de RTX. Nous avons montré qu'ils avaient tous un ratio de cellules Tfr/Tfh plus faible que les patients du bras RTX. Ainsi, l'utilisation de RTX en seconde ligne de traitement ou la non-utilisation de RTX semble limiter l'émergence de la population de Tfr spécifique à l'Ag. Ce résultat pourrait expliquer le nombre accru de rechutes chez les patients traités uniquement par corticoïdes ou chez les patients ayant reçu du RTX en deuxième ligne de traitement ou plus (Zambruno et Borradori 2008).

D'après ce travail, le seul changement significatif induit par le RTX et susceptible d'être responsable de la rémission clinique complète à long terme observée plusieurs années après les dernières perfusions de RTX est l'émergence d'une importante population de cellules Tfr. De plus, la suractivation des cellules Tfr circulantes spécifiques de l'Ag observée à M60-M90 suggère que ces cellules ont été récemment activées, contrairement à la faible activation des cellules Tfh spécifiques de l'Ag ou des cellules Tfr non spécifiques de l'Ag. Ainsi, la tolérance à la DSG3 induite par les cellules Tfr semble être un processus retardé et continu, même plusieurs années après l'obtention d'une rémission clinique.

CONCLUSION

L'ensemble de ce travail ancillaire à l'étude Ritux 3 s'est acharné à comprendre i) les mécanismes régissant l'efficacité exceptionnelle du RTX dans une maladies auto-immune médiée par des auto-anticorps sécrétés par des cellules plasmocytaires non affectées par ce traitement et ii) comprendre et essayer de trouver des moyens d'anticiper les rechutes afin d'aider les praticiens dans leur pratique.

Nous avons d'abord réussi à déterminer des facteurs prédictifs clinico-biologiques de rechute précoce après RTX, facteurs désormais utilisés par les dermatologues afin d'ajouter une perfusion de RTX au 6ème mois de traitement et dont la validation en vie réelle est actuellement en cours.

D'autres facteurs de rechute précoce, non développés au moment de l'étude sus-citée, pourraient être d'une part l'augmentation des taux de BAFF circulants. En effet, nous avons montré que ces rechutes précoces survenaient majoritairement au 6ème mois, dans le laps de temps où les LB autoréactifs réapparaissent et les taux circulants de BAFF sont les plus élevés. Cette hypothèse est par ailleurs soutenue chez les patients CS, par la corrélation entre les l'activité clinique de la maladie et les taux circulants de BAFF. D'autre part, la diversité des sous-classes d'IgG anti-DSG3 pourrait également jouer un rôle dans la physiopathologie. Certes, nous avons confirmé la nette prédominance d'IgG4 et sa pathogénicité *in vitro* en concordance avec les observations cliniques. Cependant, nous avons montré la présence d'une asscociation à d'autres sous-classes dans plus d'1/4 des cas. De plus, la présence de sous-classes d'anti-DSG3 autre que IgG4, principalement l'IgG3, était liée à un surrisque de rechute précoce. Ceci était confirmé *in vitro* par le pouvoir pathogène des IgG3 anti-DSG3 seuls, après épuration des IgG4, de sérums de patients au diagnostic. Ainsi, un score composite intégrant les taux circulants de BAFF et la diversité des sous-classes anti-DSG3 pourrait permetttre d'affiner un peu plus la détection des patients à risque de rechute précoce.

Par la suite, nous avons essayé d'expliquer les rémissions prolongées observées après RTX. D'abord, nous nous sommes focalisés sur les LB auto-réactifs. L'analyse transcriptomique de 33 gènes d'intérêt a montré que le phénotype de ces LB était finalement peu mofifié par le RTX. Cependant, l'analyse suggère tout de même un rôle potentiel de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β dans la pathogénicité du pemphigus. D'autre part, elle montre un impact de l'utilisation du RTX sur la différentiation B autoréactive puisqu'après traitement, nous observions une diminution

d’expression transcriptomique et protéomique du marqueur mémoire CD27 ; ces observations ont ainsi confirmé des précédents travaux de notre équipe suggérant un blocage de la maturation des LB autoréactifs après RTX.

L’analyse des LT folliculaires, partenaires privéligiés des LB au sein des centres germinatifs vont de pair avec les résultats précédents puisqu’elle montre un faible impact du RTX sur la polarisation des Tfh autoréactifs et l’émergence d’une large population de Tfr suractivés. Ainsi, l’action de cette population nouvellement décrite pourrait expliquer le blocage prolongé de la différentiation B observée et ainsi les rémissions prolongées.

ANNEXES

➢ *ANNEXE 1 : FIRST LINE USE OF RITUXIMAB VERSUS STANDARD CORTICOSTEROID REGIMEN IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH PEMPHIGUS: A MULTICENTER RANDOMIZED STUDY*

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

The lancet, 2017

Ce travail mené par le CHU de Rouen constitue l'étude princeps des travaux qui seront présentés par la suite.

Dans cet essai thérapeutique randomisé français, nous avons évalué l'efficacité et la tolérance d'un traitement associant du rituximab (Acm anti-CD20) associé à une corticothérapie orale à faibles doses et sur une courte durée, par rapport à une corticothérapie orale à fortes doses sur une longue durée, en traitement de première intention des pemphigus nouvellement diagnostiqués de formes modérée ou sévère.

Les patients recevaient 2 perfusions de rituximab (1g) à J0 et J14 puis deux perfusions d'entretien (500mg) à M12 puis M18 quelle que soit la sévérité initiale de la maladie. En association, les malades du bras rituximab recevaient une corticothérapie orale de 0,5 à 1mg/kg/j sur une durée de 3 ou 6 mois pour les formes modérée ou sévère, respectivement. Les patients du groupe corticoïdes recevaient une corticothérapie orale de 1 à 1,5mg/kg/j sur une durée de 12 ou 18 mois pour les formes modérée ou sévère, respectivement. Les patients étaient suivis longitudinalement pendant 24 mois, sur les plans clinique et biologique. Le critère de jugement principal était la proportion de patients ayant obtenu une rémission complète sans traitement depuis au moins 2 mois, à 24 mois de la première injection de rituximab.

D'une part, l'administration de rituximab a montré une très nette supériorité en terme d'efficacité puisqu'après 24 mois, 89% des patients du groupe RTX (41/46) étaient en rémission

complète sans traitement contre s34% des patients du groupe CS (15/44) (p <0,0001). Par ailleurs, l'utilisation du RTX a permis de diviser par 3 la dose cumulée de prednisone administrée dans le groupe concerné (6143 vs 17973, p<0.0001). Ce résultat majeur s'est directement répercuté sur la tolérance du traitement puisque les patients du groupe RTX ont présenté deux fois moins d'évènements indésirables graves que ceux au groupe CS.

D'un point de vue biologique, le RTX a permis une déplétion rapide et prolongée des LB auto-réactifs IgG^+ et des titres d'auto-Ac anti-DSG1 et anti-DSG3, grâce à l'administration des deux doses d'entretien à M12 et M18. Au contraire, on observait une persistance des LB auto-réactifs chez les patients du groupe corticoïdes qui se reflétaient par la réascension des titres d'auto-Ac à la décroissance de la corticothérapie orale, entre les $9^{ème}$ et $12^{ème}$ mois, correspondant à des doses journalières autour de 20mg.

Ainsi, l'utilisation du RTX associée à une corticothérapie courte en traitement de première intention des pemphigus modéré à sévère est à la fois plus efficace et mieux tolérée que le traitement de référence par prednisone orale à fortes doses. Cette efficacité semble liée à la déplétion prolongée des LB anti-DSG IgG^+.

Ce travail a abouti à une modification de la pratique médicale après validation par la FDA et l'ANSM et le schéma thérapeutique proposé dans cet essai est donc devenu le traitement de référence du pemphigus en première intention.

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

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

Summary

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

Methods We did a prospective, multicentre, parallel-group, open-label, randomised trial in 25 dermatology hospital departments in France (Ritux 3). Eligible participants were patients with newly diagnosed pemphigus aged 18–80 years being treated for the first time (not at the time of a relapse). We randomly assigned participants (1:1) to receive either oral prednisone alone, 1·0 or 1·5 mg/kg per day tapered over 12 or 18 months (prednisone alone group), or 1000 mg of intravenous rituximab on days 0 and 14, and 500 mg at months 12 and 18, combined with a short-term prednisone regimen, 0·5 or 1·0 mg/kg per day tapered over 3 or 6 months (rituximab plus short-term prednisone group). Follow-up was for 3 years (study visits were scheduled weekly during the first month of the study, then monthly until month 24, then an additional visit at month 36). Treatment was assigned through central computer-generated randomisation, with stratification according to disease-severity (severe or moderate, based on Harman's criteria). The primary endpoint was the proportion of patients who achieved complete remission off-therapy at month 24 (intention-to-treat analysis). This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00784589.

Findings Between May 10, 2010, and Dec 7, 2012, we enrolled 91 patients and randomly assigned 90 to treatment (90 were analysed; 1 patient withdrew consent before the random assignment). At month 24, 41 (89%) of 46 patients assigned to rituximab plus short-term prednisone were in complete remission off-therapy versus 15 (34%) of 44 assigned to prednisone alone (absolute difference 55 percentage points, 95% CI 38·4–71·7; p<0·0001. This difference corresponded to a relative risk of success of 2·61 (95% CI 1·71–3·99, p<0·0001), corresponding to 1·82 patients (95% CI 1·39–2·60) who would need to be treated with rituximab plus prednisone (rather than prednisone alone) for one additional success. No patient died during the study. More severe adverse events of grade 3–4 were reported in the prednisone-alone group (53 events in 29 patients; mean 1·20 [SD 1·25]) than in the rituximab plus prednisone group (27 events in 16 patients; mean 0·59 [1·15]; p=0·0021). The most common of these events in both groups were diabetes and endocrine disorder (11 [21%] with prednisone alone *vs* six [22%] with rituximab plus prednisone), myopathy (ten [19%] *vs* three [11%]), and bone disorders (five [9%] *vs* five [19%]).

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

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

Introduction

Pemphigus is a life-threatening autoimmune blistering disease affecting the skin and mucosa.[1–5] It is mediated by pathogenic autoantibodies directed against the desmoglein 1 and desmoglein 3 adhesion molecules of the epidermis that are responsible for the cohesion between keratinocytes in the skin and mucosa.[6–8] High doses of systemic corticosteroids are considered the standard treatment for patients with pemphigus,[9,10] and little evidence supports the use of conventional immunosuppressants as first-line treatment of this disease.[11–19]

Lancet 2017; 389: 2031–40

Published Online March 22, 2017 http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30070-3

See Comment page 1956

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

(Prof J D Bouaziz MD); Department of Dermatology, University of Reims, Reims, France (Prof P Bernard MD); Department of Dermatology, APHP, Henri Mondor Hospital, Créteil, France (S Ingen-Housz-Oro MD); Department of Dermatology Dijon University Hospital, Dijon, France (Prof P Vabres MD); Department of Dermatology, University of Lille, Lille, France (Prof E Delaporte MD); Department of Dermatology, University of Nantes, Nantes, France (Prof G Quereux MD); Department of Dermatology, University of Rennes, Rennes, France (Prof A Dupuy MD); Department of Dermatology, Centre Hospitalier Lyon Sud; Pierre Bénite, Lyon, France (S Debarbieux MD); Department of Dermatology, University of Angers, Angers, France (M Avenel-Audran MD); Department of Dermatology, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France (Prof M D'Incan MD); Department of Dermatology, University of Limoges, Limoges, France (Prof C Bedane MD); Department of Dermatology, Le Mans General Hospital, Le Mans, France (N Bénéton MD); Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, Lyon Claude Bernard University, Lyon (Prof D Jullien MD); Department of Dermatology, University of Paris V, Paris, France (Prof N Dupin MD); Department of Dermatology, Brest University Hospital, Brest, France (Prof L Misery MD); Department of Dermatology, Tours University Hospital, Tours, France (Prof L Machet MD); Department of Dermatology, University of Bordeaux, Bordeaux, France (Prof M Beylot-Barry MD); Department of Dermatology, University of Montpellier, Montpellier, France (Prof O Dereure MD); Department of Internal Medicine, Brest University Hospital, Brest, France (B Sassolas MD); and Department of Medical Information and Informatics, Rouen University Hospital, Rouen, France (T Vermeulin MD)

Research in context

Evidence before this study

Pemphigus is a life-threatening autoimmune blistering disease affecting the skin and mucosa. The combination of high doses of systemic corticosteroids and conventional immunosuppressive drugs, mostly azathioprine and mycophenolate mofetil, is regarded as standard treatment for severe cases of pemphigus. However, only 50% of patients achieve complete remission off-therapy. Many patients relapse and require a maintenance corticosteroid therapy, leading to high cumulative doses of corticosteroids and accompanying side effects. We searched PubMed for articles published from 2002–2015 with the terms "pemphigus" and "rituximab". We identified more than 400 patients with severe types of pemphigus refractory to conventional immunosuppressive drugs, who were treated with rituximab as second-line or third-line treatment. A few studies compared the first-line use of adjuvant immunosuppressive drugs as steroid-sparing agents versus placebo. Unfortunately, none of the findings from these studies showed a clear beneficial effect from the addition of conventional immunosuppressants to corticosteroids alone. High rates of short-term complete remission between 70% and 80% were reported with good tolerance, but with a 30%–60% relapse rate. Given this high efficacy of rituximab in the refractory type of pemphigus, results from a few case reports have suggested that its use as first-line treatment in pemphigus might permit rapid tapering of corticosteroid doses. Because long-term corticosteroid treatment is responsible for severe and even life-threatening side-effects in patients with pemphigus, we did a randomised trial comparing treatment with a high dose of prednisone alone given for 12 to 18 months with a regimen of rituximab plus lower initial doses of prednisone, rapidly tapered over 3 to 6 months. Our aim was to assess whether first-line rituximab plus short-term prednisone could substantially improve the occurrence of long-term complete remission off-therapy in patients with pemphigus, while allowing a decrease in cumulative doses of prednisone and a reduction of severe treatment adverse events, compared with prednisone alone.

Added value of this study

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

Implications of all the available evidence

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

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

Methods

Study design and participants

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

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

Exclusion criteria are listed in the appendix. Classification of pemphigus severity was based on Harman's criteria[39] since no threshold differentiating moderate from severe pemphigus was available at the time the study was designed, whether for the Pemphigus Disease Area Index (PDAI) or Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) scores.[40,41] Severe pemphigus was defined as skin involvement of more than 5% of the body surface area, or significant mucosal involvement defined as more than ten mucosal erosions, or diffuse gingivitis or confluent large erosions, or involvement of two or more mucosal sites. All patients provided written informed consent.

Randomisation

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

Procedures

Patients in the rituximab plus short-term prednisone group received intravenous rituximab (provided by Roche) at a fixed 1000 mg dose on days 1 and 14 after randomisation, then 500 mg at months 12 and 18. Additionally, they took oral prednisone (Cortancyl) once per day at an initial dosage of 0·5 mg/kg per day for moderate pemphigus and 1·0 mg/kg per day for severe pemphigus. The initial prednisone dose was maintained for 1 month and thereafter gradually reduced after achievement of disease control, with the aim to stop prednisone after 3 months in patients with moderate pemphigus and after 6 months in patients with severe pemphigus. Disease control was defined as the time at which new lesions ceased to form and established lesions began to heal.[42]

Patients randomly assigned to the prednisone-alone group received an initial dose of prednisone of 1·0 mg/kg per day for moderate pemphigus and 1·5 mg/kg per day for severe pemphigus. The initial dose of prednisone was maintained for 1 month, and thereafter gradually tapered in patients who achieved disease control to stop prednisone after 12 months in patients with moderate pemphigus and after 18 months in patients with severe pemphigus. The protocol for tapering prednisone doses and for treatment of relapses is in the appendix. During the entire study period, no other therapy expected to be active for pemphigus was allowed. In both treatment groups, investigators were allowed to stop treatment if a very severe or life-threatening side-effect occurred, or if a flare of pemphigus was not controlled despite the successive incremental increases in prednisone doses as scheduled in the protocol. Follow-up was initially planned for 2 years but to assess the rate of relapse after the last infusion of rituximab at month 18, we extended the follow-up to 3 years (this protocol amendment was made on April 17, 2014).

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

Outcomes

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

Statistical analysis

From our preliminary studies and the scientific literature,[1,14,15,21] we postulated that the proportion of patients in complete remission off-therapy at month 24 would increase from 40% with corticosteroids alone to 70% with rituximab plus short-term-prednisone. To achieve 80% power relative to this difference for Pearson's χ^2 test at the two-sided 0·05 level and allowing for 5% dropouts, 90 patients (2×45) were required for enrolment. Analyses were based on the intention-to-treat principle. Patients who withdrew from the study were considered as not having reached complete remission off-therapy at month 24. Proportions of patients achieving

Correspondence to:
Professor Pascal Joly,
Clinique Dermatologique,
Rouen University Hospital,
76031 Rouen, France
Pascal.Joly@chu-rouen.fr

See Online for appendix

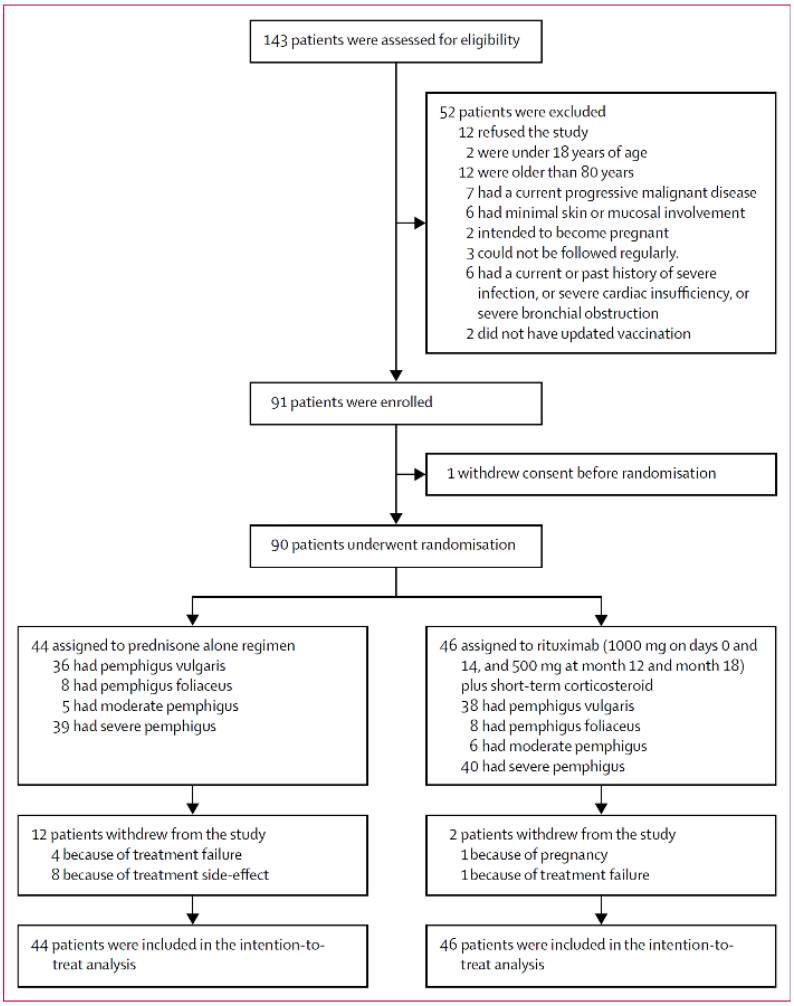


Figure 1: **Trial profile**
Eight of the 12 patients who withdrew from the prednisone-alone group were secondarily treated with rituximab.

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

Analysis of dichotomous endpoints other than the primary endpoint (complete remission off-therapy at month 24) relied on the same methods, except that we did no adjustments. Namely, we used Pearson's χ^2 test to compare observed proportions with endpoints (eg, complete remission on-minimal therapy at month 24) between the two treatment groups, and we estimated the RR of observing the endpoint with corresponding 95% CI from unadjusted log-binomial regression. For survival-type endpoints (eg, disease-free survival), we estimated survival distributions from Kaplan-Meier's method; comparisons between treatment groups relied on the logrank test. We estimated hazard ratios and corresponding 95% CIs from Cox regression. For quantitative endpoints (eg, cumulative dose of prednisone), comparisons between treatment groups relied on Student's *t*-test or Mann-Whitney's non parametric test as appropriate. For quantitative outcomes with repeated measurements over time (eg, DLQI or Skindex scores), we used a mixed linear model incorporating treatment as a fixed effect and time as a random effect. All statistical tests used the two-sided 0·05 level as their significance threshold. For quantitative variables, we reported means (SD) or median (range) or IQR. NThe study was not overseen by a data monitoring committee. We did all analyses with SAS (version 9.3). This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00784589.

Role of the funding source

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

Results

Between May 10, 2010, and Dec 7, 2012, we enrolled 91 patients the study. One patient withdrew their consent before randomisation, leaving 90 patients randomly assigned to treatment (46 to rituximab plus short-term-prednisone and 44 to prednisone alone (figure 1). 74 (82%) of 90 patients in total had pemphigus vulgaris. Mean weight loss before treatment in the 71 (79%) patients who had oral (mucosal) lesions was 6·7 kg (SD 4·5). The two groups were well balanced except for sex and for PDAI score (table 1), which was higher in patients assigned to prednisone alone than in those assigned to rituximab plus short-term prednisone (p=0·0275). Median follow-up for all participants was 729 days (IQR 711–744) and that for patients who did not withdraw from the study was 733 days (727–749 days).

At month 24, 41 (89%) of 46 patients assigned to rituximab plus short-term-prednisone were in complete remission off-therapy versus 15 (34%) of 44 patients assigned to prednisone (absolute difference 55 percentage points, 95% CI 38·4–71·7; p<0·0001. This difference corresponded to an RR of success of 2·61 (95% CI

1·71–3·99; p<0·0001) translating to an NNT of 1·82 patients (95% CI 1·39–2·60); ie, 1·82 patients would need to be treated with rituximab plus short-term prednisone rather than prednisone alone to obtain one additional success.

After adjusting for sex or baseline PDAI score, a strong beneficial effect of rituximab was still evident with an RR of complete remission off-therapy of 2·66 (95% CI 1·73–4·07; P<0.0001) and 2·55 (1·41–3·69; p<0·0001), respectively. In the subgroup of patients with pemphigus vulgaris, 34 (89%) of 38 patients assigned to rituximab plus short-term prednisone group were in complete remission off-therapy at month 24 compared with ten (28%) of 36 patients assigned to prednisone alone (absolute difference 61·7 percentage points, 95% CI 44·1–79·3; p<0·0001). The NNT was 1·62 patients (95% CI 1·26 –2·27), unadjusted RR was 3·22 (95% CI 1·88–5·52; p<0·0001), RR adjusted for sex was 3·24 (1·89–5·57; p<0·0001), and RR adjusted for PDAI score was 3·00 (1·38–4·63; p<0·0001). At month 24, no patient in the rituximab plus short-term prednisone group and one patient in the prednisone-alone group were in complete remission and still receiving minimum therapy. Five patients (11%) assigned to rituximab plus short-term prednisone and 28 patients (64%) assigned to prednisone-alone still had active lesions at month 24, or had no lesions but still took a prednisone dose higher than 10 mg/day (RR 2·45; 95% CI 1·64–3·67; p<0·0001)

Median delay to achieve complete remission off-therapy was 677 days (range 420–713, IQR 577–687) with prednisone alone and 277 days (177–751) with rituximab plus short-term prednisone (p<0·0001). Kaplan-Meier estimates showed that patients in the rituximab plus short-term prednisone group had a higher cumulative probability of achieving complete off-therapy during the study than patients in the prednisone-alone group (figure 2). Median cumulative duration of complete remission off-therapy during the study was more than seven times higher in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone: 446 days (range 0–567, IQR 401–475), than in those assigned to prednisone-alone: 62 days (range 0–608 days, IQR 49–178; p<0·0001). At month 24, relapse had occurred in 11 patients (24%) assigned to rituximab plus short-term prednisone (four [9%] severe, seven [15%] moderate) including three patients who relapsed twice, and 20 patients (45%) assigned to prednisone alone (five [11%] severe, 15 [34%] moderate) including seven patients who relapsed twice and two patients who relapsed three times. More relapses occurred in the prednisone-alone group than in the rituximab plus short-term prednisone group; the proportion of participants who achieved 2-year disease-free survival were 36·7% (95% CI 14·5–59·5) with prednisone-alone versus 75·4% (59·9–85·5; p=0·0191; figure 3). During the third year of follow-up, a relapse occurred in one (2%) of the 41 patients who were in complete remission off-therapy at month 24 in the rituximab plus short-term prednisone group and in four (27%) of the 15 patients who were in complete remission off-therapy at month 24 in the prednisone-alone group.

	Prednisone alone (n=44)	Rituximab plus short-term prednisone (n=46)
Age (years)	53·1 (13·8)	53·5 (16·2)
Sex		
Female	19 (43%)	31 (67%)
Male	25 (57%)	15 (33%)
Pemphigus subtype		
Vulgaris	36 (82%)	38 (83%)
Foliaceus	8 (18%)	8 (17%)
Severity of pemphigus (by Harman's criteria)		
Moderate	5 (11%)	6 (13%)
Severe	39 (89%)	40 (87%)
ABSIS score*	43·6 (24·1)	34·4 (20·6)
PDAI score (scale ranges from 0 to 250 points)†	46·0 (23·7)	33·5 (28·1)
PGA score‡	6·9 (1·4)	6·4 (1·6)
Quality of life		
Skindex score§	60·3 (23·7)	54·4 (24·3)
DLQI score¶	11·6 (7·0)	10·2 (6·4)
Duration of mucosal lesions (days)‖	83·0 (41·0–127·5)	112·5 (42·5–186·5)
Duration of cutaneous lesions (days)‖	83·5 (43·0–206·5)	105·0 (37·5–215·5)

Data are mean (SD), n (%), or median (IQR). ABSIS=Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score. PDAI=Pemphigus Disease Area Index. PGA=Physician Global Assessment. DLQI=Dermatology Quality of Life Index. *40 in the prednisone alone group, 45 in the rituximab plus prednisonegroup. †42 in the prednisone alone group, 46 in the rituximab plus prednisone group. ‡42 in the prednisone alone group, 46 in the rituximab plus prednisone group. §32 in the prednisone alone group, 38 in the rituximab plus prednisone group. ¶38 in the prednisone alone group, 44 in the rituximab plus prednisone group. ‖36 in the prednisone alone group, 36 in the rituximab plus prednisone group.

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

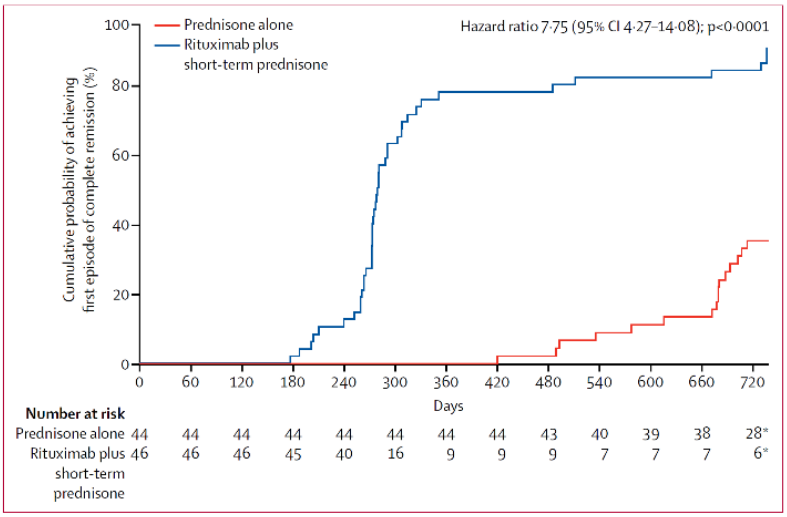


***Figure 2:* Cumulative probability of achieving complete remission off-therapy.**
Kaplan-Meier estimates of the cumulative probability of achieving a first episode of complete remission off-therapy during the study. *One patient in the prednisone-alone group and two patients in the rituximab plus short-term prednisone group who achieved complete remission off-therapy during the study further relapsed during the follow-up, and were no longer in complete remission off-therapy at month 24. Three patients in the rituximab group had their month-24 assessment a few days after day 720 and were not considered as being in complete remission off-therapy on this curve.

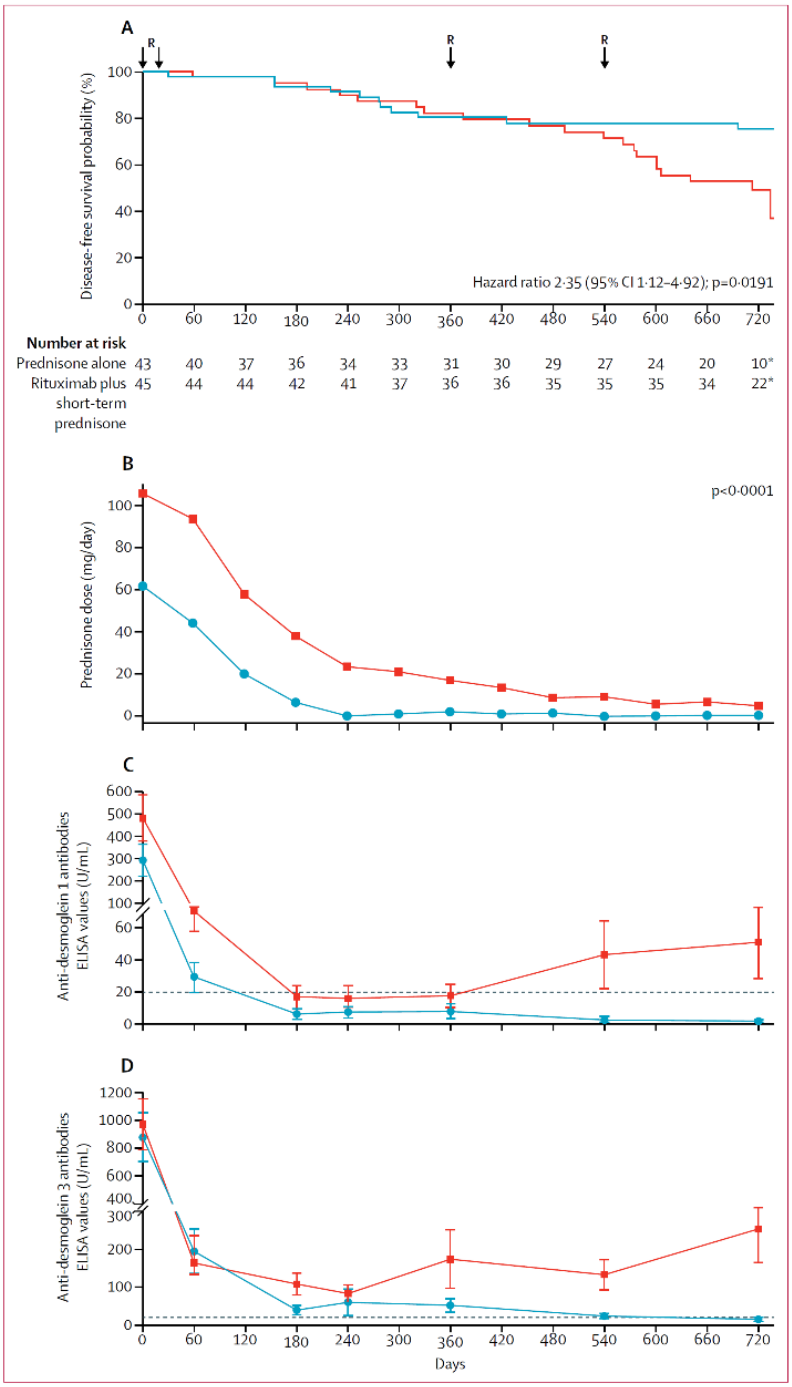


Figure 3: **Clinical and biological response to treatment**
Kaplan-Meier estimates of disease-free survival (panel A); evolution of prednisone doses (mg/day; panel B); and anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 antibody ELISA values (panels C and D) of patients with pemphigus according to treatment regimen. Red line=patients treated with prednisone alone. Blue line=patients treated with rituximab plus short-term prednisone. Arrows indicate when rituximab infusions were done.
*Ten relapse-free patients in the prednisone-alone group and 12 in the rituximab plus short-term prednisone group had their month-24 visit at a mean time of 14·8 days (SD 11·5) and 13·6 days (9·5) before day 730.
The dashed line in panels C and D represents the cutoff values proposed by the manufacturer for anti-desmoglein 1 and 3 antibodies.

Patients assigned to rituximab plus short-term prednisone took a third of the cumulative dose of prednisone during the study compared with patients assigned to prednisone-alone: 6143·1 mg (SD 2411) versus 17 973·6 mg (7 272·5 mg; p<0·0001). The DLQI and Skindex scores showed greater improvements in patients assigned to rituximab plus short-term prednisone compared with those assigned to prednisone alone (appendix; p=0·0411 and p=0·0137, respectively).

No patients died during the study. 14 patients withdrew from the study: two in the rituximab plus short-term prednisone group (reasons were pregnancy [n=1] and treatment failure [n=1]) and 12 in the prednisone-alone group (reasons were treatment failure [n=4], treatment adverse events [n=8] including severe myopathy [n=2], septic arthritis [n=1], hip osteonecrosis [n=1], psychosis [n=1], chorioretinitis [n=1], 25 kg weight gain [n=1], and cardiac failure [n=1]). More severe adverse events of grade 3–4 were reported in the prednisone-alone group (53 events in 29 patients; mean 1·20 [SD 1·25]) than in the rituximab plus prednisone group (27 events in 16 patients; mean 0·59 [1·15]; p=0·0021; table 2). The most common of these events in both groups were diabetes and endocrine disorder (11 [21%] with prednisone alone *vs* six [22%] with rituximab plus prednisone), myopathy (ten [19%] *vs* three [11%]) and bone disorders (five [9%] *vs* five [19%]).

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

Discussion

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

	Total (n=80)	Prednisone alone (n=53)	Rituximab plus short-term prednisone (n=27)
Lung infection	4 (5%)	1 (2%)	3 (11%)
Pneumonia	4 (5%)	1 (2%)	3 (11%)
Various infections	6 (8%)	4 (8%)	2 (7%)
Septicaemia	1 (1%)	0	1 (4%)
Septic arthritis	1 (1%)	1 (2%)	0
Urinary tract infection	1 (1%)	1 (2%)	0
Severe cutaneous herpes	1 (1%)	1 (2%)	0
Spondylodiscitis	1 (1%)	0	1 (4%)
Chorioretinitis	1 (1%)	1 (2%)	0
Ocular disorders	2 (3%)	2 (4%)	0
Cataract	2 (3%)	2 (4%)	0
Cardiovascular disorders*	10 (13%)	7 (13%)	3 (11%)
Angina	1 (1%)	1 (2%)	0
Myocardial infarction	1 (1%)	1 (2%)	0
Deep vein thrombosis	2 (3%)	1 (2%)	1 (4%)
Pulmonary embolism	4 (5%)	3 (6%)	1 (4%)
Cardiac failure	2 (3%)	1 (2%)	1 (4%)
Psychiatric disorders	6 (8%)	4 (8%)	2 (7%)
Delirium	1 (1%)	1 (2%)	0
Depression	4 (5%)	2 (4%)	2 (7%)
Psychosis	1 (1%)	1 (2%)	0
Bone disorders†	10 (13%)	5 (9%)	5 (19%)
Femur fracture	1 (1%)	0	1 (4%)
Vertebra fracture	4 (5%)	2 (4%)	2 (7%)
Wrist fracture	2 (3%)	1 (2%)	1 (4%)
Rotator cuff rupture	1 (1%)	0	1 (4%)
Cauda equina syndrome	1 (1%)	1 (2%)	0
Hip osteonecrosis	1 (1%)	1 (2%)	0
(Continued from previous column)			
Neurological disorders	3 (4%)	3 (6%)	0
Transient ischaemic attack	1 (1%)	1 (2%)	0
Stroke	1 (1%)	1 (2%)	0
Sciatica	1 (1%)	1 (2%)	0
Myopathy	13 (16%)	10 (19%)	3 (11%)
Major weight gain (>10 kg)	4 (5%)	4 (8%)	0
Diabetes and endocrine disorder‡	17 (21%)	11 (21%)	6 (22%)
Diabetes mellitus requiring insulin	2 (3%)	2 (4%)	0 (<1%)
Cushing syndrome	14 (18%)	8 (15%)	6 (22%)
Adrenal insufficiency	1 (1%)	1 (2%)	0
Electrolyte disorder	1 (1%)	1 (2%)	0
Hypokalaemia with cardiac arrhythmia	1 (1%)	1 (2%)	0
Hepatic disorder	1 (1%)	0	1 (4%)
Liver cytolysis	1 (1%)	0	1 (4%)
Cutaneous or ear, nose, and throat disorders	3 (4%)	1 (2%)	2 (7%)
Major skin atrophy	2 (3%)	0	2 (7%)
Ear, nose, or throat carcinoma	1 (1%)	1 (2%)	0

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

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

high doses of prednisone as the standard-regimen, since no trials in the literature showed a clear beneficial effect from the addition of conventional immunosuppressants to corticosteroids alone.[11–19] Additionally, the findings from some of these studies showed a higher rate of treatment-adverse events in patients with the combined treatment. Initial treatment with rituximab resulted in a 2·6-fold increase in the proportion of patients achieving complete remission off-therapy at month 24 compared with those treated with prednisone alone. This beneficial effect of the rituximab plus short-term prednisone regimen was still apparent after adjusting for sex and baseline PDAI score, since the RR of complete remission off-therapy did not vary significantly after adjustment. Importantly, the addition of rituximab permitted the rapid tapering of prednisone doses, since about 60% of patients receiving this treatment were able to stop prednisone after 6 months of treatment, resulting in a seven-fold higher duration of complete remission off-therapy during the study compared with patients receiving prednisone alone. Additionally, patients assigned to rituximab plus short-term prednisone had fewer severe adverse events than those assigned to prednisone alone, which was probably because of lower cumulative doses of prednisone used in the rituximab group during the study.

The fact that patients in the rituximab plus prednisone group did not have more infections than patients treated with prednisone alone, whereas circulating B-lymphocytes were no longer detectable in the rituximab-containing group, is probably because of the persistence of anti-infectious antibodies that are secreted by plasma cells not targeted by anti-CD20 therapy.[30] Rituximab might be effective in reducing the costs associated with the treatment of pemphigus,[47] especially relative to the use of intravenous immune globulins.[48] Despite the fact that comparisons of costs were not part of the trial, we retrospectively estimated the cost of both treatments, since reimbursement of rituximab is a major concern in clinical practice. We estimated in the present study that

the overcost of the first-line use of rituximab was about €5500 per patient, which was was counterbalanced by a major reduction in the cumulative doses of prednisone, and more importantly, in the number of severe and life-threatening treatment adverse events.

Our trial had some limitations. First, it was not blinded, since the tapering of prednisone doses differed between the two treatment groups. Indeed, the same rapid tapering of prednisone in both groups would have allowed the use of a placebo for rituximab in the prednisone-alone group, but would have induced an unethical and artificially high number of relapses in this group, not corresponding to the standard of care for pemphigus patients. Additionally, the use of a placebo for rituximab with two different regimens of corticosteroid tapering would have been impractical in such a multicentre study. In particular, the absence of blinding might have influenced investigators in their decision to withdraw 12 patients from the prednisone-alone group, whereas only two patients withdrew from the rituximab-containing group. Indeed, eight of the 12 patients who withdrew from the prednisone-alone group were secondarily treated with rituximab allowing a rapid decrease in prednisone doses. This decrease might be partly responsible for the absence of deaths in our study, whereas the reported 2-year mortality rate of pemphigus predicted the occurrence of between 12 and 15 deaths.[5,37]

Second, one of the four scoring systems used, the PDAI score, was slightly higher in patients from the prednisone-alone group at baseline than in those receiving rituximab plus short-term prednisone. However, we believe that this small intergroup difference corresponding to about 5% of the scale of this scoring system was unlikely to constitute a bias that might explain the major therapeutic effect observed in this study. This is also suggested by the fact that the RRs of treatment success were almost the same after adjusting for the baseline PDAI score, irrespective of the population considered: all pemphigus patients or patients with pemphigus vulgaris only. Although patients from this study who were classified as moderate pemphigus using Harman's criteria fitted with the moderate subgroup defined by proposed thresholds on the PDAI score,[48] the severe subgroup in our study corresponded to a combination of significant and extensive pemphigus on the PDAI score. Third, despite the fact that the primary endpoint was assessed after a long 2-year follow-up, one could argue that this assessment was close to the last maintenance infusion of rituximab at month 18. This timing of the last infusion is why we prolonged the follow-up of patients to month 36, which showed a low proportion of patients having a relapse after the last infusion of rituximab, suggesting a long-lasting beneficial effect of these maintenance infusions. The 500 mg dose of rituximab used for maintenance, and the time intervals between infusions, were somewhat arbitrary, although rather similar to those used in antineutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated vasculitis.[49] The occurrence of eight of the 11 relapses in the rituximab plus short-term prednisone group from month 6 to month 12, as well as a reincrease of total and desmoglein-specific blood B-lymphocytes and circulating anti-desmoglein anti bodies during this interval suggest that the first maintenance infusion of rituximab might have been of more value if done at month 6 instead of month 12. Finally, because of the few patients with moderate pemphigus in our study, the indication of a first-line treatment with rituximab combined with 3 months of corticosteroids remains uncertain in these patients.

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

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

Contributors

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

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

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

References

1 Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; **67:** 869–77.
2 Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest* 1989; **83:** 1443–48.
3 Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; **306:** 1189–96.
4 Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 2006; **355:** 1800–10.
5 Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; **337:** a180.
6 Wu H, Wang ZH, Yan A, et al. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. *N Engl J Med* 2000; **343:** 31–35.
7 Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006; **116:** 1159–66.
8 Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103:** 12855–60.
9 Zhao CY, Murrell DF. Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update. *Drugs* 2015; **75:** 271–84.
10 Lever WF, Goldberg HS. Treatment of pemphigus vulgaris with methotrexate. *Arch Dermatol* 1969; **100:** 70–78.
11 Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; **21:** CD006263.
12 Atzmony L, Hodak E, Leshem YA, et al. The role of adjuvant therapy in pemphigus: a systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2015; **73:** 264–71.
13 Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, et al. Pemphigus. S2 guideline for diagnosis and treatment–guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; **29:** 405–14.
14 Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol* 2010; **130:** 2041–48.
15 Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D. Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; **26:** 855–60.
16 Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooh M, et al. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2007; **57:** 622–28.
17 Sharma VK, Khandpur S. Evaluation of cyclophosphamide pulse therapy as an adjuvant to oral corticosteroid in the management of pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2013; **38:** 659–64.
18 Chrysomallis F, Ioannides D, Teknetzis A, Panagiotidou D, Minas A. Treatment of oral pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 1994; **33:** 803–07.
19 Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2000; **136:** 868–72.
20 Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2006; **355:** 1772–79.
21 Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 2007; **357:** 545–52.
22 Kim JH, Kim YH, Kim MR, Kim SC. Clinical efficacy of different doses of rituximab in the treatment of pemphigus: a retrospective study of 27 patients. *Br J Dermatol* 2011; **165:** 646–51.
23 Matsukura S, Knowles SR, Walsh S, Shear NH. Effect of a single-cycle alternative dosing regimen for rituximab for recalcitrant pemphigus: a case series of 9 patients. *Arch Dermatol* 2012; **148:** 734–39.
24 Heelan K, Al-Mohammedi F, Smith MJ, et al. Durable remission of pemphigus with a fixed-dose rituximab protocol. *JAMA Dermatol* 2014; **150:** 703–08.
25 Cianchini G, Lupi F, Masini C, Corona R, Puddu P, De Pità O. Therapy with rituximab for autoimmune pemphigus: results from a single-center observational study on 42 cases with long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* 2012; **67:** 617–22.
26 Leshem YA, Hodak E, David M, Anhalt GJ, Mimouni D. Successful treatment of pemphigus with biweekly 1-g infusions of rituximab: a retrospective study of 47 patients. *J Am Acad Dermatol* 2013; **68:** 404–11.
27 Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2008; **128:** 2850–58.
28 Zambruno G, Borradori L. Rituximab immunotherapy in pemphigus: therapeutic effects beyond B-cell depletion. *J Invest Dermatol* 2008; **128:** 2745–47.
29 Ahmed AR, Shetty S. A comprehensive analysis of treatment outcomes in patients with pemphigus vulgaris treated with rituximab. *Autoimmun Rev* 2015; **14:** 323–31.
30 Colliou N, Picard D, Caillot F, et al. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci Transl Med* 2013; **5:** 175ra30.
31 Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, Stanley JR. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. *J Invest Dermatol* 2015; **135:** 742–49.
32 Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, et al. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Arch Dermatol* 2012; **148:** 1031–36.
33 Cho YT, Lee FY, Chu CY, Wang LF. First-line combination therapy with rituximab and corticosteroids is effective and safe for pemphigus. *Acta Derm Venereol* 2014; **94:** 472–73
34 Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Cosnes A, et al. First-line treatment of pemphigus vulgaris with a combination of rituximab and high-potency topical corticosteroids. *JAMA Dermatol* 2015; **151:** 200–03.
35 Ahmed AR, Nguyen T, Kaveri S, Spigelman ZS. First line treatment of pemphigus vulgaris with a novel protocol in patients with contraindications to systemic corticosteroids and immunosuppressive agents: preliminary retrospective study with a seven year follow-up. *Int Immunopharmacol* 2016; **34:** 25–31.
36 Leshem YA, Gdalevich M, Ziv M, David M, Hodak E, Mimouni D. Opportunistic infections in patients with pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2014; **71:** 284–92.
37 Almugairen N, Hospital V, Bedane C, et al. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. *J Am Acad Dermatol* 2013; **69:** 583–88.
38 Lott JP, Gross CP. Mortality from non neoplastic skin disease in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2014; **70:** 47–54.
39 Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001; **144:** 775–80.
40 Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol* 2007; **17:** 4–11.
41 Rosenbach M, Murrell DF, Bystryn JC, et al. Reliability and convergent validity of two outcome instruments for pemphigus. *J Invest Dermatol* 2009; **129:** 2404–10.

42 Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI): a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol* 1994; **19:** 210–16.

43 Leplège A, Ecosse E, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P. The French version of Skindex (Skindex-France). Adaptation and assessment of psychometric properties. *Ann Dermatol Venereol* 2003; **130:** 177–83.

44 Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008; **58:** 1043–46.

45 US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 4.0: May 28, 2009.

46 Deddens JA, Petersen MR, Lei X. Estimation of prevalence ratios when PROC GENMOD does not converge. In: Proceedings of the 28th Annual SAS Users Group International Conference, Cary, NC: March 30– April 2, 2003. Paper 270–28.

47 Heelan K, Hassan S, Bannon G, et al. Cost and resource use of pemphigus and pemphigoid disorders pre- and post-rituximab. *J Cutan Med Surg* 2015; **19:** 274–82.

48 Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. *Br J Dermatol* 2016; **175:** 142–49.

49 Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2014; **371:** 1771–80.

➢ *ANNEXE 2 : RITUXIMAB AND CORTICOSTEROID EFFECT ON DESMOGLEIN-SPECIFIC B CELLS AND DESMOGLEIN-SPECIFIC T FOLLICULAR HELPER CELLS IN PEMPHIGUS*

Maho-Vaillant M, Perals C, Golinski ML, ***Hébert V****, Caillot F, Mignard C,* Riou *G, Petit M, Viguier M, Hertl M, Boyer O, Calbo S, Fazilleau N, Joly P.*

Journal of Investigative Dermatology, 2021

Ce travail a tenté de caractériser certains mécanismes immunologiques à l'origine de la rémission clinique de longue durée après le traitement par rituximab.

Pour cela, nous avons analysé les cellules autoréactives sous 3 angles différents : i) les cellules B mémoire spécifiques de la DSG3 par cytométrie en flux, ii) les cellules T folliculaires auxilliaires (Tfh) spécifiques de la DSG3 par cytométrie en flux et iii) les cellules productrices d'anticorps (ASC) par ELISPOT ; tout cela chez des patients de la cohorte Ritux 3 traités par corticostéroïdes seuls ou par rituximab.

Cette analyse post hoc a montré que le rituximab induisait une diminution significative des cellules B mémoire commutées IgG (C27+IgG+) spécifiques de la DSG3. En conséquence, les ASC anti-DSG3 n'étaient plus détectées chez les patients en rémission complète après rituximab. En revanche, les corticostéroïdes ne modifiaient pas la fréquence ou le phénotype des cellules B mémoires autoréactives, et les ASC anti-DSG3 étaient toujours détectées après traitement, même chez les patients en rémission. En utilisant un marquage tétramérique peptide-HLADRB1∗0402, nous avons pu identifier des Tfh anti-DSG3 circulants, et observer leur diminution après rituximab, alors que leur fréquence restait stable après traitement par corticostéroïdes.

Ces résultats suggèrent que la réponse durable observée après rituximab dans le pemphigus pourrait reposer, en partie, sur la diminution des Tfh anti-DSG3, qui conduirait à une déplétion des cellules B autoréactives mémoire commutées IgG, puis à la disparition des ASC anti-DSG3.

ORIGINAL ARTICLE

Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus

Maud Maho-Vaillant[1,2], Corine Perals[3], Marie-Laure Golinski[1,2], Vivien Hébert[1,2], Frédérique Caillot[4], Claire Mignard[1], Gaëtan Riou[2], Marie Petit[2], Manuelle Viguier[5], Michael Hertl[6], Olivier Boyer[2], Sébastien Calbo[2], Nicolas Fazilleau[3,7] and Pascal Joly[1,2,7]

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

[1]Department of Dermatology, Rouen University Hospital, Centre de Référence des Maladies Bulleuses Auto-Immunes, Normandie University, Rouen, France; [2]INSERM U1234, UNIROUEN, Normandie University, Rouen, France; [3]Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM U1291, CNRS U5051, University of Toulouse, Toulouse, France; [4]Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, Rouen, France; [5]Department of Dermatology, Centre de Référence des Maladies Bulleuses Auto-Immunes and EA 7509, Reims-Champagne Ardenne University, Reims, France; and [6]Department of Dermatology and Allergology, Philipps University, Marburg, Germany

[7]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

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

© 2021 CHU CHARLES NICOLLE ROUEN. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.

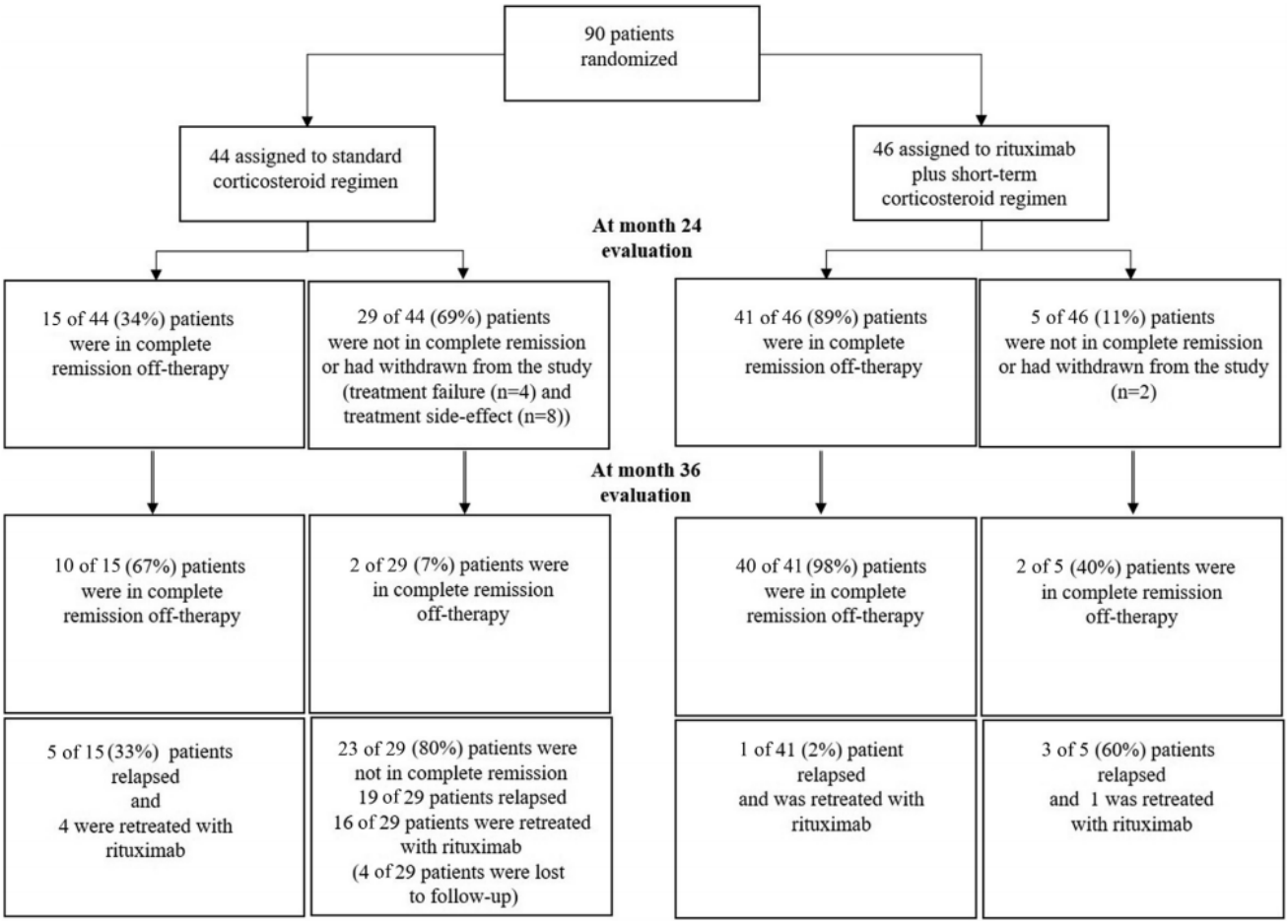


Figure 1. Flow chart of the study.

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

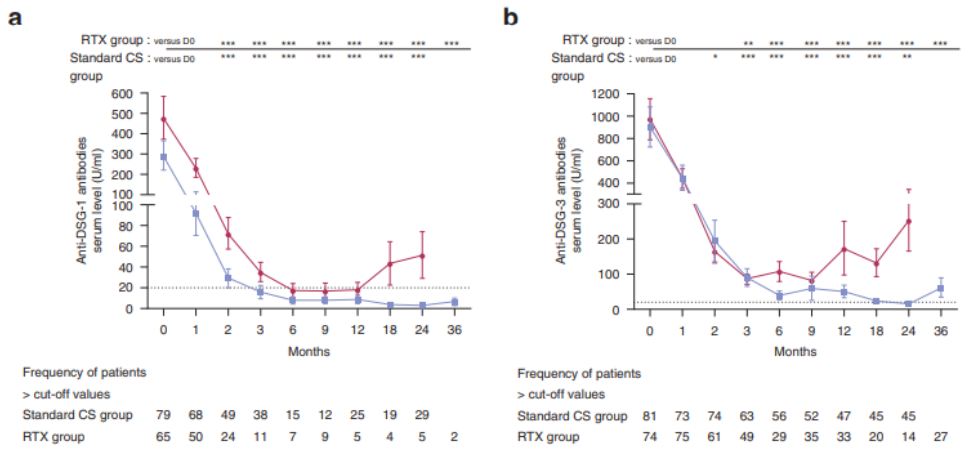


Figure 2. Evolution of anti−DSG-1 and anti−DSG-3 antibody ELISA values in sera from patients with pemphigus, according to treatment regimens. Blue line = patients assigned to the RTX group. Red line = patients assigned to the standard CS group. The dashed line represents the cut-off values proposed by 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).

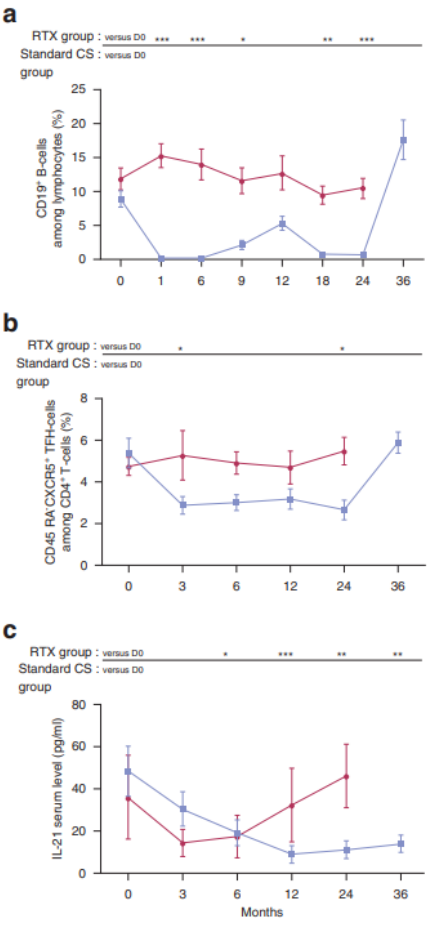


Figure 3. Evolution of peripheral blood whole B cells, TFH-cell subpopulation of CD4$^+$ T cells, and serum IL-21 level during follow-up of patients according to treatment regimen. Blue line = patients assigned to the RTX group. Red line = patients assigned to the standard CSs group. The frequency of (**a**) whole B cells and (**b**) TFH-cell subpopulation of CD4$^+$ 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.

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$^+$ B cells (baseline frequencies in Supplementary Figure S1a and b). DSG-specific B cells from patients with pemphigus were more frequently CD27$^+$ and class-switched IgG$^+$ CD27$^+$ than whole B cells (CD27$^+$: 51 ± 2% of DSG-specific B cells vs. 31 ± 3% of whole CD19$^+$ B cells, $P < 0.0001$; IgG$^+$ CD27$^+$: 15.5 ± 1.4% of DSG-specific B cells vs. 8.4 ± 1.2% of whole CD19$^+$ 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

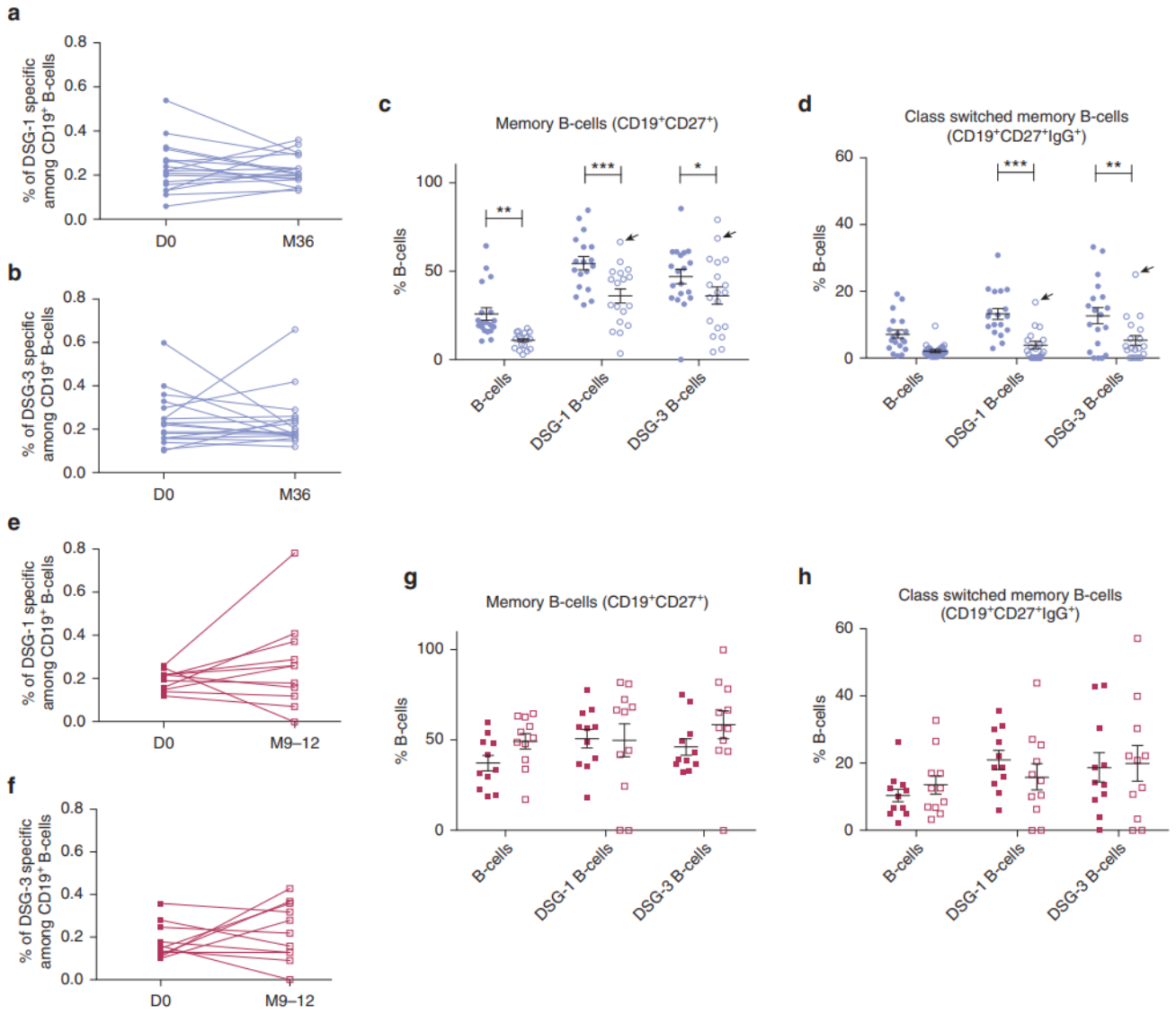


Figure 4. Frequency and phenotype of peripheral blood whole B cells and DSG-1− and DSG-3−specific B cells evaluated by flow cytometry in patients with pemphigus at D0 and after treatment. Blue = patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent disease activity is indicated by an arrow. 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 ($CD19^+$ $CD27^+$) and class-switched memory B cells ($CD19^+CD27^+IgG^+$) 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 ± 0.01% and 0.23 ± 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 $CD27^+$ memory B cells decreased from baseline to M36 after RTX treatment ($DSG\text{-}1^+$ B cells: 55 ± 4% vs. 36 ± 4%, $P < 0.001$; $DSG\text{-}3^+$ B cells: 48 ± 4% vs. 36 ± 5%, $P < 0.05$) (Figure 4c). Additionally, the frequency of class-switched DSG-specific $CD27^+$ IgG^+ B cells dramatically decreased from baseline to M36 after RTX ($DSG\text{-}1^+$ B cells: 13.5 ± 1.6% vs. 3.8 ± 1.0%, $P < 0.001$; $DSG\text{-}3^+$ B cells: 13.0 ± 2.4% vs. 4.5 ± 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 $CD27^+IgG^+$ B cells (25.0%, Figure 4d, black arrow). In contrast with the changes observed in the RTX group, we did not observe

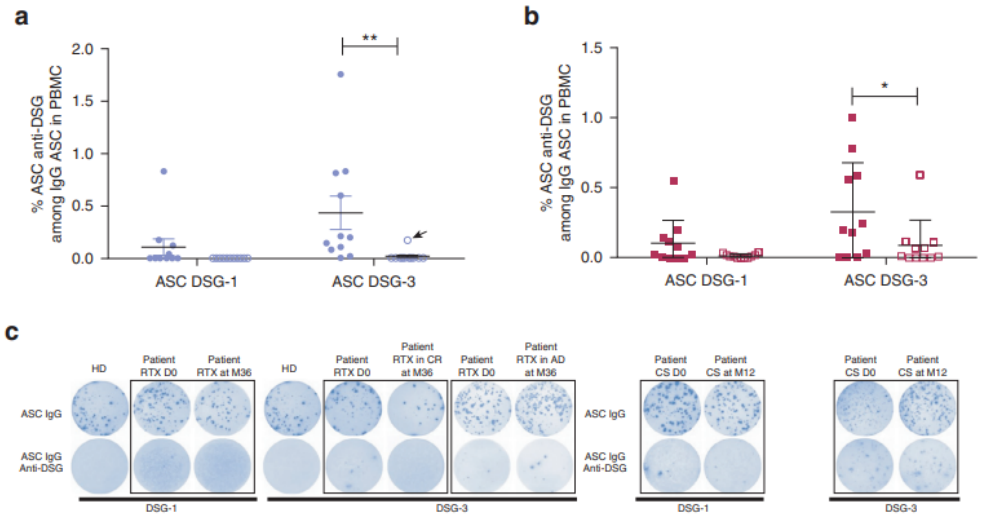


Figure 5. Frequency of peripheral blood DSG-1− and DSG-3−specific ASCs evaluated by ELISPOT assay in patients with pemphigus at D0 and after treatment. (**a**) Blue = patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent AD after RTX treatment is indicated by an arrow. (**b**) Red = patients 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 ($DSG\text{-}1^+$ B cells: 20.9 ± 2.7% vs. 15.9 ± 3.9; $P = 0.17$; $DSG\text{-}3^+$ B cells: 18.7 ± 4.3% vs. 20.0 ± 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 ± 0.07% and 0.43 ± 0.16%, respectively) and in those from the standard CS group (0.10 ± 0.05% and 0.32 ± 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 ± 0.05 at baseline vs. 0.01 ± 0.01 at M12, $P = 0.5$: DSG-3 ASC: 0.32 ± 0.10 at baseline vs. 0.089 ± 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 ± 0.27%) for Th cells and from 0.07−0.68% (mean: 0.24 ± 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 ± 0.31% at baseline vs. 0.4 ± 0.12% at M36; $P < 0.0001$; TFH: 0.25 ± 0.08% at baseline vs. 0.05 ± 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 ± 0.51% at baseline vs. 0.97 ± 0.17% at M9−12, $P = 0.0009$), DSG-3−specific

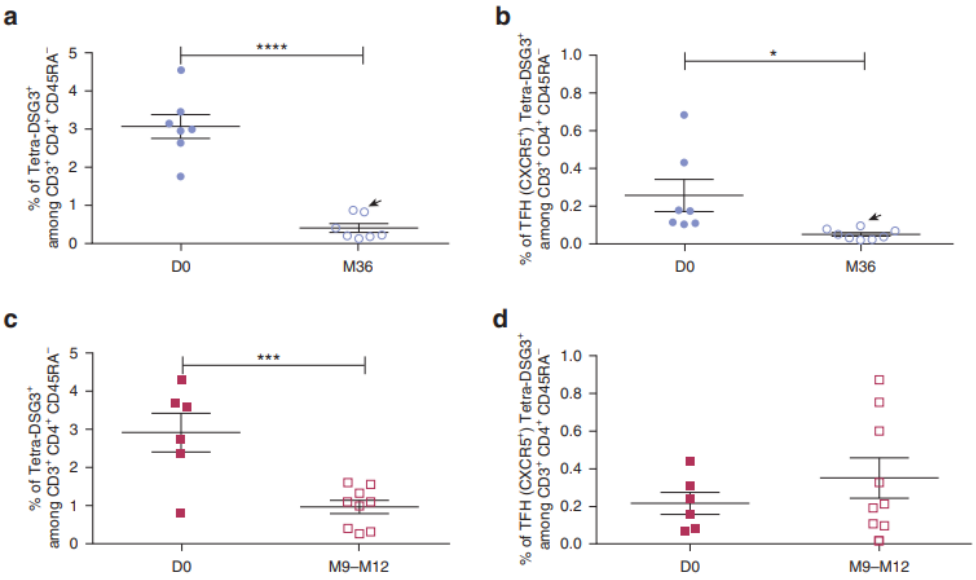


Figure 6. Frequency of peripheral DSG-3−specific T cells and TFH cells evaluated among whole CD4$^+$ T cells in patients with pemphigus at baseline and after treatment. Blue = patients assigned to the RTX group. The one patient with persistent active disease at M36 is identified by an arrow. Red = patients 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 ± 0.06 at baseline vs. 0.35 ± 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$^+$ 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$^-$ 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$^+$ 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$^+$ 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$^+$ 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 $CD4^+$ 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 $ICOS^+$ 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 $CD27^+IgG^+$ 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 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 1×10^5–4×10^5 PBMCs per well to detect anti–DSG-1 and anti–DSG-3 IgG-secreting ASCs and with 2.5×10^3–1×10^4 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.

ORCIDs

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, Gaelle Quereux, Alain Dupuy, Sebastien Debarbieux, Martine Avenel-Audran, Michel D'Incan, Christophe Bedane, Nathalie Bénéton, Denis Jullien, Nicolas Dupin, Laurent Misery, Laurent Machet, Marie Beylot-Barry, Olivier Dereure, 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, 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 follicullar 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, Hebert V, Houivet E, Calbo S, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. Lancet 2017;389:2031–40.

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.

RÉFÉRENCES

Aalberse RC, Dieges PH, Knul-Bretlova V, Vooren P, Aalbers M, van Leeuwen J. IgG4 as a blocking antibody. Clin. Rev. Allergy. 1983a;1(2):289–302

Aalberse RC, Gaag R van der, Leeuwen J van. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. J. Immunol. American Association of Immunologists; 1983b;130(2):722–6

Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. Immunology. 2002;105(1):9–19

Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch. Dermatol. 2009a;145(5):529–35

Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. Arch. Dermatol. 2009b;145(5):529–35

Abdallah F, Mijouin L, Pichon C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. Mediators Inflamm. 2017;2017

Achour A, Simon Q, Mohr A, Séité J-F, Youinou P, Bendaoud B, et al. Human regulatory B cells control the TFH cell response. J. Allergy Clin. Immunol. 2017;140(1):215–22

Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F, Cirillo N, Dmochowski M, Alonso AE, et al. Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. Exp. Dermatol. 2016;25(11):839–46

Ahmed AR, Kaveri S, Spigelman Z. Long-Term Remissions in Recalcitrant Pemphigus Vulgaris. N. Engl. J. Med. 2015;373(27):2693–4

Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, et al. Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. J. Exp. Med. 1993;177(2):419–24

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

Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR. Treatment of Pemphigus Vulgaris with Rituximab and Intravenous Immune Globulin. NEJM. 2009

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell. 2006;124(4):783–801

Akiyama M, Suzuki K, Yamaoka K, Yasuoka H, Takeshita M, Kaneko Y, et al. Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ. 2015;67(9):2476–81

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(6):1074–82

Alice Long S, Buckner JH. CD4+FOXP3+ Treg in human autoimmunity: more than a numbers game. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2011;187(5):2061–6

Al-Jassar C, Bikker H, Overduin M, Chidgey M. Mechanistic Basis of Desmosome-Targeted Diseases. J. Mol. Biol. 2013;425(21):4006–22

Almugairen N, Hospital V, Bedane C, Duvert-Lehembre S, Picard D, Tronquoy A-F, et al. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. J. Am. Acad. Dermatol. 2013;69(4):583–8

Aloulou M, Carr EJ, Gador M, Bignon A, Liblau RS, Fazilleau N, et al. Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. Nat. Commun. 2016;7

Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. J. Dermatol. Sci. 1999;20(2):92–102

Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. J. Am. Acad. Dermatol. 2003;48(2):244–52

Amagai M, Ishii K, Hashimoto T, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. J. Invest. Dermatol. 1995;105(2):243–7

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

Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J. Clin. Invest. 2000;105(5):625–31

Amber KT, Valdebran M, Grando SA. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. Front. Immunol. 2018;9

Andersen MH, Schrama D, thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T Cells. J. Invest. Dermatol. 2006;126(1):32–41

Anderson MS, Su MA. AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. Nat. Rev. Immunol. 2016;16(4):247–58

Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, et al. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. N. Engl. J. Med. 1990;323(25):1729–35

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. Massachusetts Medical Society; 1982;306(20):1189–96

Anhalt GJ, Till GO, Diaz LA, Labib RS, Patel HP, Eaglstein NF. Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 1986;137(9):2835–40

Aoki V, Rivitti EA, Diaz LA, Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. J. Dermatol. 2015;42(1):18–26

Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, Tsunoda K, Iwasaki T, Tanaka S, et al. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. J. Invest. Dermatol. 2006;126(1):105–13

Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, et al. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. Br. J. Dermatol. 2004;151(2):346–54

Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, Hashimoto T. Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. J. Dermatol. Sci. 2009;53(3):228–31

Arin MJ, Engert A, Krieg T, Hunzelmann N. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of pemphigus. Br. J. Dermatol. 2005;153(3):620–5

Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 1993;150(9):3671–80

Arroyo-Villa I, Bautista-Caro M-B, Balsa A, Aguado-Acín P, Bonilla-Hernán M-G, Plasencia C, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicullar helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2014;16(6)

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. 2006a;155(2):330–6

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. 2006b;155(2):330–6

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(10):1129–35

Assaf S, Malki L, Mayer T, Mohamad J, Peled A, Pavlovsky M, et al. ST18 affects cell-cell adhesion in pemphigus vulgaris in a tumour necrosis factor-α-dependent fashion. Br. J. Dermatol. 2021;184(6):1153–60

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

Ayatollahi M, Joubeh S, Mortazavi H, Jefferis R, Ghaderi A. IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 2004a;18(2):241–2

Ayatollahi M, Joubeh S, Mortazavi H, Jefferis R, Ghaderi A. IgG4 as the predominant autoantibody in sera from patients with active state of pemphigus vulgaris. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2004b;18(2):241–2

Ballesteros-Tato A, León B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, et al. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. Immunity. 2012;36(5):847–56

Barnadas MA, Rubiales MV, Gich I, Gelpí C. Usefulness of specific anti-desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunoassay and indirect immunofluorescence in the evaluation of pemphigus activity. Int. J. Dermatol. 2015;54(11):1261–8

Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Nouira R, Jomaa B, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. J. Invest. Dermatol. 1995;104(2):302–5

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

Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, Peserico A, Bordignon M, Baldo V, et al. Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. Clin. Dev. Immunol. 2009;2009:187864

Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006;103(34):12855–60

Berkun Y, Mimouni D, Shoenfeld Y. Pemphigus following hepatitis B vaccination-coincidence or causality? Autoimmunity. 2005;38(2):117–9

Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. Arch. Dermatol. 1995;131(1):48–52

Bhol K, Mohimen A, Ahmed R. Correlation of Subclasses of IgG with Disease Activity in Pemphigus vulgaris. Dermatology. 1994;189(Suppl. 1):85–9

Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995;92(11):5239–43

Bhol KC, Rojas AI, Khan IU, Ahmed AR. Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. Cytokine. 2000;12(7):1076–83

Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity. 2010;32(1):129–40

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009;10(3):207–17

Bluestone JA. Mechanisms of tolerance. Immunol. Rev. 2011;241(1):5–19

Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms. Science. 2002;296(5571):1308–13

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology. 2010;215(7):521–6

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. J. Allergy Clin. Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S33-40

Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. Am. J. Cancer Res. 2012;2(6):676–90

Borradori L, Sonnenberg A. Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. J. Invest. Dermatol. 1999;112(4):411–8

Botta D, Fuller MJ, Marquez-Lago TT, Bachus H, Bradley JE, Weinmann AS, et al. Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. Nat. Immunol. 2017;18(11):1249–60

Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. Eur. J. Immunol. 2010;40(10):2686–91

Boulais N, Misery L. Merkel cells. J. Am. Acad. Dermatol. 2007;57(1):147–65

Boulard C, Duvert Lehembre S, Picard-Dahan C, Kern JS, Zambruno G, Feliciani C, et al. Calculation of cut-off values based on the Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) and Pemphigus Disease Area Index (PDAI) pemphigus scoring systems for defining moderate, significant and extensive types of pemphigus. Br. J. Dermatol. 2016;175(1):142–9

Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, et al. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. J. Am. Acad. Dermatol. 1997;36(1):44–52

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J. Exp. Med. 2000;192(11):1545–52

Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. Annu. Rev. Immunol. 2015;33:257–90

Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. Nat. Rev. Immunol. 2017;17(4):233–47

Camisa C, Helm TN. Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. Arch. Dermatol. 1993;129(7):883–6

Caplan A, Fett N, Rosenbach M, Werth VP, Micheletti RG. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: Ocular, cardiovascular, muscular, and psychiatric side effects and issues unique to pediatric patients. J. Am. Acad. Dermatol. 2017;76(2):201–7

Capon F, Bharkhada J, Cochrane NE, Mortimer NJ, Setterfield JF, Reynaert S, et al. Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. 2006;154(1):67–71

Caproni M, Giomi B, Cardinali C, Salvatore E, Pestelli E, D'Agata A, et al. Further support for a role for Th2-like cytokines in blister formation of pemphigus. Clin. Immunol. Orlando Fla. 2001;98(2):264–71

Cari L, De Rosa F, Nocentini G, Riccardi C. Context-Dependent Effect of Glucocorticoids on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Regulatory T Cells: A Review of the Empirical Evidence and Clinical Applications. Int. J. Mol. Sci. 2019;20(5)

Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam K-P, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. J. Exp. Med. 2005;201(1):35–9

Cauza K, Hinterhuber G, Dingelmaier-Hovorka R, Brugger K, Klosner G, Horvat R, et al. Expression of FcRn, the MHC class I-related receptor for IgG, in human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 2005;124(1):132–9

Chaplin DD. Overview of the Immune Response. J. Allergy Clin. Immunol. 2010a;125(2 Suppl 2):S3-23

Chaplin DD. Overview of the immune response. J. Allergy Clin. Immunol. 2010b;125(2 Suppl 2):S3-23

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2001;44(6):1313–9

Chen Y, Chernyavsky A, Webber RJ, Grando SA, Wang PH. Critical Role of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Pathogenic Action of Antimitochondrial Autoantibodies Synergizing with Anti-desmoglein Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. J. Biol. Chem. 2015;290(39):23826–37

Chen J, Den Z, Koch PJ. Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. J. Cell Sci. 2008;121(17):2844–9

Chen Y, Lin W, Yang H, Wang M, Zhang P, Feng R, et al. Aberrant Expansion and Function of Follicular Helper T Cell Subsets in IgG4-Related Disease. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ. 2018;70(11):1853–65

Chen DM, Odueyungbo A, Csinady E, Gearhart L, Lehane P, Cheu M, et al. Rituximab is an effective treatment in patients with pemphigus vulgaris and demonstrates a steroid-sparing effect. Br. J. Dermatol. 2020;182(5):1111–9

Chen J, Zheng Q, Hammers CM, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Tang H-Y, et al. Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. Cell Rep. 2017a;18(1):237–47

Chen J, Zheng Q, Hammers CM, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Tang H-Y, et al. Proteomic Analysis of Pemphigus Autoantibodies Indicates a Larger, More Diverse, and More Dynamic Repertoire than Determined by B Cell Genetics. Cell Rep. 2017b;18(1):237–47

Chernyavsky A, Amber KT, Agnoletti AF, Wang C, Grando SA. Synergy among non-desmoglein antibodies contributes to the immunopathology of desmoglein antibody–negative pemphigus vulgaris. J. Biol. Chem. 2019;jbc.RA118.006743

Chernyavsky A, Chen Y, Wang PH, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptolysis. Int. Immunopharmacol. 2015;29(1):76–80

Chiossi MPV, Costa RS, Roselino AMF. Dermal dendritic cell number correlates with serum autoantibody titers in Brazilian pemphigus foliaceus patients. Braz. J. Med. Biol. Res. 2004;37(3):337–41

Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, et al. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. Cell Rep. 2019;28(4):909-922.e6

Cho MJ, Ellebrecht CT, Hammers CM, Mukherjee EM, Sapparapu G, Boudreaux CE, et al. Determinants of VH1-46 Cross-Reactivity to Pemphigus Vulgaris Autoantigen Desmoglein 3 and Rotavirus Antigen VP6. J. Immunol. 2016;197(4):1065–73

Cho MJ, Ellebrecht CT, Payne AS. The dual nature of Interleukin-10 in pemphigus vulgaris. Cytokine. 2015;73(2):335–41

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

Choi J-Y, 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. Hoboken NJ. 2015;67(4):988–99

Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, et al. Bcl6 dependent T follicular helper cell differentiation diverges from effector cell differentiation during priming and depends on the gene Icos. Immunity. 2011;34(6):932–46

Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. Nat. Med. 2011;17(8):983–8

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;143(8):1033–8

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

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol. 2013;30(1):30–41

Cirillo N. Desmosome assembly, homeostasis, and desmosomal disease [Internet]. Cell Health Cytoskelet. 2016 [cited 2018 Feb 13].

Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, Diallo A, Blazar BR, Kuchroo VK, et al. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. Nat. Immunol. 2019;20(10):1360–71

Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum. 2006;54(9):2793–806

Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Corre SL, 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. 2013a;5(175):175ra30-175ra30

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. 2013b;5(175):175ra30

Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. Cell. 2006;124(4):815–22

Corneth OBJ, Klein Wolterink RGJ, Hendriks RW. BTK Signaling in B Cell Differentiation and Autoimmunity. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2016;393:67–105

Cosway EJ, Lucas B, James KD, Parnell SM, Carvalho-Gaspar M, White AJ, et al. Redefining thymus medulla specialization for central tolerance. J. Exp. Med. 2017;214(11):3183–95

Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2006;176(6):3498–506

Crofford LJ, Nyhoff LE, Sheehan JH, Kendall PL. The role of Bruton's tyrosine kinase in autoimmunity and implications for therapy. Expert Rev. Clin. Immunol. 2016;12(7):763–73

Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. Immunity. 2014;41(4):529–42

Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. Immunity. 2019;50(5):1132–48

Cui D, Zhang L, Chen J, Zhu M, Hou L, Chen B, et al. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. Clin. Exp. Med. 2015;15(3):285–92

Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Filhio GH, et al. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. J. Autoimmun. 2008;31(4):311–24

Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. J. Natl. Cancer Inst. 2016;108(7):djv439

Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ. 2014;66(8):2037–46

Damiani G, Pacifico A, Pelloni F, Iorizzo M. The first dose of COVID-19 vaccine may trigger pemphigus and bullous pemphigoid flares: is the second dose therefore contraindicated? J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2021;35(10):e645–7

D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, et al. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. Eur. Cytokine Netw. 1997;8(4):383–7

De Simone C, Caldarola G, D'agostino M, Zampetti A, Amerio P, Feliciani C. Exacerbation of pemphigus after influenza vaccination. Clin. Exp. Dermatol. 2008;33(6):718–20

Debes GF, McGettigan SE. Skin-Associated B Cells in Health and Inflammation. J. Immunol. 2019;202(6):1659–66

Deenick EK, Chan A, Ma CS, Gatto D, Schwartzberg PL, Brink R, et al. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. Immunity. 2010;33(2):241–53

Defrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. J. Exp. Med. 1992;175(3):671–82

Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The Desmosome. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009;1(2)

Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. Nature. 1984;311(5988):752–5

Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. Autoimmunity. 2012;45(7):516–26

Diaz LA, Prisayanh P, Qaqish B, Temple BR, Aoki V, Hans-Filho G, et al. A Lutzomyia longipalpis Salivary Protein Induces Cross-Reactive Antibodies to Pemphigus Autoantigen Desmoglein 1. J. Invest. Dermatol. 2020;140(12):2332-2342.e10

Didona D, Di Zenzo G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. Front. Immunol. 2018;9

Du FH, Mills EA, Mao-Draayer Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. Auto- Immun. Highlights. 2017;8(1):12

Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? J. Immunol. 2004;172(6):3422–7

Duong BH, Tian H, Ota T, Completo G, Han S, Vela JL, et al. 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. 2010;207(1):173–87

Duvert-Lehembre S, Joly P. [Autoimmune blistering diseases]. Rev. Med. Interne. 2014;35(3):166–73

Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S. Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. Arch. Dermatol. Res. 2006;298(1):38–45

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 2013;1833(12):3471–80

Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004;1024:138–46

Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. Science. 2016;353(6295):179–84

Ellebrecht CT, Choi EJ, Allman DM, Tsai DE, Wegener WA, Goldenberg DM, et al. Subcutaneous veltuzumab, a humanized anti-CD20 antibody, in the treatment of refractory pemphigus vulgaris. JAMA Dermatol. 2014;150(12):1331–5

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(9):2370–80

Ellebrecht CT, Payne AS. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. JCI Insight. 2017a;2(5):e92021

Ellebrecht CT, Payne AS. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. JCI Insight. 2017b;2(5):e92021

Eming R, Hennerici T, Bäcklund J, Feliciani C, Visconti KC, Willenborg S, et al. Pathogenic IgG Antibodies against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRB1*04:02–Restricted T Cells. J. Immunol. 2014;193(9):4391–9

Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2008a;128(12):2850–8

Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2008b;128(12):2850–8

Enk AH, Hadaschik EN, Eming R, Fierlbeck G, French LE, Girolomoni G, et al. European Guidelines (S1) on the use of high-dose intravenous immunoglobulin in dermatology. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 2016;30(10):1657–69

España A, Diaz LA, Mascaró JM, Giudice GJ, Fairley JA, Till GO, et al. Mechanisms of Acantholysis in Pemphigus Foliaceus. Clin. Immunol. Immunopathol. 1997;85(1):83–9

Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. PloS One. 2011;6(3):e17739

Farb RM, Dykes R, Lazarus GS. Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1978;75(1):459–63

Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. Nat. Rev. Immunol. 2007;7(8):599–609

Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. Nat. Immunol. 2009;10(4):375–84

Feliciani C, Toto P, Pour SM, Coscione G, Amerio P, Amerio P, et al. In Vitro and In Vivo Expression of Interleukin-1α and Tumor Necrosis Factor-α mRNA in Pemphigus Vulgaris: Interleukin-1α and Tumor Necrosis Factor-α are Involved in Acantholysis. J. Invest. Dermatol. 2000;114(1):71–7

Figgett WA, Fairfax K, Vincent FB, Le Page MA, Katik I, Deliyanti D, et al. The TACI receptor regulates T-cell-independent marginal zone B cell responses through innate activation-induced cell death. Immunity. 2013;39(3):573–83

Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat. Immunol. 2002;3(10):944–50

Flemming A. Autoimmune diseases: CAR-T cells take aim at autoimmunity. Nat. Rev. Drug Discov. 2016;15(9):603

Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. Sci. Transl. Med. 2013;5(173):173ra23-173ra23

Franco LM, Gadkari M, Howe KN, Sun J, Kardava L, Kumar P, et al. Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type–dependent transcriptional responses. J. Exp. Med. 2019;216(2):384–406

Fu W, Liu X, Lin X, Feng H, Sun L, Li S, et al. Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. J. Exp. Med. 2018;215(3):815–25

Fuchs E. Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address. Curr. Top. Dev. Biol. 2016;116:357–74

Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O'Leary CE, Payne AS. Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. Br. J. Dermatol. 2012;167(6):1245–53

Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. J. Dermatol. Sci. 2001;26(1):55–61

Gao J, Zhu C, Zhang Y, Sheng Y, Yang F, Wang W, et al. Association Study and Fine-Mapping Major Histocompatibility Complex Analysis of Pemphigus Vulgaris in a Han Chinese Population. J. Invest. Dermatol. 2018;138(11):2307–14

Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, Vries JE de. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J. Exp. Med. 1991;173(3):747–50

Gebhard KL, Veldman CM, Wassmuth R, Schultz E, Schuler G, Hertl M. Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive T-helper (Th) 1 and Th2 cells in patients with pemphigus foliaceus and healthy individuals. Exp. Dermatol. 2005;14(8):586–92

Getsios S, Huen AC, Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5(4):271–81

Giordani L, Sanchez M, Libri I, Quaranta MG, Mattioli B, Viora M. IFN-α amplifies human naïve B cell TLR-9-mediated activation and Ig production. J. Leukoc. Biol. 2009;86(2):261–71

Giordano CN, Sinha AA. Cytokine networks in Pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint. Autoimmunity. 2012;45(6):427–39

Golinski M-L, Demeules M, Derambure C, Riou G, Maho-Vaillant M, Boyer O, et al. CD11c+ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. Front. Immunol. 2020;11:32

Grando SA. Cholinergic control of epidermal cohesion. Exp. Dermatol. 2006;15(4):265–82

Grando SA. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. Autoimmunity. 2011;45(1):7–35

Grando SA, Dahl MV. Activation of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors reverses pemphigus acantholysis. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 1993;2(2):72–86

Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: New Perspectives on a Classic. J. Invest. Dermatol. 2007;127(11):2499–515

Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 2002;109(1):59–68

Gu P, Gao JF, D'Souza CA, Kowalczyk A, Chou K-Y, Zhang L. Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells. Cell. Mol. Immunol. 2012;9(2):136–46

Hahne M, Renno T, Schroeter M, Irmler M, French L, Bornard T, et al. Activated B cells express functional Fas ligand. Eur. J. Immunol. 1996;26(3):721–4

Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Bröcker EB, Zillikens D. Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 2002;16(1):68–71

Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, et al. Persistence of Anti-Desmoglein 3 IgG+ B-Cell Clones in Pemphigus Patients Over Years. J. Invest. Dermatol. 2015a;135(3):742–9

Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, et al. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. J. Invest. Dermatol. 2015b;135(3):742–9

Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. Annu. Rev. Pathol. 2016;11:175–97

Hammers CM, Tang H-Y, Chen J, Emtenani S, Zheng Q, Stanley JR. Research Techniques Made Simple: Mass Spectrometry for Analysis of Proteins in Dermatological Research. J. Invest. Dermatol. 2018;138(6):1236–42

Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. J. Dermatol. Sci. 2015;77(2):85–92

Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti E, Eaton DP, Lin MS, Diaz LA. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)--1998. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Clin. Dermatol. 1999;17(2):225–35

Harman KE, Gratian MJ, Shirlaw PJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The transition of pemphigus vulgaris into pemphigus foliaceus: a reflection of changing desmoglein 1 and 3 autoantibody levels in pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. 2002;146(4):684–7

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat. Immunol. 2005;6(11):1123–32

Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat. Immunol. 2000;1(6):475–82

Hashimoto T. Immunopathology of IgA pemphigus. Clin. Dermatol. 2001;19(6):683–9

Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MA, Garrod DR, et al. Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. J. Invest. Dermatol. 1997;109(2):127–31

Hatzfeld M, Wolf A, Keil R. Plakophilins in Desmosomal Adhesion and Signaling. Cell Commun. Adhes. 2014;21(1):25–42

Hayashi M, Yanaba K, Umezawa Y, Yoshihara Y, Kikuchi S, Ishiuji Y, et al. IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with psoriasis. J. Dermatol. Sci. 2016;81(2):93–100

Hébert V, Boulard C, Houivet E, Duvert Lehembre S, Borradori L, Della Torre R, et al. Large International Validation of ABSIS and PDAI Pemphigus Severity Scores. J. Invest. Dermatol. 2019;139(1):31–7

Hebert V, Joly P. Rituximab in pemphigus. Immunotherapy. 2017;10(1):27–37

Hébert V, Maho-Vaillant M, Golinski M-L, Petit M, Riou G, Boyer O, et al. Modifications of the BAFF/BAFF-Receptor Axis in Patients With Pemphigus Treated With Rituximab Versus Standard Corticosteroid Regimen. Front. Immunol. Frontiers; 2021;12 Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.666022/full?&utm_source=Email_to_authors_&utm_medium=Email&utm_content=T1_11.5e1_author&utm_campaign=Email_publication&field=&journalName=Frontiers_in_Immunology&id=666022

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(2) Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752242/

Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI. Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. J. Invest. Dermatol. 1998a;110(1):62–6

Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. J. Clin. Invest. 2006;116(5):1159–66

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

Hertl M, Karr RW, Amagai M, Katz SI. Heterogeneous MHC II Restriction Pattern of Autoreactive Desmoglein 3 Specific T Cell Responses in Pemphigus Vulgaris Patients and Normals. J. Invest. Dermatol. 1998b;110(4):388–92

Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 2009;9(3):195–205

Holstein J, Solimani F, Baum C, Meier K, Pollmann R, Didona D, et al. Immunophenotyping in pemphigus reveals a TH17/TFH17 cell-dominated immune response promoting desmoglein1/3-specific autoantibody production. J. Allergy Clin. Immunol. 2021;147(6):2358–69

Hsieh C-S, Lee H-M, Lio C-WJ. Selection of regulatory T cells in the thymus. Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group; 2012;12(3):157–67

Hu CH, Michel B, Schiltz JR. Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. Am. J. Pathol. 1978;90(2):345–61

Huang A, Cheng L, He M, Nie J, Wang J, Jiang K. Interleukin-35 on B cell and T cell induction and regulation. J. Inflamm. Lond. Engl. 2017;14

Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. J. Invest. Dermatol. 2016;136(12):2495–8

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M. In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2005;124(5):939–46

Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR. Isolation of pathogenic monoclonal anti-desmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies. J. Invest. Dermatol. 2008;128(4):939–48

Ishii N, Teye K, Fukuda S, Uehara R, Hachiya T, Koga H, et al. Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. Br. J. Dermatol. 2015;173(1):59–68

Ito Y, Makita S, Maeshima AM, Hatta S, Suzuki T, Yuda S, et al. Paraneoplastic Pemphigus Associated with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Treated with Ibrutinib and Rituximab. Intern. Med. Tokyo Jpn. 2018;57(16):2395–8

Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood. 2011;117(2):530–41

Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, et al. CD19, a Response Regulator of B Lymphocytes, Regulates Wound Healing through Hyaluronan-Induced TLR4 Signaling. Am. J. Pathol. 2009;175(2):649–60

Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. Int. J. Dermatol. 1975;14(5):353–9

Janeway CA, Ron J, Katz ME. The B cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 1987;138(4):1051–5

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 1998;160(7):3555–61

Jelti L, Cordel N, Gillibert A, Lacour J-P, Uthurriague C, Doutre M-S, et al. Incidence and Mortality of Pemphigus in France. J. Invest. Dermatol. 2019a;139(2):469–73

Jelti L, Prost-Squarcioni C, Ingen-Housz-Oro S, Caux F, Bernard P, Bedane C, et al. [Update of the French recommendations for the management of pemphigus]. Ann. Dermatol. Venereol. 2019b;146(4):279–86

Johnson JL, Najor NA, Green KJ. Desmosomes: Regulators of Cellular Signaling and Adhesion in Epidermal Health and Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2014;4(11)

Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, Lee H-E, Chua M, Diaz LA, et al. p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis. J. Biol. Chem. 2010;285(12):8936–41

Joly P. Pemphigus paranéoplasique. Médecine Thérapeutique. 1997;3(9):705–8

Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). Clin. Dermatol. 2011;29(4):432–6

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

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. 2017b;389(10083):2031–40

Joly P, Mouquet H, Roujeau J-C, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. N. Engl. J. Med. 2007;357(6):545–52

Joly P, Thomine E, Gilbert D, Verdier S, Delpech A, Prost C, et al. Overlapping Distribution of Autoantibody Specificities in Paraneoplastic Pemphigus and Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. 1994;103(1):65–72

Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. J. Clin. Immunol. 1988;8(1):43–9

Jones SA, Perera DN, Fan H, Russ BE, Harris J, Morand EF. GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation. J. Autoimmun. 2015;61:73–80

de Jongh GJ, Zeeuwen PLJM, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W, et al. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. 2005;125(6):1163–73

Jung S. Good, bad and beautiful—the role of dendritic cells in autoimmunity. Autoimmun. Rev. 2004;3(1):54–60

Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. Cell. 2004;116(2):299–311

Kabuto M, Fujimoto N, Takahashi T, Tanaka T. Decreased level of interleukin-10-producing B cells in patients with pemphigus but not in patients with pemphigoid. Br. J. Dermatol. 2017;176(5):1204–12

Kabuto M, Fujimoto N, Tanaka T. Increase of interleukin-10-producing B cells associated with long-term remission after i.v. immunoglobulin treatment for pemphigus. J. Dermatol. 2016;43(7):815–8

Kalantari-Dehaghi M, Anhalt GJ, Camilleri MJ, Chernyavsky AI, Chun S, Felgner PL, et al. Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. PLoS ONE. 2013a;8(3)

Kalantari-Dehaghi M, Chen Y, Deng W, Chernyavsky A, Marchenko S, Wang PH, et al. Mechanisms of Mitochondrial Damage in Keratinocytes by Pemphigus Vulgaris Antibodies. J. Biol. Chem. 2013c;288(23):16916–25

Kalantari-Dehaghi M, Molina DM, Farhadieh M, Morrow WJ, Liang X, Felgner PL, et al. New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. Exp. Dermatol. 2011;20(2):154–6

Kamhieh-Milz J, Ghosoun N, Sterzer V, Salama A. Effect of glucocorticoid treatment on BAFF and APRIL expression in patients with immune thrombocytopenia (ITP). Clin. Immunol. Orlando Fla. 2018;188:74–80

Karlin L, Coiffier B. Ofatumumab in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas. Expert Opin. Biol. Ther. Taylor & Francis; 2015;15(7):1085–91

Karnowski A, Chevrier S, Belz GT, Mount A, Emslie D, D'Costa K, et al. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. J. Exp. Med. 2012;209(11):2049–64

Kárpáti S, Amagai M, Liu WL, Dmochowski M, Hashimoto T, Horváth A. Identification of desmoglein 1 as autoantigen in a patient with intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis type of IgA pemphigus. Exp. Dermatol. 2000;9(3):224–8

Karray M, Badri T. Pemphigus, Herpetiformis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [cited 2018 Apr 29].

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. Nat. Rev. Dis. Primer. 2017a;3:17026

Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. Nat. Rev. Dis. Primer. 2016;2:16039

Kawasaki H, Tsunoda K, Hata T, Ishii K, Yamada T, Amagai M. Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. J. Invest. Dermatol. 2006;126(12):2621–30

Kaye A, Gordon SC, Deverapalli SC, Her MJ, Rosmarin D. Dupilumab for the Treatment of Recalcitrant Bullous Pemphigoid. JAMA Dermatol. 2018;154(10):1225–6

Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. Autoimmun. Rev. 2012;11(9):670–7

Keymeulen AV, Mascre G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, Geest ND, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. J. Cell Biol. 2009;187(1):91–100

Khan U, Ghazanfar H. Chapter Three - T Lymphocytes and Autoimmunity. In: Galluzzi L, Rudqvist N-P, editors. Int. Rev. Cell Mol. Biol. Academic Press; 2018. p. 125–68

Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1^{hi} B cells are critical regulators of humoral immunity. Nat. Commun. 2015;6:5997

Kim TH, Choi Y, Lee SE, Lim JM, Kim S-C. Adjuvant rituximab treatment for pemphigus: A retrospective study of 45 patients at a single center with long-term follow up. J. Dermatol. 2017;44(6):615–20

Kim S-C, Chung YL, Kim J, Cho NJ, Amagai M. Pemphigus vulgaris with autoantibodies to desmoplakin. Br. J. Dermatol. 2001;145(5):838–40

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. 2020b;146(5):1070-1079

Kim JH, Kim YH, Kim MR, Kim S-C. Clinical efficacy of different doses of rituximab in the treatment of pemphigus: a retrospective study of 27 patients. Br. J. Dermatol. 2011;165(3):646–51

Kim SJ, Lee K, Diamond B. Follicular Helper T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. Front. Immunol. 2018;9

Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. Cell. 2003;113(2):249–60

Kneisel Andrea, Hertl Michael. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2011;9(11):927–47

Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. J. Cell Biol. 1997;137(5):1091–102

Korang K, Ghohestani R, Krieg T, Uitto J, Hunzelmann N. Exacerbation of pemphigus foliaceus after tetanus vaccination accompanied by synthesis of auto-antibodies against paraneoplastic pemphigus antigens. Acta Derm. Venereol. 2002;82(6):482–3

Korman NJ, Eyre RW, Zone J, Stanley JR. Drug-induced pemphigus: autoantibodies directed against the pemphigus antigen complexes are present in penicillamine and captopril-induced pemphigus. J. Invest. Dermatol. 1991;96(2):273–6

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;(gfaa117)

Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. 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. 2000;143(2):337–42

Kridin K. Subepidermal autoimmune bullous diseases: overview, epidemiology, and associations. Immunol. Res. 2018a;66(1):6–17

Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. Immunol. Res. 2018b;66(2):255–70

Kridin K. Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris. Ther. Clin. Risk Manag. 2018c;14:757–78

Kridin K, Sagi SZ, Bergman R. Mortality and Cause of Death in Patients with Pemphigus. Acta Derm. Venereol. 2017;97(5):607–11

Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. Front. Physiol. 2018;9

Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. Annu. Rev. Immunol. 2006;24:571–606

Lakshmi MJD, Jaisankar TJ, Rajappa M, Thappa DM, Chandrashekar L, Divyapriya D, et al. Correlation of antimuscarinic acetylcholine receptor antibody titers and antidesmoglein antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus. J. Am. Acad. Dermatol. 2017;76(5):895–902

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

Langenhan J, Dworschak J, Saschenbrecker S, Komorowski L, Schlumberger W, Stöcker W, et al. Specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus requires the entire ectodomains of desmogleins. Exp. Dermatol. 2014;23(4):253–9

Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med. 1868;44(2–3):325–37

Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. Nature. 1985;314(6011):537–9

Le Borgne M, Dubois B, Kaiserlian D. [Dendritic cells of mucosa and skin: “recruited for vaccination”]. Med. Sci. MS. 2007;23(10):819–25

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

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 2008;112(5):1570–80

Lee SH, Hong WJ, Kim S-C. Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus. Ann. Dermatol. 2017;29(4):438–45

Lee J, Lundgren DK, Mao X, Manfredo-Vieira S, Nunez-Cruz S, Williams EF, et al. Antigen-specific B cell depletion for precision therapy of mucosal pemphigus vulgaris. J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation; 2020;130(12):6317–24

Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. J. Autoimmun. 2011;36(3):228–38

Leung CL, Green KJ, Liem RKH. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. Trends Cell Biol. 2002;12(1):37–45

Li Y, Wei C, Xu H, Jia J, Wei Z, Guo R, et al. The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. Mediators Inflamm. 2018a;2018

Li S, Zhang Q, Wang P, Li J, Ni J, Wu J, et al. Association between HLA-DQB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: A meta-analysis. Immunol. Invest. 2018b;47(1):101–12

Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, et al. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. J. Clin. Invest. 2005;115(12):3440–50

Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat. Rev. Immunol. 2003;3(5):361–70

Lin W, Cerny D, Chua E, Duan K, Yi JTJ, Shadan NB, et al. Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2014;193(5):2258–66

Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3$^+$ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat. Med. 2011a;17(8):975–82

Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat. Med. 2011b;17(8):975–82

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. 2002;3(9):822–9

Lo AS, Mao X, Mukherjee EM, Ellebrecht CT, Yu X, Posner MR, et al. Pathogenicity and Epitope Characteristics Do Not Differ in IgG Subclass-Switched Anti-Desmoglein 3 IgG1 and IgG4 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. PLOS ONE. 2016;11(6):e0156800

Long KB, Young RM, Boesteanu AC, Davis MM, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. CAR T Cell Therapy of Non-hematopoietic Malignancies: Detours on the Road to Clinical Success. Front. Immunol. 2018;9:2740

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. Clin. Dev. Immunol. 2012;2012

Lunardon L, Payne AS. Inhibitory human anti-chimeric antibodies to rituximab in a pemphigus patient. J. Allergy Clin. Immunol. 2012;130(3):800–3

Lunardon L, Tsai KJ, Propert KJ, Fett N, Stanley JR, Werth VP, et al. Adjuvant Rituximab Therapy of Pemphigus: A Single-Center Experience With 31 Patients. Arch. Dermatol. 2012;148(9):1031–6

Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4$^+$ T cell immunity. Nat. Rev. Immunol. 2010;10(4):236–47

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 2002;23(9):445–9

Lykhmus O, Gergalova G, Koval L, Zhmak M, Komisarenko S, Skok M. Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathways of apoptosis induction. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014;53:246–52

Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. J. Exp. Med. 2012;209(7):1241–53

Macauley MS, Pfrengle F, Rademacher C, Nycholat CM, Gale AJ, von Drygalski A, et al. Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. J. Clin. Invest. 2013;123(7):3074–83

Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu. Rev. Immunol. 2003;21:231–64

Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J. Clin. Invest. 1999;103(4):461–8

Maho-Vaillant M, Perals C, Golinski M-L, Hébert V, Caillot F, Mignard C, et al. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. J. Invest. Dermatol. 2021;

Maloney DG. Anti-CD20 Antibody Therapy for B-Cell Lymphomas. N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society; 2012;366(21):2008–16

Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of action and resistance. Semin. Oncol. 2002;29(1S2):2–9

Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. Annu. Rev. Immunol. 2004;23(1):367–86

Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, et al. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. Am. J. Pathol. 2010;177(6):2724–30

Mao X, Sano Y, Park JM, Payne AS. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. J. Biol. Chem. 2011;286(2):1283–91

Marchenko S, Chernyavsky AI, Arredondo J, Gindi V, Grando SA. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. J. Biol. Chem. 2010;285(6):3695–704

Masson A de, Bouaziz J-D, Buanec HL, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24hiCD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood. 2015;125(11):1830–9

Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. Immunity. 2004;20(5):509–16

Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Immunity. 2014;41(6):1040–51

Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. Annu. Rev. Immunol. 2012;30(1):221–41

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat. Rev. Immunol. 2004;4(10):762–74

Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. Immunity. 2016;44(3):683–97

Meyersburg D, Schmidt E, Kasperkiewicz M, Zillikens D. Immunoadsorption in Dermatology. Ther. Apher. Dial. 2012;16(4):311–20

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;

Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. J. Cell. Mol. Med. 2007;11(3):462–81

Mintz EM, Morel KD. Clinical features, diagnosis, and pathogenesis of chronic bullous disease of childhood. Dermatol. Clin. 2011;29(3):459–62, ix

Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim H-J, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010;107(32):14292–7

Moll I, Roessler M, Brandner JM, Eispert A-C, Houdek P, Moll R. Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. Eur. J. Cell Biol. 2005;84(2–3):259–71

Morell-Dubois S, Carpentier O, Cottencin O, Queyrel V, Hachulla E, Hatron P-Y, et al. Stressful life events and pemphigus. Dermatol. Basel Switz. 2008;216(2):104–8

Morini JP, Jomaa B, Gorgi Y, Saguem MH, Nouira R, Roujeau JC, et al. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. Arch. Dermatol. 1993;129(1):69–73

Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. Immunity. 2011;34(1):108–21

Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers J-O, Youinou P, Jamin C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. Blood. 2012;119(1):106–14

Mostoslavsky R, Alt FW, Rajewsky K. The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion Mechanism. Cell. 2004;118(5):539–44

Mouquet H, Berrih-Aknin S, Bismuth J, Joly P, Gilbert D, Tron F. Expression of pemphigus-autoantigen desmoglein 1 in human thymus. Tissue Antigens. 2008a;71(5):464–70

Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L, Jacquot S, Lemercier B, Lim A, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. J. Invest. Dermatol. 2008b;128(12):2859–69

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell. 2000;102(5):553–63

Musette P, Bouaziz JD. B Cell Modulation Strategies in Autoimmune Diseases: New Concepts. Front. Immunol. 2018;9:622

Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O, et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. Clin. Immunol. Orlando Fla. 2010a;134(3):320–30

Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O, et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. Clin. Immunol. Orlando Fla. 2010b;134(3):320–30

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

Nakahara T, Takagi A, Yamagami J, Kamiya K, Aoyama Y, Iwatsuki K, et al. High anti–desmoglein 3 antibody ELISA index and negative indirect immunofluorescence result in a patient with pemphigus vulgaris in remission: evaluation of the antibody profile by newly developed methods. JAMA Dermatol. 2014;150(12):1327–30

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood. 2001;97(1):198–204

Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. Trends Cell Biol. 2013;23(11):537–46

Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat. Rev. Immunol. 2017a;17(5):281–94

Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 2009;9(10):679–91

Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grando SA. Pemphigus Vulgaris IgG and Methylprednisolone Exhibit Reciprocal Effects on Keratinocytes. J. Biol. Chem. 2004;279(3):2135–46

Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Novel Human α9 Acetylcholine Receptor Regulating Keratinocyte Adhesion is Targeted by Pemphigus Vulgaris Autoimmunity. Am. J. Pathol. 2000a;157(4):1377–91

Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris–like lesions. J. Clin. Invest. 2000b;106(12):1467–79

Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. J. Clin. Invest. 2000c;106(12):1467–79

Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. Immunol. Today. 1994;15(10):464–9

Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. Steroids. 2010;75(1):1

Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. Detection of Antigen-Specific B Cells in Patients with Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay: Requirement of T Cell Collaboration for Autoantibody Production. J. Invest. Dermatol. 2000;114(1):88–94

Noske K. Secreted immunoregulatory proteins in the skin. J. Dermatol. Sci. 2018;89(1):3–10

Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-β/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. J. Autoimmun. 2015;59:53–60

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. J. Exp. Med. 2004;199(1):91–8

Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, et al. Immunologic and histopathologic characterization of an active disease mouse model for pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2002;118(1):199–204

Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors (TLRs). Exp. Dermatol. 2010;19(8):e314–6

Oleinika K, Mauri C, Salama AD. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. Nat. Rev. Nephrol. 2019;15(1):11

Ono S, Kabashima K. Novel insights into the role of immune cells in skin and inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT). Allergo J. Int. 2015;24:170–9

O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science. 2010;327(5969):1098–102

Otten JV, Hashimoto T, Hertl M, Payne AS, Sitaru C. Molecular Diagnosis in Autoimmune Skin Blistering Conditions. Curr. Mol. Med. 2014;14(1):69–95

Oursler JR, Labib RS, Ariss-Abdo L, Burke T, O'Keefe EJ, Anhalt GJ. Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. J. Clin. Invest. 1992;89(6):1775–82

Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. Nat. Rev. Immunol. 2003;3(5):383–91

Pan M, Zhu H, Xu R. Immune cellular regulation on autoantibody production in pemphigus. J. Dermatol. 42(1):11–7

Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. Cell. 2002;109 Suppl:S35-44

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet Lond. Engl. 2001;357(9270):1777–89

Patakas A, Benson RA, Withers DR, Conigliaro P, McInnes IB, Brewer JM, et al. Th17 Effector Cells Support B Cell Responses Outside of Germinal Centres. PLOS ONE. 2012;7(11):e49715

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

Payne AS, Ishii K, Kacir S, Lin C, Li H, Hanakawa Y, et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. J. Clin. Invest. 2005;115(4):888–99

Pène J, Gauchat J-F, Lécart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells. J. Immunol. 2004;172(9):5154–7

Perniola R. Twenty Years of AIRE. Front. Immunol. Frontiers; 2018;9

Petzelbauer P, Födinger D, Rappersberger K, Volc-Platzer B, Wolff K. CD68 Positive Epidermal Dendritic Cells. J. Invest. Dermatol. 1993;101(3):256–61

Petzl-Erler ML, Santamaria J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? Tissue Antigens. 1989;33(3):408–14

Picut C, Meunier J, Lee C, Lewis R. Expression of HLA-DR and OKT6 antigens on keratinocytes and dendritic cells in pemphigus. Arch. Dermatol. Res. 1987;279(8):516–20

Pitkänen J, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. Genes Immun. Nature Publishing Group; 2003;4(1):12–21

Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. Drugs. 2003;63(8):803–43

Pollmann R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2018;54(1):1–25

Porro AM, Caetano L de VN, Maehara L de SN, Enokihara MM dos S. Non-classical forms of pemphigus: pemphigus herpetiformis, IgA pemphigus, paraneoplastic pemphigus and IgG/IgA pemphigus. An. Bras. Dermatol. 2014;89(1):96–106

Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993;90(8):3730–4

Qian Y, Diaz LA, Ye J, Clarke SH. Dissecting the Anti-Desmoglein Autoreactive B Cell Repertoire in Pemphigus Vulgaris Patients. J. Immunol. 2007;178(9):5982–90

Qian Y, Jeong JS, Maldonado M, Valenzuela JG, Gomes R, Teixeira C, et al. Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2012;189(4):1535–9

Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. J. Exp. Med. 1993;177(4):1165–73

Rafei D, Müller R, Ishii N, Llamazares M, Hashimoto T, Hertl M, et al. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. Am. J. Pathol. 2011;178(2):718–23

Rapp M, Pentland A, Richardson C. Successful Treatment of Pemphigus Vulgaris With Ofatumumab. J. Drugs Dermatol. JDD. 2018;17(12):1338–9

Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered B cell signalling in autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. 2017;17(7):421

Ray JP, Marshall HD, Laidlaw BJ, Staron MM, Kaech SM, Craft J. Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. Immunity. 2014;40(3):367–77

Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994;83(2):435–45

Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV. Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease. Immunol. Rev. 2011;244(1):115–33

Riley JK, Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. Semin. Oncol. 2000;27(6 Suppl 12):17–24

Rizzo C, Fotino M, Zhang Y, Chow S, Spizuoco A, Sinha AA. Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. Clin. Exp. Dermatol. 2005;30(5):535–40

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). N. Engl. J. Med. 1989a;320(22):1463–9

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). N. Engl. J. Med. 1989b;320(22):1463–9

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol. Rev. 2006;212:28–50

de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. Eur. J. Immunol. 2004;34(9):2480–8

Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. J. Invest. Dermatol. 1985;85(6):538–41

Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1β and interleukin-6 production. Nat. Med. 2014;20(11):1334–9

Rowland SL, Leahy KF, Halverson R, Torres RM, Pelanda R. BAFF-R signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2010;185(8):4570–81

Ruocco V, Ruocco E, Caccavale S, Gambardella A, Lo Schiavo A. Pemphigus vegetans of the folds (intertriginous areas). Clin. Dermatol. 2015;33(4):471–6

Sabouri Z, Schofield P, Horikawa K, Spierings E, Kipling D, Randall KL, 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. 2014;111(25):E2567-2575

Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. Immunity. 2014;41(6):1026–39

Sage PT, Ron-Harel N, Juneja VR, Sen DR, Maleri S, Sungnak W, et al. Suppression by T FR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. Nat. Immunol. 2016;17(12):1436–46

Saito M, Stahley SN, Caughman CY, Mao X, Tucker DK, Payne AS, et al. Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. PLoS ONE. 2012;7(12)

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat. Rev. Immunol. 2010;10(7):490–500

Salter AI, Pont MJ, Riddell SR. Chimeric antigen receptor-modified T cells: CD19 and the road beyond. Blood. 2018;131(24):2621–9

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

Sandel PC, Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. Immunity. 1999;10(3):289–99

Santi CG, Sotto MN. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J. Am. Acad. Dermatol. 2001;44(3):446–50

Sarig O, Bercovici S, Zoller L, Goldberg I, Indelman M, Nahum S, et al. Population-specific association between a polymorphic variant in ST18, encoding a pro-apoptotic molecule, and pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2012;132(7):1798–805

Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A. Involvement of TH1/TH2 Cytokines in the Pathogenesis of Autoimmune Skin Disease—Pemphigus Vulgaris. Immunol. Invest. 2009;38(6):498–509

Schiltz JR, Michel B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. J. Invest. Dermatol. 1976;67(2):254–60

Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. Exp. Dermatol. 2010;19(5):458–63

Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. The Lancet. Elsevier; 2019;394(10201):882–94

Schmidt T, Solimani F, Pollmann R, Stein R, Schmidt A, Stulberg I, et al. TH1/TH17 cell recognition of desmoglein 3 and bullous pemphigoid antigen 180 in patients with lichen planus. J. Allergy Clin. Immunol. 2018;142(2):669-672.e7

Schmidt T, Willenborg S, Hünig T, Deeg CA, Sonderstrup G, Hertl M, et al. Induction of T regulatory cells by the superagonistic anti-CD28 antibody D665 leads to decreased pathogenic IgG autoantibodies against desmoglein 3 in a HLA-transgenic mouse model of pemphigus vulgaris. Exp. Dermatol. 2016a;25(4):293–8

Schmidt T, Willenborg S, Hünig T, Deeg CA, Sonderstrup G, Hertl M, et al. Induction of T regulatory cells by the superagonistic anti-CD28 antibody D665 leads to decreased pathogenic IgG autoantibodies against desmoglein 3 in a HLA-transgenic mouse model of pemphigus vulgaris. Exp. Dermatol. 2016b;25(4):293–8

Schmitt N, Bentebibel S-E, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends Immunol. 2014;35(9):436–42

Schneider P, Tschopp J. BAFF and the regulation of B cell survival. Immunol. Lett. 2003;88(1):57–62

Schulze K, Galichet A, Sayar BS, Scothern A, Howald D, Zymann H, et al. An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2012;132(2):346–55

Schwartz RH. T Cell Anergy. Annu. Rev. Immunol. 2003;21(1):305–34

Sesarman A, Vidarsson G, Sitaru C. The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases. Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 2010;67(15):2533–50

Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. Immunity. 2003;18(2):279–88

Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. Nat. Rev. Immunol. 2015;15(7):441–51

Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2010;62(1):234–44

Skogberg G, Lundberg V, Berglund M, Gudmundsdottir J, Telemo E, Lindgren S, et al. Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. Immunol. Cell Biol. 2015;93(8):727–34

Solimani F, Mansour Y, Didona D, Dilling A, Ghoreschi K, Meier K. Development of severe pemphigus vulgaris following SARS-CoV-2 vaccination with BNT162b2. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV. 2021;35(10):e649–51

Someya T, Amagai M. Toward a new generation of smart skins. Nat. Biotechnol. 2019;37(4):382–8

Søndergaard K, Carstens J, Zachariae H. The Steroid-Sparing Effect of Long-Term Plasmapheresis in Pemphigus: An Update. Ther. Apher. 1997;1(2):155–8

Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. Br. J. Dermatol. 2001;144(6):1183–8

Spindler V, Eming R, Schmidt E, Amagai M, Grando S, Jonkman MF, et al. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. J. Invest. Dermatol. 2018;138(1):32–7

Spindler V, Heupel W-M, Efthymiadis A, Schmidt E, Eming R, Rankl C, et al. Desmocollin 3-mediated Binding Is Crucial for Keratinocyte Cohesion and Is Impaired in Pemphigus*. J. Biol. Chem. 2009;284(44):30556–64

Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. Nat. Rev. Rheumatol. 2008;4(10):525–33

Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, Bullous Impetigo, and the Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. N. Engl. J. Med. 2006;355(17):1800–10

Stanley JR, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D. Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. J. Clin. Invest. 1988;82(6):1864–70

Stern JNH, Keskin DB, Barteneva N, Zuniga J, Yunis EJ, Ahmed AR. Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris − preliminary observations. Clin. Exp. Immunol. 2008;152(3):472–81

Stohl W. Inhibition of B cell activating factor (BAFF) in the management of systemic lupus erythematosus (SLE). Expert Rev. Clin. Immunol. 2017;13(6):623–33

Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. N. Engl. J. Med. 2010;363(3):221–32

Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, et al. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. Dermatol. Basel Switz. 2007;214(3):210–20

Szatmari I, Nagy L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. EMBO J. 2008;27(18):2353–62

Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, Fujii Y, Kawakami Y, Kuwana M. Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2008;181(2):1526–35

Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, et al. T Helper Type 2-Biased Natural Killer Cell Phenotype in Patients with Pemphigus Vulgaris. J. Invest. Dermatol. 2007;127(2):324–30

Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, et al. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J. Clin. Invest. 2011;121(9):3677–88

Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A Single Helper T Cell Clone Is Sufficient to Commit Polyclonal Naive B Cells to Produce Pathogenic IgG in Experimental Pemphigus Vulgaris. J. Immunol. 2009;182(3):1740–5

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010;140(6):805–20

Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. Nat. Rev. Immunol. 2013;13(6):412–26

Tan-Lim R, Bystryn J-C. Effect of plasmapheresis therapy on circulating levels of pemphigus antibodies. J. Am. Acad. Dermatol. 1990;22(1):35–40

Teng YKO, Bruce IN, Diamond B, Furie RA, Vollenhoven RF van, 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. British Medical Journal Publishing Group; 2019;9(3):e025687

Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. Nat. Immunol. 2017;18(7):716–24

Thongprasom K, Pengpis N, Phattarataratip E, Samaranayake L. Oral pemphigus after COVID-19 vaccination. Oral Dis.

Timoteo RP, da Silva MV, Miguel CB, Silva DAA, Catarino JDS, Rodrigues Junior V, et al. Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. Mediators Inflamm. 2017;2017:7151285

Tobin DJ. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. Chem. Soc. Rev. 2006;35(1):52–67

Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983;302(5909):575–81

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

Tron F, Gilbert D, Joly P, Mouquet H, Drouot L, Ayed MB, et al. Immunogenetics of pemphigus: An update. Autoimmunity. 2006;39(7):531–9

Trouvin A-P, Jacquot S, Grigioni S, Curis E, Dedreux I, Roucheux A, et al. Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study. Clin. Exp. Immunol. 2015;180(1):11–8

Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, et al. Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. Arthritis Res. Ther. 2012;14(4):R171

Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2003a;170(4):2170–8

Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2003b;170(4):2170–8

Tsuruta D, Hashimoto T, Hamill KJ, Jones JCR. Hemidesmosomes and focal contact proteins: Functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. J. Dermatol. Sci. 2011;62(1):1–7

Tufano MA, Baroni A, Buommino E, Ruocco E, Lombardi ML, Ruocco V. Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. Br. J. Dermatol. 1999;141(6):1033–9

Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. Nat. Immunol. 2015;16(2):142–52

Ulrichts P, Guglietta A, Dreier T, van Bragt T, Hanssens V, Hofman E, et al. Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. J. Clin. Invest. 2018;128(10):4372–86

Valladeau J. [Langerhans cells]. Med. Sci. MS. 2006;22(2):144–8

Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. Cytokine. 2015;74(2):318–26

van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. J. Allergy Clin. Immunol. 2013;131(4):1204–12

Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grötzinger J, Schultz E, et al. T Cell Recognition of Desmoglein 3 Peptides in Patients with Pemphigus Vulgaris and Healthy Individuals. J. Immunol. 2004a;172(6):3883–92

Veldman C, Höhne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2004b;172(10):6468–75

Veldman C, Nagel A, Hertl M. Type I Regulatory T Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. 2006;140(2):174–83

Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2003;170(1):635–42

Vidal-Crespo A, Rodriguez V, Matas-Cespedes A, Lee E, Rivas-Delgado A, Giné E, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor CC-292 shows activity in mantle cell lymphoma and synergizes with lenalidomide and NIK inhibitors depending on nuclear factor-κB mutational status. Haematologica. 2017;102(11):e447–51

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group; 2008;8(7):523–32

Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. Cytokine Growth Factor Rev. 2013;24(3):203–15

Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. Front. Med. 2018;5

Wallach D, Cottenot F, Pelbois G, Cavelier B, Didierjean L, Saurat J-H. Subcorneal pustular dermatosis and monoclonal IgA. Br. J. Dermatol. 1982;107(2):229–34

Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. J. Cell Commun. Signal. 2016;10(3):191–6

Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol. 2017;10(1):53

Wang L, Zhao P, Ma L, Shan Y, Jiang Z, Wang J, et al. Increased Interleukin 21 and Follicular Helper T-like Cells and Reduced Interleukin 10+ B cells in Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus. J. Rheumatol. 2014;41(9):1781–92

Warren SJP, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qaqish BF, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. J. Invest. Dermatol. 2003;120(1):104–8

Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. N. Engl. J. Med. 2000;343(1):23–30

Wegner A. Chimeric antigen receptor T cells for the treatment of cancer and the future of preclinical models for predicting their toxicities. Immunotherapy. 2017;9(8):669–80

Werth VP, Joly P, Mimouni D, Maverakis E, Caux F, Lehane P, et al. Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris. N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society; 2021

Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. Immunity. 2014;41(6):1013–25

Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2011;187(9):4553–60

Wu H, Chen Y, Liu H, Xu L-L, Teuscher P, Wang S, et al. Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. Eur. J. Immunol. 2016;46(5):1152–61

Wu H, Wang ZH, Yan A, Lyle S, Fakharzadeh S, Wahl JK, et al. Protection against Pemphigus Foliaceus by Desmoglein 3 in Neonates NEJM. 2009

Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, et al. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995;92(25):11935–9

Xu L, Liu X, Liu H, Zhu L, Zhu H, Zhang J, et al. Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. Front. Immunol. 2017;8

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. 2013a;8(11)

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. 2013b;23(6):795–802

Yalçin B, Alli N. Pemphigus vulgaris following antirabies vaccination. J. Dermatol. 2007;34(10):734–5

Yan L, Wang J-M, Zeng K. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. Br. J. Dermatol. 2012;167(4):768–77

Yang M, Sun L, Wang S, Ko K-H, Xu H, Zheng B-J, et al. Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2010;184(7):3321–5

Yasuda H, Kobayashi H, Hashimoto T, Itoh K, Yamane M, Nakamura J. Subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus: demonstration of autoantibodies to desmocollin-1 and clinical review. Br. J. Dermatol. 2000;143(1):144–8

Yeh S-W, Cavacini LA, Bhol KC, Lin M-S, Kumar M, Duval M, et al. Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. Clin. Immunol. Orlando Fla. 2006;120(1):68–75

Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Wada N, Nishikawa T, Amagai M, et al. Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. Int. Immunol. 2011;23(6):365–73

Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, Shiraishi K, et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. J. Dermatol. Sci. 2017;85(3):197–207

Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. Nature. 2012;491(7423):264–8

Youinou P, Pers J-O. The late news on baff in autoimmune diseases. Autoimmun. Rev. 2010;9(12):804–6

Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. Immunity. 2009;31(3):457–68

Yuan H, Zhou S, Liu Z, Cong W, Fei X, Zeng W, et al. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. J. Invest. Dermatol. 2017a;137(11):2362–70

Zah E, Lin M-Y, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. Cancer Immunol. Res. 2016;4(6):498–508

Zan H, Casali P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. Front. Immunol. 2015;6

Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. CD40 Engagement Triggers Switching to IgA1 and IgA2 in Human B Cells Through Induction of Endogenous TGF-β: Evidence for TGF-β But Not IL-10-Dependent Direct Sμ→Sα and Sequential Sμ→Sγ, Sγ→Sα DNA Recombination. J. Immunol. 1998;161(10):5217–25

Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. Autoimmun. Rev. 2011;10(6):305–10

Zenzo GD, Lullo GD, Corti D, Calabresi V, Sinistro A, Vanzetta F, et al. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. J. Clin. Invest. 2012;122(10):3781–90

Zhang Y, Li J, Zhang Y-M, Zhang X-M, Tao J. Effect of TACI Signaling on Humoral Immunity and Autoimmune Diseases. J. Immunol. Res. 2015;2015

Zhang Q, Lu W, Liang C-L, Chen Y, Liu H, Qiu F, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. Front. Immunol. 2018;9:2359

Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcón GS, Fessler BJ, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2001;166(1):6–10

Zhang SY, Zhou XY, Zhou XL, Zhang Y, Deng Y, Liao F, et al. Subtype-specific inherited predisposition to pemphigus in the Chinese population. Br. J. Dermatol. 2019;180(4):828–35

Zhao C, Li H-Z, Zhao D-D, Ma C, Wu F, Bai Y-N, et al. Increased Circulating T Follicular Helper Cells Are Inhibited by Rituximab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. Front. Neurol. 2017a;8

Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next? Front. Immunol. 2017b;8

Zhu H, Chen Y, Zhou Y, Wang Y, Zheng J, Pan M. Cognate Th2-B cell interaction is essential for the autoantibody production in pemphigus vulgaris. J. Clin. Immunol. 2012;32(1):114–23

Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008;112(5):1557–69

Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB. Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. Arch. Dermatol. 1995;131(8):957–8

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(2):365–78

Zou Y, Yuan H, Zhou S, Zhou Y, Zheng J, Zhu H, et al. The Pathogenic Role of CD4+ Tissue-Resident Memory T Cells Bearing T Follicular Helper-Like Phenotype in Pemphigus Lesions. J. Invest. Dermatol. 2021;141(9):2141–50

Ce travail ancillaire de l'étude Ritux 3 a tenté de comprendre i) les mécanismes régissant l'efficacité exceptionnelle du RTX dans une maladies auto-immune médiée par des auto-anticorps sécrétés par des cellules plasmocytaires non affectées par ce traitement et ii) comprendre et essayer de trouver des moyens d'anticiper les rechutes afin d'aider les praticiens dans leur pratique.

Nous avons d'abord réussi à déterminer des facteurs prédictifs clinico-biologiques de rechute précoce après RTX, facteurs désormais utilisés par les dermatologues afin d'ajouter une perfusion de RTX au 6ème mois de traitement et dont la validation en vie réelle est actuellement en cours.

Un autre facteur de rechute précoce pourrait être l'augmentation des taux de BAFF circulants. En effet, nous avons montré que ces rechutes précoces survenaient majoritairement au 6ème mois, dans le laps de temps où les LB autoréactifs réapparaissent et les taux circulants de BAFF sont les plus élevés. Cette hypothèse est par ailleurs soutenue chez les patients CS, par la corrélation entre l'activité clinique de la maladie et les taux circulants de BAFF. D'autre part, la diversité des sous-classes d'IgG anti-DSG3 pourrait également jouer un rôle dans la physiopathologie. Certes, nous avons confirmé la nette prédominance d'IgG4 et sa pathogénicité *in vitro* en concordance avec les observations cliniques. Cependant, nous avons montré la présence d'une asscociation à d'autres sous-classes dans plus d'1/4 des cas. De plus, la présence de sous-classes d'anti-DSG3 autre que IgG4, principalement l'IgG3, était liée à un surrisque de rechute précoce. Ceci était confirmé *in vitro* par le pouvoir pathogène des IgG3 anti-DSG3 seuls, après épuration des IgG4, de sérums de patients au diagnostic. Ainsi, un score composite intégrant les taux circulants de BAFF et la diversité des sous-classes anti-DSG3 pourrait permetttre d'affiner un peu plus la détection des patients à risque de rechute précoce.

Par la suite, nous avons essayé d'expliquer les rémissions prolongées observées après RTX. D'abord, nous nous sommes focalisés sur les LB auto-réactifs. L'analyse transcriptomique de 33 gènes d'intérêt a montré que le phénotype de ces LB était finalement peu mofifié par le RTX. Cependant, l'analyse suggère tout de même un rôle potentiel de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β dans la pathogénicité du pemphigus. D'autre part, elle montre un impact de l'utilisation du RTX sur la différentiation B autoréactive puisqu'après traitement, nous observions une diminution d'expression transcriptomique et protéomique du marqueur mémoire CD27 ; ces observations ont ainsi confirmé des précédents travaux de notre équipe suggérant un blocage de la maturation des LB autoréactifs après RTX.

L'analyse des LT folliculaires, partenaires privéligiés des LB au sein des centres germinatifs vont de pair avec les résultats précédents puisqu'elle montre un faible impact du RTX sur la polarisation des Tfh autoréactifs et l'émergence d'une large population de Tfr suractivés. Ainsi, l'action de cette population nouvellement décrite pourrait expliquer le blocage prolongé de la différentiation B observée et ainsi les rémissions prolongées.